

The First National Conference on
Modern Research in Biological Sciences

اولین همایش ملی
پژوهش‌های نوین
در علـــوم زیستی

بهمن ماه ۱۴۰۰

برگزار کننده: دانشگاه گنبد کاووس

www.conf.gonbad.ac.ir/nmb2022

biologicalsciences@gonbad.ac.ir

دبیـــرخـــانه:

استان گلستان، شهرستان گنبد کاووس، دانشگاه گنبد کاووس، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، گروه زیست‌شناسی



محورهای همایش:

علوم سلولی و مولکولی

ژنتیک، میکروبیولوژی، بیوشیمی، بیوفیزیک، بیوانفورماتیک، زیست فناوری، نانوبیوتکنولوژی

علـــــوم جانـــــوری

فیزیولوژی، تکوین، بافت شناسی، تنوع زیستی

علـــــوم گیـــــاهی

سیستماتیک، فیزیولوژی، تکوین، بیوتکنولوژی، گیاهان دارویی، تنوع زیستی

علـــــوم زیستی دریـــا

آرایه شناسی و سیستماتیک آبزیان، فیزیولوژی، اکوفیزیولوژی و رفتارشناسی آبزیان، ژنتیک و تکوین آبزیان، اصلاح نژاد، تکثیر و پرورش، فناوری زیستی و فرآوری محصولات دریایی، تاثیر کرونا بر آبزی پروری

دبیـــرخـــانه:
استان گلستان، شهرستان گنبد کاووس، دانشگاه گنبد کاووس، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، گروه زیست‌شناسی



پیش گفتار

با یاری خداوند منّان، اولین همایش ملی پژوهش‌های نوین در علوم زیستی در دانشکده علوم پایه دانشگاه گنبد کاووس در تاریخ ۱۴ بهمن ماه ۱۴۰۰ برگزار شد.

رشته زیست شناسی یکی از زیرمجموعه های علوم پایه است و طیف وسیعی از دانش های تجربی را در بر می گیرد. شناخت و مطالعه در علم در رشته زیست شناسی زمینه موفقیت در بسیاری از علوم را فراهم می آورد. در واقع می توان رشته زیست شناسی را یکی از پایه های بنیادین مجموعه علوم تجربی دانست و بسیاری از پیشرفت های بشر مدیون توسعه علم زیست شناسی و فعالیت زیست شناسان است. درواقع می توان گفت زیست شناسان سردمداران علوم تجربی هستند. مطالعات آن ها در زمینه های سلول ها و مولکول ها، گیاهان و جانوران و تمامی موجودات زنده و نحوه تعامل آن ها با محیط اطراف، اطلاعات بسیاری را در اختیار سایر علوم قرار می دهد. از این اطلاعات در حوزه های مختلف علوم برای بهبود شرایط زندگی بشر و پیشبرد اهداف آن استفاده می شود.امروزه همه‌گیری ویروس کرونا و لزوم دستیابی به واکسن آن برای نجات جان انسان‌ها، بار دیگر اهمیت و جایگاه زیست شناسی را نمایان کرده است.

در راستای تبادل آخرین اطلاعات علمی در شاخه های مختلف زیست شناسی، دانشگاه گنبد کاووس اولین همایش ملی پژوهش های نوین را در شهر تاریخی گنبد کاووس برگزار کرد. امید است گروه زیست شناسی دانشگاه گنبد با برگزاری این همایش قدمی هرچند کوچک در این راستا برداشته باشد. از تمامی علاقه مندان و محققانی که در برگزاری اولین همایش ملی پژوهش های نوین در علوم زیستی یاری رساندند تشکر و قدردانی می‌کنیم.

دبیرخانه:

استان گلستان، شهرستان گنبد کاووس، دانشگاه گنبد کاووس، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، گروه زیست‌شناسی



اهداف اولین همایش ملی پژوهش های نوین در علوم زیستی :

این همایش در سطح ملی و در گرایش های مختلف زیست شناسی شامل علوم سلولی مولکولی و بیوشیمی،ژنتیک، بیوتکنولوژی و نانو بیوتکنولوژی، علوم جانوری، علوم گیاهی، علوم زیستی دریا میکروبیولوژی و ویروس شناسی توسط دانشگاه گنبد کاووس با اهداف زیر برگزار شد:

-معرفی آخرین دستاورد های علمی محققان داخلی در حوزه های مختلف زیست شناسی
- ایجاد تعاملات علمی بین پژوهشگران و محققان در حوزه های مختلف زیست شناسی
-هم اندیشی بین زیست شناسان و دانش پژوهان علوم مرتبط با زیست شناسی در خصوص کاربردی شدن و ارتباط بیشتر با پزشکی و صنعت
-تشویق پژوهشگران و متخصصان و ایجاد فضای مناسب جهت ارائه نتایج پژوهش های آنان

دبیرخانه:
استان گلستان، شهرستان گنبد کاووس، دانشگاه گنبد کاووس، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، گروه زیست‌شناسی



ارکان همایش :

دکتر ابوالفضل طهماسبی - ریاست محترم دانشگاه گنبدکاووس

دکتر علی ستاریان - معاونت محترم آموزشی و پژوهشی دانشگاه گنبدکاووس

دکتر سعید شُکوه - ریاست محترم دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی

دکتر مهدی شاهینی - معاونت محترم آموزشی و پژوهشی دانشکده

دکتر سهراب بوذرپور - عضو هیأت علمی گروه زیست شناسی (گرایش علوم سلولی و مولکولی) - دبیر علمی همایش

دکتر محمود صالحی - عضو هیأت علمی گروه زیست شناسی (گرایش بیوشیمی) - دبیر اجرایی همایش

دکتر سیده آیناز شیرنگی - عضو هیأت علمی گروه زیست شناسی (گرایش زیست دریا)- دبیر اجرایی همایش

دبیرخانه:
استان گلستان، شهرستان گنبد کاووس، دانشگاه گنبد کاووس، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، گروه زیست‌شناسی



کمیته علمی :

۱- دکتر مریم آخوندیان - استادیار دانشگاه مازندران

۲- دکتر زهرا اعتمادی فر - دانشیار دانشگاه اصفهان

۳- دکتر ماتیا سادات برهانی - استادیار دانشگاه گنبدکاووس

۴- دکتر رحمان پاتیمار - دانشیار دانشگاه گنبدکاووس

۵- دکتر جمیله پناهی میرزا حسنلو -استادیار دانشگاه گنبدکاووس

۶- دکتر عیسی جرجانی - استادیار دانشگاه گنبدکاووس

۷- دکتر حجت الله جعفریان- دانشیار دانشگاه گنبدکاووس

۸- دکتر میثم حبیبی - استادیار دانشگاه گنبدکاووس

۹- دکتر بهروز حیدری - دانشیار دانشگاه گیلان

۱۰- دکتر ابوالفضل دانشور - استادیار دانشگاه گنبدکاووس

۱۱- دکتر علی ستاریان -دانشیار دانشگاه گنبدکاووس

۱۲- دکتر شهریار شاکری -استادیار دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان

۱۳- دکتر سیده شیرین شاهنگیان- استادیار دانشگاه گیلان

۱۴- دکتر عدنان شهدادی - استادیار دانشگاه هرمزگان

۱۵- دکتر مجید صادقی زاده - استاد تمام دانشگاه تربیت مدرس

۱۶- دکتر حسین صبوری- دانشیار دانشگاه گنبدکاووس

دبیرخانه:

استان گلستان، شهرستان گنبد کاووس، دانشگاه گنبد کاووس، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، گروه زیست‌شناسی



کمیته علمی :

۱۷- **دکتر اصغر عبدلی** -استاد تمام پژوهشکده علوم محیطی دانشگاه شهید بهشتی

۱۸- **دکتر احسان عطازاده** - استادیار دانشگاه تبریز

۱۹- **دکتر سکینه علی جان پور** -دانشیار دانشگاه گنبدکاووس

۲۰- **دکتر مجتبی عمادی بایگی** -دانشیار دانشگاه شهرکرد

۲۱- **دکتر نسرین کاظمی پور**- دانشیار دانشگاه شیراز

۲۲- **دکتر محمدرضا کلباسی مسجدشاهی** -استاد تمام دانشگاه تربیت مدرس

۲۳- **دکتر حاجی قلی کمی** -استاد تمام دانشگاه گلستان

۲۴- **دکتر کیاوش گلزاریان پور**- استادیار دانشگاه گنبدکاووس

۲۵- **دکتر مجید محمداسمعیلی**- دانشیار دانشگاه گنبدکاووس

۲۶- **دکتر احمدرضا محرابیان** -استادیار دانشگاه شهیدبهشتی

۲۷- **دکتر ملیحه محمدی** -استادیار دانشگاه سیستان و بلوچستان

۲۸- **دکتر مریم مقدم متین** -استاد تمام دانشگاه فردوسی مشهد

۲۹- **دکتر مجید مومنی مقدم** -دانشیار دانشگاه حکیم سبزواری

۳۰- **دکتر پویان مهریان** -استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳۱- **دکتر رضا ندرلو** -دانشیار دانشگاه تهران

۳۲- **دکتر فرزانه نظری سرنجه** -استادیار دانشگاه پیام نور لرستان

دبیرخانه:
استان گلستان، شهرستان گنبد کاووس، دانشگاه گنبد کاووس، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، گروه زیست‌شناسی



کمیته اجرایی:

جعفر محمـــــودی

مسعود صابـــــری

شهرام جزایـــــری

رضـــــا داســـــار

محمدهادی معصومی

احمد صبـــــوری

زینـــــب درزی

نگین حسیـــــن پور

اسماعیل حســـن زاده

مهتـــــاب حسینی

سیده سولماز موسوی

دبیـــرخـــانه:

استان گلستان، شهرستان گنبد کاووس، دانشگاه گنبد کاووس، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، گروه زیست‌شناسی



حامیان همایش:

دانشگاه گنبد کـــاووس

دانشگاه تبریـــــــز

دانشگاه فردوسی مشهد

دانشگاه شیـــــــراز

دانشگاه شهرکـــــــرد

دانشگاه گلستـــــــان

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

پارک علـــــم و فناوری گلستـــان

انجمن زیست شناســـــی ایـــــران

انجمن فیزیولـــوژی گیاهی ایـــــران

انجمن کشت سلول و بافت ایـــــران

دارو گستـــر سارا شفازن (دانش بنیان)

دبیـــرخـــانه:

استان گلستان، شهرستان گنبد کاووس، دانشگاه گنبد کاووس، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، گروه زیست‌شناسی



چکیده مقالات

دبیـــرخـــــانه:
استان گلستان، شهرستان گنبد کاووس، دانشگاه گنبد کاووس، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، گروه زیست‌شناسی

Effect of deep eutectic solvent based on Lysine and glycerol on the structure and function of Aspergillus Niger catalase

E. Assar[1*]; A. Divsalar[1]

1- Department of Cell and Molecular Biology, School of Biological Sciences, kharazmi University, Tehran, Iran

**Corresponding author E-mail address: elnaz.assar@khu.ac.ir*

Abstract

Background and Objective: catalase enzyme has a predominant role in controlling the concentration of H_2O_2.Also there are many possible combinations of natural materials which lead to an individual deep eutectic solvent (NADES) with unique features. Because of importance of catalase in antioxidant defense system and also, the tendency to study the enzymatic behavior in non-aqueous media and especially solvents with suitable environmental characteristics, it was decided to investigate the enzymatic behavior of catalase in an environment containing amino acid lysine in the presence of glycerol.

Materials and Methods : In order to prepare NADES, the amino acid lysine with glycerol was stirred at a molar ratio of 1 to 4.5, respectively under heat (80°C) until homogeneous liquids were formed. In this experimental study, changes in enzyme activity in the presence and absence of different percentages of NADES were measured using a spectrophotometer (UV-Visible spectroscopy) at a wavelength of 240 nm (maximum absorption of hydrogen peroxide) and a temperature of 25°C. Also, Fluorescence studies were performed to investigate changes in the three-dimensional structure of the enzyme under the influence of different percentages of solvent at 25°C.The basis of this method is to measure the intensity of the inherent fluorescence emission of Tryptophan in the protein. For this purpose, the emission spectra of natural enzyme (without solvent) and enzyme in the presence of different percentages of solvent at the excitation wavelength of 290 nm were investigated.

Results: The activity of catalase was measured according to the method of Aebi based on the decreasing in the absorbance of hydrogen peroxide. Using kinetic studies obtained from spectroscopic methods as well as Michaelis-Menten diagram, changes in the kinetic parameters of the enzyme in the absence and presence of different concentrations of solvent were investigated. The kinetic results showed that in the presence of less than 5% lysine-glycerol solvent, the activity or function of catalase did not change significantly. However, in the presence of higher amounts of solvent, the activity of the enzyme is significantly reduced. Also, studies of intrinsic fluorescence emission of the enzyme with the addition of solvent indicate a gradual decrease in the intensity of fluorescence emission or quenching process.

Conclusion: According to above data, it can be concluded that the function and structure of the enzyme in the presence of low concentrations of solvent do not induce any significant changes which might be indicative of suitable solvent for this enzyme.

Keywords: Fluorescence, Kinetic study, Deep eutectic solvent, Catalase

اثرحلال های با نقطه اتکتیک پایین با پایه لیزین وگلیسرول برساختار و عملکرد کاتالاز آسپرژیلوس نیگر

النازعصار[۱]*، عادله دیوسالار[۱]

۱-گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی ، دانشکده علوم زیستی ، دانشگاه خوارزمی ،تهران ،ایران.

Email: elnaz.assar@khu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: آنزیم کاتالاز نقش مهمی در کنترل غلظت هیدروژن پراکسید دارد. ازسوی دیگرتعداد زیادی ترکیبات مشتق از مواد طبیعی وجود دارند که منجر به تشکیل حلال طبیعی با نقطه اتکتیک پایین (NADES) با ویژگی های منحصربه فرد می شود. در نتیجه، آنها حلالی مناسب برای بررسی عملکرد ماکرومولکول های زیستی مانند آنزیم ها هستند. با توجه به فراوانی و اهمیت کاتالاز در سیستم دفاع آنتی اکسیدانی و همچنین تمایل به مطالعه رفتار آنزیمی در محیط های غیر آبی و به ویژه حلال های با ویژگی های محیطی مناسب ، تصمیم گرفته شد تا تغییرات در عملکرد و ساختار آنزیم کاتالاز در حلال دیپیوتکتیک حاوی اسید آمینه لیزین در ترکیب با گلیسرول مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش ها: برای تشکیل حلال دیپیوتکتیک، اسیدآمینه لیزین همراه با گلیسرول به ترتیب در نسبت مولی ۱ به ۴/۵ تحت حرارت (۸۰ درجه سانتی گراد) هم زده شد تا زمانیکه مایعی همگن ایجاد گردد.در این مطالعه تجربی تغییرات فعالیت آنزیم در حضور و عدم حضور درصدهای مختلف حلال دیپیوتکتیک با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر (مرئی-ماوراءبنفش) در طول موج ۲۴۰ نانومتر (ماکزیمم جذب هیدروژن پراکسید) و دمای محیط(۲۵ درجه سانتی گراد) اندازه گیری شد. به منظور بررسی تغییرات در ساختمان سه بعدی و عملکردی آنزیم تحت تاثیر درصدهای مختلف حلال در دمای محیط ، مطالعات فلورسانس انجام گرفت.اساس این روش، اندازه گیری تغییر در شدت نشر فلوئورسانس ذاتی تریپتوفان های موجود در پروتئین می باشد. بدین منظور طیف نشری آنزیم طبیعی (بدون حلال) و آنزیم در حضور درصدهای مختلف حلال در طول موج تحریکی ۲۹۰ نانومتر بررسی شد.

یافته ها: فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس روش Aebi از طریق بررسی کاهش جذب هیدروژن پراکسید اندازه گیری شد.با استفاده از مطالعات سینتیکی بدست آمده از روش های طیف سنجی و همچنین نمودار میکائیلیس-منتن، تغییرات در پارامترهای سینتیکی آنزیم در غیاب و حضور غلظت های مختلف حلال بررسی شد. نتایج سینتیکی نشان داد که در حضور مقادیر کمتر از ۵٪ حلال دیپیوتیکتیک لیزین-گلیسرول ،عملکرد آنزیم تغییر چشمگیری نمی کند. اما درحضور مقادیر بیشتر از حلال ، فعالیت آنزیم بصورت محسوسی کاهش می یابد. همچنین مطالعات نشر فلورسانس ذاتی آنزیم با افزودن حلال بیانگر کاهش تدریجی شدت نشر فلورسانس و یا پدیده خاموشی است.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از مطالعات سینتیکی و ساختاری آنزیم در حضور درصدهای مختلف حلال نشان می دهد که غلظت های پایین حلال تغییرات فاحشی را در ساختار و عملکرد آنزیم القا نمی کند و می تواند پیشنهاد کننده محیطی مناسب جهت حفظ ساختار آنزیم باشد.

واژگان کلیدی: فلورسانس،مطالعات سینتیکی،حلال های با نقطه اتکتیک پایین،کاتالاز

Evaluation of aflatoxin levels in tea samples collected in East Gilan region

Elmira Farrokhi[1] , Arash Chaychi[1] , Zahra Sepehryjavan[2]

1-Division of Microbiology (Higher education), Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, Lahijan branch, Islamic Azad University(IAU), Lahijan, Gilan, I.R.Iran

1-MycologyPhd, Faculty of Basic Sciences, Lahijan branch, Islamic Azad University(IAU), Lahijan, Gilan, I.R.Iran.

2- Department of Biology, Faculty of sciences, University of MohagheghArdabili, Iran.

Corresponding Author: Elmira Farrokhi , Email: elfar_64@yahoo.com

Absract

Fungi are a group of microorganisms that, like bacteria, can be saprophytic or parasitic. In general, fungi are divided into two main categories: molds and yeasts. According to some official estimates of the world centers (FAO, WHO), more than 25% of the total grain products produced in the world are exposed to fungal infection annually. Gilan and Mazandaran followed the sampling agenda of closed and open sites (CBS). AgraQuant ® Total Aflatoxin Assay 1/20 kit produced by Romer Labs and made in the Netherlands, which operates on the basis of direct competitive ELISA. Was used.Total aflatoxin assay using RAgraQuant is a direct Linked-Enzyme assay immunosorbent assay that determines low levels of total aflatoxin (G2-G1-B2-B1) and for evaluation of toxins in cereals, legumes, nuts, forage and other substances. Finally, descriptive statistical methods and comparative statistical methods (Kolmogorov-Smirnov test, lateral analysis of variance) and SPSS software were used to analyze the obtained data. Most of the pollution in tea plantations is related to the eastern regions of Gilan. In the classification of species, after the unknown species, the largest number of species is Flavus. There is a significant difference in the scale of toxins according to species and sector. Aflatoxin was also calculated in biomass and culture medium ($P < 0.05$). While most of the collected specimens are from the east of Gilan, these areas are at risk of aflatoxin contamination.

Keywords: Aflatoxin , Tea , ELISA, Gilan

بررسی سطح آفلاتوکسین در نمونه‌های چای جمع آوری شده در منطقه شرق گیلان

المیرا فرخی[1*]؛ آرش چایچی نصرتی[1]؛ زهرا سپهری جوان[2]

۱-گروه میکروبیولوژی (آموزش عالی)، گروه بیولوژی مولکولی و سلولی، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، گیلان

۱- دکتری قارچ شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، گیلان

۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، ایران

Email: elfar_64@yahoo.com

چکیده:

قارچ‌ها گروهی از میکروارگانیسم‌ها هستند که مانند باکتری‌ها می‌توانند ساپروفیت یا انگلی باشند. به طور کلی قارچ‌ها به دو دسته اصلی کپک‌ها و مخمرها تقسیم می‌شوند. بر اساس برخی برآوردهای رسمی مراکز جهانی (FAO، WHO)، سالانه بیش از ۲۵ درصد از کل محصولات غلات تولید شده در جهان در معرض عفونت قارچی قرار دارند. گیلان و مازندران دستور کار نمونه برداری از سایت‌های بسته و باز (CBS) را دنبال کردند. از کیت AgraQuant® Total Aflatoxin Assay 1/20 تولید شده توسط Romer Labs و ساخت هلند، که بر اساس ELISA رقابتی مستقیم عمل می‌کند، استفاده شد. سنجش آفلاتوکسین توتال با استفاده از AgraQuant یک سنجش مستقیم ایمونوسوربنت با آنزیم پیوندی است که سطوح پایین آفلاتوکسین کل (G2-G1-B2-B1) و برای ارزیابی سموم در غلات، حبوبات، آجیل، علوفه و سایر مواد را تعیین می‌کند. در نهایت برای تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده از روش‌های آمار توصیفی و روش‌های آماری مقایسه‌ای (آزمون کولموگروف اسمیرنوف، تحلیل واریانس جانبی) و نرم افزار SPSS استفاده شد. بیشترین آلودگی در مزارع چای مربوط به مناطق شرقی گیلان است. در طبقه‌بندی گونه‌ها، پس از گونه‌های ناشناخته، بیشترین تعداد گونه‌ها فلاووس است. تفاوت معنی داری در مقیاس سموم بر اساس گونه و بخش وجود دارد. آفلاتوکسین نیز در زیست توده و محیط کشت محاسبه شد ($P < ۰/۰۵$). در حالی که بیشتر نمونه‌های جمع آوری شده از شرق گیلان هستند، این مناطق در معرض خطر آلودگی آفلاتوکسین هستند.

کلمات کلیدی: آفلاتوکسین، چای، الایزا، گیلان

Evaluation of SNHG5 expression in patients with chronic myeloid leukemia compared with normal individuals

Zahra Shahpour Arani [1*]; Mohammad Reza Hajjari [1]; Javad Mohamadi Asl [2]; Najmaldin Saki

1. Shahid Chamran University of Ahvaz, Faculty of Science, Department of Genetics, Ahvaz, Iran
2. Jundishapur University of Medical Sciences, School of Medicine, Department of Pathology, Ahvaz, Iran
3. Jundishapur University of Medical Sciences, School of Allied Medical Sciences, Department of Laboratory Sciences, Ahvaz, Iran

**Corresponding Author Email address: Zahra_30sh@yahoo.com*

Abstract

Background: Chronic myeloid leukemia is a type of bone marrow neoplasm that is associated with translocation between chromosomes 9 and 22 and accounts for approximately 15% of all leukemia. The annual incidence of cancer is 1 in 2 per 100,000 people worldwide. New knowledge shows that long non-coding RNAs play an important role in regulating gene expression. *SNHG*s are a subset of long non-coding RNAs that are considered to host small nuclear RNAs. Abnormal expression of *SNHG5* has been reported in various cancers including colorectal cancer, gastric cancer, bladder cancer and some malignancies and is a regulatory factor in gene expression in various cancers including chronic myeloid leukemia. The aim of this study was to evaluate and compare the expression level of *SNHG5* in the peripheral blood sample of people with chronic myeloid leukemia compared to normal individuals and then to evaluate this *SNHG* as a potential biomarker in these patients. In this study, for the first time, the expression of this gene in patients with CML who have not received any treatment has been investigated and then compared with normal individuals.

Methods: This study was conducted with a case-control design. Twenty patients with chronic myeloid leukemia (*BCR-ABL* +) and 20 normal individuals were evaluated. First, the accuracy of chronic myeloid leukemia was confirmed using karyotype, molecular and cellular methods. After RNA extraction from white blood cells and cDNA synthesis, primer design was performed and gene expression was measured by Real Time PCR. Gene expression was normalized compared to the internal control gene (*GAPDH*). Finally, the data were statistically analyzed using Graph Pad Prism 8 software and Mann-Whitney test.

Results: The findings of this study showed that the expression level of *SNHG5* in people with chronic myeloid leukemia increased significantly compared to normal people (P value <0.001). Increased expression may indicate the potential role of this molecule in the development and progression of this cancer. Conclusion: The present study indicates the effective role of *SNHG5* in the development of chronic myeloid leukemia and can be investigated as a biomarker and potential therapeutic target in future studies.

Keywords: Biomarkers, leukemia, Long non-coding RNA

ارزیابی میزان بیان *SNHG5* در افراد مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن در مقایسه با افراد نرمال

زهرا شاه‌پوری ارانی [۱*]؛ محمدرضا حجاری [۱]؛ جواد محمدی اصل [۲]؛ نجم الدین ساکی [۳]

۱- گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز
۲- گروه آسیب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه جندی شاپور اهواز
۳- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه جندی شاپور اهواز

Email: Zahra_30sh@yahoo.com

چکیده

مقدمه: لوسمی میلوئیدی مزمن نوعی نئوپلاسم مغز استخوان است که همراه با جابه‌جایی بین دو کروموزوم ۹ و ۲۲ می‌باشد و به طور تقریبی ۱۵ درصد از کل لوسمی‌ها را شامل می‌شود. نرخ سالیانه وقوع این سرطان حدود ۱ الی ۲ مورد از هر ۱۰۰۰۰۰ نفر در سطح جهان می‌باشد. دانش نوین نشان می‌دهد که RNA های غیر کدگذار طویل نقش مهمی در تنظیم بیان ژنی دارند. *SNHG*ها زیرگروهی از RNAهای غیر کدکننده طویل هستند که به عنوان میزبانی برای RNA های کوچک هسته‌ای در نظر گرفته می‌شوند. بیان غیرطبیعی SNHG5 در سرطان‌های مختلف از جمله سرطان کلورکتال، سرطان معده، سرطان مثانه و برخی بدخیمی‌ها گزارش شده است وبه عنوان فاکتور تنظیم کننده بیان ژن در سرطان‌های مختلف از جمله لوسمی میلوئیدی مزمن مطرح می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه‌ی سطح بیان SNHG5 در نمونه‌ی خون محیطی افراد مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن نسبت به افراد نرمال و به دنبال آن بررسی این SNHG به عنوان یک بیومارکر بالقوه در این بیماران می‌باشد. در این مطالعه برای اولین بار به بررسی میزان بیان این ژن در بیماران مبتلا به CML که تاکنون هیچ درمانی نشده اند و سپس مقایسه ی آن با افراد نرمال پرداخته شده است.

روش‌ها: این پژوهش با طراحی موردی-شاهدی انجام گرفت. ۲۰ بیمار مبتلا به لوسمی میلوییدی مزمن (+BCR-ABL) و ۲۰ فرد نرمال بررسی قرار گرفتند. ابتدا صحت ابتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن با استفاده از کاریوتیپ، روش‌های مولکولی و سلولی تایید گردید. پس از استخراج RNA از گلبول‌های سفید و سنتز cDNA، طراحی پرایمر صورت گرفت و بیان ژن‌ها با استفاده از روش PCR زمان واقعی(Real Time PCR) سنجیده شد. میزان بیان در مقایسه با ژن کنترل داخلی (GAPDH) نرمالیزاسیون شد. در نهایت داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Graph Pad Prism 8 و آزمون Mann-Whitney test مورد تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: یافته‌های این پژوهش نشان داد که سطح بیان SNHG5 در افراد مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن نسبت به افراد نرمال به طور معناداری افزایش می‌یابد($P\ value < 0.001$). افزایش بیان می‌تواند حاکی از نقش بالقوه این مولکول در ایجاد و پیشروی این سرطان باشد.

نتیجه‌گیری: پژوهش حاضر نشان دهنده نقش موثر SNHG5 در پیشرفت لوسمی میلوئیدی مزمن می‌باشد و می‌توان به عنوان یک بیومارکر و هدف درمانی بالقوه در مطالعات آتی مورد تحقیق قرار گیرد.

واژگان کلیدی: Biomarkers، لوسمی، Long non-coding RNA

Investigation of therapeutic effects of mesenchymal stem cells secretome in breast cancer cells through the regulation of cell cycle

Marzieh Rahimi[1]*, Fatemeh Safari[2]

۱-Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran

۲-Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran

E-mail: fsafari@guilan.ac.ir (F. Safari)

Abstract

The stem cell is the mother of all cells and has the ability to produce all the cells in the body. These cells have the ability to self-renewal and differentiate into different types of cells. Stem cells can be divided into four categories based on their ability to differentiate: totipotent stem cell, pluripotent stem cells, multipotent stem cells and unipotent stem cells. The differentiation potential of stem cells varies in each organ of the body. Stem cells are divided into two main categories in terms of origin: Embryonic stem cells (ESCs), and Adult stem cells (ASCs). One of the adult stem cells that have attracted the attention of most researchers is mesenchymal stem cells (MSCs). Easy isolation and rapid proliferation of MSCs make them a good candidate for cell therapy. Cancer as an uncontrollable growth of abnormal cells is considered as one of the major diseases with high mortality rates which threats human life in the world. Most of the clinically available anticancer chemotherapeutic agents cannot distinguish between the normal and cancerous cells. Moreover, they have unwanted side effects and drug resistance. Breast cancer is one of the leading causes of cancer related deaths among women worldwide. Cancer therapy based on stem cells is considered as a novel and promising platform. In the present study, we explored the therapeutic effects of human amniotic mesenchymal stromal cells (hAMSCs) on breast cancer cells through cell cycle regulation. In this regard, hAMSCs and breast cancer cells (MDA-MB-231) were co-cultured by using the trans-well membranes. Next, the cell cycle was analyzed by using flow cytometry method. Our results can be critical to find new anticancer therapy platforms depend on paracrine manner particularly in breast cancer. However, more experiments will be required to identify the details of the molecular mechanisms.

Keywords: Mesenchymal stem cell, Breast cancer cells, Cell cycle regulation, Co-culture

بررسی اثرات درمانی ترشح سلول های بنیادی مزانشیمی در سلول های سرطان پستان از طریق تنظیم چرخه سلولی

مرضیه رحیمی [۱] *، فاطمه صفری [۲]

۱-گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت

۲-گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت

پست الکترونیکی: fsafari@guilan.ac.ir (F. Safari)

چکیده

سلول بنیادی مادر تمام سلول ها است و توانایی تولید تمام سلول های بدن را دارد. این سلول ها قابلیت خود نوسازی و تمایز به انواع مختلف سلول را دارند. سلول های بنیادی را می توان بر اساس توانایی آنها در تمایز به چهار دسته تقسیم کرد: سلول های بنیادی همه کاره، سلول های بنیادی چند توان، سلول های بنیادی چند توان و سلول های بنیادی تک توان. پتانسیل تمایز سلول های بنیادی در هر اندام بدن متفاوت است. سلول های بنیادی از نظر منشا به دو دسته اصلی سلول های بنیادی جنینی (ESCs) و سلول های بنیادی بالغ (ASCs) تقسیم می شوند. یکی از سلول های بنیادی بالغی که توجه اکثر محققان را به خود جلب کرده است سلول های بنیادی مزانشیمی (MSCs) است. جداسازی آسان و تکثیر سریع سلول های بنیادی مزانشیمی آنها را به کاندیدای مناسبی برای سلول درمانی تبدیل می کند. سرطان به عنوان رشد بی رویه سلول های غیرطبیعی، یکی از مهم ترین بیماری های با مرگ و میر بالا محسوب می شود که زندگی انسان ها را در جهان تهدید می کند. بسیاری از عوامل شیمی درمانی ضد سرطان بالینی موجود نمی توانند بین سلول های طبیعی و سرطانی تمایز قائل شوند. علاوه بر این، عوارض جانبی ناخواسته و مقاومت دارویی دارند. سرطان سینه یکی از علل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در بین زنان در سراسر جهان است. درمان سرطان مبتنی بر سلول های بنیادی یک پلت فرم جدید و امیدوارکننده در نظر گرفته می شود. در مطالعه حاضر، ما اثرات درمانی سلول‌های استرومایی مزانشیمی آمنیوتیک انسانی (hAMSCs) را بر روی سلول‌های سرطان پستان (MDA-MB-231) با تنظیم چرخه سلولی بررسی کردیم. در این راستا، سلول های hAMSC و سرطان پستان با استفاده از غشای ترانس سلولی کشت داده شدند. سپس چرخه سلولی با استفاده از فلوسایتومتری آنالیز شد. نتایج ما می تواند برای یافتن پلتفرم های جدید درمان ضد سرطان مبتنی بر پاراکرین، به ویژه برای سرطان سینه، حیاتی باشد. با این حال، آزمایش‌های بیشتری برای شناسایی جزئیات مکانیسم‌های مولکولی مورد نیاز خواهد بود.

کلیدواژگان: سلول های بنیادی مزانشیمی، سلول های سرطانی پستان، تنظیم چرخه سلولی، کشت همزمان

Study of clonal distribution of antibiotic resistance pattern and molecular typing of *Acinetobacter baumannii* isolates from burn patients in Iran

Aysar Abbood AL Jebur[1]*, Davoud Esmaeili[1]

1. Department of Microbiology and Microbial biotechnology, faculty of life sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

2. Department of Microbiology and Applied Virology Research Center Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

N_soleimani@sbu.ac.ir

Abstract

Background: Antibacterial resistance emerges rapidly following an increase in the consumption of antibiotics against infectious diseases. Acinetobacter baumannii are gram - negative pathogens that infections related to these multidrug -resistant pathogens are currently increasing rapidly.accurate identification of the susceptibility and resistance of these organisms to various antibiotics, both genotypically and phenotypically, is costly, but the benefits in treatment, health and wellness are significant. The present study investigates the pattern of antibiotic resistance of Acinetobacter baumannii strains.

Methods: In this study, which was performed from April 2021 to November 2021, Acinetobacter baumannii isolated from 80 patients in Tehran hospitals then confirming the isolates by biochemical tests, their antibiotic susceptibility was determined by disk diffusion method (Kirby Bauer) according to CLSI 2021 protocol. Finally, the presence of blaSHV-1, bla AmpC, AAC6, blaVEB-1 genes was performed by PCR.

Results: Antibiotic resistance pattern for Acinetobacter baumannii show that the high rate of all resistance to antibiotics. The detection of SHV -1 (69%), VEB -1 (60%), AAC6 (51%), AmpC (34%) were respectively reported too.

Conclusion: This study shows an increase in antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* isolates by comparing the results with previous results. Due to the importance of this bacterium in hospitals due to nosocomial infections, rapid identification of these organisms and prevention their prevalence is mandatory. Moreover, the use of comprehensive antimicrobial treatment guidelines based on laboratory data and appropriate infection control interventions are essential.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Antibiotic Resistance, β-Lactamases, PCR

بررسی توزیع کلونال الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی وتایپینگ مولکولی سویه های اسینتوباکتر بومانی جدا شده از بیماران سوختگی در ایران

ایسر عبودال جبر [1]* ، ندا سلیمانی [1]

گروه میکروبیولوژی و زیست فناوری میکروبی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی،تهران، ایران- 1

N_soleimani@sbu.ac.ir

چکیده

مقدمه: گونه های اسینتوباکتر به عنوان یکی از مهم ترین پاتوژن های بالینی مطرح شده اند. استفاده روزافزون از آنتی‌باکتری‌های بتالاکتام در درمان عفونت‌های باکتریایی منجر به افزایش مقاومت در برابر آن‌ها شده است، بنابراین شناسایی سریع اسنیتوباکتر بومانی وشناسایی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی به تصمیم گیری موثر بالینی در مورد مصرف آنتی بیوتیک کمک می کند.

روش کار: در این مطالعه ۱۰۰ ایزوله از آسینتوباکتر بومانی از عفونت های زخم سوختگی بیمارستان های منتخب شهر تهران جمع اوری شد. مقاومت ضد میکروبی دربرابر آسینتوباکتر بومانی به روش کربی بائر طبق پروتکل ESBL و MBL سویه های (CDDT) ترکیبی دیسک دیفیوژ با استفاده از روش گردید . سپس تعیین CLSI 2020 شناسایی شدند. در نهایت برای بررسی حضور بتالاکتاماز، آنالیز ژنوتیپ PCRانجام شد.

نتایج: تجزیه و تحلیل داده ها نشان داد که به طور کلی در طی این مطالعه میزان مقاومت کلیه آنتی بیوتیک ها بالا بود. در اسینتوباکتر بومانی بیشترین مقاومت جدایه ها به سفوتاکسیم (۹۵ درصد) مشاهده شد. همچنین درصد ایزوله های مولد آنزیم در اسینتوباکتر بومانی به ترتیب (۲۰٪ و ۸۰ ٪) بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های ما نشان داد که ساختار جمعیتی جدایه‌های آسینتوباکتر بومانی از نظر ژنتیکی متنوع است. بنابراین بررسی تنوع ژنتیکی و مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های آسینتوباکتر بومانی توصیه می شود .شیوع بالای سویه‌های آسینتوباکتر بومانی در این مراکز سوختگی نشان می‌دهد که سیاست‌های تجویز آنتی‌بیوتیک باید دقیقاً تجدید نظر شود. آزمایش دقیق آنتی بیوگرام قبل از تجویز آنتی بیوتیک در عفونت های ناشی از ارگانیسم های یک ضرورت اجتناب ناپذیر است. بنابراین، با شناسایی سریع و صحیح الگوی مقاومت آنتی ESBL وMBL مولد بیوتیکی، پزشک قادر به انتخاب درمان آنتی بیوتیکی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی خواهد بود.

کلمات کلیدی: اسینتوباکتر بومانی، بلاکتاماز، مقاوم به آنتی بیوتیک، ESBL، PCR.

Evaluation of expression of NKILA genes in patients with pancreatic cancer and healthy people

Melina Ghamari goli [1] ; Zeinab Shirvani-Farsani [1*]

1-Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, IR Iran

Melina_gmr97@yahoo.com

Abstract

Background: Pancreatic cancer, occurs when cells inside the pancreas, which is located behind the stomach, begin to multiply out of control and form a mass. It is difficult to diagnose because it is located in an inaccessible area of the abdominal cavity and leads to the diagnosis of advanced disease. Despite advances in the detection and treatment of pancreatic cancer, it still has a high mortality rate and recently there is no screening method for this cancer, so identifying biomarkers can help diagnose and prevent death from pancreatic cancer. Studies have shown that in addition to environmental factors, genetic factors such as a variety of long non-coding RNAs (lncRNAs) are involved in the pathogenesis of this cancer. One of these lncRNAs is the NF-kappa B interacting lncRNA (NKILA) lncRNA, which is regulated by NF-kappa B. Stabilize IkB phosphorylation and activation of NFkappa B. Therefore, NKILA provides negative feedback to regulate NF-kappa B signaling. In many types of malignancies, NKILA suppresses NF-kappa B-mediated cancer metastasis. Thus, NKILA acts as a tumor suppressor.

Methods: Fifty patients with pancreatic cancer were selected. Fifty healthy subjects were considered as the control group who did not have pancreatic cancer and were homogeneous with the case group in terms of age and sex. RNA was extracted from blood samples of the participants. Then, the expression of the NKILA lncRNA was measured by Real time PCR. In addition, ROC curve analysis was performed to evaluate the biomarker capability of this lncaRNA.

Results: According to the findings of this study, the expression of NKILA in patients with pancreatic cancer was reduced compared to healthy individuals (Fold change: 9.06, P= 0.0008). Considering the analysis of ROC curve and AUC (0.72 and P = 0.0003) and sensitivity of 75% and specificity of 66.67%, this IncRNA may be a potential biomarker for pancreatic cancer.

Conclusion: Our results showed that NKILA lncRNA could play a role in the pathogenesis of this cancer and could be used as a suitable biomarker to differentiate between cancer patients and healthy individuals. However, more studies with more samples are needed.

Keywords: long non-coding RNA , pancreatic cancer, biomarker, NKILA

بررسی بیان RNA غیرکدکننده طویل NKILA در بیماران مبتلا به سرطان پانکراس و افراد سالم

ملینا قمری گلی[۱] ؛ زینب شیروانی فارسانی[۱*]

۱- گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی ، دانشکده علوم و فناوری زیستی ، دانشگاه شهید بهشتی ، تهران ، ایران

Melina_gmr97@yahoo.com

چکیده

مقدمه: سرطان لوزالمعده یا سرطان پانکراس زمانی رخ می‌دهد که سلول‌های درون غده لوزالمعده که پشت معده قرار دارد، به صورت خارج از کنترلی شروع به تکثیر می‌کنند و یک توده تشکیل می‌دهند. تشخیص این سرطان دشوار است زیرا در ناحیه ای غیر قابل دسترس در حفره شکمی قرار گرفته و منجر به شناسایی بیماری در مرحله پیشرفته می شود.بر خلاف پیشرفت ها در کشف و درمان سرطان پانکراس هنوز هم دارای آمار بالای مرگ و میر می باشد و اخیرا هیچ روش غربالگری برای این سرطان وجود ندارد به همین دلیل شناسایی و بررسی بیومارکر ها می تواند جهت تشخیص و پیشگیری از مرگ و میر در سرطان پانکراس کمک شایانی کند. مطالعات نشان داده اند که علاوه بر عوامل محیطی ، فاکتور های ژنتیکی از جمله انواع RNAهای غیرکدکننده طویل (lncRNAs) در بیماریزایی این سرطان نقش دارند. یکی از این lncRNA ها، NF-kappa B interacting lncRNA (NKILA) است که توسط NF-kappa B تنظیم می شود. NKILA با پوشاندن موتیف فسفریلاسیون IkB باعث می شود کمپلکس NF kappa B/IkB توسط مهار فسفریلاسیون IkB و فعال کردن NFkappa B پایدار شود. بنابراین، NKILA بازخورد منفی برای تنظیم سیگنالینگ NF-kappa B ارائه می دهد. در بسیاری از انواع تومورهای بدخیم، NKILA متاستاز سرطان را با واسطه NF-kappa B سرکوب می کند. بنابراین، NKILA به عنوان یک سرکوب کننده تومور عمل می کند .

روش ها: ۵۰ فرد مبتلا به سرطان پانکراس انتخاب شدند. ۵۰ فرد سالم نیز به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند که سرطان پانکراس را نداشته باشند و از نظر سن و جنس با گروه مورد، همگن باشند. از نمونه خون وریدی شرکت کنندگان RNA استخراج شد. سپس میزان بیان ژن موردنظر بوسیله Real time PCR اندازه گیری گردید. علاوه بر این، آنالیز منحنی ROC برای بررسی قابلیت بیومارکری این lncaRNA انجام شد.

نتایج: بر اساس یافته های این تحقیق میزان بیان ژن NKILA در بیماران مبتلا به سرطان پانکراس در مقایسه با افراد سالم کاهش داشت و این کاهش از لحاظ آماری نیز معنا دار بود (P= 0.0008) و همچنین میزان fold change هم (۹.۰۶) گزارش شد. با توجه به تجزیه و تحلیل منحنی ROC و سطح زیرمنحنی (AUC: 0.72 و P= 0.0003) و میزان حساسیت % 75 و اختصاصیت % 66.67، این IncRNA قابلیت بیومارکری مناسبی برای سرطان پانکراس را دارد.

نتیجه گیری: نتایج ما نشان داد که NKILA lncRNA میتواند در پاتوژنز این سرطان نقش داشته باشد و ممکن است بتوان از آن به عنوان بیومارکر مناسبی برای تمایز افراد مبتلا به سرطان و افراد سالم استفاده نمود. با این وجود بررسی های بیشتر با تعداد نمونه بیشتر لازم است.

واژگان کلیدی: RNA غیرکدکننده ، سرطان پانکراس، بیومارکر، NKILA

The investigation of long non-coding RNA PACER expression in patients with pancreatic cancer

Niloofar Dini[1]; Zeinab Shirvani-Farsani[1*]
[1-] Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, IR Iran

Email address: dininiloofar@gmail.com

Abstract

Background: Pancreatic cancer is the fourth leading cause of cancer related deaths with 47,050 dying from this disease in the United States, and is expected to take second place in 2030, after lung cancer. Sudden onset and lack of early diagnostic biomarkers directly lead to the high mortality rate of pancreatic cancer patients. Long noncoding RNAs (lncRNAs), are a group of RNAs greater than 200 nucleotides in length and that are not able to code for protein, play multiple roles in human cancers through all stages of their development and progression. P50-associated cyclooxygenase-2 extragenic RNA (PACER) is a novel antisense long non-coding RNA (lncRNA) located on the upstream of the promoter region of cyclooxygenase-2 (COX-2) and has been shown to increase COX-2 expression in monocytes. Studies indicate that PACER are able to activate NF-KB signaling pathway. COX-2 inhibits B-cells and natural killer T (NKT) cells, which in turn limits the power of immunosuppressors to combat tumor growth. Through this mechanism, COX-2 may promote tumorigenesis.

Methods: This study aimed to quantify the level of PACER lncRNA expression. The level of PACER lncRNA were tested in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 50 pancreatic cancer patients and 50 healthy controls by real-time PCR. In addition, ROC curve analysis as well as correlation analysis performed between the gene expression and some clinical features of pancreatic cancer cases.

Results: PACER lncRNA expression was significantly downregulated in patients with pancreatic cancer compared with healthy individuals (P-value: 0.03, fold change: 2.69). Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis was used to evaluate specificity and sensitivity of PACER lncRNA gene expression as potential biomarker for clinical diagnosis of pancreatic cancer (AUC: 0.63, P-value: 0.032, sensitivity: 76.33%, specificity: 59.1%). Our results revealed that the transcript level of PACER lncRNA could be considered as a good putative biomarker for individuals with pancreatic cancer.

Conclusion: In total, our results indicated that PACER lncRNA could be involved in the pathobiology of pancreatic cancer, and may be serving as a promising diagnostic biomarker for patients with pancreatic cancer. However, not only the larger sample size is needed, but applying

a large number of experimental and clinical tests that their results can be used to pancreatic cancer diagnosis and treatment, are also needed.

Keywords: COX-2, biomarker, signaling pathway, NF-KB

بررسی میزان بیان RNA طویل غیر کد کننده PACER در بیماران مبتلا به سرطان لوزالمعده

نیلوفر دینی[1]؛ زینب شیروانی فارسانی[1]*

۱-گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی ، دانشکده علوم و فناوری زیستی ، دانشگاه شهید بهشتی ، تهران ، ایران

Email:dininiloofar@gmail.com

چکیده

مقدمه: سرطان لوزالمعده چهارمین عامل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان با ۴۷۰۵۰ مورد مرگ ناشی از این بیماری در ایالات متحده است و انتظار می رود در سال ۲۰۳۰ پس از سرطان ریه رتبه دوم را به خود اختصاص دهد. شروع ناگهانی و فقدان بیومارکرهای تشخیصی زودهنگام مستقیماً منجر به مرگ و میر بالای بیماران سرطان پانکراس می شود. RNAهای غیرکدکننده طویل (lncRNAs)، گروهی از RNA ها با طول بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید هستند که قادر به کدگذاری پروتئین نیستند،نقش‌های متعددی در سرطان‌های انسانی در تمام مراحل رشد و پیشرفت آن‌ها ایفا می‌کنند. RNA خارج ژنی سیکلواکسیژناز ۲ مرتبط با p50 (PACER) یک RNA طویل غیر کدکننده آنتی سنس (lncRNA) جدید است که در بالادست ناحیه پروموتر سیکلواکسیژناز ۲ (COX 2) قرار دارد و نشان داده شده است که بیان COX 2 را در مونوسیت ها افزایش می دهد. مطالعات نشان می دهد که PACER می تواند مسیر سیگنالینگ NF-KB را فعال کند. COX 2 سلول های B و سلول های کشنده طبیعی T را مهار می کند، که به نوبه خود قدرت سرکوبگرهای ایمنی را برای مبارزه با رشد تومور محدود می کند. از طریق این مکانیسم، COX 2 ممکن است باعث ایجاد تومور شود.

روش‌ها: هدف این مطالعه تعیین مقدار بیان رونوشت PACER lncRNA بود. سطح lncRNA PACER در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) ۵۰ بیمار سرطان لوزالمعده و ۵۰ فرد سالم به عنوان گروه کنترل توسط Real Time PCR مورد آزمایش قرار گرفت. علاوه بر این، تجزیه و تحلیل منحنی ROC و همچنین تجزیه و تحلیل همبستگی بین بیان ژن و برخی از ویژگی های بالینی در بیماران مبتلا به سرطان پانکراس انجام شد.

نتایج: بیان lncRNA PACER در مبتلایان به سرطان پانکراس در مقایسه با افراد سالم به طور قابل توجهی کاهش یافت(P-value: ۰.۰۳ ، fold change: ۲.۶۹). برای ارزیابی اختصاصیت و حساسیت بیان ژنlncRNA PACER به عنوان بیومارکر بالقوه برای تشخیص بالینی سرطان پانکراس از آنالیز منحنی ROC استفاده شد (AUC: ۰.۶۳ ، P-value: ۰.۰۳۲، حساسیت: ۷۶.۳۳٪، اختصاصیت: ۵۹.۱٪).نتایج نشان داد که سطح رونوشت lncRNA PACER می تواند به عنوان یک بیومارکر خوب برای مبتلایان به سرطان پانکراس در نظر گرفته شود.

نتیجه‌گیری: در مجموع، نتایج ما نشان داد که lncRNA PACER می‌تواند در پاتوژنز سرطان لوزالمعده نقش داشته باشد و ممکن است به عنوان یک بیومارکر تشخیصی امیدوارکننده برای بیماران مبتلا به سرطان پانکراس مفید باشد.اگرچه،حجم نمونه بزرگتر و آزمایش های تجربی و بالینی بیشتری مورد نیاز است.

واژگان کلیدی: COX-2، بیومارکر، مسیر سیگنالینگ NF-KB

Evaluation of the Prevalence of ZnT8 and IAA Autoantibodies in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus

Sargazi, Fatemeh; Mohammadi, Malihe*; Lagzian Milad

Department of Biology, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan

Corresponding Author Email address: mmohammadi@science.usb.ac.ir

Abstract

Objective: The aim of this study was to evaluate the prevalence of autoantibodies against zinc transporter (ZnT8) and insulin (IAA) in adult patients with type 2 diabetes and therefore to estimate the prevalence of latent autoimmune diabetes in adults (LADA).

Methods: This cross-sectional study was performed on 263 patients with type 2 diabetes in South Khorasan province. Sampling was done systematically. Demographic information of patients was collected by a questionnaire. Fasting blood glucose (FBG) was determined by colorimetric method, peptide C level and ZnT8 and IAA levels were determined by ELISA method. Data were analyzed using SPSS software and $P<0.05$ was considered statistical significance level.

Results: The age range of patients was 30-70 years old and the mean age of participants was 51.75±8.98 years old. The prevalence of ZnT8 and IAA in the study population was 8.7% and 3.8%, respectively. The mean FBG in patients without antibodies and with antibodies was 150.99±12.17 mg/dl and 155.2±9.1 mg/dl, respectively, which did not show a significant difference (p=0.069). Also, the mean of C-peptide in patients with classical type 2 diabetes and those have autoantibodies was 1.34±0.44 ng/ mL and 0.730±0.31 ng/mL respectively, which was statistically significant (p=0.000)

Conclusions: The prevalence of latent autoimmune diabetes in adults in the study population is 11.4% which is consistent with a number of previous studies. Significant differences in C-peptide between positive and negative autoantibody diabetic patients indicate that the rate of pancreatic beta cell destruction in autoimmune patients is higher than in T2D; as a result, they have less ability to produce insulin and C-peptide. Therefore, it is recommended to change the treatment of autoimmune patients compared to T2D, and each patient should receive their own treatment based on peptide-C levels.

Keywords: Latent autoimmune diabetes in adults, C-peptide, Autoantibody, Fasting blood glucose

بررسی میزان شیوع اتوآنتی‌بادی علیه انتقال دهنده روی (ZnT8) و علیه انسولین (IAA) در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲

فاطمه سرگزی؛ ملیحه محمدی*؛ میلاد لگزیان

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان

Email: mmohammadi@science.usb.ac.ir

چکیده

هدف: هدف از مطالعه حاضر بررسی میزان شیوع اتوآنتی‌بادی علیه انتقال دهنده روی (ZnT8) و انسولین (IAA) در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ (T2D) و در نتیجه تخمین میزان دیابت اتوایمن نهفته در بزرگسالان (LADA) می‌باشد.

روش مطالعه: این مطالعه بر روی ۲۶۳ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ که توسط پزشک متخصص بیماری آنها تایید شده بود، در استان خراسان جنوبی انجام گرفت. نمونه‌گیری بصورت سیستماتیک انجام گرفت. اطلاعات دموگرافیک بیماران توسط پرسشنامه جمع‌آوری شد. قند خون ناشتا (FBG) با استفاده از روش کالریمتری، مقدار پپتید-C و میزان اتوآنتی‌بادی علیه ZnT8 و IAA به روش الیزا انجام پذیرفت. تفسیر داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS انجام گرفت و $P<0.05$ از نظر آماری معنی‌دار تلقی شد.

نتایج: محدوده سنی بیماران ۳۰ تا ۷۰ سال و میانگین سن بیماران 8.98±51.75 بود. شیوع ZnT8 و IAA در جمعیت تحت مطالعه به ترتیب برابر ۸.۷٪ و ۳.۸٪ بود. میانگین FBG در بیماران فاقد اتوآنتی‌بادی و بیماران دارای اتوآنتی‌بادی به ترتیب برابر 150.99±12.17 mg/dl و 155.2±9.1 mg/dl گزارش شد که تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد ($p=0.069$). همچنین میانگین پپتیدC در بیماران تیپ ۲ کلاسیک و بیماران اتوایمن به ترتیب برابر با 1.34±0.44 ng/ mL و 0.730±0.31 ng/mL بود که تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهند ($p=0.000$).

نتیجه‌گیری: میزان شیوع دیابت اتوایمن نهفته در بزرگسالان در جمعیت مورد مطالعه ۱۱.۴٪ بود که با تعدادی از مطالعات پیشین همخوانی دارد. تفاوت معنی‌دار بین میانگین پپتید-C بیماران اتوایمن و غیر اتوایمن نشان می‌دهد که احتمالا" سلولهای تولید کننده انسولین در بیماران اتوایمن نسبت به بیماران دیابت نوع ۲ آسیب بیشتری دیده و در نتیجه توانایی کمتری برای تولید انسولین و پپتید-C دارند. بنابراین تغییر شیوه درمانی بیماران اتوایمن در مقایسه با بیماران نوع ۲ دیابت توصیه می‌شود و هر بیمار باید بر اساس سطح پپتید-C روش درمان مخصوص به خود را دریافت کند.

واژگان کلیدی: دیابت اتوایمن نهفته در بزرگسالان، پپتید-C، اتوآنتی بادی، قند خون ناشتا

Expression of lincRNA-p21 in patients with pancreatic cancer and healthy individuals

Razieh Ghasemi-Pirbalouti [1], Zeinab Shirvani-Farsani[1]*

1.Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, IR Iran

Email address:raziehghasemi120@gmail.com

Abstract

Background: Pancreatic cancer arises when cells in the pancreas, a glandular organ behind the stomach, begin to multiply out of control and form a mass. These cancerous cells have the ability to invade other parts of the body. According to cancer statistics, PC patients have a 5-year survival rate of only 8%. Pancreatic cancer is also known as the “King of cancers” due to the lack of early diagnostic biomarkers and effective therapeutic methods in advanced stages. LncRNAs have emerged as novel potential therapeutic target tools.LncRNAs are generally defined as non-coding RNA molecules longer than 200 nucleotides. LncRNAs have a wide spectrum of functions. They are able to control gene expression at multiple levels—epigenetic, transcriptional, and post-transcriptional—and participate in many other important cellular functions, including X-chromosome silencing, genomic imprinting, and chromatin modification. lincRNA-p21 (long intergenic noncoding RNa-p21) is one of the well characterized. Moreover, it is found that p53-activated lincRNA-p21 serves as a transcriptional repressor in the p53 pathway and plays a role in triggering apoptosis.LincRNa-p21 is related to the development and progression of human diseases, particularly in cancer. It has been reported that lincRNa-p21 is decreased in tumor. For example, LincRNA-p21 is a transcriptional p53 target in primary chronic lymphocytic leukemia (CLL) and lymphoma cell lines, which is significantly down-regulated in CLL patients. It also has been reported to be associated with skin tumors. Hence, we aim to investigate the expression of long non coding RNA, lincRNa-p21, in patients with PC.

Methods: The level of lincRNa-p21 were evaluated in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 50 PC patients and 50 healthy controls with real-time PCR. Also, ROC curve analysis were performed.

Results: In our study, the lincRNa-p21 expression level significantly decreased (p =0.034, 4 fold) in patients compared to controls. Specificity and sensitivity of lincRNa-p21 expression were evaluated as potential biomarkers diagnosis using Receiver Operating Characteristic analysis. lincRNa-p21 AUC (the area under the ROC curve) was 0.60 (P =0.075).

Conclusion: In summary, current results showed that lincRNA-p21 might be involved in the molecular pathology of pancreatic cancer. However, larger sample size and more clinical experiments is needed.

Keywords: Biomarker, lncRNA-p21

بیان lincRNA-p21 در بیماران مبتلا به سرطان پانکراس و افراد سالم

راضیه قاسمی پیربلوطی [۱]، زینب شیروانی فارسانی [۱*]

۱-گروه ژنتیک ، دانشکده علوم و فناوری زیستی ، دانشگاه شهید بهشتی ، تهران

Email:raziehghasemi120@gmail.com

چکیده

زمینه: سرطان لوزالمعده زمانی ایجاد می‌شود که سلول‌های لوزالمعده، اندام غده‌ای در پشت معده، شروع به تکثیر خارج از کنترل و تشکیل یک توده می‌کنند. این سلول های سرطانی توانایی حمله به سایر قسمت های بدن را دارند. با توجه به آمار سرطان، نرخ بقای ۵ ساله بیماران PC تنها ۸٪ است. سرطان لوزالمعده به دلیل فقدان بیومارکرهای تشخیصی زودهنگام و روش‌های درمانی مؤثر در مراحل پیشرفته، به عنوان «پادشاه سرطان‌ها» نیز شناخته می‌شود. LncRNA ها به عنوان ابزارهای هدف درمانی بالقوه جدیدی ظهور کرده اند.LncRNA ها به طور کلی به عنوان مولکول های RNA غیر کد کننده طولانی تر از ۲۰۰ نوکلئوتید تعریف می شوند. LncRNA ها طیف وسیعی از عملکردها را دارند. آنها قادر به کنترل بیان ژن در سطوح چندگانه - اپی ژنتیکی، رونویسی، و پس از رونویسی- هستند و در بسیاری از عملکردهای مهم سلولی دیگر، از جمله خاموش کردن کروموزوم X، ایمپرینت ژنومی، و اصلاح کروماتین شرکت می کنند. lincRNA-p21 (RNa-p21 غیرکدکننده طولانی بین ژنی) یکی از مواردی است که به خوبی شناخته شده است. علاوه بر این، مشخص شده که lincRNA-p21 فعال شده با p53 به عنوان یک سرکوب کننده رونویسی در مسیر p53 عمل می کند و در تحریک آپوپتوز نقش دارد.LincRNa-p21 با توسعه و پیشرفت بیماری های انسانی، به ویژه در سرطان مرتبط است. گزارش شده است که lincRNa-p21 در تومور کاهش یافته است. به عنوان مثال، LincRNA-p21 یک هدف رونویسی p53 در لوسمی لنفوسیتی مزمن اولیه (CLL) و رده های سلولی لنفوم است که به طور قابل توجهی در بیماران CLL کاهش می یابد. همچنین گزارش شده است که با تومورهای پوستی مرتبط است. از این رو، هدف ما بررسی بیان RNA طولانی غیر کدکننده، lincRNa-p21، در بیماران مبتلا به PC است.

روش‌ها: سطح lincRNa-p21 در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی(PBMCs) ۵۰ بیمار PC و ۵۰ فرد سالم با روش Real-time PCR بررسی شد. همچنین، آنالیز منحنی ROC انجام شد.

یافته‌ها: در مطالعه ما، سطح بیان lincRNa-p21 به طور معنی‌داری (p=۰/۰۳۴، ۴ برابر) در بیماران نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. اختصاصیت و حساسیت بیان lincRNa-p21 به عنوان پتانسیل نشانگر زیستی با استفاده از آنالیز Receiver Operating Characteristic مورد بررسی قرار گرفت. lincRNa-p21 AUC (مساحت زیر منحنیROC) ۰.۶۰ (p=0.075) بود.

نتیجه گیری: به طور خلاصه، نتایج فعلی نشان داد که lincRNa-p21 ممکن است در پاتولوژی مولکولی سرطان پانکراس نقش داشته باشد. با این حال، حجم نمونه بزرگتر و آزمایش های بالینی بیشتری مورد نیاز است.

واژگان کلیدی: نشانگر زیستی، lncRNA-p21

Global Prevalence of *mcr*-Mediated Colistin Resistance in *Enterobacteriacea* and *Acinetobacter* spp Clinical Isolates: A Review

Neda Razavi Davoodi[1]; Neda Soleimani [2]; Marjan Rahnamaye-Farzami[3]

1- Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences and Technology, Shahid Beheshti University, Tehran
2- Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences and Technology, Shahid Beheshti University, Tehran
3- Research Center of Health Reference Laboratory, Ministry of Health and Medical Education, Tehran

Email: N_soleimani@sbu.ac.ir

Abstract

Increasing antibiotic resistance in multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacteria (MDR-GNB) presents significant health problems worldwide, often failing to fight MDR Gram-negative pathogens and the absence of new antibiotics that can defeat these superbugs. All of these have prompted the reconsideration of old drugs such as polymyxins that were reckoned too toxic for clinical use. Only two polymyxins, polymyxin E (colistin) and polymyxin B, are currently commercially available. Colistin is a polycationic peptide antimicrobial that was isolated and characterized in 1949. Colistin has re-emerged as a "last-line" treatment in the mid-1990s against MDR carbapenem-resistant Gram-negative pathogens due to the development of extensively drug-resistant Gram-negative pathogens, which include carbapenem-resistant *Acinetobacter*, *Pseudomonas* and Enterobacteriaceae. Until 2015, resistance to colistin was directly related to mutations in two-component regulatory systems, which are mediated by chromosomal genes. However, the emergence of the plasmid-borne *mcr-1* gene, a gene of the phosphoethanolamine transferase enzyme family, was reported for the first time in China in 2016. Horizontal transfer of mobile colistin resistance (*mcr*) genes to potential pathogens pose a serious problem. Since the report of the first *mcr* gene, *mcr-1*, in a few other *mcr* genes including *mcr-2* , *mcr-3* ,*mcr-4* , *mcr-5* , *mcr-6* , *mcr-7* , *mcr-8*, and *mcr-9* have been described in Enterobacteriaceae , and *mcr-1* , and *mcr-4* have also been reported in *Acinetobacter* spp.

We searched Google Scholar, SID, PubMed, Elsevier, and Science Direct to find articles related to molecular mechanisms and prevalence of colistin-resistant in the world between 2014 and 2021. Lebanon and China had the highest, and Germany had the lowest rate of resistance for colistin in *E. coli* clinical isolates. The highest colistin-resistant *K. pneumoniae* isolates were reported from Turkey and Iran, which accounted for almost 90% of resistant isolates in this region. To date, colistin-resistant isolates have been detected in several countries, and they create a public health concern around the world. However, the increasing prevalence of antibiotic resistance might be due to the over-prescription of antibiotics, and it has recently become a major problem in the world. In this review, we intend to discuss the recent global dissemination of mobilized colistin resistance (*mcr*) genes as an urgent public health threat. An accurate estimate of the global prevalence of *mcr* genes, their potential pathways for human transmission are required to implement control and prevention strategies.

Keywords: Colistin resistance, Prevalence, mcr gene, Enterobacteriaceae, Acinetobacter spp

مروری بر شیوع ژن‌های متحرک مقاوم به کلیستین (*mcr*) در انتروباکتریاسه ها و استینوباکترهای جدا شده از نمونه های بالینی درجهان

ندا رضوی داودی[۱]؛ ندا سلیمانی* [۲] ؛ مرجان رهنمای فرزامی [۳]

۱- گروه میکروبیولوژی.، دانشکده علوم و فناوری زیستی.، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
۲- گروه میکروبیولوژی.، دانشکده علوم و فناوری زیستی.، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
۳- مرکز تحقیقات آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران

Email: N_soleimani@sbu.ac.ir

چکیده

مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان باکتری‌های بیماری‌زا یک مسئله مهم در سراسر جهان است. متأسفانه در صنعت داروسازی برای مقابله با این معضل دستاوردهای بسیار کمی حاصل شده است. این امر باعث شده است که محققان و حوزه پزشکی مجدداً داروهای گذشته را که برای استفاده بالینی بسیار سمی تلقی می شدند، مرور کنند. در حال حاضر تنها دو پلی میکسین، پلی میکسین B و پلی میکسین E به صورت تجاری در دسترس هستند. کلیستین که یک پپتیدی پلی کاتیونی و دارای فعالیت ضد میکروبی می باشد، در سال ۱۹۴۹ جداسازی و شناسایی شد. کلیستین "آخرین راه حل" ضد میکروبی علیه باکتری های گرم منفی مقاوم به کارباپنم از جمله انتروباکتریاسه ها می باشد. قبل از دهه ۱۹۹۰، این داروها به دلیل سمیت کلیوی و عصبی خود مورد استفاده قرار نگرفتند. با این حال، شیوه های بالینی جدید و احتمالاً تولید بهبود یافته، استفاده از آنها را ایمن تر کرده است. مقاومت به کلیستین در انتروباکتریاسه ها می‌تواند به دلیل مکانیسم‌های کروموزومی و ژن‌های مقاومت به کلیستین (*mcr*) باشد. انتقال افقی ژن‌های متحرک مقاوم به کلیستین (*mcr*)در باکتری های گرم منفی یک مشکل جدی ایجاد کرده است. از زمان گزارش اولین ژن mcr، mcr-1، در سال ۲۰۱۶، چند ژن mcr دیگر از جمله mcr-2، mcr-3، mcr-4، mcr-5، mcr-6، mcr-7، mcr-8 و mcr-9در Enterobacteriaceae و *mcr*-1 و *mcr*-4 نیز در Acinetobacter spp گزارش شده است. اطلاعات مربوط به این تحقیق حاصل جست و جو در پایگاه های اطلاعاتی نظیر،Google Scholar SID ، PubMed ، Elsevier، Science Direct از سال ۲۰۱۴ تا ۲۰۲۱ می باشد و در این پایگاه های اطلاعاتی ، شیوع مقاومت به کلیستین (*mcr*) بررسی شده است. لبنان و چین بالاترین میزان مقاومت به کلیستین و آلمان کمترین میزان مقاومت را در اسنیتوباکترها داشتند. بیشترین اشرشیاکلای مقاوم به کلیستین در آسیا و کمترین در اقیانوسه گزارش شده است. بیشترین کلبسیلا پنمونیه مقاوم به کلیستین در ایران و ترکیه گزارش شده است ، به طوریکه ۹۰٪ کلبسیلا های جدا شده در این مناطق مقاوم به کلیستین بودند. هدف از این بررسی توجه و نگرانی جوامع بهداشت عمومی به شیوع *mcr* مانندها که تنوع غیر منتظره ای از خود به نمایش می گذارند، می باشد. مقاومت به کلیستین فشارهای نگران کننده ای را در درمان های بالینی و بهداشت عمومی ایجاد خواهد کرد و ضرورت نظارت بر استفاده از کلیستین به عنوان خط نهایی دفاع در برابر باکتری های گرم منفی XDR را برجسته می کند.

واژگان کلیدی: مقاومت به کلیستین، شیوع، mcr ، انتروباکتریاسه ، اسنیتوباکتر

Effects of alpha Ketoglutarate on differentiation of spermatogonial stem cells in neonate NMRI mice

First Author[1*]: Mahdi Jahanbakhsh
Second Author[1]: Dr. Tooba Mirzapoor
Third Author[2]: Prof. seyed Morteza koruji

[1] Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan

[2] Department of Anatomical Science, Iran University of Medical Science

*Corresponding Author Email address: t.mirzapoor@guilan.ac.ir

Abstract

Stem cells are the basis of spermatogenesis so that on the one hand, they maintain their population by self-renewal divisions, and on the other hand, they differentiate into spermatogenesis precursors. Cancer in men has a variety of causes that can cause infertility in men, including chemotherapy, radiation, surgery, or a combination of these treatments used to treat cancer, depending on the type, amount, and duration of use. Since these people lose their fertility due to the destructive effect of chemicals or radiation on the process of spermatogenesis or stop spermatogenesis, so extraction of spermatogonia stem cells(SSCs) from the testes of these patients, then culturing them in-vitro and providing Optimizing the conditions for their reproduction and differentiation is a new way to treat infertility. This study aimed to find the effective dose of alpha-glutarate for the differentiation of SSCs extracted from the testis tissue of neonate mice. Alpha ketoglutarate(AKG) is an essential intermediate metabolite in the Krebs cycle. This metabolite has a dual role inside the cell. It is used both in differentiation and dimethylated form to prevent differentiation. After dosing and evaluating the toxicity of AKG, we divided the spermatogonia cells into two groups, the first group with a concentration of 0.1 µg / mol AKG and the second group with BMP-4 and retinoic acid. The Real-time results clearly showed a significant increase in the expression of ACROSIN and CYCP-3 genes compared to the control group($p \leq 0.05$). Also, PLZF-specific spermatogonia markers in cells cultured by immunohistochemistry confirmed the presence of these cells.
At the end of the study, images taken using transposition electron microscopy (TEM) showed more differentiation of dose-dependent cells up to the secondary spermatocyte-like cells stage than the control group. The culture of SSCs using AKG can be a suitable differentiation factor for the culture of these cells and provide the basis for further studies and advances in infertility.

Keywords: Spermatogonial stem cells, Alpha Ketoglutarate, differentiation, infertility

اثرات آلفا کتوگلوتارات بر روند تمایز سلول های بنیادی اسپرماتوگونی موش های نابالغ نژاد NMRI در شرایط آزمایشگاه

مهدی جهان بخش[۱] ، دکتر طوبا میرزاپور[۱] ،پروفسور سید مرتضی کروجی[۲]

۱-گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت

۲-گروه اناتومی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران

Email: t.mirzapoor@guilan.ac.ir

چکیده

سلول های بنیادی، پایه اسپرماتوژنز هستند به طوریکه از یک طرف با تقسیمات خودنوزایی جمعیت خود راحفظ کرده و از طرف دیگر به پیشسازهای اسپرماتوگونی ها تمایز می یابند. سرطان در مردان دلایل مختلفی دارد که شیمی درمانی، اشعه درمانی، جراحی و یا مجموعه ای از این اقدامات که در درمان سرطان مورد استفاده قرار میگیرد بر اساس نوع، میزان و مدت استفاده میتوانند موجب عقیمی و ناباروری در مردان شوند. از آنجاییکه این افراد به دلیل تاثیر مخرب مواد شیمیایی و یا پرتو ها بر روی فرایند اسپرماتوژنز قدرت باروری خود را از دست می دهند یا دچار توقف اسپرماتوژنز می شوند لذا استخراج سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی از بیضه این بیماران , سپس کشت آنها در شرایطIn-Vitro و فراهم کردن شرایط بهینه جهت تکثیر و تمایز آنها راهکار جدیدی جهت درمان ناباروری است. هدف از این مطالعه پیدا کردن دوز موثر آلفاکتوگلوتارات برای تمایز سلول های اسپرماتوگونی مستخرج از بافت تستیس موش های صوری نابالغ است. آلفاکتوگلوتارات یک متابولیت حد واسطه بسیار مهم در چرخه کربس است. این متابولیت در داخل سلول نقش دوسویه ای دارد. هم درتمایز مورد استفاده قرار میگیرد و هم به فرم دی متیله شده مانع تمایز میشود. ما سلول های اسپرماتوگونی را پس از دوزیابی و بررسی سمیت آلفاکتوگلوتارات به دو گروه تقسیم کردیم، گروه اول غلظت ۰/۱ میکروگرم بر مول آلفاکتوگلوتارات و گروه دوم کنترل در حضور BMP-4 و رتینوئیک اسید. نتایج حاصل از ریل تایم(REAL-TIME) به روشنی گویای افزایش بیان معنادار ژن های ACROSIN و CYCP-3 نسبت به گروه کنترل بودند($p\leq0.05$). و همینطور ماکر اختصاصی اسپرماتوگونی PLZF درسلول های کشت شده توسط تکنیک ایمونوهیستوشیمی حضور این سلول ها را اثبات کردند. در انتهای پژوهش، تصاویر گرفته شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)، تمایز بیشتر سلول های وابسته به دوز را تا مرحله شبه اسپرماتوسیت ثانویه نسبت به گروه کنترل نشان دادند. کشت سلول های بنیادی اسپرماتوگونی با استفاده از آلفاکتوگلوتارات میتواند فاکتورتمایزی مناسبی برای کشت این سلول ها باشد و زمینه را برای مطالعات بیشتر و پیشرفت های مربوط به ناباروری فراهم کند.

واژگان کلیدی: سلول های بنیادی اسپرماتوگونی،آلفاکتوگلوتارات،تمایز ،کشت سلول،ناباروری

Biosynthesis of copper carbonate nanoparticles by fungal strain *Neurospora* sp. ZB12

Zahra Rabiei Faradonbeh[1], Morahem Ashengroph[1*], Asal Barshidi[1]

1. Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj

E-mail: m.ashengroph@uok.ac.ir

Abstract

The synthesis of various metal nanoparticles using biological sources including plant extracts, algal extracts and a variety of microorganisms including eubacteria, fungi, yeasts and actinomycetes has been considered in nanotechnology. Among them, fungal strains have received the most attention in the field of extracellular biosynthesis of metal nanoparticles due to their advantages including easy isolation and culture, rapid growth, high metabolic diversity and extracellular secretions. Copper carbonate nanoparticles have a wide range of applications in manufacturing pigments, insecticides, fungicides, as well as catalysts in organic reactions and desulfurization from crude oil. On the other hand, due to their electrical and thermal conductivity, they are considered as a viable alternative to gold and silver nanoparticles. In this study, based on the enrichment culture technique, 15 fungal strains with urease activity were isolated in urea-enriched API culture medium. Among the isolated strains, the supernatant of fungal strain ZB12 was able to synthesize copper carbonate nanoparticles after exposure to copper chloride and urea salts. The strain ZB12 was identified based on morphological characteristics and sequence analysis of ITS1-5.8S-ITS2 regions by ITS1 and ITS4 primers and identified in *Neurospora* genus. The formation of copper carbonate nanoparticles was confirmed by UV-visible spectrophotometry, scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction (EDX) spectroscopy. The initial concentrations of copper and urea ions were investigated as effective factors and their interference in the size of nanoparticles produced. Scanning electron microscopy analysis showed the formation of optimal copper carbonate nanoparticles by the fungal strain with an average size of about 55 nm and in the form of a spherical in the bioconversion reaction mixture containing 50 mM copper chloride and 50 mM urea. Fourier transform infrared (FTIR) analysis was performed to identify the functional groups involved in the synthesis and stability of copper carbonate nanoparticles. Based on the results due to the widespread use of copper carbonate nanoparticles in various industries, in this study, for the first time in Iran, the synthesis and development of a green method for the preparation of copper carbonate nanoparticles has been proposed.

Keywords: Green synthesis, Fungal strains, Nanocopper carbonate, Spectroscopy, Bioconversion reaction

سنتز زیستی نانوذرات کربنات مس توسط سویه قارچی *Neurospora* sp. ZB12

زهرا ربیعی فرادنبه [۱]؛ مراحم آشنگرف [۱*]؛ عسل برشیدی [۱]

1 - گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، سنندج

Email: m.ashengroph@uok.ac.ir

چکیده

سنتز انواع نانوذرات فلزی با استفاده از منابع زیستی شامل عصاره‌های گیاهی، عصاره‌های جلبکی و انواع عوامل میکروارگانیسمی شامل یوباکتری ها، قارچ‌ها، مخمرها و اکتینومیست در فناوری نانو مورد توجه قرار گرفته است. در این میان سویه‌های قارچی به دلیل مزیت‌هایی شامل جداسازی و کشت آسان، رشد سریع، تنوع متابولیکی بالا و ترشحات برون سلولی بیشترین توجه را در زمینه سنتز زیستی برون سلولی نانوذرات فلزی دریافت کرده‌اند. نانوذرات کربنات مس دارای کاربردهای گسترده در زمینه رنگدانه ها، حشره کش ها، قارچ کش ها و همچنین به‌عنوان کاتالیست‌هایی در واکنش‌های آلی و گوگردزدایی از نفت خام کاربرد دارند. از طرفی با توجه به هدایت الکتریکی و حرارتی به عنوان یک جایگزین قابل دوام برای نانو ذرات طلا و نقره در نظر گرفته شده اند. در این مطالعه، براساس تکنیک کشت غنی سازی ۱۵ سویه قارچی با فعالیت اوره‌آزی در محیط کشت API غنی شده با اوره جداسازی شد. در میان سویه های جدا شده، سوپرناتانت سویه قارچی ZB12 بعد از مواجهه با نمک کلرید مس و اوره قابلیت سنتز نانوذرات کربنات مس را دارا بود. سویه ZB12 براساس ویژگی های ریخت شناسی و آنالیز توالی نواحی ITS1-5.8S-ITS2 و به کمک پرایمرهای ITS1 و ITS4 شناسایی و در جنس Neurospora *تعیین هویت شد*. تشکیل نانوذرات کربنات مس توسط آنالیزهای UV-visible اسپکتروفتومتری، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و *طیف سنجی* پراش انرژی پرتو ایکس (EDX) تایید شد. غلظت اولیه یون مس و اوره به عنوان فاکتورهای موثر و تداخل آنها در اندازه نانوذرات تولیدی بررسی شد. تجزیه و تحلیل انجام شده به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی تشکیل نانوذرات کربنات مس بهینه توسط سویه قارچی مذکور با متوسط اندازه حدود ۵۵ نانومتر و به شکل کروی در مخلوط واکنش زیست تبدیلی حاوی ۵۰ میلی مولار کلرید مس و ۵۰ میلی مولار اوره را نشان دادند. *آنالیز مادون قرمز* تبدیل فوریه (FTIR) با هدف شناسایی گروه‌های عاملی دخیل در سنتز و پایداری نانوذرات کربنات مس انجام شد که براساس نتایج بدست آمده . با توجه به کاربردهای گسترده نانوذرات کربنات مس در صنایع مختلف، در این پژوهش، برای نخستین بار در سطح کشور، *سنتز* و توسعه یک روش سبز جهت تهیه نانوذرات کربنات مس پیشنهاد شده است.

واژگان کلیدی: سنتز سبز، سویه های قارچی، نانوکربنات مس، طیف سنجی، واکنش زیست تبدیلی

Green synthesis of silver selenide nanoparticles using *Pseudomonas* sp. strain BR011

Asal Barshidi[1], Morahem Ashengroph[1*], Zahra Rabiee FaraDonbeh[1]

1. Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj

E-mail: m.ashengroph@uok.ac.ir

Abstract

Silver selenide nanoparticles (Ag_2Se NPS) are used in various fields such as infrared sensors, photolithographic layers, electrochemical cells and electrochemical potential memory devices, photographic films, chrome-thermal materials for nonlinear optical devices and photovoltaic cells. Ag_2Se NPS are produced by various physicochemical methods including chemical reduction, electrochemical, chemical deposition, thermal evaporation and hydrothermal reaction. However, the physicochemical production of these nanoparticles, in addition to high costs and complexity of the production process, leads to environmental pollution caused by toxic chemicals and the production of toxic and dangerous by-products. Therefore, it is very important to develop methods based on green chemistry as an efficient and reliable alternative. Microbial cells are considered as important nanofactories for the production of nanoparticles due to their remarkable ability to reduce heavy metal ions. Therefore, in this study, we have tried to use the potential of native aquatic bacterial strains with the ability to biosynthesize AgNPs and SeNPs in order to biosynthesize Ag2Se NPs. In this study, the bacterial strain of *Pseudomonas* sp. strain BR011 with high tolerance to sodium selenite stock (20 mM) and silver nitrate (10 mM) was isolated based on enrichment culture technique. The bacterial strain was able to synthesize Ag_2Se NPs after exposure to selenite stock at a final concentration of 1 mM and silver nitrate at a final concentration of 2 mM. The formation of Ag_2Se NPs was confirmed by UV-Visible spectroscopic analysis which showed absorbance peaks at 375 to 425 nm. The size and morphology of the nanoparticles were determined by scanning electron microscopy (SEM). The shape of the particles was spherical and their average size was about 10 to 25 nm. X-ray energy diffraction (EDX) spectroscopy, which was performed with the aim of structural analysis of synthetic Ag_2Se NPs, showed the presence of the peaks related to elemental selenium and silver in the synthetic nanoparticles. The green synthesis of Ag_2Se NPs by bacterial strains is a simple and cost-effective process because it relies on renewable natural resources to create more compatible and sustainable products.

Keywords: Biosynthesis, Spectroscopy, Metal nanoparticles, Silver selenide, Aquatic bacterium

سنتز سبز نانوذرات سلنید نقره با استفاده از سویه باکتری Pseudomonas sp. BR011

عسل برشیدی[1]؛ مراحم آشنگرف[1*]؛ زهرا ربیعی فرادنبه[1]

1 - گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، سنندج

Email: m.ashengroph@uok.ac.ir

چکیده

نانوذرات سلنید نقره در زمینه های مختلف از قبیل سنسورهای مادون قرمز، لایه‌های فتولیتوگرافی، پیل‌های الکتروشیمیایی و دستگاه‌های حافظه پتانسیل الکتروشیمیایی، فیلم‌های عکاسی، مواد حرارتی-کروم برای دستگاه های نوری غیر خطی و سلول‌های فتوولتائیک استفاده شده است. نانوذرات سلنید نقره با روش‌های فیزیکوشیمیایی مختلفی از جمله کاهش شیمیایی، الکتروشیمیایی، رسوب‌گذاری شیمیایی، تبخیر حرارتی و واکنش هیدروترمال تولید می‌شوند. با این حال، تولید فیزیکوشیمیایی نانوذرات مذکور علاوه بر صرف هزینه‌های بالا و پیچیدگی مراحل تولید، آلودگی زیست محیطی ناشی از مواد شیمیایی سمی به کار گرفته شده و تولید فرآورده‌های جانبی سمی و خطرناک را به دنبال دارد. از این رو، توسعه روش‌های مبتنی بر شیمی سبز به عنوان یک جایگزین کارآمد و قابل اعتماد بسیار اهمیت دارد. سلول‌های میکروبی با توجه به توانایی قابل توجه‌شان برای احیای یون‌های فلزی سنگین به عنوان نانوکارخانه‌های مهمی برای تولید نانودرات در نظر گرفته می‌شوند. بنابراین، در این تحقیق سعی شده است که از پتانسیل سویه‌های باکتری بومی آبزی با قابلیت سنتز زیستی نانوذرات نقره و نانوذرات سلنیوم در راستای سنتز زیستی نانوذرات سلنید نقره استفاده شود. در این پژوهش، سویه باکتری Pseudomonas sp. BR011 با قابلیت تحمل پذیری بالا نسبت به استوک سلنیت سدیم (۲۰ میلی مولار) و نیترات نقره (۱۰ میلی مولار) براساس تکنیک کشت عنی سازی جداسازی شد. سویه باکتری مذکور پس از مواجهه با استوک سلنیت در غلظت نهایی ۱ میلی مولار و نیترات نقره در غلظت نهایی ۲ میلی مولار قابلیت سنتز نانوذرات سلنید نقره (Ag_2Se) را دارا بود. نتایج حاصل از طیف سنجی UV-Visible با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر تشکیل نانوذرات سلنید نقره را در محدوده طیف جذبی ۳۷۵ الی ۴۲۵ نانومتر تایید نمود. اندازه و ریخت شناسی نانوذرات مذکور توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) تعیین شد که شکل ذرات کروی و اندازه متوسط آنها در حدود ۱۰ تا ۲۵ نانومتر است. *طیف* سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX) که با هدف تجزیه و تحلیل ساختاری نانوذرات سلنید نقره سنتزی انجام گرفت، حضور پیک های مربوط به سلنیوم عنصری و نقره عنصری را در نانوذرات سنتزی نشان داد. سنتز سبز نانوذرات سلنید نقره توسط سویه‌های باکتری یک فرآیند ساده و مقرون به صرفه است زیرا به منابع طبیعی تجدید پذیر متکی است و محصولات سازگارتر و پایداری را به وجود می آورد.

واژگان کلیدی: سنتز زیستی، طیف سنجی، نانوذرات فلزی، سلنید نقره، باکتری آبزی

Heavy metals pollution and their bioremediation by algae

Parichehr Hanachi[1*]; Yasaman Yousefi[2]

1- Biotechnology Department, Biological Sciences Faculty, Alzahra university, Tehran, Iran
2- Biotechnology Department, Biological Sciences Faculty, Alzahra university, Tehran, Iran

**Corresponding Author Email address: p.hanachi@alzahra.ac.ir*

Abstract

Today, heavy metals are among the most important and dangerous pollutants that can have adverse effects on human health, so it is necessary to remove these pollutants from wastewater. One of the economic methods of wastewater treatment includes bioremediation. This method uses microorganisms in nature such as microalgae for treatment.

The term heavy metal is used for metals that have an atomic density greater than 4 g /cm^3 or 5 times greater than water. These metals enter the environment in two ways: natural (such as weathering minerals) and human activities (such as mining, fertilizers and pesticides) and enter the food chain of living organisms in different ways and have effects such as mutagenesis and DNA damage and increase the risk of cancer. It follows that it will even reach the next generation. Today, various physicochemical methods are used to treat water (such as membrane filtration, precipitation, and ion exchange). But these methods, in addition to being costly, produce a toxic sludge that is itself a pollutant. Also, most of these methods do not work at low concentrations of heavy metals (especially below 100 mg / L).

Bioremediation is an environmentally friendly and cost-effective method for wastewater treatment. In this method, a variety of microorganisms such as; Algae, bacteria and fungi can be used.

Bioremediation in algae is done in two ways: biosorption which is fast and the algae absorbs the contaminant on its surface and bioaccumulation which is slow and the contaminant enters the cell and purification processes (such as Covalent bonds formation between the ionized cell wall and the heavy metal, ion exchange between the positively charged wall and the heavy metal, and the formation of a bond between the positively charged metal and the negatively charged uronic acid) occur on it.

Extensive research on algae has shown that many of these organisms, in addition to being able to purify heavy metals, are also capable of purifying other pollutants (such as phosphorus and nitrogen). However, due to the increasing pollution of the environment, it is necessary to increase the treatment efficiency of these microalgae. This requires further research on the factors affecting the growth and efficiency of algae.

Keywords: environmental pollution, wastewater, wastewater treatment

آلودگی فلزات سنگین و زیست پالایی آنها توسط میکروجلبک ها

پریچهر حناچی[1*]؛ یاسمن یوسفی[2]

۱- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا ، تهران، ایران
۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا ، تهران، ایران

Email: p.hanachi@alzahra.ac.ir

چکیده

امروزه فلزات سنگین از مهمترین و خطرناک ترین آلاینده ها محسوب می شوند که می توانند اثرات ناگواری بر سلامت انسان بگذارند، در نتیجه حذف این آلاینده ها از پساب ها ضروری است. از جمله روش های اقتصادی تصفیه ی پساب ها میتوان به Bioremediation یا زیست پالایی اشاره کرد. در این روش از میکروارگانیسم های موجود در طبیعت مانند میکروجلبک ها بهره گرفته می شود. لفظ فلز سنگین برای فلزاتی به کار می رود که چگالی اتمی بزرگ تر از $4\ gr/cm^3$ یا ۵ برابر بیشتر از آب دارند. این فلزات به دو روش طبیعی (مانند هوازدگی کانی ها) و فعالیت های انسانی (مانند؛ معدن ها، کود و سم های کشاورزی) وارد محیط می شوند و از طرق مختلف وارد زنجیره غذایی جانداران شده و اثراتی مانند جهش زایی و تخریب DNA و افزایش ریسک سرطان را به دنبال دارد که حتی به نسل بعد هم راه میابد. امروزه روش های فیزیکوشیمیایی مختلفی برای تصفیه آب به کار می رود (مانند؛ فیلتراسیون با غشا، ته نشینی و تعویض یون). اما این روش ها جدای از هزینه بر بودن، باعث تولید یک لجن سمی شده که خود یک آلاینده است. همچنین بیشتر این روش ها در غلظت های پایین فلزات سنگین (مخصوصا زیر 100mg/L) کارایی ندارند. زیست پالایی (Bioremediation) یک روش دوست دار محیط زیست و مقرون به صرفه برای تصفیه پساب است. در این روش از انواع میکروارگانیسم هایی مانند؛ جلبک، باکتری و قارچ می توان استفاده کرد.

زیست پالایی در جلبک ها به دو صورت انجام می گیرد: جذب زیستی که سریع است و جلبک آلاینده را بر روی سطح خود جذب می کند و تجمع زیستی که کند است و آلاینده وارد سلول شده و فرایند های تصفیه ای (مانند؛ شکل گیری باند های کووالان بین دیواره سلولی یونیزه و فلز سنگین، تعویض یون بین دیواره دارای بار مثبت و فلز سنگین و ایجاد باند بین بار مثبت فلز و یورونیک اسید با بار منفی) روی آن صورت می گیرد. در تحقیقات گسترده ای که بر روی انواع جبلک ها صورت گرفته است مشخص شده است که بسیاری از این جانداران علاوه بر توانایی تصفیه فلزات سنگین، توانایی تصفیه سایر آلاینده ها (همچون فسفر، نیتروژن) را نیز دارند. اما با توجه به افزایش روزافزون آلودگی های زیست محیطی، بالا بردن راندمان تصفیه ای این ریز جلبک ها الزامیست. این امر مستلزم پژوهش های بیشتر برروی فاکتور های موثر بر رشد و کارایی جلبک است.

واژگان کلیدی: آلودگی محیط زیست، پساب، تصفیه آب

Investigation of Phytochemical and antioxidant activity of plant root extract Scutellaria multicaulis

Shadi Hojatizadeh[1*]; Parichehr Hanachi[1]; Zahra Gharari[1]

1- Biotechnology Department, Biological Sciences Faculty, Alzahra university, Tehran, Iran

Corresponding Author Email address:sh.hojatizadeh@student.alzahra.ac.ir

Abstract

Oxidative stress by producing free radicals leads to widespread disorders in the body, in contrast, antioxidants have an opposite effect by eliminating and preventing the production of these free radicals. Plants are antioxidant sources with high amounts of phenol and flavonoids and these compounds are found in all parts of plants.

The aim of this study was to analyses the phenolic, flavonoid content and antioxidant activity of *Scutellaria multicaulis* root extract. The roots of this plant have interest to many countries in traditional medicine.

Materials and methods: The analyses for phenol and flavonoid root extract content were used the Folin-Ciocalteu and aluminum chloride methods. Antioxidant activity of these extracts was analyzed by free radical inhibition (DPPH) of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl methods. Evaluation of this study were conducted using UV-vis spectroscopy. The statistical data analyses was using SPSS V22.0 software, Duncen test was apply for data analysis and $P < 0.01$ was consider for significant levels between groups .

The results of the study showed that the root extract of *Scutellaria multicaulis* is rich in phenolic and flavonoid compounds at 10 mg/ml concentration of the extract, it contains phenolic, flavonoid, 0.13733 (± 0.0041) and 0.13800 (± 0.011), respectively. Antioxidant activity with DPPH test: 0.49167 (± 0.044), indicating significant ($p < 0.01$) antioxidant activity in extract.

The conclusion of this study showed that the roots of *Scutellaria multicaulis* has potential source of bioactive compounds with antioxidant and antimicrobial properties may can be used in food, drug and human health.

Keywords: Antioxidant, Flavonoid and Phenolic compounds, *Scutellaria multicaulis*

بررسی فعالیت فیتوشیمیایی و آنتی اکسیدانی عصاره ریشه گیاه *Scutellaria multicaulis*

شادی حجتی زاده[1]*؛ پریچهر حناچی[1]؛ زهرا قراری[1]

1 - گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا ، تهران، ایران

* *Email address: sh.hojatizadeh@student.alzahra.ac.ir*

چکیده

استرس اکسیداتیو با تولید رادیکال های آزاد منجر به اختلات گسترده ای در بدن می شود در مقابل آنتی اکسیدان ها با ازبین بردن و پیشگیری از تولید این رادیکال های آزاد اثری متضاد را اعمال می کنند. گیاهان از منابع آنتی اکسیدانی هستند که دارای مقادیر فراوانی فنول و فلاونوئید می باشند این ترکیبات در تمام قسمت های گیاهان یافت می شوند. هدف از این مطالعه،ارزیابی محتوی فنولی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ی ریشه گیاه Scutellaria multicaulis می باشد. ریشه این گیاه از دیرباز مورد توجه بسیاری از کشورها در طب سنتی بوده است.

ارزیابی محتوی فنل و فلاونوئیدی عصاره ریشه به ترتیب به روش های فولین-سیوکالتو و کلرید آلومینیوم انجام شد. سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی این عصاره ها به روش مهار رادیکال آزاد 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) انجام شد. مطالعات ارزیابی با استفاده از جذب نمونه ها توسط دستگاه اسپکتروسکوپ UV-vis انجام شد و سپس داده های حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS V22.0 آنالیز و با آزمون Duncen در سطح $P < 0.01$ گروه بندی شدند.

نتایج آنالیز نشان داد که عصاره ریشه گیاه *Scutellaria multicaulis* غنی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی است بطوریکه در غلظت 10 mg/ml از عصاره به ترتیب محتوی فنولی، فلاونوئیدی؛ 0.0041 ± 0.13733 mg/ml و ± 0.13800 mg/ml 0.011 می باشد. فعالیت آنتی اکسیدانی در آزمایش DPPH: 0.044 ± 0.49167 mg/mlاست که نشان دهنده فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی در عصاره ی این بافت از گیاه می باشد.

نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان داد که ریشه گیاه Scutellaria multicaulis بعنوان منبع غنی و بالقوه از ترکیبات زیستی فعال با خاصیت آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی قابل استفاده در صنعت غذا، دارو و حفظ سلامت انسان می باشد.

واژگان کلیدی: آنتی اکسیدان، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی، گیاه اسکوتلاریا

Association between rs2273348 polymorphism of TARDBP gene on late dementia in people diagnosed with Alzheimer's disease

Majedeh Mohammadi[1*]; Dr Farzam Ajamian[1]

1*;1 Guilan university, Department of Biology, Faculty of sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Majedeh.mohammadi75@gmail.com

Abstract

LATE (limbic-predominant Age-related TDP-43 Encephalopathy) has clinical complications similar to Alzheimer's, but at the same time it is a completely different disease in terms of its origin. Individuals with LATE-NC experience an amnestic syndrome similar to Alzheimer disease (AD) and yet neuropathological and MRI-based studies have demonstrated that late-nc is distinct. Unlike Alzheimer's disease (AD), which is cased by the accumulation of amyloid and tau proteins in the brain, (LATE) is caused by the accumulation of TDP-43 protein in the brain and therefore drug therapies that reduce amyloid and tau proteins have practically failed to cure all kind of AD-like syndromes in the patients with Alzheimer's disease. In 2006, phosphorylated TDP-43 was discovered as a disease protein that is the signature of amyotrophic lateral sclerosis and most cases of prefrontal lobe degeneration, known as FTDL-TDP. TDP-43, a 43 kDa with 414 amino acids, is a protein encoded by the TARDBP gene on chromosome 1P36; a protein that binds to RNA and DNA, as well as bands to the other proteins expressing in most human tissues and cell types. It plays an important role in regulating RNA processing by transcriptional suppression and has various functions in regulating gene expression at the transcriptional and translational levels. Improper expression of phosphorylated TDP-43 causes mRNA binding incorrectly and disease onset. It is often unphosphorylated and is mostly found in the nucleus, while in disease condition, it is phosphorylated. The research steps included preparing samples from Alzheimer's and control patients, DNA extraction, primer design for rs2273348 TDP_43 gene loci by Oligo7 software, amplification of the desired gene fragments by Tetra-ARMS-PCR method and finally statistical analysis by MedCalc software. The aim of this study was to investigate the presence of rs2273348 TDP-43 gene in Alzheimer's samples with AD symptoms and, as expected, the expression of TDP-43 gene changed in a percentage of AD samples. There is a relationship between locus genotype rs2273348 polymorphism in TDP-43 gene and AD disease. X^2 test, $P \leq 0.05$ and degree of freedom one is significant. However, future studies with more patients and controls are needed to confirm the results. Also, additional evidences are necessary to further clarify the findings of this research.

Keywords: TDP-43, LATE, Alzheimer disease (AD)

ارتباط بین پلی مورفیسم rs2273348 ژن TARDBP بر زوال عقل دیررس در افراد مبتلا به بیماری آلزایمر

ماجده محمدی[1]*؛ نام و دکتر فرزام عجمیان[1]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت

Email: majedeh.mohammadi75@gmail.com

چکیده

LATE (انسفالوپاتی TDP-43 مرتبط با سن غالب لیمبیک) دارای عوارض بالینی مشابه آلزایمر است، اما در عین حال از نظر منشأ بیماری کاملاً متفاوت است. افراد مبتلا به LATE-NC سندرم فراموشی مشابه بیماری آلزایمر (AD) را تجربه می‌کنند و در عین حال مطالعات نوروپاتولوژیک و مبتنی بر MRI نشان داده‌اند که late-nc متمایز است. برخلاف بیماری آلزایمر (AD) که با تجمع پروتئین‌های آمیلوئید و تاو در مغز ایجاد می‌شود، (LATE) ناشی از تجمع پروتئین TDP-43 در مغز است و بنابراین درمان‌های دارویی که باعث کاهش پروتئین‌های آمیلوئید و تاو می‌شوند عملا موفق به درمان انواع سندرم های شبه AD در بیماران مبتلا به آلزایمر نشده اند. در سال ۲۰۰۶، TDP-43 فسفریله شده به عنوان یک پروتئین بیماری که نشانه اسکلروز جانبی آمیوتروفیک ودر اکثر موارد دژنراسیون لوب جلوی مغزاست، به نام FTDL-TDP کشف شد. TDP-43، یک پروتئین ۴۳ کیلو دالتونی با ٤١٤ اسید آمینه، پروتئینی است که توسط ژن TARDBP که برروی کروموزوم ۱P36 واقع شده است کدگذاری می شود. TDP-43 پروتئینی است که به RNA و DNA متصل می شود و همچنین به پروتئین های دیگر که در اکثر بافت ها و انواع سلول های انسانی بیان می شوند، باند می شود. نقش مهمی در تنظیم پردازش RNA با سرکوب رونویسی ایفا می کند و عملکردهای مختلفی در تنظیم بیان ژن در سطوح رونویسی و ترجمه دارد. بیان نادرست TDP-43 فسفریله شده باعث اتصال نادرست mRNA و شروع بیماری می شود. TDP-43 اغلب غیر فسفریله است و بیشتر در هسته یافت می شود، در حالی که در شرایط بیماری، فسفریله می شود. مراحل تحقیق شامل تهیه نمونه از بیماران آلزایمر و شاهد، استخراج DNA، طراحی پرایمر برای جایگاه های ژنی TDP_43 rs2273348 توسط نرم افزار Oligo7، تکثیر قطعات ژن مورد نظر به روش Tetra-ARMS-PCR و در نهایت تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم افزار MedCalc بود. هدف از این مطالعه بررسی وجود ژن TDP-43 rs2273348 در نمونه‌های آلزایمر با علائم AD بود و طبق انتظار، بیان ژن TDP-43 در درصدی از نمونه‌های AD تغییر کرد و نشان داد بین پلی مورفیسم ژنوتیپ جایگاه rs2273348 در ژن TDP-43 و بیماری AD رابطه وجود دارد. آزمون X2، P≤0.05 و درجه آزادی یک معنی دار است. با این حال، مطالعات آینده با بیماران و کنترل های بیشتری برای تایید نتایج مورد نیاز است. همچنین شواهد تکمیلی برای روشن شدن بیشتر یافته های این تحقیق ضروری است.

واژگان کلیدی: بیماری الزایمر، بیماری LATE ، TDP-43

The study of effect of recombinant Heat-Shock Protein 70 of *Rutilus Frisii Kutum* on enzymatic activity of carbonic anhydrase under high-temperature conditions.

Omid Saberi[1*]; Hossein Ghafoori[1]

1- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

* *Email:* omid.saberi.k@gmail.com

Abstract

Heat-Shock Protein family members are usually induced by various environmental factors and stressful conditions to hinder the detrimental effects of these factors. HSPs survive cells against harmful situations by refolding aggregated or misfolded proteins. High temperature is one of such factors leading to misfolding or denaturation of proteins. In this study, we investigated changes in Carbonic Anhydrase's activity to prove the effect of Hsp70 recombinant protein. Carbonic Anhydrase catalyzes the hydrolysis of *p*-nitrophenylacetate to acetate and *p*-nitrophenol, so the enzyme activity was evaluated using a spectrophotometer by following the changes in absorbance at 400 nm due to the production of *p*-nitrophenol. The blends of recombinant Hsp70 and Carbonic Anhydrase was prepared at various mixing ratios in a temperature gradient from 37 to 60 degrees centigrade. In addition, Hsp40 was also added in different vials as the co-chaperone of Hsp70 with the same ratios at the same temperature. The results revealed that carbonic anhydrase could break down its substrate considerably in 45 degrees centigrade with a mixing ratio of 1:4:4 for CA, Hsp70, and Hsp40, respectively. The result emphasizes the significance of molecular chaperones and their positive impacts on cell survival in high-temperature conditions.

Keywords: Molecular Chaperones, Heat-Shock Protein 70, Carbonic Anhydrase

تاثیر عملکرد چپرونی پروتئین Hsp70 نوترکیب بر تغییرات فعالیت آنزیمی کربنیک انهیدراز در محیط in vitro تحت دماهای مختلف در کبد ماهی Rutilus Frisii Kutum

امید صابری [1*]؛ حسین غفوری[1]

1 - گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت

*Email: omid.saberi.k@gmail.com

چکیده

پروتئین‌های استرسی (Heat Shock Proteins) معمولا بوسیله عوامل محیطی مختلف و موقعیت‌های استرسی متفاوت بیان می‌شوند تا از اثر مخرب این عوامل جلوگیری کنند. یکی از این عوامل، افزایش دما می‌باشد که منجر به بدتاخوردن یا تجزیه‌شدن پروتئین های حیاتی سلول‌ها می‌گردد. پروتئین‌های خانواده‌ی HSP با کمک به تاخوردن مناسب این پروتئین‌ها به بقای سلول‌ها در شرایط زیان‌بار این چنینی کمک می‌کنند. در این مطالعه، به منظور بررسی عملکرد چپرونی Hsp70 نوترکیب، تغییرات میزان فعالیت آنزیم کربنیک انهیدراز در دماهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. یکی از سوبستراهای کربنیک انهیدراز، پارانیتروفنیل استات می‌باشد که در حضور این آنزیم به پارانیتروفنل و استات هیدرولیز می‌گردد. پارانیتروفنل زرد رنگ بوده به‌طوری که تغییرات میزان جذب نوری آن در طول موج ۴۰۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری می‌باشد. در این آزمایش، فعالیت این آنزیم بر حسب تغییرات جذب در دقیقه (ΔAbs/min) مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی اثر چپرونی Hsp70 نوترکیب بر فعالیت آنزیم کربنیک انهیدراز، این چپرون با نسبت‌های ۱:۱، ۱:۲، ۲:۱، 1:4 و 4:1 همراه با کربنیک انهیدراز (هرکدام در یک ویال) مخلوط گردید. ضمنا به دلیل اینکه Hsp40 برای Hsp70 نقش کوچپرونی داشته و در بهبود فعالیت آن نقش به‌سزایی دارد، از این پروتئین در کنار Hsp70 استفاده شد. به این منظور نسبت‌های ۱:۱:۱، ۱:۱:۲، ۲:۲:۱، 1:1:4 و 4:4:1 از کربنیک انهیدراز، Hsp70 و Hsp40 به ویال‌های جداگانه اضافه شدند. پس از تیمار ویال‌ها در دماهای ۳۷ تا ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت، فعالیت کربنیک انهیدراز در طول موج ۴۰۰ نانومتر به روش Kinetic سنجیده شد. نتایج نشان می‌دهد کربنیک انهیدراز در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد در هیچ کدام از نسبت‌ها فعالیتی نداشت، در حالی که در دماهای پایین تر توانست پارانیتروفنیل استات را هیدرولیز کند. در این مطالعه، پروتئین Hsp70 نوترکیب بواسطه فعالیت چپرونی خود موجب بهبود عملکرد آنزیم کربنیک انهیدراز گردید. جالب توجه است که کربنیک انهیدراز در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد با حضور همزمان Hsp70 و Hsp40 (با نسبت های ۴ برابری در مقایسه با آنزیم) بیشترین فعالیت را دارد که بیانگر تاثیر مثبت و حیاتی چپرون‌های مولکولی در شرایط حاد دمایی می‌باشد.

واژگان کلیدی: چپرون مولکولی، پروتئین شوک حرارتی ۷۰، کربنیک انهیدراز

The Emerging role of Nanosensors for early detection of cancer metastasis

Tara Akhtarkhavari[1]; Maryam M. Matin[1*]

1- Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

**Corresponding Author Email address: matin@um.ir*

Abstract

Cancer is one of the leading causes of death worldwide; and despite tremendous achievements in the field of cancer therapy, metastasis is almost the most common problem among cancer patients. Early diagnosis of metastasis could significantly enhance the survival rate among cancer patients. Conventional metastasis detection methods have some limitations, including false-positive and false-negative results, redundant costs, and unnecessary exposure to radiation that could put at risk the early detection of metastasis among cancer patients. The Advent of nanotechnology provided a great context for designing practical nanosensors for early detection of cancer metastasis. Here, we conducted a literature review to categorize various nanosensors in the detection of cancer metastasis. This study was conducted on papers that were indexed in Pubmed before December 2021. The literature review was based on the following keywords: nanosensors, metastasis, cancer, diagnostics, nanoparticle, etc. For detection of metastasis, nanosensors can be designed based on cancer cell properties or/and physiological changes as a consequence of secondary cancer cell appearance and metastasis. First category nanosensors could be coated with specific ligands or targeting peptides for detection of cancer cells. The second category could design based on changes in the environment of cancer cells such as of change of pH, reactive oxygen species, and the presence of enzymes like proteases. Nanosensors could be applied in conjugation with theranostic agents or could produce urine by-products for non-invasive diagnosis in the presence of cancer cells. Scientists could also combine nanosensors with treatment strategies such as conjugation with mitochondrial targeting peptide for inducing apoptosis at the time of cancer cell detection. The application of nanosensors in cancer metastasis detection shows tremendous advantages, that could overcome the limitations of classical techniques. Nanosensors have a high potential to provide real-time, non-invasive, and biocompatible methods for early detection of cancer metastasis with accuracy at the level of the single cancer cell. Although more in vivo and in vitro studies are needed, by the combination of nanoparticles with theranostic agents and therapy strategies, real-time diagnosis and treatment could be provided in a near future.

Keywords: nano-detector, secondary tumor, malignant growth, nanoparticle, diagnostics

نقش نوظهور نانوحسگرها در تشخیص زودهنگام متاستاز در سرطان

تارا اخترخاوری[1]؛ مریم مقدم متین[1*]

1 - گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

Email: matin@um.ir

چکیده

سرطان یکی از علل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان است و با وجود دستاوردهای فوق العاده در زمینه درمانِ انواع سرطان‌ها، متاستاز تقریباً شایع‌ترین مشکل در بین بیماران مبتلا به سرطان است. تشخیص زودهنگام متاستاز می‌تواند میزان بقا در بیماران را به میزان قابل توجهی افزایش دهد. امروزه متاسفانه، روش‌های مرسوم تشخیص متاستاز دارای محدودیت‌هایی چون نتایج مثبت و منفی کاذب، هزینه‌های اضافی، و قرار گرفتن غیرضروری در معرض تشعشعاتِ مضر هستند که این محدودیت ها می‌توانند تشخیص زودهنگام متاستاز را در میان بیماران به خطر بیندازند. خوشبختانه ظهور فناوری نانو، زمینه مناسبی برای طراحی نانوحسگرهای کاربردی جهت تشخیص زودهنگام متاستاز را فراهم کرده است. این مطالعه به منظور دسته‌بندی و گردآوری اطلاعات نانوحسگرهای مورد استفاده در تشخیص متاستاز انجام شد و این تحقیق مروری بر روی مقالات نمایه شده در پایگاه داده Pubmed با تاریخ چاپ قبل از آذرماه سال ۱۴۰۰ صورت گرفته است. کلمات کلیدی استفاده شده عبارت بودند از: نانوحسگر، متاستاز، روش های تشخیصی، نانوذرات و غیره. به منظور تشخیص متاستاز، نانوحسگرها را می توان بر اساس مشخصات سلول سرطانی و یا تغییر در خواص فیزیولوژیکی محیط سلول سرطانی در حالت متاستاز طراحی کرد. نانوحسگرهای دسته اول می توانند با لیگاندهای اختصاصی یا پپتیدهای هدف برای تشخیص سلول های سرطانی پوشانده شوند. دسته دوم می توانند بر اساس تغییرات محیط سلول‌ها نظیر تغییردر pH، گونه های فعال اکسیژن و یا حضور آنزیم هایی مانند پروتئازها طراحی شوند. نانوحسگرها می‌توانند به صورت ترکیب با درمان هدفمند و تصویربرداری همزمان استفاده شده و یا می‌توانند به گونه ای طراحی شوند که در اثر واکنش با سلول سرطانی محصولات فرعی خاصی تولید کنند که همراه با دفع در ادرار به صورت غیرتهاجمی قابل تشخیص باشند. از طرف دیگر می‌توان نانوحسگرها را همراه با استراتژی‌های درمانی خاص مانند عوامل القا مرگ برنامه ریزی شده سلول تجویز کرد.. استفاده از نانوحسگرها در تشخیص متاستاز مزایای فوق‌العاده‌ای را نشان می‌دهد که می‌تواند بر محدودیت‌های روش های فعلی تشخیص متستازغلبه کند. در نهایت، نانوحسگرها پتانسیل بسیاربالایی برای تشخیص درجا، غیرتهاجمی و زیست سازگار برای تشخیص زودهنگام متاستاز با دقت در حد تک سلول سرطانی دارند. اگرچه مطالعات آزمایشگاهی و مطالعات حیوانات آزمایشگاهی بیشتری مورد نیاز است، اما با ترکیب نانوذرات با عوامل تشخیصی و درمانی، تشخیص زودهنگام همراه با درمان در آینده ای نه چندان دور امکان پذیر خواهد بود.

واژگان کلیدی: آشکارساز نانو، تومور ثانویه، رشد بدخیم، نانوذره، روش های تشخیصی

Study of CYP1B1 Gene Mutations in Families with Primary Congenital Glaucoma in Southern Iran

Zahra Nemati [1], Issa Jorjani [2*], Mona Entezam [3], Hossein Sabouri [4]

1- Master student of cellular and molecular biology, Department of Biology, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Genetics, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

4- Associate Professor, Department of Plant Production, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran.

Email: eisa_jorjani@yahoo.com

Abstract

Introduction: Primary Congenital Glaucoma (PCG) is a type of childhood glaucoma and one of the major causes of irreversible blindness in children due to developmental defects of the aqueous humor outflow pathway structures. PCG often presents with an autosomal recessive pattern, due to obstruction in the drainage of the aqueous humor due to congenital anomalies of trabecular meshwork growth and anterior chamber angle structures during fetal development.This disease is characterized by an increase in congenital intraocular pressure (IOP) due to decreased aqueous humor outflow due to dysfunction of the trabecular meshwork. Elevated IOP leads to optic nerve damage and gradual loss of vision. PCG occurs mainly in the first 3 years of life. The CYP1B1 gene is the most commonly reported gene and is currently the major known genetic cause of PCG. CYP1B1 expression plays an important role in regulating the growth and functions of the trabecular meshwork.

Aims: This study was performed to evaluate the genetic mutations of CYP1B1 gene in 11 patients with primary congenital glaucoma in southern Iran by sequencing the exons of this gene by Sanger sequencing. Also, the rate of CYP1B1 gene mutation in PCG patients in southern Iran and its comparison with other populations and also the type of common mutations in CYP1B1 gene in patients in southern Iran and determining the exon carrying the most CYP1B1 gene mutation in PCG patients in southern Iran were other objectives of this project.

Method: In this study, 11 families of PCG patients in southern Iran were studied. Conscious consent was obtained from all patients. Patients' familial pedigrees were also drawn. Exons encoding the CYP1B1 gene, including exons 2 and 3, as the main gene responsible for the disease, were amplified by PCR and then sequenced by Sanger sequencing. For one family, Segregation Analysis was performed on Proband and his parents. All variants found were interpreted based on genetic guidelines.

Results: In this study, 5 different mutations such as c.182G> A (p.Gly61Glu) and c.1103G> A (p.Arg368His) were reported in seven families. Some of the mutations were the most common mutations in about half of the patients we studied.

Conclusion: Percentage of patients we studied had at least one pathogenic mutation in the CYP1B1 gene. The frequency of mutations observed in CYP1B1 gene in the studied patients compared to other breeds in the world and other parts of Iran seems to be slightly different, which indicates the role of other known genes in PCG or the possibility of other unknown mutant genes in this Patients.

Keywords: Primary congenital glaucoma, CYP1B1 gene, mutation analysis

بررسی جهش‌های ژنتیکی ژن CYP1B1 در خانواده‌های مبتلا به بیماری گلوکوم مادرزادی اولیه در جنوب ایران

زهرا نعمتی[۱]، عیسی جرجانی[۲*]، مونا انتظام[۳]، حسین صبوری[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی-ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشگاه علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران.

۲- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران.

۳- استادیار گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

۴-دانشیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران.

Email: eisa_jorjani@yahoo.com

چکیده

مقدمه: گلوکوم مادرزادی اولیه (PCG: Primary Congenital Glaucoma) نوعی گلوکوم دوران کودکی و یکی از علل مهم نابینایی برگشت ناپذیر در کودکان است که ناشی از نقایص تکامل ساختارهای مسیر خروجی مایع زلالیه می‌باشد. PCG اغلب با الگوی اتوزومی مغلوب، ناشی از انسداد در تخلیه مایع زلالیه به دلیل ناهنجاری‌های مادرزادی رشد شبکه ترابکولار و ساختارهای زاویه محفظه قدامی در طول رشد جنین به وجود می‌آید. این بیماری با افزایش فشار داخل چشم مادرزادی (IOP) ناشی از کاهش خروج مایع زلالیه به دلیل نقص عملکرد شبکه ترابکولار مشخص می‌شود. IOP افزایش یافته، منجر به آسیب دیدگی عصب بینایی و از بین رفتن تدریجی بینایی می شود. PCG عمدتاً در ۳ سال اول زندگی بروز پیدا می کند. ژن CYP1B1 شایعترین ژن گزارش شده و در حال حاضر علت اصلی ژنتیکی شناخته شده PCG است. بیان CYP1B1 نقش مهمی در تعدیل رشد و عملکردهای شبکه ترابکولار ایفا می‌کند.

اهداف: این مطالعه به منظور بررسی جهش‌های ژنتیکی ژن CYP1B1 در ۱۱ بیمار مبتلا به بیماری گلوکوم مادرزادی اولیه در جنوب ایران با تعیین توالی اگزون‌های این ژن به روش Sanger sequencing انجام شد. همچنین میزان جهش ژن CYP1B1 در مبتلایان PCG جنوب ایران و مقایسه آن با سایر جمعیت‌ها و نیز نوع جهش‌های شایع در ژن CYP1B1 در بیماران جنوب ایران و تعیین اگزون حامل بیشترین جهش ژن CYP1B1 در مبتلایان PCG جنوب ایران، از اهداف دیگر این طرح بود.

روش: در این مطالعه ۱۱ خانواده از مبتلایان به PCG در جنوب ایران مورد مطالعه قرار گرفتند. از کلیه بیماران رضایت نامه آگاهانه اخذ گردید. شجره نامه خانوادگی بیماران نیز ترسیم گردید. اگزون‌های کد کننده ژن CYP1B1 شامل اگزون‌های ۲ و ۳، به عنوان ژن اصلی مسئول ایجاد بیماری، به روش PCR تکثیر و سپس به روش Sanger sequencing، تعیین توالی و بررسی شدند. برای یک خانواده نیز Segregation Analysis در پروباند و والدین او انجام شد. کلیه واریانت‌های یافت شده براساس گایدلاین‌های ژنتیکی مورد تفسیر قرار گرفتند.

یافته‌ها : در این مطالعه ۵ جهش متفاوت مانند (c.182G>A (p.Gly61Glu و c.1103G>A (p.Arg368His در هفت خانواده گزارش شد. تعدادی از جهش ها شایع‌ترین جهش‌ها در حدود نیمی از بیماران مورد مطالعه ما بود.

نتیجه‌گیری: درصدی ازبیماران مورد مطالعه ما حداقل یک جهش پاتوژن در ژن CYP1B1 داشتند. فراوانی جهش‌های مشاهده شده در ژن CYP1B1 در بیماران مورد مطالعه در مقایسه با سایر نژادها در دنیا و مناطق دیگر ایران اندکی متفاوت به نظر می‌رسد که این امر نشان‌دهنده نقش سایر ژن‌های شناخته شده در بیماری PCG و یا احتمال وجود ژن‌های جهش یافته ناشناخته دیگر، در این بیماران می‌باشد.

واژگان کلیدی: گلوکومای مادرزادی اولیه، ژن CYP1B1، بررسی جهش

Title: Design of shRNA against Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) RNA polymeraz gene to prevent virus replication

Zeynab mousavi[1*]; Behnaz Saffar [2]; Azam Mokhtari[3]; Leila Asadi samani[4]

.1- Department of Genetics, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
2- Department of Genetics, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
3-Department of Pathobiology, School of Veterinary medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
4-phD student in genetics, Tarbiat Modares University,Tehran,Iran

Email: zaynab.mousavi123@gmail.com

Abstract

Pancreatic necrotic disease is caused by IPNV (infectious pancreatic necrosis virus), which belongs to the genus Aquabirna virus and the family BirnaViridae. This virus is the most serious disease of(*Oncorhynchus mykiss*) virus that has been diagnosed in the breeding areas of this fish in Iran.Symptoms of the virus include exophthalmos, abdominal injury, and gill discoloration. The IPNV virus has a bifurcated genome A and B and a double-stranded RNA, the A genome fragment is larger in size and structurally and functionally includes a large ORF readable template and a small ORF readable template. The smaller genome fragment B encodes the nonstructural protein VP1. Polymerase is dependent on viral RNA and acts as a initiator in RNA synthesis. So it would be a good target for RNAi gene therapy. And sh RNA is a promising approach to the RNAi technique that allows the deletion of specific genes. The day is felt. For the antiviral application of sh RNA against IPNV, the sequence of VP1 polymerase gene related to RNA of IPN virus was first obtained from NCBI. Then, IPNV RNA-dependent VP1 polymerase gene protected regions were identified by the clustal omega online server between different strains of the virus. BLOCK-iT ™ RNAi Designer, WI siRNA selection program, www.invivogen.com/sirnawizard/ was used to design suitable shRNA molecules against protected regions of the RNA-dependent VP1 gene sequence. After discarding off-target targets, the best were selected based on overlap with protected areas and RNA loop location. An important point when designing is to check the alignment of the selected molecules with the host cell genome to ensure that these molecules are designed for the specific gene. These shRNAs were aligned with the fish genome, and three of them were selected with other priorities, such as CG%. Computational patterns confirm that this new system is effective in silencing the gene. It is therefore suggested that the shRNAs designed in this study may provide treatment for the IPNV virus.

Keywords: Infectious pancreatic necrosis(IPNV) ، RNA polymeraz ، RNAi technique ، ShRNA, Gene silencing.

عنوان مقاله : طراحی shRNA علیه ژن RNA پلی مراز ویروس عامل نکروز عفونی پانکراس (IPNV)جهت جلوگیری از تکثیر ویروس

زینب موسوی [۱*]؛ بهناز صفار [۲]؛ اعظم مختاری [۳]؛ لیلا اسدی سامانی [۴]

۱- گروه ژنتیک ، دانشگاه دولتی ، شهرکرد
۲- گروه ژنتیک ، دانشکده علوم ، دانشگاه دولتی، شهرکرد
۳-گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی ، دانشگاه دولتی ، شهرکرد
۴-دانشجوی دکتری ژنتیک ،دانشگاه دولتی تربیت مدرس ،تهران

Email: zaynab.mousavi123@gmail.com

چکیده

بیماری نکروزعفونی پانکراس ناشی از ویروس IPNV (infectious pancreatic necrosis virus) است که متعلق به جنس آکوبیرناویروس و خانواده بیرناویریده است . این ویروس به عنوان جدی ترین بیماری ویروس ماهی قزل آلای رنگین کمان است که در ایران در مناطق پرورش این ماهی تشخیص داده شده است. علایم این ویروس شامل: اگزوفتالمی ، آسیب شکمی و کم رنگ شدن آبشش ها است.

ویروس IPNV دارای ژنوم دو قطعه ایی A و B و RNA دو رشته ایی است، قطعه ژنومA اندازه بزرگتری دارد و از نظر ساختاری و عملکردی شامل یک قالب بازخواندنی ORFبزرگ و یک قالب بازخواندنی کوچک ORF است . قطعه ژنومی B با اندازه کوچکتر پروتیین غیر ساختاریVP1را کد می کند. VP1 پلی مراز وابسته به RNA ویروسی است و به عنوان آغاز گر در سنتز RNA عمل می کند. بنابراین هدف خوبی برای ژن درمانی RNAi خواهد بود. و sh RNA یک رویکرد امیدوار کننده از تکنیک RNAi است که امکان حذف ژن خاص را فراهم می کند.به لحاظ جایگاه برتر ایران در تولید ماهیان سردآبی و اهمیت IPNV در ایجاد تلفات در ماهیان، نیاز به مقابله با بیماری های مربوط به آبزیان با دانش روز احساس می شود.

به منظور کاربرد ضد ویروسی sh RNA علیه IPNV ، ابتدا توالی ژن VP1 پلی مراز وابسته به RNA ویروس IPN از NCBI به دست آمد . سپس، مناطق حفاظت شده ی ژن VP1 پلی مراز وابسته به IPNV RNA توسط سرور آنلاین clustal omega بین سویه های مختلف ویروس مشخص گردید. به منظور طراحی مولکول های shRNA مناسب علیه مناطق حفاظت شده ی توالی ژن VP1 پلی مراز وابسته به RNA از وب سرور های BLOCK-iT™ RNAi Designer ، WI siRNA selection program ، www.invivogen.com/sirnawizard/ استفاده شد. پس از دور انداختن خارج از اهداف، بهترین ها بر اساس همپوشانی با مناطق حفاظت شده و مکان یابی حلقه RNA انتخاب شدند. نکته ی قابل توجه هنگام طراحی، بررسی هم ترازی مولکول های انتخابی با ژنوم سلول میزبان است تا اطمینان حاصل گردد که این مولکول های طراحی شده برای ژن مورد نظر اختصاصی هستند. این shRNA ها با ژنوم ماهی همسو بودند و سه مورد از آنها با اولویت های دیگر مانند درصد CG انتخاب شدند.الگوهای محاسباتی تایید می کنند که این سیستم جدید در خاموش کردن ژن موثر است. بنابراین پیشنهاد می شود که shRNA های طراحی شده در این مطالعه ممکن است درمان ویروس IPNV را فراهم کند.

واژگان کلیدی : بیماری نکروز عفونی پانکراس ، ژن RNA پلی مراز ،تکنیک RNAi ، ShRNA ، خاموش سازی ژن

The effect of different concentrations of sodium nitrate on the biomass content of *spirulina* microalgae

Nayereh Beig Mohammadi[1]; Fakhri Sadat Hosseini[2*]; Gholamreza Pazuki[3]

1-Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran
2- Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran
3- Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering , Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran

** Email: F.hosseini@alzahra.ac.ir*

Abstract

Spirulina is a filamentous, spiral cyanobacterium that grows in tropical and subtropical waters with high pH and salt concentrations. *Spirulina* contains valuable nutrients such as protein, carbohydrates, lipids and chlorophyll pigments, phycocyanin and carotenoids, so it is widely used in the pharmaceutical, food, cosmetics, biofuels and wastewater treatment industries. One of the problems of *spirulina* culture is its low biomass yield, which can be changed by varying the components of the culture medium (such as sodium chloride, sodium nitrate, pH, etc.) and environmental conditions (such as light intensity, dark/light period, temperature, aeration rate, etc.) provided optimal conditions for the growth of *spirulina*, which will increase the biosynthesis of various compounds, increase biomass content and reduce production costs. *Spirulina* microalgae were prepared from the north of Iran and were sterilized in a 250 ml Erlenmeyer flasks medium containing 200 ml of culture medium with different concentrations of NaNO3 (2.5, 4, 5.5) were cultured under exactly the same conditions at 30 ° C, 15% inoculation, light/dark period of 12: 8 hours for 14 days. The presence of algae was first confirmed by microscopic methods. The absorbance of the samples was read at 750 nm on the seventh and fourteenth days and their dry weight at the end of the fourteenth day was calculated using the calibration curve of optical density and dry weight. According to the results, the amount of 1.725 ± 0.01 mg/ml in the concentration of 2.5 g/l NaNO3 provides the best conditions for biomass production and increasing the amount of NaNO3 in *spirulina* culture medium has little effect on biomass content production and even an inhibitory effect on its growth. In this study, the amount of sodium salts (sodium chloride and sodium nitrate) was investigated to increase biomass productivity.

Keywords: Biomass yield, Cultivation of algae, Nitrogen source

تاثیر غلظت‌های مختلف نمک سدیم‌نیترات بر روی میزان زیست‌توده ریزجلبک اسپیرولینا

نیره بیگ‌محمدی[۱]، فخری سادات حسینی*[۲]، غلامرضا پازوکی[۳]

۱- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم‌زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران
۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم‌زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران
۳- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران

Email: F.hosseini@alzahra.ac.ir

چکیده

اسپیرولینا یک سیانوباکتری رشته‌ای و مارپیچی شکل است که در آب‌های گرمسیری و نیمه‌گرمسیری با مقادیر pH و غلظت نمک بالا رشد می‌کند. اسپیرولینا دارای ترکیبات غذایی باارزشی نظیر پروتئین، کربوهیدرات، لیپید و رنگدانه‌های کلروفیل، فیکوسیانین و کاروتنوئید است، به همین جهت به طور گسترده‌ای در صنعت داروسازی، مواد غذایی، محصولات آرایشی، سوخت‌های زیستی و تصفیه فاضلاب کاربرد دارد. یکی از مشکلات کشت اسپیرولینا، بازدهی کم زیست‌توده آن است که می‌توان با تغییر اجزا محیط کشت (مانند میزان سدیم کلرید، سدیم نیترات، pH و...) و شرایط محیطی (مانند شدت نور، دوره تاریکی/ روشنایی، دما، میزان هوادهی و...) شرایط بهینه برای رشد اسپیرولینا را فراهم کرد که منجر به افزایش بیوسنتز ترکیبات مختلف، افزایش زیست توده و کاهش هزینه‌های تولید خواهد شد. در این مطالعه غلظت‌های مختلف نمک سدیم‌نیترات به منظور افزایش میزان زیست‌توده مورد بررسی قرار گرفت. ریزجلبک اسپیرولینا از شرکت ارگانیک الجی از ناحیه‌ی شمال ایران تهیه شد و در محیط‌کشت زاروک استریل شده در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری که حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت با غلظت‌های مختلف نمک سدیم‌نیترات (۲/۵ g/l، ۴، ۵/۵) بودند، تحت شرایط کاملا یکسان دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، تلقیح ۱۵٪، دوره نوری تاریکی/روشنایی ۱۲:۸ ساعت به مدت ۱۴ روز کشت داده شدند. در ابتدا با استفاده از روش‌های میکروسکوپی، وجود جلبک تایید شد. جذب نمونه‌ها در روزهای هفتم و چهاردهم در ۷۵۰ نانومتر خوانش شد و با استفاده از نمودار وزن خشک بر حسب جذب، میزان وزن خشک آن‌ها در پایان روز چهاردهم محاسبه شد. با توجه به نتایج به دست آمده، میزان ۰/۰۱ ± ۱/۷۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در غلظت ۲/۵ گرم بر لیتر سدیم‌نیترات بیشترین زیست‌توده را در بین نمونه‌ها تولید کرد و می‌توان گفت بهترین شرایط را برای تولید زیست‌توده بیشتر فراهم می‌کند و افزایش غلظت سدیم‌نیترات در محیط کشت اسپیرولینا تاثیر چندانی بر افزایش بازده تولید زیست‌توده نداشته و حتی غلظت‌های بالای نمک سدیم‌نیترات می‌تواند تاثیر مهاری بر روی رشد اسپیرولینا داشته باشد.

واژگان کلیدی: کشت جلبک، بیومس، منبع نیتروژن

The effect of different concentrations of trehalose and fetal calf serum (FBS) on the viability rate of canine spermatogonia stem cells

Peyman Rahimi-Feyli[1*], Amir Rasaie[2], Peyman Ghorbani[2], Tayebe mohammadi[3]

1-

2- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi university, Kermanshah

3- Resident of Theriogenolory, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi university, Kermanshah

4- Associate Professor, Department of Basic Sciences and Pathobiologies, Faculty of Veterinary Medicine, Razi university, Kermanshah

**Corresponding Author Email address: peymanrahimi@razi.ac.ir*

Abstract

Background and purpose: Cryopreservation is the best method to long-term storage population of rare cell lines, including human and animal spermatogonial stem cells in vitro. Since, the ability to preserve spermatogonial stem cells in the laboratory is a prerequisite for their biological study and subsequent use in oncologic patient, tissue engineering and assistant reproductive technologies (ART). So far, various methods, including different protocols and many cryoprotactant, have been tested to for different freezing methods (tissue and cell) and cryoprotactent. The aimed of this study is to evaluate the effect of different concentrations of FBS and Trehalose on canine SSCs viability rate (%) following defreezing.

Materials and Methods: The testicular cells of pre-pubertal canine were extracted by TESE technique, afterwards isolated by two-step enzymatic digestion method and purified by differential plating. The cells were then divided into eight experimental groups. The cryopreservation basic medium has been Dulbecco's modified Eagle *medium* **(**DMEM) containing 10% dimethyl sulfoxide (DMSO). Groups 1, 2, 3, and 4 were supplemented with 10% FBS and 0, 50, 100 and 200 mM Trehalose, respectively. Groups 5, 6, 7 and 8 were supplemented with 20% FBS and 0, 50, 100 and 200 mM Trehalose, respectively. SSCs viability rate (%) were estimated in three different stages (immediately after isolation, after adding cryoprotectant media and after thawing). Conformation of SSCs identification was performed by immunocytochemistry staining against plzf antigen.

Results: Results show that cryoprotectant does not have any toxic effects on SSCs and also, SSCs viability rate (%) in 10%FBS is higher than 20% FBS media significantly. Furthermore, SSCs viability rate in the medium containing 200 mM Trehalose is significantly higher than other groups ($P < 0.05$).

Conclusion: Generally, it seems that the freezing medium containing 10% DMSO with 10% FBS and 200 mM Trehalose is the most suitable medium for freezing canine spermatogonial stem cells.

Keywords: Stem cell, Spermatogonia, Cryopreservation, Trehalose, FBS, PLZF

تاثیر غلظت‌های مختلف ترهالوز و سرم گوساله جنینی (FBS) بر زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی سگ در فرآیند انجماد

پیمان رحیمی فیلی[۱*]، امیر رسایی[۲]، پیمان قربانی[۲]، طیبه محمدی[۳]
۱- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی، کرمانشاه
۲- دستیار تخصصی رشته تولیدمثل، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی، کرمانشاه
۳- استادیار گروه علوم پایه و پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی، کرمانشاه
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: peymanrahimi@razi.ac.ir

چکیده

سابقه و هدف: تکنیک انجماد بهترین روش برای حفظ طولانی مدت جمعیت رده های مهم سلولی از جمله سلول های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) انسان و حیوانات در شرایط آزمایشگاه و بدنبال آن استفاده این سلولها در سلول درمانی بیمارن سرطانی ، مهندسی بافت و تکنیک های کمک تولیدمثلی (تولید حیوانات تراریخته و داروهای نوترکیب) می باشد. تاکنون روشهای مختلفی از جمله پروتکلهای متفاوت و مواد محافظ انجماد زیادی برای تعیین بهترین روش انجماد (بافت و سلول) صورت گرفته است. هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی تاثیر غلظت های مختلف سرم گوساله جنینی(FBS) و ترهالوز بر درصد زنده مانی سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی سگ بود.

مواد و روش ها: بافت بیضه سگ های نابالغ با روش تکنیک TESE برداشت و سلولها بوسیله هضم آنزیمی دو مرحله ای استخراج شده و با حذف تمایزی خالص سازی گردید.سپس، سلولها به هشت گروه آزمایشی تقسیم بندی شدند. محیط پایه انجماد شامل DMEM حاوی ۱۰ درصد دی متیل سولفوکسید بود. در گروههای ۱، ۲ و ۳ و۴ از FBS با غلظت ۱۰ درصد و از ترهالوز به ترتیب با غلظت های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار و در گروه های ۵، ۶، ۷ و ۸ از FBS با غلظت ۲۰ درصد و از ترهالوز به ترتیب با غلظت های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار استفاده شد. درصد حیات سلول ها در گروه های مختلف آزمایشی در سه مرحله مختلف (بلافاصله پس از استخراج، متعاقب افزودن محیط انجماد و پس از یخ گشایی) مورد سنجش قرار گرفت. جهت شناسایی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی از رنگ آمیزی ایمنوسیتوشیمی علیه نشانگر plzfاستفاده شد.

نتایج: نتایج این مطالعه نشان میدهد مواد محافظ در برابر انجماد اثرات سمی روی اسپرماتوگونی سگ ندارند. همچنین، درصد زنده مانی این سلولها در محیط حاوی ۱۰ درصد FBS به طور معنی داری بیشتر از درصد زنده مانی آنها در محیط حاوی ۲۰ درصد FBS بود ($P<0.05$). علاوه بر درصد حیات سلول ها در محیط حاوی ترهالوز با غلظت ۲۰۰ میلی مولار ($F_{10}T_{200}$) ۶۹/۲±۴/۰۴ بطور معنی داری بالاتر از گروه های دیگر بود ($P<0.05$).

نتیجه گیری: در مجموع به نظر میرسد محیط انجماد حاوی ۱۰ درصد DMSO توام با ۱۰ درصد FBS و ۲۰۰ میلی مولار ترهالوز مناسب ترین محیط برای انجماد اسپرماتوگونی سگ مناسب است.

واژگان کلیدی: سلول بنیادی، اسپرماتوگونی ، انجماد، ترهالوز، FBS، plzf

Molecular cloning of the endolysin of *Klebsiella pneumoniae* phage KP27 in pET28a

Fatemeh Rahmati[1], Mehdi Imani[1*], Safiyeh Aghazadeh[1] and Hossein Zarei Jaliani[2]

[1]Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran;

[2]Department of Medical Biotechnology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

Abstract

Endolysins are hydrolase used by most bacteriophages to enzymatically degrade the host bacterial peptidoglycan (PG) layer at the end of their lytic multiplication cycle. Recently, interest in phages has increased due to their antibacterial potential. Special attention has been paid to endolysins, which show their activity on very dangerous and resistant pathogens such as *K. pneumoniae*. This bacterium is associated with nosocomial infections. This bacterium is associated with nosocomial infections and can express pathogens including serum resistance, capsular polysaccharides, pili and siderophores. *K. pneumoniae* is dangerous opportunistic pathogen commonly found in hospitals and natural environments. Due to its high virulence and multidrug resistance, *K. pneumoniae* is a common pathogen associated with nosocomial infections that are difficult to combat and Kp27 is a natural enemy of bacteria and as a potential antimicrobial source for controlling *Klebsiella* infections. Endolysin Kp27 has a high heat resistance compared to other endolysins. Structurally, it has a globular shape and has 140 amino acids with a molecular weight of 15.88 kDa. In this study, molecular cloning of endogenous KP27 phage of *Klebsiella* bacterium was performed into *pET28a* expression plasmid. First, with the help of bioinformatics studies and tools, its gene and protein sequences were retrieved and then, cloned between two enzymes *NcoI* and *XhoI* in plasmid *pET28a*, and finally the accuracy of cloning was confirmed by sequencing. By cloning the gene encoding endolysin KP27, recombinant protein production can be achieved, which has many applications, including the control of nosocomial pathogens and food.

Key words: Endolysin, Bacteriophage, Infection, Enzymatic Antibiotics

کلونینگ مولکولی اندولیزین فاژ KP27 کلبسیلا پنومونیه در پلاسمیدpET28a

فاطمه رحمتی[۱]، مهدی ایمانی[۱*]، صفیه آقازاده[۱] و حسین زارعی جلیانی[۲]

[۱]گروه علوم پایه ، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

[۲] گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی ، یزد، ایران

چکیده

اندولیزین‌ها آنزیم‌های هیدرولازی هستند که توسط بیشتر باکتریوفاژها برای تجزیه آنزیمی لایه پپتیدوگلیکان (PG) باکتری میزبان در انتهای چرخه ضرب لیتیکی آنها استفاده می‌شود. اندولیزین‌هایی بیشتر مورد توجه هستند که فعالیت خود را روی عوامل بیماری زای بسیار خطرناک و مقاوم به چند دارو از جمله *کلبسیلا پنومونیه* (*Klebsiella pneumoniae*) نشان می‌دهند . این باکتری که با عفونت‌های بیمارستانی در ارتباط است قادر به بیان عوامل بیماری‌زایی از جمله مقاومت سرمی، پلی ساکاریدهای کپسولی ، پیلی و سیدروفورها است. *کلبسیلا پنومونیه* یک پاتوژن فرصت طلب خطرناک است که معمولاً در بیمارستان ها و محیط های طبیعی یافت می شود و به دلیل قدرت بیماریزایی بالا و مقاومت چند دارویی یک پاتوژن شایع مرتبط با عفونت های بیمارستانی است که مبارزه با آن دشوار است و باکتریوفاژ KP27 به عنوان دشمنان طبیعی باکتری‌ها و منبع بالقوه ضد میکروبی برای کنترل عفونت‌های *کلبسیلا* است. اندولیزین KP27 دارای پایداری بالایی در برابر حرارت، نسبت به سایر اندولیزین‌ها می‌باشد. این پروتئین از نظر ساختاری کروی و دارای ۱۴۰ اسید آمینه و وزن مولکولی ۱۵/۸ کیلو دالتون است. در این مطالعه کلونینگ مولکولی اندولیزین فاژ KP27 باکتری *کلبسیلا* در پلاسمید بیانی *pET28a* انجام شد. ابتدا با کمک مطالعات و ابزارهای بیوانفورماتیک، توالی ژنی و پروتئینی آن استخراج و سپس بین دو آنزیم *NcoI* و *XhoI* در پلاسمید *pET28a* کلون شد و سرانجام صحت کلونینگ با انجام تعیین توالی تایید شد. با کلونینگ ژن کد کننده اندولیزین KP27 می‌توان به تولید و پروتئین نوترکیب آن دست پیدا کرد که دارای کاربردهای فراوانی از جمله کنترل باکتری‌های بیماری‌زای بیمارستانی و مواد غذایی می‌باشد.

کلید واژگان: اندولیزین ، باکتریوفاژ، عفونت، آنتی بیوتیک آنزیمی

Title: Design of shRNA against Infectious hematopoietic necrosis virus(IHNV) NV gene to prevent virus replication

Zahra Alaie[1*]; Behnaz Saffar[2]; Azam Mokhtari[3]; Leila Asadi Samani[4]

1-MSc student of Genetics, Shahrekord University, Shahrekord
2- Department of Genetics, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord
3- Department of Pathobiology, School of Veterinary medicine, Shahrekord University, Shahrekord
4- PhD student in Genetics, Tarbiat Modares University; Tehran, Iran

Email: Pegah,alaie@yahoo.com

Abstract

Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) is an economically important pathogen causing clinical disease and mortalities in a wide variety of salmonid species, including the main salmonid species produced in aquaculture, Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Symptoms of the disease include typical gross appearance, including darkening of the skin, pale gills, exophthalmia, petechial hemorrhages, empty gut and ascitic fluid. The main mode of infection of fish with IHNV is via water or food and to date, genes in IHNV have not been silenced by RNA interference and shRNA assisted, and no research has been done on this and no treatment has been identified for the virus. The NV gene product is essential for the efficient replication of the virus in cell culture, and pathogenicity of the virus in trout, the aim of this study was to knock down the NV gene through shRNA and the RNA interference technique (RNAi), which allows the deletion of a specific gene.

For antiviral use of shRNA against IHNV, firstly the NV gene sequence of IHNV from the standard isolate were obtained from NCBI. Second, with blast the standard sequence in NCBI, another strain from Rahbdovidae viral family was found, they had the highest homology in the NV sequence to the standard isolate that finally 12 strains with the highest homology were selected. Then, conserved regions are recognized through Clustal Omega. Subsequently, the NV gene sequence of IHNV was given to online websites for designing shRNA, such as: BLOCK-iT™ RNAi Designer, WI siRNA selection program, and siRNA Wizard software. After removing off-target sequences, the best ones were chosen based on overlapping with conserved regions and locating at RNA loop CLC genomics workbench application. An important point when designing is to check the alignment of the selected molecules with the host cell genome to ensure that these designed molecules are specific for the desired gene so these shRNAs were aligned with the fish genome and three of them were selected with other priorities such as CG%. Computational patterns confirm this new system is effective at gene silencing. Therefore, the shRNAs designed in this study may provide inhibition of the replication of infectious hematopoietic necrosis virus.

Keywords: Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV), NV gene, RNAi, shRNA, Gene silencing

عنوان مقاله : طراحی shRNA علیه ژن NV ویروس عامل بیماری نکروز عفونی بافت خونساز(IHNV) جهت جلوگیری از تکثیر ویروس

زهرااعلائی[1]*؛ بهناز صفار[2]؛ اعظم مختاری[3]؛ لیلا اسدی سامانی[4]

1- دانشجوی ارشد ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد
2- گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد
3- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی ، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد
4- دانشجوی دکتری ژنتیک، دانشگاه تربیت مدرس ، تهران ، ایران

Email: Pegah.alaie@yahoo.com

چکیده

IHNV یک پاتوژن مهم اقتصادی است که باعث ایجاد بیماری‌های بالینی و مرگ و میر در طیف گسترده‌ای از گونه‌های ماهی آزاد، از جمله گونه‌های اصلی ماهی آزاد تولیدشده در آبزی پروری، ماهی آزاد آتلانتیک (Salmo salar) و قزل‌آلای رنگین کمان (Oncorhynchus mykiss) می‌شود. علائم این بیماری شامل ظاهر ناخوشایند، تیره شدن پوست، آبشش‌های رنگ پریده، اگزوفتالمی، خونریزی‌های پتشیال، روده خالی می‌باشد. روش اصلی آلودگی با IHNV از طریق آب یا غذا است و تا به حال با روش تداخل RNA و به کمک shRNA، ژن‌های بیماری نکروز عفونی بافت خونساز خاموش نشده و تحقیقی در این باره صورت نگرفته‌است و هیچ راه درمانی برای این ویروس شناسایی نشده‌است. محصول ژن NV برای تکثیر مؤثر ویروس در کشت سلولی و بیماری‌زایی ویروس در قزل آلا ضروری است، هدف از این تحقیق خاموش سازی ژن NV از طریق shRNA و تکنیک تداخل RNA(RNAi) است که امکان حذف ژن خاص را فراهم می کند. به منظور کاربرد ضد ویروسی shRNA علیه IHNV،ابتدا توالی ژن IHNV NV ازسویه‌ی استاندارد از NCBI به دست آمد. دوم، با هم‌تراز کردن توالی استاندارد در NCBI، سویه‌های دیگری از خانواده ویروسی رابدوویریده (Rahbdovidae) یافت شد، آنها بالاترین همولوژی را در توالی NV با سویه استاندارد داشتند که در مجموع 12 تا سویه با بیشترین همولوژی انتخاب شد. سپس مناطق حفاظت شده توسط Clustal omega مشخص گردید. به منظور طراحی مولکول های shRNA مناسب علیه مناطق حفاظت شده ی توالی ژن NV از وب سرور های BLOCK-iT™ RNAi Designer ، WI siRNA selection program، siRNA Wizard software استفاده شد. پس از حذف توالی‌های خارج از هدف ، بهترین ها بر اساس همپوشانی با مناطق حفاظت شده و مکان یابی در حلقه RNA با برنامه CLC genomics workbench انتخاب شدند. نکته ی قابل توجه هنگام طراحی، بررسی هم ترازی مولکول های انتخابی با ژنوم سلول میزبان است تا اطمینان حاصل گردد که این مولکول های طراحی شده برای ژن مورد نظر اختصاصی هستند. این shRNA ها با ژنوم ماهی همسو بودند و سه مورد از آنها با اولویت های دیگر مانند CG انتخاب شدند. بنابراین احتمال دارد shRNAهای طراحی‌شده در این مطالعه مهار تکثیر ویروس نکروز خون‌ساز عفونی را فراهم کنند.

واژگان کلیدی: بیماری نکروز عفونی بافت خونساز، ژن NV، تکنیک RNAi، shRNA، خاموشی ژن

Risk of significant antibiotic resistance in *Acinobacter baumannii* isolated from burn hospital

Aysar Abbood AL Jebur[1]*, Davoud Esmaeili[1]

1. Department of Microbiology and Microbial biotechnology , faculty of life sciences and Biotechnology , Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

2. Department of Microbiology and Applied Virology Research Center.Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

esmaeili308@bmsu.ac.ir

Abstract

Background : Antibacterial resistance emerges rapidly following an increase in the consumption of antibiotics against infectious diseases . Acinetobacter baumannii are gram - negative pathogens that infections related to these multidrug -resistant pathogens are currently increasing rapidly.accurate identification of the susceptibility and resistance of these organisms to various antibiotics, both genotypically and phenotypically, is costly, but the benefits in treatment, health and wellness are significant. The present study investigates the pattern of antibiotic resistance of Acinetobacter baumannii strains.

Methods : In this study , which was performed from April 2021 to November 2021 , Acinetobacter baumannii isolated from 80 patients in Tehran hospitals then confirming the isolates by biochemical tests , their antibiotic susceptibility was determined by disk diffusion method (Kirby Bauer) according to CLSI 2021 protocol. Finally, the presence of blaSHV-1, bla AmpC, AAC6, blaVEB-1 genes was performed by PCR.

Results : Antibiotic resistance pattern for Acinetobacter baumannii show that the high rate of all resistance to antibiotics . The detection of SHV -1 (69%) , VEB -1 (60%) , AAC6 (51%) , AmpC (34%) were respectively reported too.

Conclusion : This study shows an increase in antibiotic resistance in Acinetobacter baumannii isolates by comparing the results with previous results . Due to the importance of this bacterium in hospitals due to nosocomial infections, rapid identification of these organisms and prevention their prevalence is mandatory. Moreover, the use of comprehensive antimicrobial treatment guidelines based on laboratory data and appropriate infection control interventions are essential.

Keywords: Acinetobacter baumannii , Antibiotic Resistance , β-Lactamases , PCR

خطر مقاومت آنتی بیوتیکی مهم در آسینوباکتر بومانی ایزوله شده از بیمارستان سوختگی

ایسر عبودال جبر *[1] داوود اسماعیلی[1]

۱- گروه میکروبیولوژی و زیست فناوری میکروبی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی،تهران، ایران.

۲-گروه میکروبیولوژی و مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی، دانشگده علوم بزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران.

esmaeili308@bmsu.ac.ir

چکیده

مقدمه: آسینتوباکتر بومانی پاتوژن گرم منفی می باشند که در حال حاضر عفونت های مرتبط با این پاتوژن های مقاوم به چند دارو بشدت در حال افزایش می باشند.شناسایی دقیق حساسیت و مقاومت این دو ارگانیسم به آنتی بیوتیک های مختلف هم به روش ژنوتیپی و هم فنوتیپی هرچند هزینه بر است ولی سودهایی که در بخش درمان، بهداشت و سلامت دارد قابل توجه می باشد.مطالعه حال حاضر الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های آسینتوباکتر بومانی را بررسی می نماید.

مواد و روش ها: این مطالعه که از فروردین ماه سال ۱۴۰۰ تا آبان ۱۴۰۰ انجام گرفت ۸۰سویه از ایزوله های آسینتوباکتر بومانی از بیمارستان منتخب تهران جمع آوری گردید. پس از تایید ایزوله ها با تست های بیوشیمیایی، حساسیت آنتی بیوتیکی آنها به روش کربی بائر طبق پروتکل CLSI ۲۰۲۱تعیین گردید.حضور ژن های-blaSHV, 1,blaAmpC, ,AAC6, blaVEB-1با استفاده از روش PCR بررسی گردید.

نتایج: میزان فراوانی ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی آسینتوباکتر بومانی دربیمارستان سوختگی ژن , VEB-1 (۶۰ %) , SHV -1 ۶۹%) , AmpC (۳۴%) , AAC6 (۵۱%)

نتیجه گیری: این مطالعه نشان دهنده افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های آسینتوباکتر بومانی با توجه به مقایسه نتایج به دست آمده با نتایج گذشته می باشد با توجه به اهمیت این باکتری در بیمارستان ها به سبب عفونت های بیمارستانی شناسایی سریع این ارگانیسم ها و جلوگیری از شیوع آنها الزامی می باشد.

کلمات کلیدی: آسینتوباکتر بومانی ، مقاومت آنتی بیوتیکی ، بتالاکتاماز ، پی سی آر

Evaluation of effect of chicory extract-loaded in polymeric carrier on LncRNA MEG3 and cellular methyltransferases genes expression and apoptosis in Huh-7 cells

Faezeh Shahmohammadi[1*]; Majid Sadeghizadeh[1]

1- Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran

**Corresponding Author Email address: sadeghma@modares.ac.ir*

Abstract

Liver cancer is the sixth most common cancer and the fourth leading cause of cancer death worldwide, with a poor prognosis and resistance to chemotherapy. Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary malignancy of the liver and responsible for more than 80 percent of cases. Despite therapeutic advances in recent years, HCC has shown high resistance to treatment. Therefore, new diagnostic and therapeutic approaches are needed. Epigenetic therapy is useful in reversing some of the cancer defects because of reversibility of the epigenetic alterations. Many plant sources, currently used to treat cancer or other diseases, are naturally multi-purpose, safe, inexpensive and accessible. Chicory is a dicotyledonous plant containing inulin that has various biological functions such as antioxidant and anti-inflammatory activities. MEG3 is a tumor suppressor long non-coding RNA being expressed in many normal tissues. Methylation of MEG3 promoter region elicits the decrease in its expression in HCC cells. The aim of this study was to evaluation the effect of chicory extract-loaded in polymeric carrier on the expression level of methyltransferases 1, 3a and 3b and the tumor inhibitory gene MEG3. We first performed MTT assay to evaluate the effect of chicory extract and chicory extract-loaded in polymeric carrier on cell viability at 24 and 48 hours. Chicory extract-loaded in polymeric carrier has lethal properties at a much lower concentration than chicory extract. The cells were treated with chicory extract-loaded in polymeric carrier according to IC50, at 24 and 48 hours. Then we measured the expression of MEG3, DMNT1, DNMT3a and DNMT3b genes before and after treatment by the use of Real Time PCR technique. The results showed chicory extract-loaded in polymeric carrier could increase the expression of down-regulated MEG3 and decrease the expression of up-regulated methyltransferases 1, 3a and 3b in Huh-7 cells. The effect of chicory extract-loaded in polymeric carrier on apoptosis of Huh-7 cells was also investigated using flow cytometry at 24 and 48 hours. The results illustrated 50 percent of Huh-7 cells were in late apoptosis stage after treatment.

Keywords: Hepatocellular Carcinoma, Chicory, Epigenetic, LncRNA, Methylation

بررسی اثر عصاره‌ی کاسنی بارگذاری شده در حامل پلیمری بر بیان ژن‌های LncRNA MEG3 و متیل ترنسفرازهای سلولی و آپوپتوز در سلول‌های Huh-7

فائزه شاه محمدی[1*]؛ مجید صادقی زاده[1]

1 - گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

Email: sadeghma@modares.ac.ir

چکیده

سرطان کبد ششمین سرطان شایع و چهارمین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در سراسر جهان، با پیش آگهی ضعیف و مقاومت در برابر شیمی‌درمانی است. کارسینوم هپاتوسلولار (HCC)، سرطان اولیه کبد است و تا ۹۰ درصد از کل بدخیمی‌های کبدی را تشکیل می‌دهد. علیرغم پیشرفت‌های درمانی در سال‌های اخیر، HCC مقاومت بالایی در برابر درمان نشان می‌دهد. از این رو رویکردهای جدید تشخیصی و درمانی مورد نیاز است. درمان اپی‌ژنتیکی سرطان به دلیل برگشت پذیری تغییرات اپی‌ژنتیکی، در بهبود برخی از نقایص سرطان مفید است. بسیاری از منابع گیاهی، که در حال حاضر برای درمان سرطان و یا سایر بیماری‌ها استفاده می شوند، به طور طبیعی داری چند هدف هستند و ایمن، ارزان و در دسترس می‌باشند. کاسنی گیاهی دولپه‌ای حاوی اینولین است که عملکردهای مختلف بیولوژیکی مانند فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و ضد التهابی دارد. MEG3 یک RNAی طویل غیر کد کننده سرکوبگر تومور است که در بسیاری از بافت‌های نرمال بیان می‌شود. متیلاسیون ناحیه پروموتر MEG3 باعث کاهش بیان آن در سلول‌های HCC می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره کاسنی بارگذاری شده در حامل پلیمری بر سطح بیان متیل ترنسفرازهای ۱، 3a و 3b و ژن مهار کننده‌ی تومور MEG3 است. ابتدا سنجش MTT را برای بررسی اثر عصاره کاسنی و عصاره کاسنی بارگذاری شده در حامل پلیمری بر زنده مانی سلول در ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام دادیم. عصاره کاسنی بارگذاری شده در حامل پلیمری نسبت به عصاره کاسنی، در غلظت بسیار پایین تری خاصیت کشندگی دارد. سپس سلول‌های Huh-7 را توسط عصاره کاسنی بارگذاری شده در حامل پلیمری مطابق با IC50 بدست آمده، در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار کردیم. سپس میزان بیان ژن‌های MEG3، DMNT1، DNMT3a و DNMT3b قبل و بعد از تیمار را با استفاده از تکنیک Real Time PCR سنجیدیم. نتایج بدست آمده نشان داد که عصاره کاسنی بارگذاری شده در حامل پلیمری می‌تواند باعث افزایش بیان MEG3 و کاهش بیان متیل ترنسفرازهای ۱، 3a و 3b در سلول‌های Huh-7 شود. اثر عصاره کاسنی بارگذاری شده در حامل پلیمری بر آپوپتوز سلول‌های Huh-7 نیز توسط فلوسایتومتری در ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی شد، نتایج نشان داد که سلول‌های Huh-7 پس از تیمار به سمت آپوپتوز می‌روند.

واژگان کلیدی: کارسینوم هپاتوسلولار، کاسنی، اپی ژنتیک، رونوشت بلند غیرکدکننده، متیلاسیون

Evaluation of effect of milk thistle-loaded in nano micelle on miRNA-155-3p, SOCS2 expression and apoptosis in Huh-7 cells

Saghar Rahnama[1]; Majid Sadeghizadeh[1*]; Sadegh Babashah[1]

1- Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Author Email address :Sadeghma@modares.ac.ir*

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is responsible for 90% of all cancers. Milk thistle is a dicotyledonous plant and grows very well in regions of Iran. This plant is very popular because of its anti-cancer properties. Non-coding transcripts (ncRNAs), an evolutionarily conserved family, serve as potential modulators of gene expression at the post-transcriptional level. Effect of milk thistle on microRNAs and its target genes has been studied in different cancers. Among known onco microRNAs, mir-155-3p plays an important role in various cancers such liver cancer. This microRNA shows an up-regulated expression in liver cancer. In contrast, SOCS2 gene shows a down-regulated expression in liver cancer. SOCS2 gene can be used as a prognosis biomarker in liver cancer, and its increased expression reduces the viability of liver cancer cells. We obtained the IC50 of milk thistle extract loaded in nanoparticle by the use of MTT test at 24 and 48 hours. In addition, we compared the effect of milk thistle extract and milk thistle extract loaded in nanoparticle on cancer cells proliferation. We found that milk thistle extract loaded in nanoparticle is able to kill Huh-7 cancer cells at lower concentrations toward milk thistle extract. We treated the cancer cells with concentrations below IC50 of milk thistle extract loaded in nano-particle at 24 and 48 hours and evaluated the expression of mir-155-3p and SOCS2 by the use of real time PCR before and after treatment. Results showed that milk thistle extract loaded in nano-particle can reduce the elevated expression of mir-155-3p and increase the reduced expression of SOCS2 in Huh-7 cells. These changes in the expression were significant (p-value < 0.05). Moreover, we evaluated the effect of milk thistle extract loaded in nano particle on the apoptosis of huh-7 cell at 24- and 48-hours using flow cytometry. The results of flow cytometry showed milk thistle extract loaded in nano particle gives rise to late apoptosis of huh-7 cells. Therefore, using of plant extracts such as milk thistle extract loaded in nano particle can speed up the process of cancer treatment as a powerful supplement.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, Nano milk thistle, microRNA, Apoptosis

بررسی عصاره‌ی خارمریم بارگذاری شده در نانومیسل بر بیان mir-155-3p، ژن SOCS2 و آپوپتوز در سلول‌های Huh-7

ساغررهنما[1]؛ مجید صادقی زاده[1*]؛ صادق باباشاه [1]

1 - گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

E-mail: Sadeghma@modares.ac.ir

چکیده

هپاتوسلولار کارسینوما (HCC) مسئول نود درصد از کل موارد سرطان کبد می‌باشد. خارمریم یک گیاه دو لپه‌ای می‌باشد و در بخش‌هایی از ایران رشد خوبی دارد که به علت خاصیت ضد سرطانی آن بسیار مورد توجه هست. رونوشت‌های غیر کد کننده (ncRNAs) که یک خانواده‌ی از لحاظ تکاملی محافظت شده می‌باشند، به عنوان تعدیل کننده‌های بالقوه بیان ژن‌ها در سطح پس از رونویسی می‌باشند. آن‌ها فرآیندهای سلولی نظیر آپوپتوز را از طریق تغییر بیان ژن‌ها در HCC تنظیم می‌کنند. . اثرگذاری عصاره‌ی خارمریم در تغییر بیان بعضی از miRNAs و ژن‌های هدف آن‌ها در برخی از سرطان‌ها مطالعه شده است. در میان انکومیرهای شناخته شده، miR-155 نقش بسیار مهمی را در بسیاری از سرطان ها از جمله کبد بازی می کند. این میکروآر ان آ در سرطان کبد بیان بسیار بالایی را نشان می دهد. برعکس، ژن SOCS2 بیان پایینی را در سرطان کبد نشان می دهد. ژن SOCS2 می‌تواند به عنوان یک بیومارکر پیش آگاهی در سرطان کبد باشد و بیان افزایش یافته‌ی آن باعث کاهش زنده مانی سلول‌های سرطانی کبدی می‌شود. ما با استفاده از تست MTT میزان IC50 عصاره‌ی خارمریم بارگذاری شده در نانومیسل را در ۲۴ و ۴۸ ساعت بدست آوردیم. همچنین یک اثر مقایسه‌ای بین عصاره‌ی خارمریم و خارمریم بارگذاری شده در نانومیسل بر تکثیر سلول سرطانی انجام دادیم که نشان دادیم عصاره‌ی خارمریم بارگذاری شده در نانومیسل در غلظت بسیار پایین تری قادر به از بین بردن سلول‌های سرطانی Huh-7 است. ما سلول‌های سرطانی را با غلظت زیر IC50 از عصاره ی خارمریم بارگذاری شده در نانومیسل در ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار کردیم و بیان ژن mir-155-3p و SOCS2 را قبل و بعد از تیمار با استفاده از تکنیک real-time PCR سنجش کردیم که نتایج حاصل از این تست نشان داد که عصاره‌ی خارمریم بارگذاری شده در نانومیسل قادر به کاهش بیان mir-155-3p افزایش یافته و افزایش بیان ژن SOCS2 کاهش یافته در این رده ی سلولی با p-value کمتر از 0.05 می باشد. همچنین اثر عصاره‌ی خارمریم بارگذاری شده در نانومیسل را در ۲۴ و ۴۸ ساعت بر روی آپوپتوز سلول‌های Huh-7 با استفاده از فلوسایتومتری سنجش کردیم و به این نتیجه رسیدیم که سلول‌های Huh-7 به سمت Late apoptosis کشیده می‌شوند.

کلمات کلیدی: هپاتوسلولار کارسینوما، نانوخارمریم، میکروآرانآ، آپوپتوز

Cloning, Expression, Purification and Determination of Receptor Binding Domain of SARS-CoV-2

Zahra Moazezi[1*]; Majid Sadeghizadeh[1]; Reza Hassan Sajedi[2]

1- Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Email: sadeghma@modares.ac.ir

Abstract

Our world is currently grappling with a virus that has caused a pandemic and killed many people and severely endangered the social and economic situation of countries. The cause of corona disease is SARS-CoV-2, a virus from the SARS family that has caused other epidemics in the last century. This virus uses its own surface spike protein to enter the host cell and binds to the ACE2 surface protein for enter its genetic material into the cell and infect it.

Therefore, in studies related to this virus, spike protein and especially the receptor binding region of this protein is very important for researchers, because the inhibition of this protein and its receptor binding region give rise to prevention of its binding to the cell surface protein and the cell does not allow the virus from entry.

As a result, become more and more familiar with the virus genome and its proteins will help us to understand better and find the possible ways to prevent and treat it.

Cloning is one of the methods by which we can amplify the genes of this virus and purify its proteins so that we can benefit from them in future studies. For this purpose, in this study, we amplified the RBD region from the commercial plasmid containing the spike fragment of Sinobiological company and after checking the correct amplification of the gene by gel electrophoresis, it was cloned in the PET28a expression vector once with GFP and once in wild type. Then, we inserted the expression vector into Rosetta and BL21 strains and induced protein synthesis and RBD expression in host cells with different concentrations of IPTG.

Finally, to evaluate and confirm the synthesis of recombinant protein in the cell, we examined the green light from GFP using a fluorescence microscope and used SDS gel to confirm the synthesis of wild protein.

Keywords: Virus, COVID19, RBD, Spike, Cloning

کلونینگ، بیان، خالص سازی و تعیین ویژگی قطعه‌ی اتصال به گیرنده(RBD) ژن اسپایک ویروس کرونای جدید

زهرا معززی طهران خواه[1]*؛ مجید صادقی زاده[1]؛ رضا حسن ساجدی[2]

1 - گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
2 - گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

Email: sadeghma@modares.ac.ir

چکیده

در حال حاضر دنیای ما درگیر دست و پنجه نرم کردن با ویروسی است که عامل ایجاد پاندمی شده است که تعداد زیادی از انسان ها را به کام مرگ کشیده و وضعیت اجتماعی و اقتصادی کشورها را به شدت به خطر انداخته است. نام عامل ایجاد کننده‌ی بیماری کرونا، SARS-CoV-2 است که ویروسی از خانواده‌ی SARS بوده که در قرن اخیر همه‌گیری‌های دیگری را نیز ایجاد کرده‌اند. ویروس کرونای جدید برای ورود به سلول میزبان از پروتئین اسپایک سطح خود استفاده و با اتصال به پروتئین سطحی ACE2 ماده‌ی ژنتیکی خود را وارد سلول و عفونت‌زایی می‌کند. از این رو در مطالعات مرتبط با این ویروس پروتئین اسپایک آن و علی‌الخصوص ناحیه‌ی اتصال به گیرنده در این پروتئین بسیار مورد توجه محققان قرار دارد، چرا که با مهار این پروتئین و ناحیه اتصال به گیرنده‌ی آن و جلوگیری از اتصال آن به پروتئین سطحی سلول می‌شود جلوی ورود ویروس به سلول میزبان را گرفت. به همین منظور آشنایی هر چه بیشتر با ژنوم ویروس و همچنین پروتئین‌های آن به ما کمک خواهد کرد تا راه‌های احتمالی برای درمان و پیشگیری از ابتلا به آن را بهتر و بیشتر بشناسیم. کلونینگ یکی از روش‌هایی است که به وسیله‌ی آن می‌توانیم ژن‌های این ویروس را تکثیر و پروتئین‌های آن را خالص‌سازی کنیم تا در مطالعات بعدی از آن‌ها بتوانیم بهرهمند گردیم.

بدین منظور در این تحقیق ما از روی پلازمید تجاری حاوی قطعه اسپایک شرکت Sinobiological ناحیه RBD را تکثیر کرده و پس از بررسی تکثیر صحیح ژن توسط ژل الکتروفورز، آن را در وکتور بیانی PET28a یکبار به صورت نوترکیب با GFP و یک مرتبه به صورت وحشی کلون کرده، سپس وکتور بیانی را وارد سویه Rosetta و BL21 کرده و با غلظت‌های مختلف IPTG سنتز پروتئین و بیان RBD در سلول میزبان را القا کردیم. در آخر برای بررسی و تایید سنتز پروتئین نوترکیب در سلول با استفاده از میکروسکوپ فلوروسانس نور سبز رنگ حاصل از GFP را مورد بررسی قرار داده و برای تایید سنتز پروتئین وحشی از ژل SDS استفاده کردیم.

واژگان کلیدی: ویروس، کرونای جدید، ناحیه اتصال به گیرنده، اسپایک، تکثیر ژن

Bioinformatics studies of the position of 172 of Aspergillus flavus urate oxidase to evaluate structural stability and unfolding properties

Mozhgan Sabet[1], Bagher Seyedalipour[1*], Mehdi Imani[2], Mohammad Pazhang[3]

[1] Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Mazandaran, Iran

2 Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

3 Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Science, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

*Corresponding author: E-mail: b.seyedalipour@umz.ac.ir

Abstract

Urate oxidase (UOX), which is also known as uricase, is an important enzyme in purine degradation. It catalyzes uric acid degradation and produces allantoin, which is much more soluble than uric acid. during the evolutionary process, urate oxidase activity seems to have been lost in some higher primates including human, which prevents uric acid from breaking down. The accumulation of uric acid in the body can result in hyperuricemia. Urate oxidase is used for the treatment of hyperuricemia and gout. The low stability of protein drugs such as UOX is a significant drawback in their liquid solutions. Therefore, protein engineering can be used to improve thermostability enzymes. The aim of this study was to investigate the substitution of Glu to Ile at position 172 of urate oxidase to evaluate the structural properties and stability. In this study, the amino acid sequence of uricase was extracted from UniProt database and investigated by servers including I-Mutant, iStable, DynaMut, PremPS, Hope Server. Analysis with I-Mutant server at 25°C and pH 7 showed an increase in stability with ΔG=0.49Kcal/mol. Input information for the stability prediction process in the iStable integrated server was loaded with PDB ID:1R56, the temperature of 25°C, and pH=7. iStable server, predicting protein thermal stability changes by integrating various characteristic modules, confirmed the increase of enzyme stability with ΔG = 0.52 Kcal/mol. The PremPS server, predicting the impact of point mutations on protein stability, has reported an increase of stability protein mutant (ΔG=0.58 Kcal/mol) in comparison with wild type. The basis of DynaMut server analysis includes entropy changes, enzyme flexibility analysis, prediction of interactions, and analysis of altered energies between mutant and wild type. The results of E172I were obtained by DynaMut server: ΔΔG: 1.338 kcal/mol (Stabilizing) and ΔΔSVib ENCoM: 0.391 kcal.mol^{-1}. K^{-1} (Increase of molecule flexibility). With the Hope Server, the second structure, charge and size, alterations of bonds, and hydrophobicity of mutant were

analyzed and compared with wild type. The results of studying these servers have confirmed changes in stability, structure, and intermolecular interactions of the enzyme in 172 locations. In this regard, to evaluate the conformational and structural stability of both wild type and mutated uricase from the bioinformatic servers was used. Insights obtained from this study provide guidelines for the experimental design of recombinant uricase with increased stability.

Keywords: Bioinformatics server, Hyperuricemia, E172I variant, Uricase

مطالعات بیوانفورماتیکی مربوط به موقعیت ۱۷۲ آنزیم اورات اکسیداز آسپرژیلوس فلاووس جهت ارزیابی پایداری ساختاری و خصوصیات واتاپی

مژگان ثابت[۱]، باقر سیدعلیپور[۱*]، مهدی ایمانی[۲]، محمد پاژنگ[۳]

۱گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، مازندران، ایران

۲گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳ گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

*نویسنده مسئول: E-mail: b.seyedalipour@umz.ac.ir

چکیده

اورات اکسیداز (UOX) که به اوریکاز نیز معروف است، آنزیم مهمی در تجزیه پورین ها است که فرایند تجزیه اسیداوریک راکاتالیز می کند و باعث تولید آلانتوئین می شود که نسبت به اسیداوریک بسیار محلول تر است. در طول فرایند تکاملی فعالیت اورات اکسیداز در برخی از پریمات های عالی از جمله انسان ازبین رفته است، که این امر باعث عدم تجزیه اسیداوریک می گردد. تجمع اسید اوریک در بدن منجر به هایپراوریسمی می شود. اورات اکسیداز جهت درمان هایپراوریسمی و نقرس استفاده می شود. یکی از نقص های قابل توجه پروتئین های دارویی مانند اورات اکسیداز (UOX) پایداری کم آنهاست. بنابراین میتوان از مهندسی پروتئین برای بهبود پایداری حرارتی آنزیم استفاده کرد. هدف ازاین مطالعه جایگزینی اسیدآمینه گلوتامیک اسید به ایزولوسین در موقعیت ۱۷۲ آنزیم اورات اکسیداز جهت ارزیابی خصوصیات ساختاری و پایداری آنزیم می باشد. در این مطالعه توالی اسیدآمینه اوریکاز از پایگاه داده UniProt استخراج و توسط سرورهایی شامل:I-Mutant , iStable , DynaMut , PremPS , Hope Server بررسی شد. آنالیز با سرور I-Mutant در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و pH=7 افزایش پایداری با ΔG: 0.49 kcal/mol نشان داد. اطلاعات ورودی برای انجام فرایند پیش‌بینی پایداری در سرور یکپارچه iStable، با فایل ورودی PDB ID:1R56، دما ۲۵°C و pH=7 بارگذاری شد. سرور iStable، با پیش بینی تغییرات پایداری حرارتی پروتئین با یکپارچگی مدول های مشخصه مختلف، افزایش پایداری آنزیم را با :ΔG 0.52 kcal/molتایید نمود. سرور PremPS با پیش بینی تاثیر جهش های نقطه ای برروی پایداری پروتئین، افزایش پایداری پروتئین جهش یافته(ΔG: 0.58 kcal/mol) در مقایسه با نوع وحشی را گزارش کرده است. اساس آنالیز سرور DynaMut بررسی هایی شامل : تغییرات آنتروپی، بررسی انعطاف پذیری آنزیم، پیش بینی برهمکنش ها و آنالیز انرژی های تغییریافته بین تیپ وحشی و جهش یافته می باشد. نتایج حاصل ازجهش یافته E172I توسط سرور DynaMut : پایداری با ΔΔG: 1.338 kcal/mol (Stabilizing) و افزایش انعطاف پذیری با ENCoM: 0.391 kcal.mol^{-1}.K^{-1} $\Delta\Delta S_{Vib}$ بدست آمد. به کمک Hope Server، ساختار

دوم، بار و اندازه، تغییرات پیوندها و هیدروفوبیسیته جهش یافته آنالیز و با تیپ وحشی مقایسه شد. نتایج حاصل از مطالعه این سرورها تغییرات پایداری، ساختار و برهمکنش های بین مولکولی آنزیم را درموقعیت ۱۷۲ تایید کرده است. در همین راستا، برای ارزیابی پایداری ساختاری اوریکاز وحشی و جهش یافته از سرورهای بیوانفورماتیک استفاده شد. بینش به‌دست‌آمده از این مطالعه دستورالعمل‌هایی را برای طراحی آزمایشی اوریکاز نوترکیب با افزایش پایداری ارائه می‌کند.

کلید واژه : سرورهای بیوانفورماتیک ، هایپراوریسمی، جهش یافته E172I ، اوریکاز

Investigation of structural and stability characterization of Aspergillus flavus uricase mutant enzyme in position 274 using bioinformatics servers

Hatameh Jafarpor[1], Bagher Seyedalipour[1*], Mehdi Imani[2], Mohammad Pazhang[3]

[1] Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Mazandaran, Iran

2 Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

3 Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Science, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

*Corresponding author: E-mail: b.seyedalipour@umz.ac.ir

Abstract

Urate oxidase (UOX) is a homotetramer enzyme with a molecular weight of 135 kDa contains 302 amino acids. Uricase is one of the oxidoreductase enzymes that catalyzed the degradation of uric acid (insoluble) to allantoin (soluble). Human beings and many of the great primates lost this enzyme due to nonsense mutations during evolution. So, a lack of uricase causes the accumulation of uric acid in the blood and causes hyperuricemic diseases such as gout. Uricase can be used as an enzymatic drug to treat these diseases, but one of the disadvantages of uricase Aspergillus flavus in enzyme therapy is its low thermal stability. To solve this problem, protein engineering can be used by the site-directed mutagenesis method. The purpose of this study was to evaluate the position of 274 uricase enzymes (N274I) to check the enzyme′s stability. We utilized I-Mutant, iStable, DynaMute, and PremPS servers for obtaining the necessary information to check the stability and structural changes of the mutant enzyme and compared to wild type. In this study, the sequence of the amino acid uricase with code 1R56 was extracted from UniProt. I-Mutant server calculates the structural stability changes of a protein related to a single nucleotide mutation per unit of free energy, as well as predicts destructive and pathogenic mutations. After analyzing the I-Mutant server, the stability of the protein at 25 ° C and pH 7 with ΔG = 0.66 Kcal/mol was predicted. Server iStable predicted the increase of stability of the enzyme with ΔG = 0.688 Kcal/mol at 25 ° C and pH 7. PreamPS Server which analyzes the effect of single mutations on stability and Gibbs free energy changes, shows an increase in stability with ΔG = 0.33 Kcal/mol. Server DynaMut predicts the impact of mutations on protein conformation, flexibility, and stability. Results from this server showed ΔG = 0.149 Kcal/mol and a decrease in entropy and the flexibility of the mutant protein compared to wild type. This consensus approach is for the more accurate and reliable prediction of both stabilizing and destabilizing mutations. Further, this data help to investigate a wide variety of

applications, ranging from protein functional analysis, optimization of stability, and understanding the role of mutations in diseases. Therefore, the insights obtained from the study of bioinformatic servers provide a guideline for the experimental development of uricase drugs for treating gout and related diseases.

Keywords: Urate oxidase, Gout, N274I variant, Bioinformatics server

بررسی ویژگی های ساختاری و پایداری آنزیم جهش یافته اوریکاز آسپرژیلوس فلاووس درموقعیت ۲۷۴ توسط سرور های بیوانفورماتیکی

حاتمه جعفرپور[۱]، باقر سیدعلیپور[۱*]، مهدی ایمانی[۲]، محمد پاژنگ[۳]

۱-گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، مازندران، ایران

۲-گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

*نویسنده مسئول: *E-mail: b.seyedalipour@umz.ac.ir*

چکیده

اورات اکسیداز (UOX) آنزیم هموتترامر با وزن مولکولی ۱۳۵ کیلو دالتون دارای ۳۰۲ اسید آمینه می باشد. اوریکاز جزء آنزیم های اکسیدوردوکتاز می باشد که در تجزیه اسیداوریک نامحلول به الانتوئین محلول نقش دارد. انسان و تعداد زیادی از نخستین های عالی این آنزیم را به دلیل جهش های بی معنی در طول تکامل از دست دادند. بنابراین کمبود اوریکاز سبب تجمع اسید اوریک در خون و ایجاد بیماری های هایپراورسیمی مانند نقرس می شود. اوریکاز می تواند به عنوان داروی آنزیمی برای درمان این بیماریها استفاده شود، اما یکی از معایب اوریکاز آسپرژیلاوس فلاوس در آنزیم درمانی پایداری حرارتی پایین آنهاست. برای رفع این مشکل می توان از مهندسی پروتئین به روش جهش زایی هدف داراستفاده کرد. هدف از این مطالعه بررسی موقعیت ۲۷۴ آنزیم اوریکاز(N274I) جهت بررسی پایداری آنزیم می باشد. برای بدست آوردن اطلاعات لازم جهت بررسی تغییرات پایداری و ساختاری آنزیم جهش یافته و مقایسه آن با آنزیم وحشی از سرورهای I-Mutant, iStable, DynaMute, PremPS, استفاده شد. در این مطالعه توالی اسیدآمینه اوریکاز با کد 1R56 از پایگاه داده UniProt استخراج شد. سرور I- Mutant تغییرات پایداری ساختاری پروتئین مربوط به یک جهش تک نوکلئوتیدی را در واحد انرژی آزاد محاسبه می‌کند، همچنین جهش‌های مخرب و بیماری زا را پیش بینی می‌کند. پس از آنالیز سرور I-Mutant ، پایداری پروتئین را در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و pH=7 با ΔG=0.66 Kcal/mol پیش بینی شد. سرور iStable افزایش پایداری انزیم را با ΔG=0.688 Kcal/mol در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و pH=7 پیش بینی کرد. سرورPremPS که تأثیر

تک جهش ها بر روی پایداری، ساختار پروتئین و تغیرات انرژی آزاد گیبس بررسی میکند افزایش پایداری را با ΔG=0.33 Kcal/mol را نشان داد .سرور DynaMute تأثیر جهش ها را بر ساختار پروتئین، انعطاف پذیری و پایداری پیش بینی می کند. نتایج حاصل از این سرور ΔG=0.149 Kcal/mol پیش بینی کرد و همچنین کاهش آنتروپی و کاهش انعطاف پذیری پروتئین جهش یافته نسب به حالت وحشی را نشان داد. . این رویکرد اجماع برای پیش‌بینی دقیق‌تر و مطمئن‌تر جهش‌های پایدارکننده و ناپایدارکننده است. علاوه بر این، این داده ها به بررسی طیف گسترده ای از کاربردها، تجزیه و تحلیل عملکردی پروتئین، بهینه سازی پایداری و درک نقش جهش در بیماری ها کمک می کند. بنابراین، بینش به‌دست‌آمده از مطالعه سرورهای بیوانفورماتیک، راهنمایی برای توسعه آزمایشی داروی اوریکاز برای درمان نقرس و بیماری‌های مرتبط با آن است.

کلمات کلیدی : اورات اکسیداز، نقرس، جهش یافته N274I، سرورهای بیوانفورماتیکی

The effects of nano-micelles containing milk thistle extract on expression levels of oncogenic lncRNA SNHG5 in hepatocellular carcinoma cell lines (Huh-7)

Zahra Yousefi Yeganeh[1*];Sadegh Babashah[1]; Majid Sadeghizade [1]

1- Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Email: babashah@modares.ac.ir

Abstract

Hepatocellular carcinoma is one of the most leading causes of death in the world. It ranks sixth of the incidence of malignant tumors, and third of mortality in the world. Although numerous therapies and molecular mechanisms have been discovered, their effectiveness is still limited due to the high rate of metastasis or recurrence, and the overall survival rate of malignant cancers remains low. Long non-coding RNAs (lncRNAs) are a class of regulatory RNAs, longer than 200 nucleic acids that do not have ability to encode proteins or peptides. lncRNAs regulate gene expression and function at the transcriptional, translational, and post-translational levels. They perform in variety of biological functions. In recent decades, lncRNA has been shown to play an important role in the pathogenesis of many diseases, including cancer, metabolic disorders, and in particular, tumor growth, metastasis, cellular processes, and drug resistance. Milk thistle is a dicotyledonous plant that grows well in parts of Iran. The effect of nano-micelles containing milk thistle extract on altering the expression of some lncRNAs and their target genes has been studied in some cancers. Oncogenic lncRNAs such as SNHG5, which have been shown to be highly expressed in some cancers, including HCC, stimulate cell proliferation, migration, and invasion of HCC cells, inhibit apoptosis in these cells, and ultimately promote HCC cancer.

For this purpose in this study, after culturing the Huh-7 cell line using MTT assay, we examined the cell proliferation rate in Huh-7 cells treated with nano-micelles containing milk thistle extract at 24 and 48 hour And obtaining IC50, we showed that nanomicelles containing milk thistle extract at lower concentrations than extract have the ability to kill Huh-7 cells. Thus, Huh-7 cells were treated with concentrations below IC50 at 24 and 48 hours, and expression of SNHG5 was measured before and after treatment using real time PCR. It showed a decrease in expression of SNHG5 with p-value is less than 0.05 in these cells. In addition, we examined the apoptosis of Huh-7 cells treated with nano-micelles containing milk thistle extract at 24 and 48 hour using flow cytometry. As a result, nano-micelles containing milk thistle extract increased the rate of apoptosis in huh-7 cancer cells.

Keywords: Hepatocellular Carcinoma, Nano-micelles milk thistle, Long non-coding RNAs, Apoptosis

بررسی اثر نانومیسل های حاوی عصاره ی خار مریم بر بیان lncRNA انکوژنیک SNHG5 در رده سلولی کارسینومای هپاتوسلولار (Huh-7)

زهرا یوسفی یگانه[1]*؛ صادق باباشاه[1]؛ مجید صادقی زاده[1]
1 - گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

Email: babashah @modares.ac.ir

چکیده

هپاتوسلولار کارسینوما از مهمترین دلایل مرگ ناشی از سرطان در جهان می‌باشد. از نظر بروز تومورهای بدخیم در رتبه ششم، و از نظر میزان مرگ و میر در رتبه سوم جهان است. گرچه روش‌های درمانی متعدد و مکانیسم‌های مولکولی مرتبطی کشف شده است، اما تاثیر آن‌ها به علت نرخ بالای متاستاز یا عود، هنوز محدود و میزان بقای کلی سرطان‌های بدخیم همچنان پایین است. رونوشت‌های غیرکدکننده بلند (lncRNA) دسته‌ای از رونوشت‌های RNA تنظیمی با طول بیش از ۲۰۰ نوکلئوتیداند که توانایی رمزگذاری پروتئین‌ها را ندارند. lncRNAها با تنظیم بیان و عملکردهای ژنی در سطوح رونویسی، ترجمه و پس از ترجمه؛ عملکردهای بیولوژیکی متنوعی را دارند. در گذشته نشان داده شده که lncRNA در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان، اختلالات متابولیکی نقش زیادی دارد و به طور خاص، نشان داده که نقش مهمی در رشد تومور، متاستاز، فرآیندهای سلولی و مقاومت دارویی دارد. خارمریم گیاهی دو لپه‌ای است که در بخش‌هایی از ایران نیز رشد خوبی دارد. اثر نانومیسل‌های عصاره‌ی خارمریم در تغییر بیان برخی از lncRNA و ژن‌های هدف آن‌ها در برخی از سرطان‌ها مطالعه شده است. lncRNA های انکوژنیک مانند SNHG5 بیان بالایی را در برخی از سرطان‌ها از جمله HCC نشان داده که منجر به تحریک تکثیر سلولی، مهاجرت و تهاجم در سلول‌های HCC شده و آپوپتوز را در این سلول‌ها مهار می‌کنند و در نهایت باعث پیشرفت سرطان HCC می‌شوند.

ما در این تحقیق بعد از کشت رده‌ی سلولی Huh-7 ، با استفاده از تست MTT میزان تکثیر سلولی را در سلولی Huh-7 تیمار شده با نانو میسل های حاوی عصاره‌ی خار مریم در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی کردیم و بعد از بدست آوردن IC50 ، نشان دادیم که نانومیسل های حاوی عصاره‌ی خار مریم در غلظت های پایین تری نسبت به عصاره‌ی خار مریم توانایی از بین بردن سلول های Huh-7 را دارند. بدین ترتیب سلول های Huh-7 را با غلظت زیر IC50 در بازه های زمانی ۲٤ و ٤٨ ساعت تیمار کرده و بیان LncRNA SNHG5 را قبل و بعد از تیمار با استفاده از روش real- time PCR سنجش کردیم که نتایج حاصل نشان دهنده‌ی کاهش بیان LncRNA SNHG5 در این رده سلولی با p-value کمتر از ۰،۰۵ می باشد. با استفاده از فلوسایتومتری میزان آپپتوز سلول های Huh-7 تیمار شده را در بازه‌های زمانی ۲٤ و ٤٨ ساعت را بررسی و به این نتیجه رسیدیم که نانومیسل های حاوی عصاره‌ی خارمریم باعث افزایش آپپتوز در Huh-7 می شود.

واژگان کلیدی: هپاتوسلولار کارسینوما، نانو میسل خارمریم، رونوشت‌های غیرکدکننده بلند، آپوپتوز

Synthesis of microcapsules containing herbicide with polyhydroxyalcanoate produced by a luminescent *Vibrio* bacteria

Arefe N.Ahmadi[1]; Mansour Mashreghi[1,2]*; Ali Ganjeali[1]; Mohammad Hasan Mohassel Rashed[3]

1- Department of Biololgy, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad
2-Industrial Biotechnology Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad
3- Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad

*Email: mashrghi@um.ac.ir

Abstract

Polyhydroxyalkanoates are polymers with a polyester structure that are produced by a variety of bacteria under specific conditions, including a high carbon to nitrogen ratio. These polymers are produced and stored as granules inside the cell. These polymers have received a lot of attention due to their suitable properties such as biodegradability, biocompatibility and processibility, and therefore have been studied for use in various fields including medicine, pharmaceuticals, agriculture and bioplastics production. One of the applications of this polymer includes producing compounds for controlled release of active ingredients such as drugs or agrochemicals that can increase their duration of action as well as reduce their adverse side effects.

To produce polyhydroxyalkanoate, *Vibrio* sp. (VLC) was cultured in nutrient broth medium containing salt and glycerol and after 48 hours, the bacteria were centrifuged and dried in a freez-dryer. SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) was used to extract the polymer from the bacteria. The polymer was finally centrifuged and dried in a freeze-dryer. The structure of the polymer extracted from the bacteria was investigated using FTIR (Fourier-transform infrared) and XRD (X-ray diffraction) analyzes. FTIR showed the presence of C=O, C-O-C, CH3 and OH groups in the polymer, which are important groups in PHA. Also, the presence of a peak at a point of 20 degrees on the XRD spectrum is a sign of PHA. Finally, the results of these analyzes were compared and matched with the standard PHA. Also, the production efficiency of this polymer in *Vibrio* bacteria was calculated and it was close to 25%, which is an acceptable amount. Emulsion method was used to make microcapsules. In this method, the organic phase containing a combination of bacterial polymer and herbicide in chloroform and the aqueous phase containing PVA (Polyvinyl alcohol) solution were prepared. Then the organic phase was added to the aqueous phase and after evaporation of chloroform, the microcapsules were centrifuged and dried with a freeze-dryer. The structure of the obtained microcapsules was examined by FTIR and XRD analyzes and their shape was examined by a light microscope. The results of structural analysis showed that the herbicide was combined with bacterial polymer and their shape showed that the produced microcapsules were completely spherical and also the size distribution was almost uniform.

Keywords: Bacterial Polymer, Biodegradable, Controlled Release, Agrochemicals

ساخت میکروکپسول حاوی علف کش با پلی هیدروکسی آلکانوات تولید شده توسط باکتری ویبریوی لومینسانس

عارفه نخل احمدی[۱]؛ منصور مشرقی[۱و۲*]؛ علی گنجعلی[۱]؛ محمدحسن راشد محصل[۳]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی، مشهد
۲- گروه تحقیقاتی بیوتکنولوژی صنعتی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی، مشهد
۳- گروه اگروتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد

Email: mashrghi@um.ac.ir

چکیده

پلی هیدروکسی آلکانوات ها (PHA) پلیمرهایی هستند که توسط باکتری های مختلفی در شرایط خاص محیطی از جمله نسبت بالای منبع کربن به نیتروژن تولید می شوند. این پلیمرها به صورت گرانول هایی در داخل سلول ساخته و ذخیره می شوند. این پلیمرها به دلیل ویژگی های مناسب زیادی از جمله زیست تخریب پذیری، زیست سازگاری و قابلیت تغییر پذیری مورد توجه زیادی قرار گرفته و به همین علت برای استفاده در زمینه های مختلفی از جمله پزشکی، دارویی، کشاورزی و ساخت پلاستیک های زیستی مورد بررسی قرار گرفته اند. از موارد کاربرد این پلیمر می توان به ساخت ترکیباتی برای آزادسازی کنترل شده مواد فعال مانند داروها و یا مواد شیمیایی کشاورزی اشاره کرد که می تواند باعث افزایش طول مدت اثر آن ها و همچنین کاهش اثرات منفی ناخواسته آن ها شود. برای تولید پلی هیدروکسی آلکانوات، باکتری ویبریو (*Vibrio* sp. VLC) در محیط نوترینت براث حاوی نمک و گلیسرول کشت داده شد و بعد از گذشت ۴۸ ساعت، باکتری ها سانتریفیوژ و با دستگاه فریزدرایر خشک شدند. برای استخراج پلیمر از باکتری از SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) استفاده شد. پلیمر در نهایت سانتریفیوژ شده و با دستگاه فریزدرایر خشک شد. ساختار پلیمر استخراج شده از باکتری با استفاده از آنالیزهای FTIR (Fourier-transform infrared) و XRD (X-ray diffraction) بررسی شد. FTIR حضور گروه های C=O، C-O-C، CH3 و OH را در پلیمر نشان داد که گروه های شاخص در PHA می باشند. همچنین وجود قله در نقطه ۲۰ درجه در نمودار XRD از نشانه های PHA است. در نهایت نتایج این آنالیزها با PHA استاندارد مقایسه و مطابقت داده شد. همچنین بازده تولید این پلیمر در باکتری ویبریو محاسبه شد و نزدیک به ۲۵ درصد بود که میزان قابل قبولی است. برای ساخت میکروکپسول از روش امولسیون استفاده شد. در این روش فاز آلی حاوی ترکیب پلیمر باکتریایی و علف کش در کلروفرم و فاز آبی شامل محلول PVA (Polyvinyl alcohol) تهیه شد. سپس فاز آلی به فاز آبی اضافه شده و پس از تبخیر کلروفرم در نهایت میکروکپسول های ساخته شده سانتریفیوژ و با دستگاه فریز درایر خشک شد. ساختار میکروکپسول های به دست آمده با آنالیزهای FTIR و XRD و شکل آن ها به کمک میکروسکوپ نوری بررسی شد. نتایج آنالیزهای ساختاری نشان داد که علف کش با پلیمر باکتریایی ترکیب شده و بررسی شکل آن ها نشان داد که میکروکپسول های تشکیل شده کاملا کروی بوده و همچنین توزیع اندازه در آن ها تقریبا یکنواخت بود.

واژگان کلیدی: پلیمر باکتریایی، زیست تخریب پذیر، آزادسازی کنترل شده، مواد شیمیایی کشاورزی

Study the association of G(-866)A polymorphism in UCP2 gene with presbycusis risk

Faezeh Karimnia[1]; Isa Jorjani[1*]; Omid Jazayeri[2]; Hossein sabouri[3]; Mohammad Karimian[4]

1-Master student of Genetics, Department of biology ,Faculty of basic of science, Gonbad kavous University, Gonbad, Iran
1*- Assistant Professor of Department of biology ,Faculty of basic of science, Gonbad kavous University, Gonbad, Iran
2- Assistant professor of Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of basic of science University of Mazandaran, Babolsar, Iran
3- Associate professor of Department of Plant Production, Collage of Agriculture, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran
4- Assistant professor of Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of basic of science University of Mazandaran, Babolsar, Iran

Email : eisa_jorjani@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: Presbycusis or ARHL is the most common aging diseases worldwide. According to the World Health Organization criteria, approximately one third of people over the 65 years suffer from this disease. Various genetic and environmental factors are involved in the development of presbycusis. One of the most important factors involved in pathology of presbycusis is oxidative stress, which is caused by an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and its excretion, resulting in the accumulation of ROS and cell damage. UCP2 is one of the most important genes involved in oxidative stress pathway. The protein encoded by this gene is located in the inner membrane of mitochondria and is involved in controlling the level of ROS. This study aimed to investigate the association of rs659366 single nucleotide polymorphism in UCP2 gene with the risk of presbycusis.

Materials and Methods: In a case-control study, 30 healthy individuals and 30 cases with presbycusis were randomly enrolled. After blood collection from all participants, PCR-RFLP method was used to determine the genotype of the mentioned polymorphism. The association between this polymorphism and presbycusis disease was also investigated using SPSS ver.19 statistical software.

Results: Data analysis showed that AG genotype (OR: 1.6558, 95% CI= 0.5786-4.7391, *P*= 0.3472), AA genotype (OR: 0.6959, 95%CI= 0.0497-7.4154, *P*= 0.6959), and allele A (OR= 1.1597, 95%CI= 0.5151 to 2.6111, *P*= 0.7205) were not associated with presbycusis risk.

Conclusions: According to the above-mentioned findings, the G(-866)A polymorphism in UCP2 gene is not associated with the risk of presbycusis. However, this study is a pilot test and more sample size is needed to achieve more accurate results.

Keywords: ARHL, Aging, Genetic Polymorphism, RFLP-PCR, Oxidative stress

بررسی ارتباط پلی مورفیسم G(-866)A ژن UCP2 با ریسک ابتلا به بیماری پیرگوشی

فائزه کریم نیا[۱]؛ عیسی جرجانی[۱*]؛ امید جزایری[۲]؛ حسین صبوری[۳]؛ محمد کریمیان[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران
*۱- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبدکاووس ، گنبد کاووس، ایران
۲- استادیار گروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
۳- دانشیار گروه امور زراعی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران
۴- استادیار گروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

Email: eisa_jorjani@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: پیرگوشی یا اختلال شنوایی مرتبط با سن، از شایع ترین بیماری های سنین پیری در سراسر جهان محسوب می شود. بنا بر گزارشات سازمان جهانی بهداشت تقریبا یک سوم افراد بالای ۶۵ سال از این بیماری رنج می برند. عوامل ژنتیکی و محیطی مختلفی در ایجاد پیرگوشی نقش دارند. از جمله مهم ترین عوامل دخیل در پاتولوژی این اختلال، استرس اکسیداتیو است. این فرآیند توسط عدم تعادل بین تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) و دفع آن ایجاد می شود و نتیجه آن تجمع ROS و آسیب به سلول ها می شود. UCP2 از مهمترین ژن های دخیل در مسیر استرس اکسیداتیو می باشد. پروتئین حاصل از این ژن در غشای داخلی میتوکندری واقع شده و در کنترل میزان ROS نقش دارد. هدف از این تحقیق بررسی ارتباط پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs659366 موجود در ژن UCP2، با ریسک ابتلا به پیرگوشی می باشد.

مواد و روش ها: در یک مطالعه مورد-شاهدی، ۳۰ فرد سالم و ۳۰ فرد بیمار مبتلا به پیرگوشی به طور تصادفی وارد مطالعه شدند. پس از خونگیری از همه افراد شرکت کننده در مطالعه، از روش PCR-RFLP جهت تعیین ژنوتایپ پلی مورفیسم موردنظر استفاده شد. ارتباط این پلی مورفیسم با بیماری پیرگوشی نیز با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ver. 19 مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: آنالیز داده ها نشان داد که ژنوتایپ AG (P= 0.3472 , 95%cl: 0.5786 to 4.7391, OR: 1.6558) ژنوتایپ AA (P= 0.6959, 95%cl: 0.0497 to 7.4154, OR: 0.6959) و آلل A (P = 0.7205, 95%cl: 0.5151 to 2.6111, OR: 1.1597) با ریسک ابتلا به پیرگوشی ارتباط ندارند.

نتایج: با توجه به یافته های بالا پلی مورفیسم G(-866)A ژن UCP2 با ریسک ابتلا به بیماری پیرگوشی ارتباط ندارند. با این حال، این مطالعه یک آزمون پایلوت محسوب می شود و دستیابی به نتایج دقیقتر نیاز به حجم نمونه بیشتری می باشد.

واژگان کلیدی: اختلال شنوایی مرتبط با سن، پیری، پلی مورفیسم ژنتیکی، RFLP-PCR، استرس اکسیداتیو

Association study of rs1057035 polymorphism in Dicer gene with risk of preeclampsia

Fatemeh Koohi[1]; Saeed Irian[1]; Omid Jazayeri[2*]; Mohamad Karimian[2]

1- Department of cell and molecular biology- Faculty of Biological sciences Kharazmi University Tehran-Iran
2- Department of molecular and cell biology- Faculty of basic of science- University of Mazandaran- Babolsar-Iran

* *o.jazayeri@umz.ac.ir*

Background and aim: Preeclampsia is a common and specific complication of pregnancy that usually occurs with high blood pressure and protein excretion in the third trimester of pregnancy. About 5 to 7% of pregnant women suffer from preeclampsia and it is the second leading cause of death in pregnant women worldwide. This disease is a multifactorial disorder and is defined as a systemic syndrome. Various genetic and environmental factors are involved in the development of this disease. Genetic factors include the variations in genes involved in miRNA biogenesis pathway. In this study, we investigated the association of rs1057035 single nucleotide polymorphism in the Dicer gene, an important gene involved in pathway of of the miRNA biogenesis pathway, with the risk of preeclampsia in an Iranian population.
Materials and methods: This study was carried out on 31 pregnant women with preeclampsia and 32 healthy pregnant women. We determined the genotype of rs1057035 by RFLP-PCR method and examined the association between this polymorphism and preeclampsia using SPSS ver.19 statistical software.
Results: Regardin to the data analysis, TC genotype (OR = 0.48 (95% CI: 0.1089 to 2.1297), P = 0.3353) CC genotype (OR = 2.89 (95% CI: 0.1127 to 74.1731), p = 0.5214) and C allele with (OR = 0.84 (95% CI: 0.24 to 2.93), p = 0.7964) were not associated with the risk of preeclampsia.
Conclusions: According to the study findings, the rs1057035 polymorphism of the Dicer gene has no significant association with preeclampsia risk. However, our sample size is small and to obtain more accurate outcome, further studies with larger sample size are required.

Keywords: blood pressure, pregnancy, miRNA biogenesis pathway, genotyped, RFLP-PCR

بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs1057035 در ژن دایسر با ریسک ابتلا به پره اکلامپسی

فاطمه کوهی[۱]؛ سعید آیریان [۱]؛ امید جزایری [۲*]؛ محمد کریمیان [۲]

۱- گروه سلولی و ملکولی، دانشکده علوم زیستی ، دانشگاه خوارزمی، تهران
۲- گروه سلولی و ملکولی، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه مازندران، بابلسر

Email::o.jazayeri@umz.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: پره اکلامپسی یک نوع عارضه شایع و اختصاصی در دوران بارداری است که به طور معمول همراه با فشار خون بالا و دفع پروتئین در سه ماهه سوم بارداری ایجاد می شود. حدود ۵ تا ۷ درصد زنان باردار دچار پره اکلامپسی می شوند و دومین عامل مرگ و میر مادران باردار در سطح جهان می باشد. این بیماری، یک اختلال چند عاملی و به عنوان یک سندرم سیستمیک تعریف می شود. عوامل ژنتیکی و محیطی مختلفی در ایجاد پره اکلامپسی دخیل هستند. از جمله عوامل ژنتیکی دخیل در پاتوژنز این بیماری می توان به واریته های ژنتیکی موجود در ژن های مسیر بیوژنز miRNA اشاره کرد. در این تحقیق قصد داریم ارتباط پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs1057035 موجود در ژن دایسر بعنوان یکی از ژن های مهم مسیر بیوژنز miRNA را با ریسک ابتلا به پره اکلامپسی در یک جمعیت ایرانی مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش ها: این مطالعه برروی ۳۱ خانم باردار مبتلا به پره اکلامپسی و ۳۲ خانم باردار سالم انجام گرفت. واریته ی مورد نظر به روش RFLP-PCR تعیین ژنوتایپ شد و ارتباط این واریته با بیماره پره اکلامپسی، با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ver.19 مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها : با توجه به آنالیزداده ها، ژنوتایپ TC (OR= 0.48 (95% CI: 0.1089 to 2.1297), P=0.3353) ژنوتایپ CC (OR = 2.89 (95%CI: 0.1127 to 74.1731), p =0.5214) و آلل C با (OR= 0.84 (95%CI: 0.24 to 2.93), p =0.7964) ارتباطی با ریسک ابتلا به پره اکلامپسی نداشتند.

نتیجه گیری: با توجه به یافته های مطالعه، پلی مورفیسم rs1057035 از ژن دایسر با بیماری پره اکلامپسی ارتباط معنی داری ندارد. البته حجم نمونه های ما کوچک است و برای دستیابی به نتایج دقیق تر، به مطالعات بعدی با حجم نمونه بزرگتر نیاز است.

واژگان کلیدی: فشار خون، حاملگی، مسیر بیوژنز miRNA، تعیین ژنوتایپ، RFLP-PCR

lncRNA-miRNA-mRNA axes in cancer

Reza Ranji[1]

M.Sc student, Department of Genetics, Tarbiat Modares University

Email: ranjireza@modares.ac.ir

Abstract

Background: Non coding RNAs are expressed in a wide range of cancers. According to the role of cell signaling pathways in initiation, progression and metastasis of cancer, lncRNAs and miRNAs that are involved in these pathways can influence on all of the tumorgenesis aspects. Therefore, those can perform as oncogenes or tumor suppressors.

Objectives: This study attempts to investigate the regulatory function of lncRNAs through lncRNA-miRNA-mRNA axes that have immense potential as a therapeutic target in cancer.

Methods: The content of the current study is drawn from published literatures in PubMed and google scholar between 2015 and 2021.

Results: Besides the regulation that both miRNAs and lncRNAs alone exert on mRNAs, it has been reported that they interact with one another, further modulating their influence in the transcriptome. In cancer, the most prevalent lncRNA-miRNA interaction is the presence of lncRNAs acting as decoys for miRNAs. LncRNAs that bind miRNAs and prevent their interaction with their target are regarded to as competitive endogenous RNAs (ceRNAs), decoys or sponges. LncRNAs acting as sponges are effectively positive regulators of mRNA transcripts. It is worth mentioning that at least 10-40% of human mRNAs are a target for miRNAs through targeting their 3`UTR region. Interestingly, most lncRNAs capture miRNAs using regions close to their 3′ end named miRNA Response Elements (MRE). Competitive endogenous RNAs influence a wide range of biological processes and dysregulation of lncRNA-miRNA-mRNA axes is the cause of various cancerous mechanisms. For instance, their role has been revealed in EMT , recurrence related to CSCs and drug resistance in breast cancer.

Discussion: Regarding the specific interaction between lncRNAs and miRNAs and its effect on the expression of mRNAs, the lncRNA-miRNA-mRNA axis can be oncogenic or tumor-suppresive. Further studies in this field lead to our increased knowledge of cancer pathology and contribution to the development of potential diagnostic biomarkers and therapeutic targets.

Keywords: lncRNA, miRNA, mRNA, cancer

محرظور های lncRNA-miRNA-mRNA در سرطان

رضا رنجی[۱]

۱-گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

Email: ranjireza@modares.ac.ir

چکیده

مقدمه: رونوشت های غیرکدکننده در طیف وسیعی از سرطان ها به طور نامعمولی بیان می شوند. با توجه به نقش مسیرهای پیام رسانی سلولی در آغاز سرطان، پیشرفت آن و متاستاز ، رونوشت های غیرکدکننده بلند (lncRNAs) و کوچک (miRNAs) درگیر در این مسیرها می توانند بر همه جنبه های تومورزایی تاثیر بگذارند، بنابراین قادرند در نقش انکوژن یا سرکوبگر تومور عمل کنند

اهداف: این مطالعه تلاش می کند تا عملکرد تنظیمی lncRNA ها را از طریق محورهای lncRNA-miRNA-mRNA در سرطان بررسی کند که پتانسیل زیادی را در هدفگیری درمانی دارد.

روش تحقیق: محتوای مطالعه حاضر از مقالات منتشرشده در پایگاه های داده PubMed و Google Scholar در بین سال های ۲۰۱۵ تا ۲۰۲۱ استخراج شده است.

نتایج: علاوه بر تنظیمی که lncRNA ها و miRNA ها به تنهایی بر روی mRNA ها اعمال می کنند، این دو نوع RNA از طریق میانکنش با یکدیگر نیز در ترانسکریپتوم تاثیر می گذارند. شایع ترین میانکنش lncRNA-miRNA در سرطان، حضورlncRNA ها به عنوان طعمه هایی برای miRNA هاست. lncRNA هایی که به miRNA ها متصل شده و از میانکنش آنها با هدفشان جلوگیری می کنند، به عنوان RNA های درونی رقابتی(ceRNA) ، طعمه ها یا اسپانج ها در نظر گرفته می شوند. اسپانج ها به طور موثری تنظیم کننده های مثبت رونوشت های mRNA هستند. شایان ذکر است که حداقل ۱۰ تا ۴۰ درصدmRNA های انسانی از طریق هدف گیری ناحیه `UTR ۳ شان مورد هدف miRNA ها قرار می گیرند. به طور جالبی بیشترlncRNA ها با استفاده از نواحی نزدیک به انتهای `3 شان که عناصر پاسخ به miRNA (MRE) نامیده می شوند، miRNAها را به دام می اندازند. ceRNA ها طیف وسیعی از فرآیندهای بیولوژیکی را تحت تاثیر قرار می دهند و بدتنظیمی محورهای lncRNA-miRNA-mRNA عامل مکانیسم های سرطانی مختلف است. برای مثال در سرطان پستان نقش آن ها در گذار اپیتلیال مزانشیم ، عود مجدد مرتبط با سلول های بنیادی سرطانی و مقاومت دارویی مشخص شده است.

نتیجه گیری: با توجه به میانکنش ویژه بین lncRNA ها و miRNA ها و تاثیر آن بر بیان mRNA ها ، محور lncRNA-miRNA-mRNA می تواند نقش انکوژنی یا سرکوبگری تومور داشته باشد. مطالعات بیشتر در این زمینه منجر به دانش افزایش یافته ما درباره پاتولوژی سرطان و کمک به گسترش بیومارکر های تشخیصی و اهداف درمانی بالقوه خواهد شد.

واژگان کلیدی: رونوشت های غیرکدکننده بلند , میکرو آر ان آ , رونوشت های کدکننده , سرطان

assosiation between miR-149 single nucleotide polymorphism and ovarian cancer

N. Tajoddin[1*]; S. Talesh Sasani[1]; F. Fakor[2]

1- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Guilan
2- Associate Professor, Department of Medical, Faculty of Medical Sciences, Guilan University of Medical Science

** Email: Niloofartajoddin@gmail.com*

Abstract

Ovarian cancer (OC) is ranked the fifth leading causes of cancer death in women and is also the most lethal gynaecological malignancy in the developed world. Up to 75% of women are diagnosed at advanced stage (stage III and IV). Currently, the 5year survival rate after diagnosis is only 29% at advanced stage, with 52% of the deaths occurring in women aged 60 years and above. The most deaths from serous type of OC include genetic mutations in PTEN, BRCA1, BRCA2, TP53, and expression of WT1, ERα and PAX8, and their effects on DNA repair, leading to genomic instability. SNPs in miRNA genes such as miR149 rs2292832 may affect their function by altering miRNA expression, thus contributing to cancer. The gene encoding miR149, is located on the long arm of chromosome 2, Far away from the centromere. rs2292832 (T>C) are in the non-translational region or intron on this gene and is another pre-miRNA SNP that was studied in diverse cancers. mir-149 CT and CT/CC genotypes were associated with lower risk of liver cancer, while C allele of hsa-mir-149 may have a potentially protective role in male gastric cancer. In spite of these findings, studies failed to detect significant associations between rs2292832 and other malignant tumors, such as lung cancer, ovarian cancer and colorectal cancer. In this study, blood samples were collected from 20 patients with ovarian cancer and 20 healthy individuals. Then we designed specific primers using Oligo7 software and genotyping carried out by tetra-primer amplification refractory mutation system PCR. Finally, data analysis was performed by MedCalc software. Chi-square test was used in order to evaluate the significant level of genotypic distribution differences between cases and controls. Based on this test, significant difference was observed in genotypic distribution of *miR149* (rs2292832) polymorphism between healthy and control groups (χ^2=8.08, P=0.01). In addition, presence of CC genotype was associated with higher risk of ovarian cancer (OR=2.51; 95% CI=1.27-4.96, P=0.007) In conclusion, functional miR149 promoter polymorphism (rs2292932) may affect the Ovarian cancer susceptibility. However, further studies on different ethnic groups and also examination of other functional genetic polymorphisms of miR149 gene are required to confirm our results.

Keywords: Serous, SNP, rs2292832, Tetra- ARMS PCR, Chi-Square

ارتباط بین پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی miR-149 و سرطان تخمدان

نیلوفر تاج الدین[1*]؛ سهیلا طالش ساسانی[1]؛ فرشته فکور[2]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت
۲- گروه پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت

Email: Niloofartajoddin@gmail.com

چکیده

سرطان تخمدان (OC)، پنجمین علت مرگ ناشی از سرطان و همچنین کشنده ترین بدخیمی زنان در کشورهای توسعه یافته است. تا ۷۵ درصد از زنان در مراحل پیشرفته (مرحله III و IV) تشخیص داده می شوند. در حال حاضر، میزان بقای ۵ ساله پس از تشخیص تنها ۲۹ درصد در مراحل پیشرفته است که ۵۲ درصد از مرگ و میرها در زنان ۶۰ ساله و بالاتر رخ می دهد. بیشترین مرگ و میر ناشی از نوع سروزی OC شامل جهش های ژنتیکی در PTEN، BRCA1، BRCA2، TP53 و بیان WT1، ERα و PAX8 و اثرات آنها بر ترمیم DNA است که منجر به ناپایداری ژنومی می شود. SNPها در ژن‌های miRNA مانند miR149 rs2292832 ممکن است با تغییر بیان miRNA بر عملکرد آن‌ها تأثیر بگذارند و در نتیجه در ایجاد سرطان نقش داشته باشند. ژن رمزکننده miR149، در بازوی بلند کروموزوم ۲، بسیار دور از سانترومر واقع شده است. rs2292832 (T>C) در ناحیه غیر ترجمه‌ای یا اینترون روی این ژن قرار دارد و یکی دیگر از SNP های pre-miRNA است که در سرطان های مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. ژنوتیپ های mir-149 CT و CT/CC با کاهش ابتلا به سرطان کبد مرتبط بودند، در حالی که الل C hsa-mir-149 ممکن است نقش محافظتی بالقوه ای در سرطان معده مردان داشته باشد. علی‌رغم این یافته‌ها، مطالعات نتوانستند ارتباط قابل‌توجهی بین rs2292832 و سایر تومورهای بدخیم مانند سرطان ریه، سرطان تخمدان و سرطان روده بزرگ را شناسایی کنند. در این مطالعه از ۲۰ بیمار مبتلا به سرطان تخمدان و ۲۰ فرد سالم نمونه خون جمع آوری شد. سپس پرایمرهای اختصاصی را با استفاده از نرم افزار Oligo7 طراحی کردیم و ژنوتیپ با استفاده از سیستم PCR جهش تقویت کننده تترا پرایمر انجام شد. در نهایت تجزیه و تحلیل داده ها توسط نرم افزار MedCalc انجام شد. تست Chi-Square به‌منظور ارزیابی میزان قابل توجه تفاوت پراکندگی ژنوتیپی بین افراد کنترل و بیمار به‌کار گرفته شد. طی این بررسی، تفاوت قابل توجهی بین پراکندگی ژنوتیپی برای پلی‌مورفیسم rs2292832 ژن miR149، در بین گروه‌های کنترل و بیمار مشاهده شد (χ^2=8.08, P=0.01). علاوه بر آن، حضور ژنوتیپ CC با خطر افزایش ابتلا به سرطان تخمدان همراه می‌باشد (OR=2.51; 95% CI=1.27-4.96, P=0.007). در نتیجه پلی‌مورفیسم پروموتری عملکردی ژن miR149 (rs2292832) ممکن است بر استعداد ابتلا به سرطان تخمدان تأثیرگذار باشد. مطالعات بیشتر روی تفاوت نژادی گروه‌ها و همچنین بررسی سایر پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی عملکردی ژن miR149 برای تأیید نتایج مطالعه ما مورد نیاز است.

واژگان کلیدی: سروز، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی، rs2292832، Tetra-ARMS PCR، کای اسکوئر

The effect of a novel mutation in loop VI of human superoxide dismutase on the structure and enzymatic activity

Nastaran Namadian1; Bagher Seyedalipour 2*; Saman Hosseinkhani 3

1- Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Mazandaran, Iran.
2- Bagher seyedalipour, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Mazandaran, Iran.
3- Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

E-mail: b.seyedalipour@umz.ac.ir

Abstract

The human superoxide dismutase (hSOD1) is a 32 kDa homodimer, and each subunit has a copper ion with a catalytic role, a zinc ion with a structural role, and an intramolecular disulfide bond, that catalyzes two molecules of superoxide anion into hydrogen peroxide and water. More than 180 different mutations in the SOD1 gene have been reported, which are associated with the familial form of amyotrophic lateral sclerosis (FALS), many of which are due to amino acid replacement. Protein misfolding and protein aggregations are common features in patients with neurodegenerative diseases, such as ALS. In this study, by substituting leucine to phenylalanine (L106F) at position 106, the effect of mutation on enzymatic activity and structural properties and also compared with WT-SOD1 were investigated. The pET-28a(+) vector, which contains the SOD1 gene, was amplified using the site-directed mutagenesis Quick-change method. The amplified product was digested using the DpnI enzyme and transformed into E.coli BL21 (DE3) using the chemical method heat shock. IPTG inducers were used for expression in the bacterial system. Protein purification was performed using Ni-NTA affinity chromatography. The results of bioinformatics servers showed the destructive effect of mutations on protein structure. The specific activity of wild-type and L106F mutant was 7031.25 and 2812.5 U/mg at a concentration of 0.1 mM pyrogallol, respectively. Increased mutant intrinsic fluorescence compared to wild-type indicates structural changes and tryptophan exposure in a non-polar environment. The results of structural fluorescence studies with ANS showed an increase in hydrophobic pockets and in the L106F mutant a decrease in fluorescence emission indicated a decrease in hydrophobic surface pockets at the protein. Overall, our results showed that mutations in loop VI lead to structural changes and implications for the initiation of ALS. Further studies on loop VI provided clearer evidence for the pathogenicity and its association with the ALS phenotype.

Keywords: Site-directed mutagenesis, Amyotrophic lateral sclerosis, L106F mutant

تأثیر جهش جدید در لوپ VI سوپراکسید دیسموتاز انسانی بر ساختار و فعالیت آنزیمی

نسترن نمدیان[۱]؛ باقر سیدعلیپور[۲*]؛ سامان حسینخانی[۲]

۱- گروه زیست شناسی سلولی مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر
۲- گروه زیست شناسی سلولی ولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر
۳-گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

Email: b.seyedalipour@umz.ac.ir

چکیده

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز انسانی (SOD1) یک هومودیمر ۳۲ کیلو دالتون است و هر زیر واحد آن دارای یک یون مس با نقش کاتالیک، یک یون روی با نقش ساختاری و یک پیوند دی سولفیدی درون مولکولی می باشد که دو مولکول آنیون سوپراکسید را به هیدروژن پراکسید و آب کاتالیز می کند. در ژن کدکننده این آنزیم بیش از ۱۸۰ نوع جهش مختلف شناسایی شده است که اکثر این جهش ها به دلیل جایگزینی آمینواسید است و با فرم ارثی بیماری اسکلروز جانبی آمیوتروفیک (FALS) در ارتباط است. بدتاخوردگی پروتئین و تجمع پروتئینی از ویژگی های مشترک بین بیماری های تحلیل برنده عصبی از جمله ALS می باشد. در این پژوهش با جایگزینی اسیدآمینه ی لوسین به فنیل آلانین (L106F) در موقعیت ۱۰۶، تاثیر جهش یافته بر فعالیت و خصوصیات ساختاری و مقایسه آن با پروتئین وحشی مورد بررسی قرار گرفت. از وکتور pET- 28a(+) که حاوی ژن کد کننده سوپراکسید دیسموتاز ۱ است، استفاده شد و بعد از طراحی پرایمرها جهش زایی هدفدار با روش (Quick-change PCR) انجام شد. محصول تکثیر با استفاده از آنزیم *DpnI* هضم و به باکتری *E.coli* BL21(DE3) به روش شیمیایی شوک حرارتی منتقل شد. برای بیان پروتئین در سیستم باکتریایی، از القاء کننده IPTG استفاده شد. جهت تخلیص پروتئین از کروماتوگرافی تمایلی ستون نیکل آگارز استفاده شد. نتایج سرورهای بیوانفورماتیکی، تاثیر مخرب جهش بر ساختار پروتئین را نشان دادند. بیشترین فعالیت آنزیم طبیعی و جهش یافته ی L106F به ترتیب ۷۰۳۱/ ۲۵ U/mg و ۲۸۱۲/۵ U/mg در غلظت ۰/۱ پیروگالول بدست آمد. افزایش نشر فلورسانس ذاتی جهش یافته نسبت به نوع وحشی نشان دهنده تغییرات ساختاری و قرار گرفتن تریپتوفان در محیط غیرقطبی می باشد. کاهش نشر فلورسانس با ANS حاکی از کاهش پاکت‌های هیدروفوب در سطح پروتئین جهش یافته بود. به طور کلی نتایج ما نشان داد، جهش در لوپ VI منجر به تغییرات ساختاری و تسهیل بیماری ALS می شود. مطالعات بیشتر بر روی لوپ VI به تایید بیماری زایی و ارتباط آن با فنوتیپ بیماری ALS کمک می کند.

واژگان کلیدی: جهش زایی هدفدار، اسکلروزجانبی آمیوتروفیک، جهش یافته‌ی L106F

Comparison of methods used for keratin extraction from wool and evaluation their effects on keratin characteristics

Ozra peiravi[1], Mansour Mashreghi[1*,2,3], Ahmad Hosseini Bandegharaei[4]

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[2]Industrial Biotechnology Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, 9177948974, Iran
[3]Nano Research Center, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, 9177948974, Iran
[4]Faculty of Chemistry, Semnan University, Semnan, Iran
**Corresponding Author: mashreghi@um.ac.ir*

Abstract

Production of useful materials with special capabilities from incidental-products and waste is one of the important goals of waste management and recycling which has been considered by many researchers in many countries. Wool is one of the most important sources of keratin with more than 95% of keratin content. Keratin is a polyamide with high chemical functionality that contains some short acidic peptide sequences with cell adhesion properties. Hence, keratin has a high commercial potential for bio-based biomedical applications, bio-films, cosmetics, medical membrane, sponges, injectable gel, drug delivery, and porous scaffolds for tissue engineering. Keratin, with its many functional groups, can be applied as a powerful adsorbent to remove water contaminants. Due to the complex three-dimensional structure, dissolution and extraction of keratin is a difficult process. This process requires the use of harsh chemical methods and conditions that, result in severe degradation of keratin. This problem poses its application with a number of limitations and obstacles. In this research, keratin extraction from wool fibers was performed by three methods including reduction, alkali hydrolysis and sulfitolysis. In the alkali hydrolysis method, keratin was extracted, using sodium hydroxide and converted to nanokeratin by ultrasonic method while in the reduction method, keratin was extracted by L-cysteine as a reducing agent. In the sulfitolysis method, disulfide bonds were reduced by sodium metabisulfite, urea and sodium dodecyl sulfate. In order to select the best method in terms of extraction efficiency, keratin yield was calculated. The physiochemical properties of the produced keratin were evaluated by Field emission scanning electron microscopy (FE-SEM), fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction spectroscopy (XRD). The highest extraction efficiency was related to sulfitolysis method and equal to 70%. FT-IR spectrum analysis showed peptide bands related to amide I, II and III in all three methods. FT-IR spectrometry analysis showed peptide amide bands I, II and III in all three methods. Compared to the natural wool, the XRD patterns for the keratin regenerated, clearly show the decrease of the peak at about 9° and the enlargement of the peak at about 19.50°. FE-SEM images of keratin resulted from sulfitolysis showed a flaky/ porous structure, while the keratin structure in the reduction method and the alkaline method were granular. In this study, according to the results of the analyzes performed and the extraction yield, the sulfitolysis method was selected.

Keywords: Alkaline extraction, Sulfitolysis, Reduction, Extraction yield

مقایسه روشهای استخراج کراتین از پشم و ارزیابی اثرات آن بر ویژگی‌های کراتین

عذرا پیروی ریوش[۱]، منصور مشرقی[۱و۲و۳]، احمد حسینی بنده قرا ئی[۴]
۱-گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
۲-گروه تحقیقاتی بیوتکنولوژی صنعتی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- مرکز تحقیقاتی نانو، دانشگاه فردوسی مشهد
۴- دانشکده شیمی، دانشگاه سمنان

Corresponding Author: mashreghi@um.ac.ir

چکیده

تولید مواد مفید با قابلیت‌های ویژه، از محصولات جانبی و زاید، یکی از اهداف مهم مدیریت و بازیافت زباله است که در بسیاری از کشورها مورد توجه محققان زیادی قرار گرفته است. پشم یکی از مهم‌ترین منابع کراتین است که بیش از ۹۵ درصد آن را پروتئین کراتین تشکیل می‌دهد. کراتین یک پلی آمید با عملکرد شیمیایی بالا است و به علت توالی‌های کوتاه پپتیدی اسیدی با خاصیت چسبندگی سلول، دارای پتانسیل تجاری بالایی در کاربردهای زیست پزشکی از جمله فیلم‌های زیستی، مواد آرایشی، غشای پزشکی، اسفنج، ژل تزریقی، رهایش دارو، داربست متخلخل برای کشت بافت در مهندسی بافت است. کراتین با داشتن گروههای عاملی زیاد، می‌تواند به عنوان یک جاذب قدرتمند در حذف آلاینده‌های آب به کار برده شود. با توجه به ساختار سه بعدی پیچیده‌کراتین، انحلال و استخراج آن فرایندی دشوار است. این فرایند، نیازمند استفاده از روش‌ها و شرایط شیمیایی سخت است که منجر به تخریب شدید کراتین می‌شود. این مساله می‌تواند کاربرد آن را با یکسری محدودیت‌ها و موانع مواجه کند. در این پژوهش کراتین موجود در الیاف پشم با سه روش احیا، هیدرولیز قلیایی و سولفیتولیز استخراج شد. در روش هیدرولیز قلیایی کراتین با استفاده از سدیم هیدروکسید استخراج و با کمک امواج اولتراسونیک تبدیل به نانو کراتین شد. در روش احیا با استفاده از L سیستئین، به عنوان یک عامل کاهنده، کراتین استخراج شد. در روش سولفیتولیز احیای باندهای دی‌سولفیدی با سدیم‌متابی‌سولفیت، اوره و سدیم دودسیل سولفات انجام شد. به منظور انتخاب بهترین روش، بازده استخراج در هر روش، محاسبه شد. بررسی ساختار فیزیکوشیمیایی کراتین، با آزمون‌های FT-IR، XRD و تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی FE-SEM صورت گرفت. بیشترین بازده استخراج مربوط به روش سولفیتولیز و برابر با ۷۰ درصد به دست آمد. آنالیز طیف FT-IR، باندهای پپتیدی مربوط به آمید I و II و III را در هر سه روش نشان داد. از مقایسه الگوهای XRD پشم طبیعی و کراتین بازیابی شده از پشم، در هر سه روش کاهش پیک در حدود ۹ درجه و بزرگ شدن پیک ۱۹/۵ درجه به وضوح قابل تشخیص بود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی FE-SEM به دست آمده از روش سولفیتولیز یک ساختار ورقه‌ای و متخلخل را نشان داد. در حالیکه ساختار کراتین در روش احیا و روش قلیایی به صورت دانه‌ای بود. در این پژوهش با توجه به نتایج حاصل از آنالیزهای انجام شده و بازده استخراج، روش سولفیتولیز انتخاب شد.

واژگان کلیدی: استخراج قلیایی، سولفیتولیز، احیا، بازده استخراج

Improving the stability of Aspergillus flavus uricase using Site-Directed Mutagenesis at position 269

Mona Akhlaqi [1], Bagher Seyedalipour[1*], Mehdi Imani[2], Mohammad Pazhang[3]

1- Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Mazandaran, Iran

2- Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

3- Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Science, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

***Corresponding author:** E-mail: b.seyedalipour@umz.ac.ir*

Abstract

Urate oxidase (EC 1.7.3.3) plays an important role in the degradation pathway of purines and causes catalysis of uric acid to 5-hydroxyisoavarate and hydrogen peroxide, which eventually converts to allantoin. In the process of human evolution, due to mutations in the urate oxidase gene and the creation of early termination codon, the translation of this enzyme in humans is inhibited, thus causing no degradation of uric acid. Accumulation of uric acid in the body can lead to hyperuricemia and gout. The medicinal form of this enzyme is rasburicase. Pharmaceutical proteins become unstable against several factors, including rising temperatures. To deal with this problem can be from using genetic manipulation and protein engineering. The aim of this study was to replace the amino acid glutamine with leucine at the position of 269 uricase enzyme to improve and increase the stability of the aspergillus flavus uricase enzyme. In this study, plasmid pET28a containing uricase gene and *E. coli* BL21 (DE3) strain were used. The site-directed mutagenesis was performed by the Quick-Change PCR method to create single-point mutations using *Pfu* DNA polymerase. The pET28a-UOX were transformed into *E. coli* BL21 competent cells using the heat shock method (calcium chloride). To ensure plasmid transfer, bacteria were cultured on a medium containing appropriate antibiotics (kanamycin). Plasmid extraction was performed in small volumes using a plasmid extraction kit. After confirming the quality of plasmid extraction by examination on 1% agarose gel, samples were sent to determine the sequence. Sequencing was performed using an automatic sequencer by T7 promoter universal primers. The wild-type and mutant proteins were expressed in *E. coli*-BL21 (DE3), at 37 °C, at 230 rpm for 7h, and purified using Ni-NTA agarose affinity chromatography. Protein concentrations were determined by the Bradford method and were analyzed on a 12% SDS-PAGE gel. After purification of the enzyme, the optimum temperature and thermal stability of the mutant enzyme at the temperature range (0-60 °C) were compared with the wild sample and the results showed optimum temperature and thermal stability higher of the mutant enzyme compared to the wild

type. Therefore, our results provide insights to improve the stability of urate oxidase and expand its applications.

Keywords: Uricase, *E. coli*-BL21, Thermal stability, point mutagenesis

بهبود پایداری آنزیم اوریکاز آسپرژیلوس فلاووس با استفاده از جهش زایی هدفدار در موقعیت ۲۶۹

منا اخلاقی[۱]، باقر سیدعلیپور[۱*]، مهدی ایمانی[۲]، محمد پاژنگ[۳]

۱گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، مازندران، ایران

۲گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳ گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

*نویسنده مسئول: E-mail: b.seyedalipour@umz.ac.ir

چکیده

اورات اکسیداز (EC 1.7.3.3) نقش مهمی را در مسیر تجزیه ی پورین ها داشته و باعث کاتالیز اوریک اسید به ۵_هیدروکسی ایزواورات و هیدروژن پراکسید می شود که در نهایت به آلانتوئین تبدیل می شود. در روند تکامل انسان، در اثر جهش در ژن اورات اکسیداز و ایجاد کدون خاتمه زودرس، ترجمه ی این آنزیم در انسان مهار شده بنابراین باعث عدم تجزیه اسیداوریک می گردد. تجمع اسید اوریک در بدن می‌تواند منجر به هایپر اوریسمی و نقرس شود. شکل دارویی این آنزیم، راسبوریکاز است. پروتئین های دارویی در برابر عوامل متعدد از جمله افزایش دما ناپایدار می شوند. که برای مقابله با این مشکل می توان از دستکاری ژنتیکی و مهندسی پروتئین استفاده کرد. هدف این مطالعه جایگزینی اسیدآمینه ی گلوتامین به لوسین در موقعیت ۲۶۹ آنزیم اوریکاز جهت بهبود و افزایش پایداری آنزیم اوریکاز آسپرژیلوس فلاووس می باشد. دراین تحقیق از پلاسمید pET28a(+) حاوی ژن اوریکاز و باکتری *E.coli* سویه BL21 (DE3) مورد استفاده قرار گرفت. جهش زایی هدفدار به روش Quick-change PCR به منظور ایجاد جهش تک نقطه ایی با استفاده از *Pfu* DNA polymerase انجام شد. pET۲۸a-UOX به *E. coli* BL۲۱ ترنسفرم شد، سلول های توانمند با استفاده از روش شوک حرارتی ایجاد شدند (کلرید کلسیم). جهت اطمینان از انتقال پلاسمید، باکتری ها روی محیط حاوی آنتی بیوتیک مناسب (کانامایسین) کشت داده شدند. برای اطمینان بیشتر، استخراج پلاسمید در حجم کم با استفاده از کیت استخراج پلاسمید صورت گرفت. پس از حصول اطمینان از کیفیت استخراج پلاسمید از طریق بررسی بر روی ژل آگارز ۱٪ نمونه ها جهت تعیین ترادف ارسال شدند. توالی یابی با استفاده از یک توالی سنجی خودکار توسط پرایمرهای جهانی پروموتر T۷ انجام شد. پروتئین های نوع وحشی و جهش یافته در *E. coli*-BL21(DE3) ، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، در ۲۳۰ دور در دقیقه به مدت ۷ ساعت بیان شدند و با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA آگارز خالص شدند. غلظت پروتئین با روش برادفورد تعیین و بر روی ژل ۱۲٪ SDS-PAGE آنالیز شد. پس از تخلیص آنزیم، دمای بهینه و پایداری حرارتی آنزیم جهش یافته در دامنه دمایی (۰-۶۰ درجه سانتیگراد) با نمونه وحشی مقایسه شد و نتایج حاکی از دمای بهینه و پایداری دمای بالاتر آنزیم جهش یافته در مقایسه با تیپ وحشی می باشد. بنابراین، نتایج ما بینش هایی را برای بهبود پایداری اورات اکسیداز و گسترش کاربردهای آن ارائه می دهد.

کلید واژه : اوریکاز، اشریشیاکلی BL21، پایداری دمایی، جهش زایی نقطه ای

Effect of $AgNO_3$ on Potato tuber catalase activity

Saeedeh Noori-Harzanagh[1*]; Nader Chaparzadeh[2]

1- MS Student, Department of Biology, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
2- Professor, Department of Biology, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

** Email: nchapar@azaruniv.ac.ir*

Abstract

Enzymes, as catalysts, accelerate biochemical reactions in living organisms. C Catalase (E.C. 1.11.1.6) is a heme-containing enzyme that is present in most aerobic organisms. The enzyme is a key antioxidant enzyme for detoxification of hydrogen peroxide during oxidative stress. Heavy metals are highly toxic, and living organisms detoxify heavy metals in a variety of ways. In one of these methods, antioxidant enzymes protect living organisms from oxidative stress caused by heavy metals. Heavy metals increase oxidative stress by decreasing the activity of antioxidant enzymes, which leads to increased production of reactive and toxic oxygen species at the cellular level. High levels of reactive oxygen species causes oxidation of biomolecules.

Silver is one of the environmental heavy metals and its amount in the earth's crust is about 0.1 gram per ton. Silver nitrate, by producing reactive oxygen species, damages cellular structures such as enzymes in a variety of mechanisms, such as interactions with sulfhydryl groups. The results of various studies have shown that when plants are exposed to low amounts of heavy elements, the activity of catalase increases, but the absorption of large amounts of these elements by plants reduces its activity.

Potato tubers are a good source of the catalase. Many of the potato tubers catalase properties have been studied and identified. The enzyme is found in various intracellular compartments such as cytosol, mitochondria and peroxisomes. In current study, the enzyme was extracted from the potato tubers using phosphate buffer at low temperature and separated by centrifugation. Catalase activity at 35 °C was measured by spectrophotometry at 415 nm using titanium reagent. Incubation of the enzyme with different concentrations of silver nitrate (AgNO3) was studied at the mentioned temperature. Statistical analysis showed that catalase activity significantly decreased with increasing AgNO3 concentration. The enzyme catalase has a very crucial role in living organisms due to its multiple isozymes. This study clearly revealed that Ag causes of the negative effects on the structure and function of the catalase. When plants are exposed to heavy elements such as Ag, in addition to the primary toxic effects, heavy elements also cause secondary oxidative stress by reducing the activity of catalase.

Keywords: Catalase, Silver, Stress

تاثیر نیترات نقره بر فعالیت آنزیم کاتالاز غده سیب زمینی

سعیده نوری هرزنق[1*]؛ نادر چاپارزاده[2]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
۲- استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

Email: nchapar@azaruniv.ac.ir

چکیده

چکیده آنزیم‌ها به عنوان کاتالیزور واکنش‌های بیوشیمیایی را در موجودات زنده تسریع می‌کنند. آنزیم آهن‌دار کاتالاز (E.C. 1.11.1.6)در اغلب موجودات هوازی وجود دارد که یک آنزیم کلیدی آنتی‌اکسیدان در سمزدایی از پراکسید هیدروژن به هنگام تنش اکسیداتیو است. فلزات سنگین بسیار سمی هستند و موجودات زنده آنها را به روش‌های مختلف سمزدایی می‌نمایند. در یکی از این روش‌ها، با استفاده از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان موجودات زنده در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از فلزات سنگین محافظت می‌شوند. فلزات سنگین، با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان موجب افزایش تولید گونه‌های‌اکسیژن فعال و سمی در سطح سلولی و باعث اکسیداسیون مولکول‌های زیستی وافزایش تنش اکسیداتیو می‌شوند.

نقره یکی از فلزات سنگین محیطی بوده و میزان آن در پوسته زمین در حدود ۱/۰ گرم در هر تن می باشد. نیترات نقره به عنوان عامل ایجاد کننده گونه‌های اکسیژن فعال با مکانیسم های مختلف با برهمکنش با گروه های سولفیدریل به ساختارهای سلولی مانند آنزیم‌ها آسیب می‌زند. نتایج تحقیقات مختلف نشان داده که وقتی گیاهان در معرض تنش ضعیف عناصر سنگین قرار می¬گیرند میزان فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش پیدا می‌کند ولی جذب مقادیر زیاد این عناصر توسط گیاهان موجب کاهش فعالیت آن می‌شود. غده سیب زمینی یک منبع خوب برای آنزیم کاتالاز محسوب می‌شود. بسیاری از ویژگی‌های کاتالاز غده سیب زمینی مطالعه و مشخص شده است. این آنزیم در بخش‌های درون سلولی مختلف مانند سیتوزول، میتوکندری‌هاو پراکسیزوم‌ها قرار دارد. دراین مطالعه عصاره آنزیمی با استفاده از بافر فسفات در دمای پایین استخراج و توسط سانتریفیوژ از غده سیب زمینی جداسازی شد. فعالیت آنزیم کاتالاز در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد با روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۱۵ نانومتر با استفاده از معرف تیتانیوم اندازه گیری شد. تلقیح آنزیم با غلظت های مختلف نیترات نقره در دمای فوق مطالعه گردید. بررسی آماری نشان داد که به شکل معنی‌داری با افزایش غلظت نیترات نقره فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش یافت. آنزیم کاتالاز به دلیل داشتن ایزوزیم‌های مختلف دارای نقش بسیار مهم در موجودات زنده می‌باشد. چنین ارزیابی می‌گردد که نقره موجب آسیب به ساختار و عملکرد آنزیم کاتالاز می‌شود. وقتی گیاهان در معرض عناصر سنگین مانند نقره قرار بگیرند با کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز، عناصر سنگین به غیر از اثرات سمی اولیه موجب ایجاد تنش اکسیداتیو ثانویه نیز می‌گردند.

واژگان کلیدی: کاتالاز، نقره، تنش

Protein extraction from soybeans under different precipitation conditions

Fatemeh Safakhah[1]; Fakhri Sadat Hosseini[2*]; Mahboobeh Zarrabi[3]

1- Biotechnology Department, Al-Zahra University ,Tehran, Iran
2- Biotechnology Department, Al-Zahra University ,Tehran, Iran
3- Biotechnology Department, Al-Zahra University ,Tehran, Iran
* *Email:f.hosseini@alzahra.ac.ir*

Abstract

Soy is one of the rich sources of protein among oilseeds. Given nearly 40% of soy consist of protein, it is not surprising that soy has become an important source of protein for animal and human feed. To reduce the serum concentration of cholesterol and triglycerides, soy is a good substitute for animal proteins. Polypeptide chains of soy protein polymers with disulfide and hydrogen bonds are attached to an intricate three-dimensional structure. The two main polymers of soy protein are glycine protein and Konglycin protein, which make up about 80% of the total soy protein. This protein is mainly an amorphous polymer and decomposes at a temperature of about 230 ° C. Various methods are used to extract proteins. One of these methods is sedimentation. Sedimentation can be done with the help of organic solvents, salts, or ultrasound. In the current study, we have performed an investigation of the different deposition conditions for soy protein extraction. Commercial and meal soybean have been obtained from reputable centers. Consequently, we have used three methods for deposition. 1. SDS (sodium dodecyl sulfate) and DTT (Dithiothreitol) was used for chemical precipitation. 0.06 g of soybean pH = 7.5 with TRIS-HCL. Then SDS and DTT were added by 1% by weight. It is centrifuged after stirring. The supernatant is precipitated with cold acetone. 2. The second method is sedimentation at the pH isoelectric point of soybean. In this method, using molar NaOH1, the pH is raised to 10. The supernatant is brought to PH = 4 after centrifugation. 3. all the stages of the third method are similar to the second one, but we have used an ultrasonic bath after the alkaline deposition stage for 1 hour at 4 ° C. The amount of protein extracted by the first method in commercial soybeans is 0.0036 g and in meal, soybean is 0.0083 g. In the second method, 20.3 g of protein is obtained from 10.00 g of commercial solid soybean and 61.2 g of protein is obtained from soybean meal. By the third method, 88.7 grams of protein was obtained from 10.00 grams of commercial soy and 0.8 grams of protein was obtained from soybean meal. The results reveal that using sedimentation at the pH isoelectric point pH and simultaneous use of ultrasonic bath is amore efficient method for protein extracting.

Keywords: Soybean meal, commercial soybean, separation, Ultrasonic bath

استخراج پروتئین از سویا تحت شرایط مختلف رسوبدهی

فاطمه صفاخواه[۱]؛ فخری سادات حسینی[۲*]؛ محبوبه ضرابی[۳]

۱- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران
۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران
۳- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران

Email:f.hosseini@alzahra.ac.ir

چکیده

سویا به‌عنوان یک منبع غنی از پروتیئن در میان دانه‌های روغنی شناخته می‌شود. با حدود40% محتوای پروتئینی، سویا به‌عنوان منبع مهمی برای تامین خوراک دام و انسان به کار می‌رود. از این دانه‌ی روغنی می‌توان به عنوان جایگزینی برای پروتئین‌های حیوانی استفاده نمود که سبب کاهش غلظت سرمی کلسترول و تری گلیسیریدها می‌شود. همچنین تحقیقات نشان داده است که پروتیئن‌های موجود در سویا دارای خواص ضد سرطانی هستند. پروتئین‌های سویا به صورت یک ساختار گلوبولین هستند که در دانه‌های روغنی سویا ذخیره می‌شوند. زنجیره‌های پلی پپتیدی پلیمرهای آن با پیوندهای دی سولفیدی و هیدروژنی با وزن مولکولی از 300000 تا 600000 کیلو دالتون به یک ساختار پیچیده سه بعدی متصل شده و در هم پیچیده می‌شوند. دو پلیمر پروتئینیِ اصلی سویا گلیسینین و کنگلیسینین هستند که حدود 80% کل محتوای پروتئینی سویا را تشکیل می‌دهند. روش‌های مختلفی برای استخراج پروتئین‌ها به‌کار می‌رود. یکی از این‌روش‌ها، رسوب‌دهی است. رسوب‌دهی می‌تواند به کمک حلال‌های آلی، نمک‌ها یا امواج فراصوت انجام شود. مطالعه پیش‌رو با هدف بررسی شرایط مختلف رسوب‌دهی برای استخراج پروتئین سویا انجام گرفته است. در این پژوهش، سویای تجاری وکنجاله سویا از مراکز معتبر تهیه شده و برای رسوب‌دهی با سه روش، مورد آزمایش قرار گرفته شد. در روش اول برای رسوب‌دهی شیمیایی از SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) و DTT (Dithiothreitol) استفاده شد. 0.06 g سویا با TRIS-HCl به pH=7.5 رسانده‌شد و 1% وزنی حجمی به آن SDS و DTT اضافه گشت. در ادامه، این مخلوط سانتریفیوژ شده و سوپرناتانت آن با استون سرد رسوب داده شد.در روش دوم، رسوب‌دهی در نقطه ایزوالکتریک پرروتئین صورت گرفت. در این روش با استفاده از NaOH (1M)، pH به 10 رسانده شد و سپس pH سوپرناتانت بعد از سانتریفیوژ باکمک HCl (1M) تا ۴ کاهش داده‌شد. روش سوم مشابه روش دوم بوده با این تفاوت که پس از مرحله‌ی رسوب قلیایی، از حمام اولتراسونیک با دما $4^{\circ}C$ به مدت 1ساعت استفاده گردید و بعد از آن، محلول در دمای $4^{\circ}C$ ساکن قرار داده شد. مقدار پروتئین استخراج شده طبق روش اول در سویای تجاری 0.0036 g و در کنجاله سویا 0.0083g است. در روش دوم از 10.00 g سویای جامد تجاری 3.20 g پروتئین، و از کنجاله سویا 2.61g پروتئین به‌دست آمد. در روش سوم از 10.00 g سویای تجاری، 7.88 g پروتئین و از کنجاله سویا 8.00 g پروتئین به‌دست آمد. براساس نتایج به‌دست آمده استفاده از رسوب‌دهی در pH نقطه ایزوالکتریک سویا و استفاده‌ی همزمان از حمام اولتراسونیک روش بهتری بوده که می‌توان برای استخراج پروتئین سویا از آن استفاده کرد.

واژگان کلیدی:کنجاله سویا ، سویای تجاری، جداسازی، حمام اولتراسونیک

Effects of tannic acid on K562 CML cell line

Torkan H.Z Sabounchi[1*]; Safiyeh Aghazadeh[1]

1- Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

[*]*sabounchitorkann@gmail.com*

Abstract

Chronic myeloid leukemia (CML) is a type of leukemia characterized by the presence of a Philadelphia chromosome, caused by the genetic translocation t(9;22) (q34;q11). This genetic abnormality leads to the formation of BCR-ABL tyrosine kinase, which drives survival, proliferation, and resistance to apoptosis induced by chemotherapeutic agents. Hence, it is motivated to find new anti-cancer agents for combating drug resistance. Tannic acid belongs to a subset of hydrolyzable tannins groups commonly found in numerous plants and foods including vegetables, nuts, and coffee. Polyphenolic structure of tannic acid is comprised of gallic acid molecules esterified to several functional hydroxyl groups. Among many naturally occurring polyphenolic compounds, tannic acid has received much attention due to its significant biological functions, including anti-cancer, anti-mutagenic, and bacteriostasis activity. However, the anti-leukemic effect of tannic acid has not studied in detail. In that line, we are aimed to investigate the effects of tannic acid on the proliferative behavior of K562 CML cell line. For this purpose, the K562 cell line was treated with different concentrations of tannic acid. After 48 hours, trypan blue exclusion assay was performed to determine cell viability, and tannic acid induced cell death was measured with acridine orange-ethidium bromide staining assay. Moreover, intracellular ROS content along with GSH level and catalase activity were performed.

Based on our results from the trypan blue exclusion assay, tannic acid treatment effectively inhibited cell survival in a dose dependent manner (1–10 µM) and gained IC50 at 5µM concentration. The rate of cellular apoptosis was approximately 1.5, 2.5, and 3.3 times higher than the control sample at concentrations of 1, 5, and 10 µM tannic acid. Tannic acid led to an increase in the intracellular ROS content consistent with a decrease in intercellular GSH levels in a concentration dependent manner. The amount of ROS increased by 11, 22, and 64% compared to the control cells. Also catalase activity was reduced by ۰٫۲٤ – 0.13 U/mg protein following exposure of cells to 1–10 µM of tannic acid. Our findings indicate that tannic acid induces apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells by augmentation of intracellular oxidative stress.

Keywords: BCR-ABL, Apoptosis, oxidative stress

بررسی اثرات تانیک اسید بر رده سلولی CML K562

ترکان حسین ضیا صابونچی[1*]؛ صفیه آقازاده[1]

۱- ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه بیوشیمی

Email: sabounchitorkann@gmail.com

چکیده

لوسمی میلوئیدی مزمن (CML) نوعی سرطان خون است و در اثر جابه‌جایی ژنتیکی t(9;22) (q34;q11) حاصل می‌شود. این ناهنجاری ژنتیکی منجر به تشکیل BCR-ABL تیروزین کیناز می‌شود که باعث بقا، تکثیر و مقاومت در برابر آپوپتوز ناشی از عوامل شیمی درمانی می‌شود. از این‌رو هدف این مطالعه، یافتن عوامل ضد سرطانی جدید برای مبارزه با مقاومت دارویی است. آنتی‌اکسیدان تانیک اسید به زیرمجموعه‌ای از تانن‌های قابل هیدرولیز تعلق دارد که معمولاً در گیاهان و مواد غذایی متعددی یافت می‌شود. ساختار پلی‌فنلی تانیک اسید از مولکول‌های گالیک اسید استری شده به چندین گروه هیدروکسیل عاملی تشکیل شده است. در میان بسیاری از ترکیبات پلی‌فنل طبیعی، تانیک اسید به دلیل عملکردهای بیولوژیکی قابل‌توجهی از جمله فعالیت ضد سرطانی، ضد جهش‌زایی و باکتریوستازی مورد توجه قرار گرفته است. با این حال، اثر ضد لوسمی تانیک اسید به طور دقیق مورد مطالعه قرار نگرفته است. هدف ما بررسی اثرات تانیک اسید بر تکثیر رده سلولی K562 CML است. برای این منظور رده سلولی K562 با غلظت‌های مختلف تانیک اسید تیمار شد. پس از 48 ساعت، آزمون رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو برای تعیین زنده‌مانی سلولی انجام شد و مرگ سلولی ناشی از تانیک اسید با روش رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج-اتیدیوم بروماید اندازه‌گیری شد. علاوه براین، محتوای ROS داخل سلولی همراه با میزان GSH و فعالیت آنزیم کاتالاز مورد سنجش قرار گرفت. براساس نتایج حاصل از روش رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو، تانیک اسید به طور موثری بقای سلولی را به روشی وابسته به غلظت (1-10 µM) مهار کرد و IC50 در غلظت 5 میکرومولار حاصل گردید. میزان آپوپتوز سلولی در غلظت‌های 1، 5 و 10 میکرومولار تانیک اسید تقریبا 1.5، 2.5 و 3.3 برابر بیشتر از نمونه شاهد بود. علاوه بر این، تانیک اسید با کاهش سطح GSH درون سلولی، منجر به افزایش محتوای ROS به صورت وابسته به غلظت گردید و میزان ROS به‌ترتیب ۱۱، ۲۲ و ٦٤ درصد نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت. همچنین فعالیت آنزیم کاتالاز به دنبال تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۱۰-۱ میکرومولار تانیک اسید، به میزان 0.13 – 0.24 به ازا U/mg پروتئین کاهش یافت. یافته‌های ما نشان می‌دهد که تانیک اسید از طریق افزایش استرس اکسیداتیو درون‌سلولی، آپوپتوز را در سلول‌های لوسمی میلوئیدی مزمن القا می‌کند.

واژگان کلیدی: BCR-ABL، آپوپتوز، استرس اکسیداتیو

Primary germ cells for the production of transgenic birds

Maryam Farzaneh [1,2*]

[1] Fertility, Infertility and Perinatology Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

[2] Cellular and Molecular Research Center, Medical Basic Sciences Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Email: Maryamfarzaneh2013@yahoo.com

Abstract

Avian embryos have always been a good model for basic and applied science research. Various approaches to the production of transgenic birds have been of interest to researchers over the years. For the production of transgenic birds and the observation of the presence of foreign genes in subsequent generations, it is important that a cell, in addition to its high reproducibility, be able to transmit gene constructs to subsequent generations, and the possibility of extracting recombinant product in the gene carrier. One of the valuable resources for the production of transgenic birds is the use of primordial germ cells (PGCs). PGC cells are precursors of gametes that migrate to the anterior region of the embryo during early development of the embryo and are capable of transferring to the next generation and producing chimeric chickens. PGC cells reach the blood vessels so that they can enter the bloodstream and migrate through the bloodstream to the germinal cells. Accordingly, PGC cells can be separated from three developmental stages: the crescent section in the embryonic stage 14 (according to Table HH), in which PGCs temporarily stop in the upper part of the early embryo. The number of isolated cells at this stage is small and a small population of the desired cells is obtained. The blood flow in stage 19 of the embryo is related to the time of migration of PGC cells through the bloodstream, and in stage HH28 from primary gonads. These cells are recognizable by the large size of the nucleus and nucleus, the lipid and glycogen-bound marginal cytoplasm. The presence of SSEA-1, EMA-1, and *Vasa*-specific gene expression in these cells is also remarkable. Today, by injecting the foreign gene into PGC cells and transferring it to the primary embryo, it is possible to transfer the target gene to subsequent generations. So far, these cells have been recognized as one of the best tools for genetic instruction and tracing. Accordingly, this article reviews the methods of obtaining and culturing avian PGC cells and their importance in producing transgenic birds.

Keywords: Stem cells, Gene transfer, Gallus gallus, Cell culture

جایگاه سلول‌های جنسی اولیه در تولید پرندگان تراریخته

مریم فرزانه [۲،۱]

[۱] مرکز تحقیقات باروری، ناباروری و سلامت جنین، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
[۲] مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی خلیج فارس، پژوهشکده علوم پایه پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

Email: Maryamfarzaneh2013@yahoo.com

چکیده

جنین پرندگان همواره مدلی مناسب در تحقیقات علوم پایه و کاربردی هستند. در طول سالیان گذشته رویکردهای مختلفی به‌منظور تولید پرندگان تراریخته مورد توجه محققین قرار گرفته است. برای تولید پرندگان تراریخته و از طرفی مشاهده حضور ژن خارجی در نسل‌های بعدی، سلولی حائز اهمیت است که علاوه بر قدرت تکثیرپذیری بالا، بتواند سازه ژنی را به نسل‌های بعد منتقل کند و امکان استخراج فراورده نوترکیب در نسل حامل ژن به‌صورت غالب، فراهم شود. یکی از این منابع ارزشمند برای تولید پرندگان تراریخته، استفاده از سلول‌های جنسی اولیه ((Primordial Germ cells (PGCs) می باشد. در مراحل اولیه تکوین حدود ۱۳۰-۳۰ سلول PGC در بخش مرکزی ناحیه شفاف در مرحله تکوینی X که حاوی ۳۰۰۰۰-۶۰۰۰۰ سلول است، تجمع می‌یابند. سپس این سلول‌ها در هنگام تشکیل خط اولیه به سمت فوقانی مهاجرت کرده و خود را به مرز ناحیه شفاف و بخش خارج جنینی می‌رسانند سلول‌های PGC، پیش ساز گامت‌ها هستند که توانایی انتقال به نسل بعد و تولید کایمر زایا را دارند. سلول‌های PGC خود رو به عروق خونی رسانیده تا اینکه بتوانند خود را وارد جریان خون کنند و به‌واسطه جریان خون به‌سمت پل‌های زاینده مهاجرت کنند. بر همین اساس سلول‌های PGC را می‌توان از سه مرحله تکوینی جدا کرد: ۱. بخش هلال زایا در مرحله ۱۴جنینی (بر اساس جدول HH)، که PGC در این منطقه به‌صورت موقت در قسمت بالایی جنین اولیه توقف می‌کنند، تعداد سلول‌های جدا شده در این مرحله کم بوده و جمعیت کمی از سلول‌های مورد نظر به‌دست می‌آید، ۲. جریان خون در مرحله ۱۹ جنینی که مربوط به زمان مهاجرت سلول‌های PGC از طریق جریان خون است، ۳. گنادهای اولیه در مرحله ۲۸ جنینی. این سلول‌ها به‌واسطه سایز بزرگ هسته و هستک، سیتوپلاسم حاشیه‌ای حاوی لیپید و گلیکوژن قابل شناسایی هستند. همچنین حضور نشانگرهای سطحی SSEA-1، EMA-1 و بیان ژن اختصاصی *Vasa* در این سلول‌ها قابل توجه است. امروزه با تزریق ژن خارجی به سلول های PGC و انتقال آن به جنین اولیه، امکان انتقال ژن هدف به نسل‌های بعدی فراهم شده است، تا جایی که این سلول‌ها به عنوان یکی از بهترین ابزار برای دستورزی‌ها و ردیابی‌های ژنتیکی شناخته شده اند. بر همین اساس، در این مقاله مروری روش های دستیابی و کشت سلول های PGC پرندگان و اهمیت این سلول ها در تولید پرندگان تراریخته مورد بررسی قرار می گیرد.

واژگان کلیدی: سلول های بنیادی، انتقال ژن، گالوس گالوس، کشت سلول

Partial purification of Asparaginase from *Cairina moschata* Duck and its activity in the Presence of Some ions and Compounds of Medicinal plants

Maryam Mohajerani, Mohammad Mohammadi Firozjaee

Dpartment of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran Babolsar ,Iran

**Corresponding Author Email address:: m.mohajerani@umz.ac.ir*

Abstract

The presence of asparaginase as an enzyme that hydrolyzes asparagine to aspartic acid has been reported in various organisms including animals, plants and microorganisms other than humans. This enzyme plays an important role in cellular metabolism in the metabolism of most organisms. On the other hand, its use in food industry reduces acrylamide in food products related to it. In addition, the enzyme L-asparaginase plays an important role in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. According to the reported sensitivities of L-asparaginase enzyme extracted from microbial sources in different individuals, the aim of this study was to extract and evaluate of the properties of L-asparaginase enzyme from animal sources such as Muscovy duck liver. For this purpose, duck liver's asparaginase enzyme was partially isolated using homogenization, centrifugation, ammonium sulfate precipitation and dialysis at 4 °C and then the enzyme activity was estimated according to the general generation method with generator reagent. Finally, the function of the enzyme at different temperatures and pH as well as the presence of ions and some effective plant compounds were evaluated. Based on the obtained results, the specific activity of asparaginase enzyme isolated from duck liver was determined to be 2.97 U/mg. The optimal pH of enzyme activity was 7.5 and its optimal temperature was estimated to be 37 °C. The effect of ions and different plant compounds also showed a decreasing effect on enzyme function in all cases, which among ions, calcium and among plant compounds, caffeine, the most reduction was 68.3 and 77.7%, respectively. Dihydroxyflavone and quercetin had the least effect on asparaginase activity and zinc ion maintained enzyme activity. Because access to this enzyme from microbial sources has been reported to limit patients, including the onset of allergy symptoms, extraction of the enzyme from animal sources such as duck liver is not only an affordable and inexpensive source, but also its extraction and purification for evaluation. And in vitro and in vivo studies can be considered for future researchers.

Keywords: Partial purification, Caffeine , Generator method, Asparaginase, kinetic parameters

خالص سازی جزیی آسپاراژیناز از اردک موسکووی (Cairina moschata) و بررسی فعالیت آن در مجاورت برخی یون ها و ترکیبات سازنده گیاهان دارویی

مریم مهاجرانی، محمد محمدی فیروزجائی

۱- گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی ، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه مازندران ، بابلسر

Email: m.mohajerani@umz.ac.ir

چکیده

حضور آسپاراژیناز به عنوان یک آنزیم هیدرولیزکننده آسپاراژین به آسپارتیک اسید، در موجودات زنده مختلف از جمله حیوانات، گیاهان و میکروارگانیسم ها به غیر از انسان گزارش شد. این آنزیم در متابولیسم اکثر موجودات نقش مهمی را در سلامت سلولی ایفا می کند. ازطرفی کاربرد آن در صنایع غذایی موجب کاهش تولید آکریلامید در مواد غذایی و محصولات مرتبط با آن می گردد. علاوه بر آن آنزیم ال- آسپاراژیناز نقش مهمی در درمان لوسمی لنفوبلاستی حاد ایفا می کند. با توجه به حساسیت های گزارش شده از آنزیم آسپاراژیناز استخراج شده از منابع میکروبی در افراد مختلف، هدف این مطالعه، استخراج و بررسی خواص آنزیم ال- آسپاراژیناز از منابع جانوری نظیر کبد اردک موسکووی می باشد. برای این منظور آنزیم آسپاراژیناز جگر اردک با استفاده از روش‌های هموژنیزاسیون، سانتریفیوژ، رسوب دهی با آمونیوم سولفات و دیالیز در دمای چهار درجه سانتی گراد، به صورت جزئی جداسازی و پس از آن، فعالیت آنزیم طبق روش عمومی نسلریزاسیون تخمین زده شد. در نهایت عملکرد آنزیم در دما و pH های مختلف و همچنین در حضور یون ها و برخی ترکیبات مؤثره گیاهی ارزیابی گردید. براساس نتایج به دست آمده، فعالیت ویژه آنزیم آسپاراژیناز جداسازی شده از جگر اردک ۲ /۹۷ U/mg تعیین شد. فعالیت بهینه آنزیم در pH= ۷/۵ و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برآورد گردید. نتیجه اثردهی یون ها و ترکیبات گیاهی مختلف نیز حاکی از تأثیرات کاهشی بر عملکرد آنزیم در تمامی موارد بود که از بین یون ها، کلسیم و از میان ترکیبات گیاهی، کافئین، بیشترین میزان کاهش را به ترتیب در مقادیر ۶۸/۳ و۷۷/۷ درصد اعمال نمودند. دی هیدروکسی فلاوون و کوئرستین کمترین تاثیر را برفعالیت آسپاراژیناز نشان دادند و یون روی نیز موجب حفظ فعالیت آنزیم شد. از آنجا که دستیابی به این آنزیم از منابع میکروبی محدودیت هایی برای بیماران از جمله بروز علائم آلرژی گزارش شده است لذا استخراج آنزیم از منابع جانوری مانند کبد اردک نه تنها منبع قابل دسترس و کم هزینه است، بلکه استخراج و خالص سازی آن به منظور بررسی و مطالعات برون تنی و درون تنی برای محققین بعدی می تواند، مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی:خالص سازی جزیی، کافئین، روش نسلر، آسپاراژیناز، پارامترهای سینتیکی

The effect of Cerium oxide nanoparticles in improvement of spermatogenesis parameters in Malathion treated mice

Awat Mohammadi Talvar[1], Ahmad Gharzi[1*]

1- Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah

*ahgharzi@yahoo.com

Abstract

Infertility is a complex problem with various aspects wherein 20-30% of cases is due to men. As pesticides produce free radicals they can damage the reproductive system. Therefore, antioxidants such as nanoparticles can recover damages caused by pesticides. The aim this study is to by using a nanoparticle, Cerium oxide, improve the damages caused by Malathion on spermatogenesis. To fulfill this purpose, 49 adult male rats were divided into 7 groups. The first group received nothing. The second group was received 100 mg/kg Malathion, the third group was received 50 mg/kg Cerium oxide, the 4th to 7th groups were received 100mg/kg Malathion along with 5, 10, 20 and 50mg/kg Cerium oxide, respectively. Treatments were conducted daily and intraperitoneally for 4 weeks. After that all rats were sacrificed and their gonads were removed. Following the preparation of sperm suspensions and smears the gonads were processed for histological studies. Examinations showed that in addition to reducing the body weight, Malathion decreased the number of Sertoli cells, primary spermatocytes, round and elongated spermatids. Moreover, the count, motility and viability of sperms were reduced by Malathion. However, in groups which received Cerium oxide along with Malathion, body weight, seminiferous tubules diameter and thickness of germinal epithelium increased. Furthermore, Cerium oxide improved sperm parameters damaged by Malathion. This improvement was more obvious in the 6th and 7th groups received 20 and 50mg/kg Cerium oxide. Based on the results, it seems cerium oxide can reduce the negative effects of Malathion in spermatogenesis.

Keywords: Infertility, Pesticide, Spermatogenesis, Antioxidan

تاثیر نانوذرات اکسید سریم بر بهبود پارامترهای اسپرماتوژنز در موش‌های تیمار شده با مالاتیون

آوات محمدی تلوار[۱]؛ احمد قارزی[۱*]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه
Email:ahgharzi@yahoo.com

چکیده

ناباروری یک اختلال پیچیده با جنبه‌های مختلف است که ۳۰-۲۰٪ آن از مردان ناشی می‌شود. آفت‌کش‌ها بخاطر ایجاد رادیکالهای آزاد اکسید کننده از عوامل آسیب رسان به سیستم تولید مثلی محسوب می‌شوند. لذا آنتی‌اکسیدانت‌ها مثل نانوذرات می‌توانند در بهبود مشکلات تولید مثلی موثر باشند. هدف این تحقیق بهبودآسیب‌های ناشی از آفت کش مالاتیون بر فرآیند اسپرماتوژنز توسط نانو ذره اکسید سریم است. برای این منظور، تعداد ۴۹ موش نر بالغ به ۷ گروه ۷ تایی تقسیم شدند. گروه اول دارویی دریافت نکرد. گروه دوم ۱۰۰mg/kg مالاتیون،گروه سوم ۵۰mg/kg اکسید سریم، گروه چهارم تا هفتم به ترتیب ۵، ۱۰، ۲۰، و ۵۰mg/kg اکسید سریم همراه ۱۰۰mg/kgمالاتیون روزانه و به مدت ۴ هفته بصورت داخل‌صفاقی دریافت نمودند. پس از دوره تیمار، موش‌ها قربانی شده و غدد تناسلی خارج و پس از تهیه سوسپانسیون و اسمیر اسپرمی برای مطالعات بافتی آماده شدند. نتایج بررسی‌ها نشان داد که مالاتیون علاوه بر کاهش وزن موشها تعداد سلول‌های سرتولی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید گرد و طویل را در لوله‌های منی‌ساز کاهش داده است. همچنین مالاتیون باعث کاهش تعداد اسپرم، زنده مانی، تحرک و افزایش ناهنجاری های مورفولوژیکی اسپرمی شد. لیکن استفاده همزمان اکسید سریم با مالاتیون باعث افزایش وزن، قطر و ضخامت اپیتلیوم لوله‌های منی‌ساز گردید. به علاوه، اکسید سریم ناهنجاری‌های اسپرمی ناشی از مالاتیون را بهبود بخشید. این بهبودی در گروه‌های شش و هفت (۲۰ و۵۰mg/kg) بیشتر از سایر گروه‌ها بود. بنابراین، بر اساس نتایج بدست آمده بنظر می‌رسد که اکسید سریم می‌تواند اثرات منفی استفاده از مالاتیون در اسپرماتوژنز را کاهش دهد.

واژگان کلیدی: ناباروری، آفت کش، اسپرماتوژنز، آنتی‌اکسیدانت

Histological study of the skin of the dorsal and ventral regions in *Boleophthalmus dussumieri* Valenciennes, 1837 in Zangi estuary (northwest of Persian Gulf)

Fahimeh Saberi[1]; Ahmad Gharzi[1*]; Ashraf Jazayeri[2], Vahid Akmali[1], Khosro Chehri

1- Department of Biology, Faculty of Science, Razi University of Kermanshah
2- Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz

*Corresponding Author: ahgharzi@yahoo.com

Abstract

Boleophthalmus dussumieri recently separated from the Gobiidae family and belonging to the Oxudercidae family and is classified under the suborder Gobioidei and the order Gobiiformes, distributing along the coasts of the Oman Sea and the Persian Gulf. In order to carry out histological studies, specimens 6 (males) and 4 (females), captured, identified and were killed and fixed in Boeing fixator solution. Then, the steps of tissue sectioning and hematoxylin and eosin staining were performed. Examination of the skin of the dorsal and ventral regions using light microscopes in both males and females showed that the epidermis is composed of a stratified epithelium consisting of three cell layers, including the superficial, middle, and germ layers. The superficial layer is composed of several layers of flat, squamous cells with a large number of blood capillaries. The middle layer consists of several layers of globular to polyhedral cells. The basal or germinal layer is also composed of several rows of cubic cells with a spherical nucleus. Also, the dermis of the skin consists of thick bundles of collagen fibers and abundant blood vessels. In some areas, many protuberances from the dermis enter the epidermis, which is known as " dermal bulges ". In addition, the results of histometric examinations by using ImageJ software showed that the thickness of the epidermal layer was significantly different between males and females ($P < 0.05$) as the epidermis in females (87.97µ) was thicker than males (74.32 µ). Finally, based on the amphibian lifestyle of mudskippers, it seems that in species that are more hydrophilic, the upper and middle parts of the body being often exposed to air, have shorter diffusion distances. Therefore, it can be expected that the uptake of air through the skin in *Boleophthalmus dussumieri* takes place more in the upper part of the body than in the lower part or appendix.

Keywords: *Boleophthalmus dussumieri*, epidermis, dermis, diffusion distance

مطالعه بافت شناسی پوست نواحی پشتی و شکمی در گلخورک ماهی Boleophthalmus dussumieri Valenciennes, 1837 در خور زنگی (شمال غربی خلیج فارس)

فهیمه صابری[۱]؛ احمد قارزی[۱*]؛ اشرف جزایری[۲]؛ وحید اکملی[۱]؛ خسرو چهری[۱]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه
۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران، اهواز
Email: ahgharzi@yahoo.com

چکیده

گلخورک دوسومیر *Boleophthalmus dussumieri* که اخیرا از خانواده گاوماهیان Gobiidae جدا شده و در خانواده گلخورک ماهیان Oxudercidae قرار گرفته است، در زیر راسته Gobioidei و راسته Gobiiformes طبقه بندی می‌شود و در امتداد سواحل دریان عمان و خلیج فارس، پراکنش دارد. به منظور انجام مطالعات بافتی، نمونه‌ها (۶ نر و ۴ ماده) پس از صید و شناسایی با استفاده از کلید شناسایی کشته و در محلول بوین، فیکس شدند. سپس مراحل مقطع گیری بافتی و رنگ آمیزی H & E انجام شد. مطالعه میکروسکوپی پوست نواحی پشتی و شکمی، در دو جنس نر و ماده نشان داد که اپیدرم از یک اپی‌تلیوم مطبق متشکل از سه طبقه سلولی شامل سطحی، و زاینده تشکیل شده است. طبقه سطحی از چندین لایه سلول‌های مسطح و سنگفرشی به همراه تعداد زیادی مویرگ‌های خونی، تشکیل شده است. طبقه میانی، متشکل از چندین لایه سلول‌های کروی تا چند وجهی است. طبقه زاینده نیز از چند ردیف سلول‌های مکعبی واجد یک هسته کروی تشکیل شده است. همچنین، درم پوست متشکل از دستجات ضخیم کلاژنی و مویرگ‌های خونی فراوان است. در برخی نواحی، برآمدگی‌هایی از درم وارد اپیدرم می‌شود که اصطلاحا تحت عنوان برآمدگی درمی نامیده می‌شوند. علاوه بر این، نتایج حاصل از بررسی‌های هیستومتریک با استفاده از نرم‌افزار Image J در سطح معنی‌داری ($P<0.05$) نشان داد ضخامت لایه‌ی اپیدرم در دو جنس نر و ماده اختلاف معنی‌داری دارد بطوریکه در جنس ماده (۸۷/۹۷ میکرون) بیشتر از جنس نر (۷۴/۳۲ میکرون) بود. در نهایت، بر اساس شیوه زندگی دوزیستیِ گلخورک ماهیان، به نظر می‌رسد در گونه‌هایی که آبدوست‌تر هستند، قسمت‌های فوقانی و میانی بدن که اغلب در معرض هوا قرار دارند، مقادیر کمتری فاصله انتشار وجود دارد. از این رو، می‌توان انتظار داشت که جذب هوا از طریق پوست در گل خورک ماهی دوسومیر، بیشتر در ناحیه فوقانی بدن نسبت به قسمت پایین بدن یا قسمت ضمیمه انجام شود.

کلمات کلیدی: گلخورک دوسومیر، اپیدرم، درم، فاصله انتشار

Evaluating the effect of yttrium oxide nanoparticles on cognitive deficits induced by streptozotocin in male Wistar rats

Mohammad Yoonesi[1], Delaram Eslimi Esfahani[1], Leila Dargahi[2], Elmira Beirami[1*]

1- Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
2- NeuroBiology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Corresponding Author Email address :Elmira.beirami@khu.ac.ir*

Abstract

Introduction: Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by progressive cognitive decline, dementia, psychiatric symptoms and behavioral disorders. Nowadays, nanotechnology is considered as an important scientific and industrial technology in the world. Yttrium oxide (Y_2O_3) nanoparticles are the most widely used nanoparticles in the field of medicine and nutrition and can cross the blood-brain barrier and protect cells from the risk of stress, toxic materials and affect cognitive functions. The aim of this study was to investigate the protective effect of Y_2O_3 against memory impairment induced by streptozotocin (STZ).
Methods: In this study, 56 male Wistar rats, weighing 200-250 g, were used. The animals were divided into seven groups including: control (non-surgical), sham (pseudosurgery), STZ, STZ groups with daily administration of yttrium oxide nanoparticles (0.1, 0.3 and 0.5 mg/kg; intraperitoneal) and finally the group that treated with only 0.5 mg/kg of yttrium oxide nanoparticles. STZ microinjected bilaterally into the lateral ventricles (3 mg/kg, bilaterally, 3 µl/hemisphere) and after three weeks (day 22), Morris water maze test was used to measure spatial memory for confirming the induction of Alzheimer. After confirming the induction of Alzheimer's model by STZ, Y_2O_3 nanoparticles (0.1, 0.3 and 0.5 mg/kg) were administered intraperitoneally for 21 days/daily (24 hours after intraventricular microinjection of STZ) and on day 22 spatial memory was assessed.
Results: STZ-induced Alzheimer's rats showed a significant decrease in the spatial memory compared with control and sham groups. Y_2O_3 nanoparticles treatment (0.5 mg/kg) attenuated STZ-induced cognitive impairments. Other doses showed a dose response effect in the improvement of spatial memory compared with STZ group.
Conclusion: Y_2O_3 nanoparticles could be used as a novel therapeutic way for treating cognitive deficits in AD.

Keywords: Alzheimer, Streptozotocin, Yttrium oxide nanoparticles, Morris water maze

بررسی اثر نانوذرات اکسید ایتریم بر نقایص شناختی ناشی از استرپتوزوتوسین در موش رت نر نژاد ویستار

محمد یونسی[۱]؛ دلارام اسلیمی اصفهانی[۱]؛ لیلا درگاهی[۲]؛ المیرا بیرامی*[۱]

۱- گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران
۲- مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
Email: Elmira.beirami@khu.ac.ir

چکیده

مقدمه: بیماری آلزایمر یک بیماری عصبی است که با کاهش پیشرونده شناخت، فراموشی، علائم روانشناختی و اختلالات رفتاری مشخص می‌گردد. امروزه نانوتکنولوژی به عنوان یک فناوری علمی و صنعتی مهم در جهان مورد توجه قرار گرفته است. نانوذرات اکسید ایتریوم (Y_2O_3) پرمصرف‌ترین نانوذرات در زمینه پزشکی و تغذیه هستند و می‌توانند از سد خونی مغزی عبور کرده و سلول‌های عصبی را در برابر استرس و مواد سمی محافظت نموده و بر عملکردهای شناختی تأثیر بگذارند. هدف از این مطالعه بررسی اثر محافظتی Y_2O_3 در برابر اختلال حافظه ناشی از استرپتوزوتوسین (STZ) بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از ۵۶ سر رت نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد که در ۷ گروه ۸تایی قرار داشتند. این گروه‌ها شامل: گروه کنترل، گروه شم، گروه STZ، گروه STZ به همراه سه دوز نانوذرات Y_2O_3 (۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و در نهایت گروهی که فقط دوز ۰/۵میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذره را دریافت نمودند. STZ (۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ۳ میکرولیتر در هر بطن جانبی) به صورت دو طرفه در بطن‌های جانبی تزریق شد و پس از سه هفته تست ماز آبی موریس برای اندازه‌گیری حافظه فضایی و تایید القاء آلزایمر مورد استفاده قرار گرفت. پس از تایید القاء مدل آلزایمر با تزریق STZ، نانوذرات Y_2O_3 (۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ۲۴ ساعت پس از تزریق داخل بطنی STZ به طور روزانه و به مدت ۲۱روز و به صورت داخل صفاقی تجویز شد. ۲۴ ساعت بعد از اتمام تزریقات حافظه فضایی حیوانات مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: موش‌های آلزایمری شده با STZ کاهش معنی‌داری را در حافظه فضایی نسبت به گروه‌های کنترل و شم نشان دادند. درمان با نانوذرات Y_2O_3 (بخصوص در دوز ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) توانست اختلالات شناختی ناشی از STZ را کاهش داده و تقریباً به سطح گروه کنترل برساند. لازم به ذکر است که در این مطالعه با افزایش دوز دارو تفاوت معنی‌داری در بهبود حافظه نسبت به گروه STZ مشاهده گردید که در دوزهای پایین تر قابل مشاهده نبود.

نتیجه‌گیری: نانوذرات اکسید ایتریوم می‌تواند به عنوان یک روش درمانی جدید برای درمان نقایص شناختی در بیماران آلزایمری مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: آلزایمر، استرپتوزوتوسین، نانوذرات اکسید ایتریوم، ماز آبی موریس

Study of the protective effects of dark chocolate on learning, memory and anxiety in male rats with Alzheimer's disease

Hamid Shokati Basir [1]; Naser Mirazi [1*]; Alireza Komaki [2]

1- Department of Biology, Faculty of basic science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
2- Neurophysiology Research Center, Hamadan University of Medical Science, Hamadan, Iran

* *mirazi@basu.ac.ir*

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is one of the major reasons of dementia. Clinically, patients initially induce by short-term memory impairment, which consequently leads to functional and behavioral disorders. Beta-amyloid (Aβ) accumulation in the brain is the first event in the process of AD, which plays a key role in increase of oxidative stress. Oxidative stress is an important pathological factor in neurological diseases, including AD, which can lead to the death of nerve cells. Dark chocolate is a plant-based food made from the cocoa tree and is a rich source of a group of antioxidants called flavonoids such as epicatechin and catechin. In the present study, 60 male adult rats divided into 6 groups (n=10). Control group received distilled water orally for 60 days. Sham group received 5 µl of phosphate buffered saline through intracerebroventricular (ICV) injection. Positive control group received 500 mg / kg cocoa orally for 60 days. Alzheimer rat model group received 5 µl of Aβ solution through ICV injection. Prevention group received 500 mg / kg of cocoa orally for 60 days and then 5 µl of Aβ solution through ICV injection. Treatment group received 5 µl of Aβ solution through ICV injection and then 500 mg / kg of cocoa orally for 60 days. memory, learning and anxiety assessed by behavioural tests included by Morris water maze, shuttle box, elevated plus maze, respectively. The results showed that ICV injection of Aβ reduced memory and learning and increases anxiety levels; while cocoa consumption significantly improved the disorder caused by Aβ. According to the results of the present study, it is possible that cocoa due to its antioxidant properties has a neuroprotective effect and can improve Aβ induced disorders on memory, learning and anxiety.

Keywords: Alzheimer's disease, Dark chocolate, Memory and Learning, Rat

مطالعه‌ی اثرات حفاظتی شکلات تلخ بر حافظه، یادگیری و اضطراب در موش‌های صحرایی نر آلزایمری

حمید شوکتی بصیر[۱]؛ ناصر میرازی[۱*]؛ علیرضا کمکی[۲]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
۲- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، همدان
Email: mirazi@basu.ac.ir

چکیده

بیماری آلزایمر یکی از دلایل عمدهٔ زوال عقل است. از نظر بالینی، بیماران در ابتدا دچار اختلال حافظهٔ کوتاه‌مدت هستند که به دنبال آن دچار اختلال عملکردی و رفتاری می‌شوند. تجمع بتاآمیلوئید در مغز اولین اتفاق در روند بیماری آلزایمر است که نقش مهمی در افزایش استرس اکسیداتیو دارد. استرس اکسیداتیو یک عامل مهم آسیب‌شناسی در بیماری‌های عصبی ازجمله آلزایمر است که می‌تواند منجر به مرگ سلول‌های عصبی شود. شکلات تلخ، غذایی با منشأ گیاهی، تهیه‌شده از درخت کاکائو و منبع غنی از گروهی از آنتی‌اکسیدان‌ها به نام فلاونوئیدها مانند اپی‌کاتچین و کاتچین است. در مطالعه حاضر ۶۰ سر موشِ صحراییِ نرِ بالغ به ۶ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل آب مقطر را به‌صورت خوراکی طی ۶۰ روز دریافت کردند. گروه شم جراحی ۵ میکرولیتر محلولِ بافرِ نمکِ فسفات به‌صورت تزریق داخل بطنی دریافت کردند. گروه کنترل مثبت ۵۰۰ mg/kg کاکائو را به‌صورت خوراکی طی ۶۰ روز دریافت کردند. گروه آلزایمر ۵ میکرولیتر محلول بتاآمیلوئید به‌صورت تزریق داخل بطنی دریافت کردند. گروه پیشگیری ۵۰۰ mg/kg کاکائو را به‌صورت خوراکی طی ۶۰ روز و سپس ۵ میکرو لیتر محلول بتاآمیلوئید به‌صورت تزریق داخل بطنی دریافت کردند. گروه درمان ۵ میکرو لیتر محلول بتاآمیلوئید به‌صورت تزریق داخل بطنی و سپس ۵۰۰ mg/kg کاکائو را به‌صورت خوراکی طی ۶۰ روز دریافت کردند. حافظه، یادگیری و اضطراب به ترتیب به‌وسیلهٔ آزمون‌های رفتاری مازِ آبیِ موریس، شاتل باکس و مازِ به‌علاوهِ مرتفع ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که تزریق داخل بطنی بتاآمیلوئید سبب اختلال در حافظه و یادگیری می‌شود و سطح اضطراب را افزایش می‌دهد؛ درحالی‌که مصرف کاکائو باعث بهبود معنادار اختلال پیش‌آمده توسط بتاآمیلوئید می‌گردد. با توجه به نتایج پژوهش حاضر، گمان می‌رود که کاکائو به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود، دارای اثر حفاظت عصبی باشد و می‌تواند اختلالات ناشی از بتاآمیلوئید بر حافظه، یادگیری و اضطراب را بهبود بخشد.

واژگان کلیدی: بیماری آلزایمر، شکلات تلخ، حافظه و یادگیری، موش صحرایی

Identification and isolation of heterotrophic marine algae from mangrove forests of Bushehr province

Zahra Shafaghat [1]; Farzaneh Najafi[1*];Ramezanali khavarinejad[3]
Mahdi Mohammadi[4]

1- PhD student in plant physiology, Kharazmi University
2- Associate Professor Plant Biology Faculty of Biological Sciences, Department of Plant Sciences, Kharazmi University
3- Assistant Professor, Persian Gulf Research Institute, Department of Biotechnology

* *Email:z.shafahgat@gmail.com*

Abstract

thraustochytrids were designated as a unique group that thraustochytrids were included within the phylum Heterokonta within the Chromophyta (Stramenopiles) kingdom. Schizochytrium Sp. a new genus in the family Thraustochytriaceae , Goldst. & Belsky (1964) was isolated. Thraustochytrids belong to a marine group of eukaryotic protists called Labyrinthulomycetes; single celled organisms abundantly distributed in marine ecosystems. These unicellular proteins are considered for their extraordinary structure and biochemical properties. These cells have a uniform spherical shape and their diameter varies between 30 and 100 micrometers. Schizochytrium Sp. genus is a member of the heterotrophic stramenopiles, which are characterized and distinguished from other fungoid organisms by the followingcharacteristics: biflagellate zoospores, rhizoid-like ectoplasmic net elements produced by a unique organelle and multilamellate cell walls omposed of Golgi body-derived scales. The genus Schizochytrium has been characterized by successive binary division of its vegetative cells. Cells possessing only β-carotene as carotenoid pigment and possessing and 20% arachidonic acid as the fatty acids. Thraustochytrids are large-celled marine heterokonts and classified as oleaginous microorganisms due to their production of docosahexaenoic (DHA) and eicosapentaenoic (EPA) ω-3-fatty acids. Among the thraostochitrides, the two genera Thraustochytrium and Schizochytrium are the most widely used. As well as applications in mariculture, DHA and EPA are prescribed in diets due to their clinical importance to human health. The development of refined isolation and identification techniques is important for the cultivation of *Schizochytrium*. Modifications to the existing lipid extraction methods and utilisation of sophisticated analytical instruments have increased extraction yields of DHA and EPA. Schizochytrium could therefore emerge as an alternative to fish oil with the potential for commercialisation and may grow and accumulate lipids by utilising low cost substrates .Light microscopic observations were fitted.Vegetative cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde and 0.1% sucrose in 0.1 M cacodylate buffer on ice for 5 h. For Extraction of DNA

Cells were harvested after 3–4 days of culture. To obtain the almost complete 18S rRNA gene, we used a polymerase chain reaction (PCR) protocol with a DNA polymerase. In this study, Schizochytrium genus was isolated from mangrove forests of Bushehr province and was identified and isolated molecularly and morphologically.

Keywords: Morphologi, Thraustochytrids, Omega3

شناسایی و جداسازی جلبک دریایی هتروتروف از جنگل‌های حرا استان بوشهر

زهراشفقت[۱]؛ فرزانه نجفی*[۲]؛ رمضانعلی خاوری نژاد[۳]؛ مهدی محمدی[۴]

۱- گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران
۲- گروه علوم گیاهی ، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران
۳- گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران
۴- گروه زیست فناوری، پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر

Email:z.shafahgat@gmail.com
najafi_f@khu.ac.ir
ra.khavarinejad@gmail.com
mmohammadi@pgu.ac.ir

چکیده

تراستوکیتریدها یک گروه منحصر به فرد هستند که در شاخه Heterokonta در قلمرو Chromophyta (Stramenopiles) قرار گرفتند. *Schizochytrium* sp. یک جنس جدید در خانواده Thraustochytriaceae می‌باشد که به وسیله (Goldstein and Belsky 1964) شناسایی و جداسازی شد. Thraustochytrids متعلق به گروه دریایی از protists یوکاریوتی به نام Labyrinthulomycetes هستند. موجودات تک سلولی که به طور فراوان در اکوسیستم های دریایی توزیع شده اند. این پروتیست‌های تک سلولی بر اساس ساختار فوق العاده و خصوصیات بیوشیمیایی مورد توجه قرار می‌گیرند. این سلول‌ها شکل کروی یکنواختی دارند و قطر آن‌ها بین ۳۰ تا ۱۰۰ میکرومتر متغیر هستند. جنس Schizochytrium هتروتروف است که با ویژگی‌های زیر از سایر موجودات قارچی مشخص و متمایز می‌شوند: زئوسپورهای دوفلاژله، عناصر خالص اکتوپلاسمی ریزوئید مانند که توسط یک اندامک منحصربه‌فرد و دیواره‌های سلولی چندلایه‌ای متشکل از فلس‌های مشتق شده از جسم گلژی تولید می‌شوند. جنس *Schizochytrium* با تقسیم دوتایی متوالی سلول‌های رویشی آن مشخص می‌شود. سلول‌هایی که فقط بتاکاروتن را به عنوان رنگدانه کاروتنوئیدی دارند و دارای ۲۰٪ اسید آراشیدونیک به عنوان اسیدهای چرب هستند. Thraustochytrids هتروکونت‌های دریایی بزرگ سلولی هستند و به دلیل تولید اسیدهای چرب دوکوزاهگزانوئیک (DHA) و ایکوزاپنتانوئیک ω-3 (EPA) به عنوان میکروارگانیسم‌های چربی طبقه بندی می شوند. در بین ترائوستوکیتریدها ، دو جنس Thraustochytrium و Schizochytrium بیشتر مورد استفاده قرار گرفته‌اند. DHA و EPA به دلیل اهمیت بالینی در سلامتی انسان و همچنین برنامه های کاربردی در پرورش ماهی ، در رژیم های غذایی تجویز می شوند. توسعه تکنیک های جداسازی و شناسایی تصفیه شده برای کشت Schizochytrium مهم است. اصلاح روش‌های استخراج چربی موجود و استفاده از ابزارهای تحلیلی پیچیده باعث افزایش بازده DHA و EPA شده است. بنابراین Schizochytrium می تواند به عنوان یک روغن جایگزین در زمینه تجارت بالقوه مطرح شود و با استفاده از بسترهای کم هزینه رشد کرده و لیپیدها را تجمع دهد مشاهدات مورفولوژیکی توسط میکروسکوپی نوری بررسی شد. سلول های رویشی در گلوتارآلدئید ۲.۵ درصد و ساکارز ۰/۱ درصد در بافر ۰.۱ مولار کاکودیلات روی یخ به مدت ۵ ساعت ثابت شدند و سپس توسط میکروسکوپ نوری مشاهده گردید. برای استخراج DNA سلول ها پس از ۳-۴ روز از کشت برداشت شدند.

برای به دست آوردن ژن تقریبا کامل S rRNA۱۸، از پروتکل واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) با DNA پلیمراز استفاده کردیم.در این پژوهش جنس Schizochytrium از جنگل‌های حرا استان بوشهر جدا و به صورت مولکولی و مورفولوژی شناسایی و جداسازی گردید.

کلمات کلیدی: مورفولوژی، تراستوکتریدها، امگا۳

Sex differences in the effect of long-term high-fat diet on insulin resistance and memory deficit in Wistar rats

Azam Abedi Koshalshahi*[1], Tahereh Foroutan[1], Leila Mohaghegh Shalmani[2], Leila Dargahi[3]

1- Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
2- Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3- Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

** abedi.masoomeh93@gmail.com*

Abstract

This study investigates whether 16-week high-fat diet (HFD) consumption causes insulin resistance and memory impairment in a sex-dependent manner in rats when compared with normal chow diet (NCD) intake. After weaning, twenty male and female rats were randomly fed high-fat (60% fat) or normal chow diet (10% fat) for 16-weeks. During the experiments, body weight, food and calorie intake were recorded weekly. In the eighth week of the study, animals' blood samples were collected through the retro-orbital sinus for measurement of glucose, insulin, and lipid profile (cholesterol, triglycerides and LDL). Also, at week 8 and 12 of the study, the glucose tolerance test was performed by intraperitoneal injection of D-glucose and collecting blood via tail vein at 0, 30, 60, and 120 min intervals. Finally, spatial memory performance was evaluated by Morris Water Maze (MWM) test in the week 16. Despite a significant decrease in the cumulative weekly food intake, the gain in body weight and calorie intake were not different in HFD compared to NCD rats in both sexes. The fasting blood glucose and serum insulin were increased significantly in male but not female HFD rats. Therefore, HFD male rats showed a significant increase in the HOMA-IR index, an index of insulin resistance. Evaluating glucose tolerance test results after 8 weeks showed that HFD significantly increased the blood glucose levels at 30 min in both sexes and at 60 min in male HFD rats when compared with NCD groups. At week 12, an increase in blood glucose level at 30 min was observed in male HFD rats when compared to their respective control groups. The analysis of results related to lipid profiles showed that the LDL-cholesterol concentration was remarkably increased in HFD rats compared to control group in both sexes. Evaluating spatial learning and memory showed that while the effect of training is significant in all the four groups, memory retrieval measured by the latency to find the hidden platform and the time spent in target quadrant, is impaired in only HFD male rats compared to corresponding control. As a result, sex interferes with the high-fat diet-induced development of insulin resistance, and memory impairment.

Keywords: Nutrition, Hyperglycemia, Cognitive impairment

اثر وابسته به جنسیت رژیم غذایی پرچرب طولانی مدت بر بروز مقاومت به انسولین و اختلال حافظه در رت های نژاد ویستار

اعظم عابدی کوشالشاهی*[1]، طاهره فروتن[1]، لیلا محقق شلمانی[2]، لیلا درگاهی[3]

۱ - گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

۲- گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳- مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

Email : abedi.masoomeh93@gmail.com

چکیده

هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر مصرف ۱۶ هفته‌ای رژیم غذایی پرچرب (HFD) بر مقاومت به انسولین و اختلال حافظه در یک وضعیت وابسته به جنسیت در مقایسه با رژیم غذایی معمولی (NCD) در رت می‌باشد. بعد از خاتمه شیرخوارگی، بیست رت نر و ماده به مدت ۱۶ هفته با رژیم غذایی پرچرب (۶۰٪ چربی) و غذای معمولی (۱۰٪ چربی) تغذیه شدند. در طول آزمایش، وزن حیوانات، میزان ورودی و کالری غذا به صورت هفتگی ثبت شد. در هفته هشتم مطالعه، نمونه خون حیوانات از طریق سینوس رترو-اوربیتال برای اندازه‌گیری گلوکز، انسولین و پروفایل لیپیدی (کلسترول، تری‌گلیسیرید و LDL) جمع‌آوری گردید. همچنین در هفته ۸ و ۱۲ مطالعه، تست تحمل گلوکز با تجویز داخل صفاقی گلوکز و خون‌گیری از ورید دم در فواصل زمانی صفر، ´۳۰، ´۶۰ و ´۱۲۰ انجام شد. در نهایت، شکل‌گیری حافظه فضایی با استفاده از آزمون ماز آبی موریس (MWM) مورد ارزیابی قرار گرفت. علیرغم کاهش معنی‌دار در مصرف غذای هفتگی، تفاوتی در وزن بدن و کالری دریافتی درگروه HFD در مقایسه با گروه کنترل در هر دو جنس وجود نداشت. با این حال، گلوکز خون ناشتا و انسولین سرم به طور قابل توجهی در رت های نر گروه HFD افزایش یافت. از اینرو، رت های نر تغذیه شده با رژیم‌های غذایی پرچرب افزایش قابل توجهی در شاخص مقاومت به انسولین (HOMA-IR) نشان دادند. ارزیابی نتایج تست تحمل گلوکز پس از ۸ هفته نشان داد که HFD به طور قابل توجهی میزان گلوکز خون را در زمان ´۳۰ در هر دو جنس و در زمان ´۶۰ فقط در جنس نر، در مقایسه با گروه‌های NCD افزایش می‌دهد. اگر چه، در هفته ۱۲ تنها افزایش سطح گلوکز خون در زمان ´۳۰ پس از تزریق داخل صفاقی D-گلوکز در رت های نر در گروه HFD مشاهده گردید. آنالیز نتایج مربوط به پروفایل لیپیدی نشان داد که غلظت LDL در رت های HFD نسبت به گروه کنترل در هر دو جنس افزایش یافته است. ارزیابی یادگیری و حافظه فضایی نشان داد در حالی که تأثیر تمرین در هر چهار گروه معنی‌دار است، ارزیابی حافظه که با تأخیر برای یافتن سکوی پنهان و زمان صرف شده در ربع هدف اندازه‌گیری می‌شود، تنها در رت های نر HFD در مقایسه با گروه کنترل متناظر دچار اختلال می‌شود. بنابراین تفاوت‌های جنسیتی در ایجاد مقاومت به انسولین و اختلال حافظه ناشی از رژیم غذایی پرچرب نقش دارد.

کلید واژگان: تغذیه، هایپرگلیسمی، آسیب شناختی

Comparison of anatomical and histological structure of the gastrointestinal tract of *Laudakia nupta* with *Lacerta media*

Forouzan Karami Zalani; Ahmad Gharzi; Rasoul Karamiani*

Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah, Iran
* *Email: r.karamiani@razi.ac.ir*

Abstract

This study compares the anatomical and histological structure of the gastrointestinal tract in the species of large-scale rock agama (*Laudakia nupta*) and the Three-lined Lizard (*Lacerta media*). Samples (two samples for each species) were collected in spring (May) from the foothills of the Zagros Mountains in Kermanshah Province and after transfer to the laboratory, were anesthetized with chloroform and wait until death. Gastrointestinal organs were dissected out and prepared for microscopic study after passing through passage, cutting and staining stages. The results showed that the tongue in the anterior part has a lot of coarse filiform papillae and large circumvallate papillae in the posterior part. The epithelium of the esophageal mucosa in both species is composed of ciliated cylindrical cells, which in the gastric mucosa are made of cylindrical non-ciliated epithelial cells. In the small intestine, numerous folds and villi are seen along with scattered goblet cells. In colon and large intestine the goblet cells constitute a significant part of the epithelium. In the liver, parenchymal hepatocyte cells are arranged in plates and black spots of Hemosiderin are observed among them. In the central of the each hepatic lobule a central vein is clearly observed. Due to the fact that *Laudakia nupta* has an omnivorous diet, its gut is longer than *Lacerta media*, because it digests the plants that are part of *Laudakia nupta* food and needs more time to process. *Lacerta media* has an insect-eating diet and requires strong muscles to chew and crush insects, while the thickness of the muscle layer and the serous layer in its stomach is greater than that of *Laudakia nupta*. In *Laudakia nupta*, mucosal muscles in the esophagus were clearly visible, whereas in *Lacerta media* these muscles are absent.

Keywords: Histology, Gastrointestinal system, Tongue

مقایسه ساختار تشریحی و بافت شناسی دستگاه گوارش Laudakia nupta با Lacerta media

فروزان کرمی زلانی؛ احمد قارزی؛ رسول کرمیانی*

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه

*Email: r.karamiani@razi.ac.ir

چکیده

این تحقیق به مقایسه و بررسی ساختار تشریحی و بافت شناسی دستگاه گوارش در گونه‌های آگامای صخره‌ای فلس درشت (Laudakia nupta) و سوسمار سه خط (Lacerta media) می پردازد. نمونه‌ها (هر گونه دو نمونه) در فصل بهار (اردیبهشت) از دامنه کوه‌های زاگرس در استان کرمانشاه جمع آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه با کلروفرم بیهوش و صبر تا مرگ آنها، تشریح شدند. متعاقبا اعضای دستگاه گوارش از بدن نمونه‌ها خارج و پس از گذراندن آنها از مراحل پاساژ بافتی، برش گیری و رنگ آمیزی برای مطالعه‌ی میکروسکوپی آماده گردیدند. نتایج بدست آمده نشان داد زبان در قسمت قدامی دارای پرزهای نخی-شکل زبر و خشن فراوان و پرزهای جامی-شکل بزرگ در قسمت خلفی است. اپی‌تلیوم مخاط مری در هر دو گونه، از سلول های استوانه ای مژک‌دار تشکیل شده که این ساختار در مخاط معده، از سلول های اپی تلیال استوانه‌ای بدون مژک ساخته شده است. در روده ی کوچک، چین خوردگی ها و پرزهای فراوانی همراه با سلول های گابلت پراکنده مشاهده شد. سهم قابل توجهی از اپی تلیوم کولون و روده‌ی بزرگ، مربوط به سلول های گابلت می‌باشد. در بررسی ساختار کبد، سلول‌های هپاتوسیت در پارانشیم کبدی به صورت صفحاتی بدنبال دنبال یکدیگر قرارگرفته و در بین آن ها لکه های سیاه رنگ هموسیدرین وجود دارد. در مرکز لوبول‌های کبدی ورید مرکزی بخوبی مشهود است. باتوجه به این که Laudakia nupta رژیم غذایی همه چیزخواری دارد، طول لوله ی گوارشی آن بیش تر از Lacerta media می باشد، زیرا هضم گیاهان که بخشی ازرژیم غذایی Laudakia nupta را تشکیل می دهند به مدت زمان بیش تری برای پردازش نیاز دارد از طرفی چون *Lacerta media* رژیم حشره خواری دارد و جویدن و خرد کردن حشرات به ماهیچه های قوی نیازمند است، ضخامت لایه‌ی عضلانی و لایه‌ی سروز در معده ی آن در مقایسه با Laudakia nupta بیش تر می باشد. در *Laudakia nupta*، عضلات مخاط در مری به طور واضح مشاهده شدند، درحالی که در Lacerta media این عضلات وجود ندارند.

واژگان کلیدی: بافت شناسی، دستگاه گوارش، زبان

Evaluation of the effect of Phycocyanin on viability and maturation of Oocytes isolated from ovaries of NMRI mice in the *in vitro* condition

Zahra Izadi[1]; Hanieh Jalali[2*]; Seyedeh Maliheh Safavi[3]

1- Department of Animal Biology; Faculty of Biological Science; Kharazmi University; Tehran; Iran
2- Department of Animal Biology; Faculty of Biological Science; Kharazmi University; Tehran; Iran
3- Department of Biotechnology; Iranian Research Organization for Science and Technology; Tehran; Iran

Email: jalali@khu.ac.ir

Abstract

Introduction and aim: In vitro culture condition usually produce high levels of ROS, which is harmful to oocyte. Therefore, optimizing oocyte culture conditions and using compounds that can prevent the process of oocyte aging in the external environment is an essential subject. Antioxidants are used to reduce oxidative stress. One of the natural pigments, which is a blue protein pigment complex, is Phycocyanin, which is found in cyanobacteria and microalgae. Phycocyanin is an extremely powerful antioxidant that inhibits ROS. In the current study, due to the known strong antioxidant effects of Phycocyanin, different concentrations of this substance isolated from blue-green algae were added to the culture medium of ovarian isolated oocytes and the effect of different concentrations on the viability of oocytes and their maturity was investigated.

Materials and methods: In this study, PMSG was injected into three groups of 8 NMRI mice aged 5 to 6 weeks for superovulation and after 48 hours, ovaries were dissected and oocytes were isolated. After release of oocytes in culture medium, concentrations of 300 and 150 µg / ml of Phycocyanin were applied to them. The results were examined after 16 hours under a reverse light microscope. Oocyte viability was determined based on oocyte morphology and maturity was determined based on the release of the first polar body.

Results: This study showed that in the control group the viability rate was 58% and maturity was 0%. At a concentration of 300 µg / ml of phycocyanin, high lethal effects were observed for oocytes. However, at a concentration of 150 µg / ml, viability rate was 75% and maturity was 30%, which was significantly different from the control group.

Discussion: Considering the known antioxidant effects of Phycocyanin and inhibition of ROS by this substance, the present study showed that an appropriate concentration of Phycocyanin can improve oocytes culture conditions and increase their viability and maturity in vitro. These results suggest the use of this valuable marine substance in assisted reproductive therapies.

Keywords: Fertility, Antioxidant, Oxygen free radicals, Cell Death

بررسی اثر فیکوسیانین بر زنده مانی و بلوغ تخمک‌های جدا شده از تخمدان موش سوری NMRI در شرایط کشت آزمایشگاهی

زهرا ایزدی[۱]؛ هانیه جلالی*[۲]؛ سیده ملیحه صفوی[۳]

۱- گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۲- گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۳- گروه بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش های علمی صنعتی ایران، تهران، ایران

Email: jalali@khu.ac.ir

چکیده

مقدمه و هدف: شرایط کشت آزمایشگاهی معمولا سطح بالای رادیکال‌های آزاد را پدید می آورد که عاملی آسیب‌رسان بر تخمک‌ها است؛ لذا بهینه کردن شرایط کشت تخمک و استفاده از ترکیباتی که بتوانند از روند پیری تخمک در محیط خارج از بدن جلوگیری کنند ضروری به نظر می رسد. مواد آنتی‌اکسیدانی برای کم کردن تنش اکسایشی مورد استفاده قرار می گیرند. یکی از رنگدانه های طبیعی که یک کمپلکس رنگدانه پروتئینی آبی رنگ می باشد فیکوسیانین است که در سیانوباکتری ها و ریزجلبک ها یافت می شود. فیکوسیانین یک آنتی اکسیدان فوق‌العاده قوی بوده و موجب مهار رادیکال‌های آزاد می‌شود. دراین مطالعه با توجه به اثرات آنتی اکسیدانی قوی شناخته شده فیکوسیانین غلظت های متفاوتی از این ماده جداسازی شده از جلبک های سبزآبی به محیط کشت تخمک‌های جداشده از تخمدان موش های سوری اضافه شد و تاثیر غلظت های مختلف بر میزان زنده بودن تخمک ها و میزان بلوغ آنان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه به سه گروه ۸ تایی موش سوری NMRI با سن ۵ تا ۶ هفته جهت سوپراوولاسیون، PMSG تزریق شد و پس از ۴۸ ساعت تشریح تخمدان ها و جداسازی تخمک‌ها انجام شد. پس از آزادسازی تخمک ها در محیط کشت، غلظت‌های ۳۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فیکوسیانین بر آنان تاثیر داده شد. نتایج بعد از گذشت ۱۶ ساعت در زیر میکروسکوپ نوری معکوس مورد بررسی قرار گرفت. میزان زنده‌مانی تخمک‌ها براساس مورفولوژی اووسیت و میزان بلوغ براساس آزادسازی گویچهٔ قطبی اول تعیین شد.

نتایج: این مطالعه نشان داد درگروه کنترل میزان زنده مانی ۵۸٪ و بلوغ ۰٪ بود. در غلظت $۳۰۰ \mu g/ml$ فیکوسیانین، اثرات کشندگی بالا برای اووسیت مشاهده شد ولی در غلظت $۱۵۰ \mu g/ml$ ، میزان زنده مانی ۷۵٪ و بلوغ ۳۰٪ بود که نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی دار وجود داشت.

بحث: با توجه به اثرات شناخته شدهٔ آنتی‌اکسیدانی فیکوسیانین و مهار ROS توسط این ماده، مطالعهٔ حاضر نشان داد که غلظت مناسبی از فیکوسیانین می‌تواند موجب بهبود شرایط کشت تخمک و افزایش بقاء و بلوغ آنها در شرایط کشت آزمایشگاهی شود. این نتایج کاربرد این مادهٔ ارزشمند دریایی در درمان‌های کمک باروری را پیشنهاد می‌کند.

واژگان کلیدی: باروری، آنتی‌اکسیدان، رادیکال آزاد اکسیژن، مرگ سلولی

A comparative study on the effect of extracts of two Persian Gulf microalgae on the quality of oocytes isolated from the ovaries of NMRI mice

Zahra Izadi[1]; Hanieh Jalali[2*]; Seyedeh Maliheh Safavi[3]

1- Department of Animal Biology; Faculty of Biological Science; Kharazmi University; Tehran; Iran
2- Department of Animal Biology; Faculty of Biological Science; Kharazmi University; Tehran; Iran
3- Department of Biotechnology; Iranian Research Organization for Science and Technology; Tehran; Iran

Email: jalali@khu.ac.ir

Abstract

Introduction and aim: Aging and declining fertility in women force them to use assisted reproductive techniques such as in vitro fertilization (IVF). Although, in vitro fertilization is the preferred technology in the treatment of infertility, in vitro culture conditions usually produce high levels of ROS. Therefore, improving culture conditions and using antioxidant supplements are used to reduce oxidative stress. Some species of microalgae produce bioactive compounds such as antioxidants. Microalgae in the Persian Gulf region are among the most important microalgae in the world. The aim of this study was to investigate the effects of compounds in ethanolic extracts of two different species of Chlorella microalgae collected from this area on mouse oocytes and their viability as well as their maturity.

Materials and methods: In this study, three groups of 8 NMRI mice aged 5 to 6 weeks were used; PMSG injection was performed for superovulation and after 48 hours, ovaries were dissected and oocytes were isolated. After releasing the oocytes in the culture medium, concentrations of 150 µg / ml of two different microalgae extracts named Chlorella spN4 and Chlorella spD1 were added to the culture medium and the results were examined 16 hours later under a reverse light microscope. Oocyte viability was studied based on oocyte morphology and maturity was determined based on the release of the first polar body.

Results: This study showed that in the control group, the viability rate of oocytes was 58% and the maturity rate was 0%. While in the group affected by Chlorella spN4 extract, the viability rate was 70% and the maturity rate was 12% and in the group affected by Chlorella spD1 extract, the viability rate was 80% and the maturity rate was 6%. The results of both experimental groups were statistically significant compared to the control group.

Discussion: Due to the antioxidant effect of Chlorella microalgae extracts and inhibition of ROS by this extract, this study showed that the appropriate concentration of ethanolic extracts derived from microalgae of the Persian Gulf region is effective in improving the activity and maturation of oocytes and can be considered in the treatment of fertility disorders.

Keywords: In Vitro Fertilization, Microalga, Persian Gulf, infertility

بررسی مقایسه ای اثر عصاره‌های دو میکروآلگ خلیج فارس بر کیفیت تخمک های جدا شده از تخمدان موش سوری نژاد NMRI

زهرا ایزدی[۱]؛ هانیه جلالی*[۲]؛ سیده ملیحه صفوی[۳]

٤- گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
٥- گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
٦- گروه بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش های علمی صنعتی ایران، تهران، ایران

Email: jalali@khu.ac.ir

چکیده

مقدمه و هدف: بالا رفتن سن و کاهش میزان باروری در زنان آنان را مجبور به استفاده از روش های کمک باروری نظیر لقاح درون آزمایشگاهی (IVF) می کند. لقاح آزمایشگاهی اگرچه تکنولوژی مطلوب در درمان ناباروری است اما شرایط کشت آزمایشگاهی معمولا سطوح بالای رادیکال آزاد را پدید می آورد. بنابراین بهبود شرایط کشت و استفاده از مکمل های آنتی اکسیدانی برای کم کردن تنش اکسایشی مورد استفاده قرار می گیرند. برخی از گونه های ریزجلبک ها ترکیبات زیستی فعالی مانند آنتی اکسیدان ها تولید می کنند. ریزجلبک های منطقه خلیج فارسی جزء ریزجلبک های مهم دنیا محسوب می شوند. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات ترکیبات موجود در عصاره اتانولی دو گونه متفاوت از ریزجلبک Chlorella جمع آوری شده از این منطقه بر روی تخمک های موش انجام گرفت و میزان زنده ماندن و مرگ سلولی و همینطور بلوغ آنان مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه از سه گروه ۸ تایی موش سوری NMRI با سن ۵ تا ۶ هفته استفاده شد؛ به این صورت که ابتدا جهت سوپراوولاسیون تزریق PMSG انجام شده و پس از ۴۸ ساعت تشریح تخمدان‌ها و جداسازی تخمک‌ها انجام شد. پس از آزادسازی تخمک ها در محیط کشت، غلظت های ۱۵۰ میکروگرم در میلی لیتر از دو عصاره میکروآلگ متفاوت تحت نام های Chlorella spN4 و Chlorella spD1 به محیط کشت اضافه شد و نتایج بعد ۱۶ ساعت در زیر میکروسکوپ نوری معکوس مورد بررسی قرار گرفت. میزان زنده مانی تخمک ها بر اساس مورفولوژی تخمک و میزان بلوغ بر اساس آزادسازی گویچه قطبی اول مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج: این مطالعه نشان داد در گروه کنترل، میزان زنده مانی تخمک ها ۵۸٪ و میزان بلوغ تقریبا صفر درصد مشاهده شد. در حالیکه در گروه تحت تاثیر عصاره Chlorella spN4 میزان زنده مانی ۷۰٪ و میزان بلوغ ۱۲٪ بوده و در گروه تحت تأثیر عصاره Chlorella spD1 میزان زنده مانی ۸۰٪ و میزان بلوغ ۶٪ مشاهده گردید. نتایج هردو گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل از لحاظ آماری معنی‌دار بود.

بحث: با توجه به اثر آنتی اکسیدانی عصاره های ریزجلبک Chlorella و مهار رادیکال آزاد توسط این عصاره‌ها، این مطالعه نشان داد غلظت مناسب از عصاره های اتانولی برگرفته از میکروآلگ های منطقه خلیج فارس بر بهبود روند فعالیت و بلوغ سلول تخمک تأثیرگذار بوده و می تواند در مشکلات باروری مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: لقاح آزمایشگاهی،میکروآلگ، خلیج فارس، ناباروری

Evaluation of the effect of routine on caspase-3 expression in bleomycin-treated mice

Razieh Sadat Sajjadi 1 *, Homa Mohseni Kouchesfahani 2, Elahe Amini 3

1- Master student, Department of Animal Sciences, Faculty of Life Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Life Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Life Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

Responsible author's e-mail address: raziehsadat19@gmail.com

Abstract

Bleomycin (BLM) is an anti-cancer drug that has high cytotoxicity and is used to treat squamous cell carcinoma of the head and neck, Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma, etc. Rutin is a type of glycoside flavonoid that is capable of altering the activity of enzymes. Apoptosis is one of the most important mechanisms of drug damage to reproductive tissues. The aim of this study was to investigate the effects of bleomycin and routine on the expression of caspase-3 as an important cysteine protease in apoptosis.

Methods: In this in vitro experimental study, the ovaries of 30 female Wistar rats were examined. For this purpose, mice were randomly divided into 5 groups of 6: control group 1: routine solvent (Salin, Dmso, tween 80) control group 2: bleomycin solvent (saline) control group 3: routine experimental group 1: bleomycin experimental group 2: bleomycin + Routines were categorized that were examined for 15 days and then the prepared ovaries were used to measure the expression of caspase 3 gene. Caspase 3 expression was measured by Real Time PCR and the data analysis diagram was drawn by SPSS software.

Results: Caspase 3 expression in experimental group 1 (bleomycin injection group) showed a significant increase ($P < 0.05$) compared to control groups. In experimental group 2 (bleomycin injection group with routine) there was a significant decrease ($P < 0.05$) in caspase 3 expression.

Conclusion: Rutin has antioxidant and anti-apoptotic effects by inhibiting the expression of caspase 3 gene, which plays an essential role in apoptosis, is able to exert function and inhibit the toxic effects of bleomycin on ovarian tissue.

Keywords: Cancer, Apoptosis, Cysteine protease, Routine, Bleomycin

بررسی اثر روتین بر بیان کاسپاز ۳ در موشهای تحت تیمار با بلئومایسین

راضیه سادات سجادی [۱*]، هما محسنی کوچصفهانی[۲]، الهه امینی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۲- استاد، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

آدرس پست الکترونیکی نوسنده مسئول: raziehsadat19@gmail.com

چکیده

بلئومایسین (BLM) یک داروی ضد سرطان است که سمیت سلولی بالایی دارد و در درمان سرطان سلول سنگفرشی سر و گردن، لنفوم هوچکین و غیر هوچکین و ... استفاده می شود. روتین یک نوع فلاونوئید گلیکوزیدی است که قادر به تغییر فعالیت آنزیم ها است. آپوپتوز یکی از مکانیسم های مهم آسیب داروها بر بافت های تولیدمثلی است. هدف از این پژوهش بررسی اثرات بلئومایسین و روتین بر بیان کاسپاز۳ به عنوان یک سیستئین پروتئاز مهم در آپوپتوز می باشد.

روش کار: در این پژوهش تجربی آزمایشگاهی، تخمدان ۳۰ موش ماده نژاد ویستار مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور موشها به طور تصادفی در ۵ گروه ۶ تایی تقسیم شدند: گروه کنترل ۱: حلال روتین (Salin, Dmso, tween 80) گروه کنترل۲: حلال بلئومایسین(سالین) گروه کنترل۳: روتین گروه تجربی۱: بلئومایسین گروه تجربی۲: بلئومایسین + روتین دسته بندی شدندکه ۱۵ روز مورد بررسی قرار گرفتند و سپس از تخمدان های تهیه شده برای سنجش بیان ژن کاسپاز ۳ مورد استفاده قرار گرفت. سنجش بیان کاسپاز ۳ از طریق Real Time PCR صورت گرفت و نمودار آنالیز دادها توسط نرم افزار SPSS رسم گردید.

نتایج: بیان کاسپاز ۳ در گروه تجربی ۱ (گروه تزریقی بلئومایسین) افزایش معنادار ($P<0.05$) در مقایسه با گروه های کنترل نشان داد. در گروه تجربی ۲ (گروه تزریقی بلئومایسین توأم با روتین) کاهش معنادار ($P<0.05$) بیان کاسپاز۳ صورت گرفته است.

نتیجه گیری: روتین با دارا بودن اثرات آنتی اکسیدان و آنتی آپوپتوزی از طریق مهار بیان ژن کاسپاز۳ که نقشی اساسی در آپوپتوز بر عهده دارد قادر به اعمال عملکرد و مهار اثرات سمی بلئومایسین بر بافت تخمدان می باشد.

کلمات کلیدی: سرطان، آپوپتوز، سیستئین پروتئاز، تخمدان، آنتی اکسیدان

Surveying the effect of Curcumin on ethanol-induced amnesia in NMRI mice

Mahmoud Heidari*; Nasrinsadat Azami*; Sajjad Sepahi

Department of Biology, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Gorgan

* *Email: Heidarimahmoud@gorganiau.ac.ir*
n.azami@gorganiau.ac.ir

Abstract

Background: Medicinal herbs with high antioxidant property such as curcumin have been investigated in different studies to improve amnesia of Alzheimer disease. This study has evaluated potential of curcumin in improvement of amnesia induced by ethanol.

Methods In this study, 112 male NMRI mice weighing 30-40 gr were used in three phases. Injections were done intraperitoneally. The first phase was performed to get optimal ethanol dose can induce amnesia, the second phase to prove non impairing effect of curcumin doses including 6.5, 12.5, 25, 50 mg/kg and the third phase to survey the effect of different doses of curcumin on amnesia induced by ethanol. Data was recorded and analyzed in GraphPad Prism software version 9 using ANOVA test. $P<0.05$ was considered as first significant level.

Results: The results of the first phase showed that three doses including 0.5, 0.75, 1 mg/kg of ethanol can significantly ($p<0.01$ and $p<0.001$) induce amnesia. The second phase result showed non impairing effect for curcumin. The third phase result showed that all doses of curcumin can significantly improve amnesia. (6.5 and 12.5 mg/kg $p<0.001$ and doses 25 and 50 mg/kg $p<0.001$ mg/kg).

Conclusion Curcumin can improve memory function possibly due to its antioxidative property. However, more studies are needed for its administration route.

Keywords: Alzheimer, Memory, Curcumin, amnesia

بررسی تاثیر کورکومین بر فراموشی ناشی از اتانول در موش سوری نژاد NMRI

محمود حیدری*، نسرین سادات اعظمی*؛ سجاد سپاهی

گروه زیست شناسی دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان

Email: Heidarimahmoud@gorganiau.ac.ir
n.azami@gorganiau.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات مختلفی از داروهای گیاهی با خواص آنتی اکسیدانی بالا جهت بهبود فراموشی در بیماری آلزایمر استفاده کرده اند. این مطالعه پتانسیل کورکومین را در بهبود فراموشی ناشی از اتانول مورد بررسی قرار داده است.

روش کار: در این مطالعه، ۱۱۲ سر موش سوری نژاد NMRI به وزن ۴۰-۳۰ گرم در سه آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. تزریق ها بصورت درون صفاقی صورت گرفت. آزمایش اول جهت تعیین دوز مناسب اتانول به منظور تخریب حافظه، آزمایش دوم به منظور اثبات عدم ایجاد فراموشی توسط دوزهای مختلف ۶.۵، ۱۲.۵، ۲۵، ۵۰ kg/mg کورکومین، آزمایش سوم، جهت بررسی تاثیر دوزهای مختلف کورکومین بر فراموشی ایجاد شده توسط اتانول انجام شد. داده ها در نرم افزار گراف پد پریسم ورژن ۹ وارد و توسط آزمون ANOVA تجزیه و تحلیل شدند. P< ۰/۰۵ سطح معنی داری اول در نظر گرفته شد.

یافته ها: نتیجه آزمایش اول نشان داد که سه دوز ۰/۵ ۰/۷۵ ۱ kg/mg اتانول به طور معنی داری (p< ۰/۰۰۱ و p< ۰/۰۱) توانایی القاء فراموشی را دارند. آزمایش دوم نشان داد که هیچ کدام از دوزهای کورکومین باعث ایجاد فراموشی نمی شوند. آزمایش سوم نشان داد که دوزهای ۱۲.۵ kg/mg و ۶/۵ کورکومین در P< ۰/۰۱ و دوزهای ۵۰ kg/mg و ۲۵ در P< ۰/۰۰۱ باعث بازگشت حافظه تخریب شده می شوند.

نتیجه گیری: کورکومین احتمالا بدلیل خواص آنتی اکسیدانی بالا می تواند باعث بهبود حافظه گردد. با این حال، تحقیقات بیشتری در نحوه استفاده از این داروی گیاهی مورد نیاز می باشد.

واژگان کلیدی: آلزایمر، حافظه، کورکومین، فراموشی

Surveying the effect of nanochitosan containing Curcumin on ethanol-induced amnesia in NMRI mice

Goljahan Iri[1]; Mahmoud Heidari[1*]; Nasrinsadat Azami[*1]; Mehdi Ebadi[2]

1- Department of Biology, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Gorgan
2- Department of Chemistry, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Gorgan

** Email: Heidarimahmoud@gorganiau.ac.ir*
n.azami@gorganiau.ac.ir

Abstract

Background: The effect of medicinal herbs with high antioxidant property such as curcumin and nanotechnology approaches has been studied in amnesia improvement of Alzheimer animal model. In this study, potential of curcumin included Chitosan nanoparticles has been evaluated in improvement of amnesia induced by ethanol.

Methods In this experimental study, 128 NMRI mice weighing 30-40 gr were used in three phases. Injections were done intraperitoneally. The first phase was performed to get optimal ethanol dose can induce amnesia, the second phase to prove non impairing effect of nanoparticle enclosed curcumin, the third phase to survey the effect of different doses of nanoparticle enclosed curcumin on amnesia induced by ethanol. Data was recorded and analyzed in GraphPad Prism software using ANOVA and Tukey post hoc test. $P<0.05$ was considered as first significant level.

Results: The first phase result showed that doses 0.5, 0.75, 1 mg/kgBW of ethanol can significantly induce amnesia. The second phase result showed non impairing effect of nanoparticle enclosed curcumin. The third phase result showed that all doses of nanoparticle enclosed curcumin can significantly ($p<0.001$) improve amnesia, but chitosan nanoparticle alone and saline couldn't.

Conclusion: Chitosan nanoparticles used in this study made lower doses of curcumin to be effective in memory improvement. However, more studies are needed for the application of this nanoparticle in oral drug delivery.

Keywords: Alzheimer, Drug Delivery, Memory, Curcumin, Chitosan

بررسی تاثیر نانوذرات کیتوزان حاوی کورکومین بر فراموشی ناشی از اتانول در موش سوری نژاد NMRI

گل جهان ایری[۱]؛ محمود حیدری[۱*]؛ نسرین سادات اعظمی [۱*]؛ مهدی عبادی[۲]

۱- گروه زیست شناسی دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان
۲- گروه شیمی دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان

Email: Heidarimahmoud@gorganiau.ac.ir
n.azami@gorganiau.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: داروهای گیاهی با خواص آنتی اکسیدانی بالا از جمله کورکومین بهمراه روش های نانوتکنولوژی جهت بهبود فراموشی در مدل آلزایمر مورد مطالعه قرار گرفته اند. این مطالعه پتانسیل نانوذرات کیتوزان حاوی کورکومین در بهبود فراموشی ناشی از اتانول را مورد بررسی قرار داده است.

روش کار: در این تحقیق تجربی، ۱۲۸ سر موش سوری نژاد NMRI به وزن ۴۰-۳۰ گرم در سه آزمایش استفاده شد. تزریق ها بصورت درون صفاقی صورت گرفت. آزمایش اول جهت تعیین دوز مناسب اتانول به منظور تخریب حافظه، آزمایش دوم به منظور اثبات عدم ایجاد فراموشی توسط کورکومین، آزمایش سوم، جهت بررسی تاثیر دوزهای مختلف کورکومین پوشش شده با نانوذرات کیتوزان بر فراموشی ایجاد شده توسط اتانول انجام شد. داده ها در نرم افزار گراف پد پریسم وارد شدند و توسط آزمون ANOVA تجزیه و تحلیل شدند. P< ۰/۰۵ سطح معنی داری اول در نظر گرفته شد.

یافته ها: ازمایش اول نشان داد که دوزهای ۰/۵ ۰/۷۵ ۱، kg/mg اتانول به طور معنی داری (p< ۰/۰۰۱ و p< ۰/۰۱) باعث فراموشی می شوند. آزمایش دوم نشان داد که کورکومین پوشش شده با نانوذرات کیتوزان باعث ایجاد فراموشی نمی شوند. آزمایش سوم نشان داد که همه دوزهای کورکومین با اختلاف معنی داری (p< ۰/۰۰۱) باعث بازگشت حافظه تخریب شده می شوند. ولی تزریق نانو ذرات کیتوزان و سالین باعث بهبود حافظه تخریب شده نمی شوند.

نتیجه گیری: نانو ذرات کیتوزان استفاده شده در این مطالعه می تواند باعث اثرگذاری دوزهای پایین کورکومین در بهبود حافظه گردد. با این حال، تحقیقات بیشتری در استفاده از این نانوذرات جهت انتقال خوراکی داروها مورد نیاز می باشد.

واژگان کلیدی: آلزایمر، دارورسانی، حافظه، کورکومین، کیتوزان

Surveying the effect of nanochitosan containing Donepezil on ethanol-induced amnesia in NMRI mice

Nasrinsadat Azami[1*]; Mahmoud Heidari[*1]; Sajjad Sepahi[1]; Mehdi Ebadi[2]

1- Department of Biology, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Gorgan
2- Department of Chemistry, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Gorgan

** Email: n.azami@gorganiau.ac.ir*
Heidarimahmoud@gorganiau.ac.ir

Abstract

Background: Progressive neurodegeneration of nervous system and disorder of learning and memory are characteristics of Alzheimer disease. One aspect for disease treatment is improvement of drug delivery. Chitosan nano particle has been used in this study for Donepezil transportation and its effect on amnesia improvement was studied.

Materials & Methods: In this experimental study, 136 NMRI mice weighing 30-40 g were used. All injections were done intraperitoneally. The first experiment was done for getting optimal dose of ethanol for inducing amnesia, the second experiment for improving non impairing effect of encapsulated Donepezil (0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/kg), the third experiment for assessing the effect of different doses of encapsulated Donepezil in on amnesia induced by ethanol. Data was recorded as mean ± SD, analyzed in GraphPad Prism software using ANOVA and Tukey post hoc test. $P<0.05$ was considered as significant level.

Results: The first experiment showed that ethanol (0.5, 0.75, 1 mg/kg)could significantly induce amnesia. The second experiment showed non impairing effect of encapsulated Donepezil. The third experiment showed that all doses of encapsulated Donepezil but not saline and chitosan nano particle groups, could significantly improve amnesia induced by ethanol.

Conclusion: Chitosan nano particle used in this study can efficiently be used in drug delivery. However, more study should be done for this composition to be used as oral drug transportation.

Keywords: Alzheimer, Memory, Chitosan, Drug Delivery

بررسی تأثیر نانوکیتوزان حاوی داروی دونپزیل بر فراموشی ناشی از اتانول در موش سوری نژاد NMRI

نسرین سادات اعظمی [۱*]؛ محمود حیدری [۱*]؛ سجاد سپاهی [۱]؛ مهدی عبادی [۲]

۱- گروه زیست شناسی دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان
۲- گروه شیمی دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان
Email: n.azami@gorganiau.ac.ir
Heidarimahmoud@gorganiau.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: تخریب پیش رونده سیستم عصبی و اختلال حافظه و یادگیری از ویژگی های بیماری آلزایمر می باشد. یکی از جنبه های مطالعاتی در درمان بیماری ها، بهبود فرایند دارورسانی است. در این مطالعه از نانو ذرات کیتوزان جهت انتقال داروی دونپزیل و تاثیر آن بر بهبود فراموشی ناشی از اتانول استفاده شد.

روش بررسی: در این تحقیق تجربی، ۱۳۶ موش سوری نژاد NMRI به وزن تقریبی ۴۰-۳۰ گرم استفاده شد. تمامی تزریق ها بصورت درون صفاقی صورت گرفت. در آزمایش اول دوز مناسب اتانول جهت القاء فراموشی، آزمایش دوم جهت اثبات عدم تخریب حافظه توسط دونپزیل پوشش شده و آزمایش سوم، تاثیر دوزهای مختلف دونپزیل پوشش شده بر فراموشی ناشی از اتانول انجام شد. داده ها بصورت میانگین و انحراف معیار ثبت گردید. نرم افزار گراف پد پریسم، آزمون ANOVA جهت تجزیه و تحلیل استفاده شد. ۰/۰۵ >P سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته ها: ازمایش اول نشان داد که دوزهای (۰/۷۵، ۰/۵ kg/mg و۱) اتانول به طور معنی داری سبب ایجاد فراموشی می شوند. آزمایش دوم نشان داد که دونپزیل پوشش شده باعث تخریب حافظه نمی شوند. آزمایش سوم نشان داد که بر خلاف گروه های سالین و نانو ذرات کیتوزان، همه دوزهای دونپزیل پوشش شده به طور معنی داری فراموشی ناشی از اتانول را بهبود می بخشند.

نتیجه گیری: نانو ذرات کیتوزان استفاده شده در این مطالعه می تواند بطور موثری در انتقال دارو استفاده شود. لیکن تحقیقات بیشتر جهت کاربرد این ترکیب در انتقال خوراکی داروها مورد نیاز است.

واژگان کلیدی: آلزایمر، حافظه، کیتوزان، دارورسانی

Ecdysterone in combination with High-intensity interval training exercise alleviate anxiety & depression, hippocampal oxidative stress levels and neuronal loss in an amyloid beta-induced rat model of Alzheimer's disease: A behavioral, biochemical and histological study

Parsa Gholipour[1*]; Alireza Komaki[2]; Mahdi Ramezani[2]; Hesam Parsa[1]

1. Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Bu Ali Sina University, Hamedan, Iran
2. Neurophysiology Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

**parsagholipour1996@gmail.com*

Abstract

Background and Aim: Hippocampal oxidative stress has a key role in the pathophysiology of Alzheimer's disease (AD)-associated behavioral deficits. Ecdysterone (Ecdy), a natural product and major steroid hormone, exhibits anti-oxidative and neuroprotective effects. High-intensity interval training (HIIT) has emerged as an effective method for improving physiological brain functions. The present study was designed to investigate the comparative effects of separate and combined HIIT and Ecdy treatment on anxiety-like behavior and also, depression-like behavior functions in an amyloid beta (Aβ)-induced rat model of AD.

Methods: Rats were treated simultaneously with HIIT exercise and Ecdy (10 mg/kg/day; P.O.), starting 10 days after Aβ-injection, and they continued for eight consecutive weeks. At the end of the treatment course, anxiety-like behavior and also, depression-like behavior functions of the rats were assessed by elevated plus maze and forced swimming paradigms. Subsequently, brain sample was collected for biochemical and histological analysis.

Results: The results of behavioral tests illustrated that Aβ injection caused increase of anxiety-like behavior and also, depression-like behavior in elevated plus maze test and forced swimming test respectively. These deficits were accompanied by increase of hippocampal oxidative stress in the Wistar rats. Treatment with HIIT and Ecdy not only with each other but also any one alone could alleviate anxiety-like behaviors significantly, while just treatment with both HIIT and Ecdy together caused an improvement in depression-like behavior. Meanwhile HIIT and Ecdy next to

each other could ameliorate hippocampal oxidant status. However, their combination resulted in a more complete and powerful improvement in all the above-mentioned Aβ-related deficits. **Conclusion:** These data provide evidence that a combination of HIIT and Ecdy treatment improves Aβ-induced behavioral deficits, possibly through amelioration of hippocampal oxidative status.

Keywords: Ecdysterone, High Intensity Interval Training, Aβ, stress oxidative, Alzheimer

اکدیسترون در ترکیب با تمرین ورزشی تناوبی شدید اضطراب، افسردگی، سطوح استرس اکسیداتیو هیپوکمپی و آسیب نورونی را در رت مدل آلزایمری القا شده با آمیلوییید بتا را بهبود می بخشد. یک مطالعه ی رفتاری، بیوشیمیایی، بافت شناسی

پارسا قلی پور[1*]؛ علیرضا کمکی[2]؛ مهدی رمضانی[2]; حسام پارسا[1]

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، داانشگاه بوعلی سینا، همدان
۲- - گروه فیزیولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، داانشگاه علوم پزشکی، همدان

*Email: *Parsagholipour1996@gmail.com*

چکیده

زمینه و هدف: استرس اکسیداتیو هیپوکامپ نقشی کلیدی در پاتوفیزیولوژی بیماری آلزایمر (AD) دارد. اکدیسترون یک محصول طبیعی و هورمون استروئیدی اصلی است که دارای اثرات ضد اکسیداتیو و محافظ عصبی است. تمرینات تناوبی با شدت بالا (HIIT) به عنوان روشی مؤثر برای بهبود عملکردهای فیزیولوژیکی مغز مطرح شده است. مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات مقایسه ای جداگانه و ترکیبی تیمارهای HIIT و اکدیسترون بر عملکردهای رفتاری شبه اضطرابی و همچنین شبه افسردگی در مدل موش صحرایی القاء شده توسط آمیلوئید بتا (Aβ) طراحی شد.

روش ها: ۱۰ روز پس از تزریقAβ ، موش های صحرایی همزمان با تمرین HIIT و اکدیسترون (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم در روز؛ به روش خوراکی) به مدت هشت هفته متوالی تحت درمان قرار گرفتند. در پایان دوره درمان، عملکردهای رفتاری شبه اضطرابی و همینطور شبه افسردگی موشهای صحرایی توسط تست های ماز بعلاوه مرتفع و شنای اجباری مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از آن، نمونه هیپوکمپ مغز برای تجزیه و تحلیل بیوشیمیایی جمع آوری شد.

نتایج: نتایج آزمون های رفتاری نشان داد که تزریق Aβ باعث افزایش میزان رفتار شبه اضطرابی و همچنین شبه افسردگی به ترتیب در آزمون های ماز بعلاوه مرتفع و شنای اجباری می شود. این نقایص رفتاری با افزایش استرس اکسیداتیو هیپوکامپ موش های صحرایی همراه بود. HIIT و اکدیسترون نه تنها در کنار یکدیگر بلکه هر یک به تنهایی نیز رفتارهای شبه اضطرابی را به طور معنادار بهبود بخشیدند، در حالی که درمان تنها با هر دو HIIT و اکدیسترون باعث بهبود رفتار شبه افسردگی شد. ضمنا HIIT و اکدیسترون

در کنار هم باعث بهبود وضعیت اکسیدانی هیپوکمپ نیز شدند. با این حال، ترکیب آن ها موجب بهبود کامل تر و قدرتمندتر تمامی نقایص مذکور ناشی از تزریق Aβ شد.

نتیجه‌گیری: این داده‌ها شواهدی را ارائه می‌دهند که ترکیب تیمار HIIT و اکدیسترون احتمالاً از طریق بهبود وضعیت اکسیداتیو هیپوکامپ، نقایص رفتاری القاء شده توسط Aβ را بهبود می‌بخشد.

واژگان کلیدی: اکدیسترون، تمرین ورزشی تناوبی شدید، آمیلوئیدبتا، استرس اکسیداتیو، آلزایمر

Protective effect of Hydroalcoholic Extract of *Portulaca oleracea* on Hepatotoxicity of Bisphenol A.

Davood Fazli[1*]

[1-] Department of Biology, Payame Nour University(PNU), Tehran, Iran.

** Corresponding Author's E-mail:Fazlibio57@gmail,com*

Abstract

The aim of this study was to evaluate the protective effects of *Portulaca oleracea* extract against hepatotoxicity caused by bisphenol A (BPA). Reactive oxygen species (ROS) are cytotoxic agents that lead to significant oxidative damage. Bisphenol A is a potentially endocrine-disrupting chemical agent that is widely used in plastic industries. Human is at greater risk of exposure to BPA because it can be released from polymeric materials and enter water and food sources. *P. oleracea* contains many biologically active compounds and is a rich source of many nutrients like oxalic acids, alkaloids, omega-3 fatty acids and flavonoids. This plant is a promising natural product, which could be useful for the prevention of cardiovascular, neurodegenerative and other chronic diseases caused by oxidative stress. In this study, 49 rats were randomly divided into 7 groups: control group, sham group (receiving 500 µg of corn oil / kg BW), group receiving toxin (500 µg of bisphenol A / kg BW), positive control (100 mg of hydroalcoholic extract of *P. oleracea* / kg BW), and three treatment groups receiving purslane hydroalcoholic extract (500 µg of bisphenol A + 50, 100, 150 mg of hydroalcoholic extract of purslane hydroalcoholic extract/ kg BW, respectively). All injections were performed Intraperitoneal Route for 14 consecutive days. At the end of the injection time (14 days), all animals were anesthetized with chloral hydrate and after dissection, Serum and liver tissue homogeneity were prepared to measure the studied factors. data were analyzed by SPSS software. Alkaline phosphatase and bilirubin levels increased and glutathione-s-transferase decreased in the bisphenol group when compared to control group. Also the results of this study showed significant decrease of Alkaline phosphatase and bilirubin and significant increase of glutathione-s-transferase in the purslane treated groups in comparison with BPA group ($p<0.05$). Moreover, the decrease in alkaline phosphatase and bilirubin levels and the increase in glutathione peroxidase were significant only in the *P. oleracea* 100 treatment group in comparison with control group($p<0.05$). According to the results of this study, hepatotoxicity and oxidative stress induced by bisphenol A effects could be decreased using purslane .

Keywords: Alkaline phosphatase, bilirubin, glutathione-s-transferase

اثر حفاظتی عصاره هیدروالکلی خرفه در برابر مسمومیت کبدی با بیسفنول A

داود فضلی[1*]

[1] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم- دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

Email: fazlibio57@gmail.com

چکیده

هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر حافظتی عصاره خرفه در برابر سمیت کبدی ناشی از بیسفنول می‌باشد. گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) عوامل سیتوتوکسیک هستند که موجب آسیب اکسیداتیو قابل ملاحظه می‌شوند. بیسفنول A یک ماده شیمیایی مختل کننده غدد درون‌ریز است که در صنایع پلاستیک بصورت وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرد. به دلیل اینکه این ماده از مواد پلیمری آزاد و وارد منابع آبی و غذایی می شود، انسان در معرض خطر بیشتری قرار دارد. گیاه خرفه دارای بسیاری از ترکیبات فعال زیستی و منبع غنی از مواد مغذی از قبیل اگزالیک اسید، آلکالوئیدها، اسید چرب امگا ۳ و فلاونوئیدها می‌باشد. این گیاه می‌تواند برای جلوگیری از بیماری‌های قلبی، تحلیل برنده سیستم ایمنی و سایر بیماری‌های مزمن با منشأ استرس اکسیداتیو مفید واقع شود. در این مطالعه ۴۹ رت به طور تصادفی به ۷ گروه ۷ تایی تقسیم شدند: کنترل، شم (دریافت کننده ۵۰۰ میکروگرم روغن ذرت/کیلوگرم وزن بدن)، گروه دریافت کننده سم (۵۰۰ میکروگرم بیسفنولA/کیلوگرم وزن بدن)، کنترل مثبت (۱۰۰ میلی‌گرم عصاره هیدروالکلی گیاه خرفه/کیلوگرم وزن بدن) و سه گروه تیمار دریافت کننده خرفه (۵۰۰ میکروگرم بیسفنولA + ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم عصاره هیدروالکلی گیاه خرفه/کیلوگرم وزن بدن). تمام تزریقات به روش درون صفاقی و طی ۱۴ روز پیاپی انجام شد. پس از اتمام زمان تزریقات (۱۴ روز) تمامی حیوانات با کلرال هیدرات بیهوش و تشریح شدند. سرم و هموژن بافتی کبد برای سنجش فاکتورهای مورد بررسی تهیه گردید. داده‌های حاصل با نرم‌افزار spss مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در گروه بیسفنول در مقایسه با گروه کنترل مقادیر آلکالین فسفاتاز و بیلی‌روبین افزایش و گلوتاتیون ترانسفراز کاهش یافته بود. در گروه‌های تیمار با خرفه نسبت به گروه بیسفنول مقادیر آلکالین فسفاتاز و بیلی‌روبین کاهش معنی‌دار و گلوتاتیون ترانسفراز افزایش معنی‌داری یافته بود($p<۰/۰۵$). علاوه بر این، کاهش سطح آلکالین فسفاتاز و بیلی روبین و افزایش گلوتاتیون پراکسیداز فقط در گروه تیمار با خرفه ۱۰۰، نسبت به گروه کنترل معنی دار بود($p<۰/۰۵$). بر اساس نتایج این تحقیق سمیت کبدی و اکسیدانی ناشی از بیسفنول با استفاده از خرفه کاهش می‌یابد.

کلمات کلیدی: آلکالین فسفاتاز، بیلی‌روبین، گلوتاتیون ترانسفراز

The effect of different doses of silver nanoparticles on proliferation, colonization and DNA methylation of spermatogonia stem cells in neonatal mice

Marjan Mortezanejad; Tooba Mirzapour*; Mahvash Hadavi

Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran

*Dr.tooba72@gmail.com

Nanoparticles include particles ranging in size from 10 to 100 nanometers that enter the human body through inhalation, ingestion, injection, physical contact, cuts, or wounds. Silver nanoparticles are used as one of the main materials in industrial products, water purifiers, packaging materials, medical devices, cosmetics, wound dressings. Due to the widespread use of silver nanoparticles, it is important to study the effects of these materials on various tissues, especially reproductive organs and spermatogonia cells. In this study, the effect of different doses of silver nanoparticles was investigated on spermatogonia stem cell proliferation and self-renewal and DNA methylation. Silver nitrate as a precursor was exposed to the nettle extract (*Urtica dioica)* as a reducing agent. DLS (Dynamic Light Scattering) results showed that the size of silver nanoparticles produced in this reaction was between 10 and 100 nm. In the next stage, testicular tissue of neonatal mice (n = 15) was exposed to 0.5 mg/ml of trypsin and collagenase enzymes after leaving the sclerotome sac, and spermatogonia stem cells were isolated during two stages of enzymatic digestion method. The effect of different concentrations of silver nanoparticles (41.6, 20/3, 41/6, 83/3, 166, 333, 500 µg / ml) on cell viability was investigated by MTT **(**Methyl Thiazolyl Tetrazolium**)** test and compared with control group. The results showed that doses of 20/3 and 41/6 µg / ml of silver nanoparticles had the maximum damage effects and 75.9% and 70.1% of the cells survived, respectively. There was no significant difference in survival rate between the control and treatment groups ($p \geq 0.05$). The effect of silver nanoparticles on DNA methylation was investigated in the treatment and control groups based on methylation method after extracting of DNA from cells. The results showed that silver nanoparticles inhibit proliferation and colonization of stem cells in a dose-dependent pattern. The self-renewal of spermatogonial stem cells is reduced by increasing the dose of silver nanoparticles. Epigenetic changes due to DNA methylation were also severe in cultured spermatogonia, so that at higher doses of silver nanoparticles (41/6 µg/ml) DNA methylation was reduced. Rapid advancement of nanotechnology Increases the production of various nanoparticles, followed by the chance of human exposure to nanoparticles, which can threaten their health.

Keywords: *Urtica dioica* plant extract, Spermatogonial Stem Cells, DNA Methylation, Silver Nanoparticle

تاثیر دوزهای مختلف نانوذرات نقره برتکثیر، کلونیزایی و متیلاسیون DNA سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی موشهای سوری نوزاد

مرجان مرتضی نژاد؛ طوبا میرزاپور *؛ مهوش هادوی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت ،ایران

Dr.tooba72@gmail.com

چکیده

نانوذرات شامل ذراتی با اندازه های ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر بوده که از طریق استنشاق، بلع، تزریق، تماس فیزیکی، بریدگی یا زخم وارد بدن انسان می شوند. نانوذرات نقره به عنوان یکی از مواد اصلی در محصولات صنعتی، دستگاه های تصفیه آب، مواد بسته بندی، دستگاههای پزشکی، مواد آرایشی بهداشتی و پانسمان زخم استفاده می شوند. باتوجه به کاربرد گسترده نانوذرات نقره، بررسی اثرات این مواد بر بافتهای مختلف به ویژه اندام های تولید مثلی و سلولهای اسپرماتوگونی حائز اهمیت است. در این مطالعه اثر دوز های مختلف نانوذرات نقره بر تکثیر و خودنوزایی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی و متیلاسیون DNA مورد بررسی قرار گرفت. نیترات نقره به عنوان پیش ماده در معرض عصاره گیاه گزنه (*Urtica dioica*) به عنوان عامل احیاگر قرار گرفت. نتایج DLS Dynamic (Light Scattering) نشان داد سایز نانوذرات نقره تولید شده در این واکنش، بین ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر می باشد. در مرحله بعد بافت بیضه موشهای نوزاد (n = ۱۵) پس از خروج از کیسه اسکلرونوم در معرض غلظت ۰/۵ میلیگرم بر میلی لیتر آنزیمهای تریپسن و کلاژناز قرار گرفت و سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی طی دو مرحله هضم آنزیمی جداسازی شدند. با روش MTT (Methyl Thiazolyl Tetrazolium)اثر غلظتهای مختلف نانوذرات نقره (۵۰۰ ، ۳۳۳، ۱۶۶، ۸۳/۳، ۴۱/۶، ۲۰/۳، میکروگرم بر میلی لیتر) بر زنده مانی سلولها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد دوز های ۲۰/۳ و ۴۱/۶ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات نقره کمترین آسیب سلولی را به همراه داشتند و به ترتیب ۷۵/۹ و ۷۰/۱ درصد سلولها زنده ماندند. از نظر درصد زنده مانی اختلاف معنی داری بین این گروهها و گروه کنترل مشاهده نشد ($p \geq ۰/۰۵$). سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی به مدت یک هفته در معرض غلظت های انتخاب شده قرار گرفتند و تاثیر نانوذرات نقره برمیزان متیلاسیون DNA پس از استخراج DNA از این سلولها، با استفاده از کیت Methylation در گروههای تیمار و کنترل بررسی شد. نتایج نشان داد نانوذرات نقره به صورت وابسته به دوز، تکثیر سلول های بنیادی اسپرماتوگونی و کلونیزایی آنها را مهار میکند. هرچقدر دوز نانوذرات نقره بیشتر باشد خودنوزایی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی کاهش مییابد. تغییرات اپی ژنتیکی ناشی از متیلاسیون DNA نیز در اسپرماتوگونی های کشت شده، شدید بود به طوریکه در دوز بالاتر نانوذرات نقره (۴۱/۶ µg/ml) کاهش متیلاسیون DNA مشاهده گردید. پیشرفت سریع فناوری نانو باعث افزایش تولید نانوذرات مختلف و به دنبال آن شانس قرار گرفتن انسان در معرض نانوذرات شده است که می تواند سلامت انسانها را تهدید کند.

کلمات کلیدی: عصاره گیاه گزنه، سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی، متیلاسیون DNA , نانوذرات نقره

Effect of platelet rich plasma on sperm parameters and histological alteration in testicular ischemia/reperfusion model

Siamak Yari[1*]

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
Email: yarisiamak@yahoo.com

Abstract

Introduction: Testicular torsion is a urological emergency affecting mostly newborns, children and adolescent boys. Surgical intervention and testicular detorsion has important preventive role against testicular damages. Testicular torsion-detorsion leads to formation of ischemia-reperfusion. Many pharmacological agents and interventions for treatment of testicular ischemia-reperfusion have been used. Platelet rich plasma contains high level of growth factors. Platelet rich plasma has regenerative effect in various ischemic models. In this study we aimed to evaluate the effects of Platelet rich plasma on sperm parameters such as concentration, viability and abnormal morphology rate and histological changes including seminiferous tubular diameter, seminiferous epithelial thickness in testicular ischemia/reperfusion model.

Materials and methods: Twenty-one male Wistar albino rats were divided into three groups of seven animals in each: group one (sham), group two (ischemia-reperfusion), group three (ischemia/reperfusion+platelet rich plasma). Platelet rich plasma was prepared from allogeneic blood. Platelet rich plasma was administered via intraperitoneal route. At the end of experiments, testicular and epididymal weight were measured. Sperm parameters including: concentration, abnormal morphology rate and viability were examined. Sperm concentration evaluated by hemocytometer, sperm morphology assessed with eosin staining and viability with two-step eosin-nigrosin staining method. Testicular sections were stained with hematoxylin-eosin. Morphometric examination with Image J software was performed for measurement of seminiferous tubular diameter, seminiferous epithelial thickness. Statistical analysis was carried out with Prism software. Data were evaluated with One-Way ANOVA with tukey´s post hoc.

Results: Testicular ischemia-reperfusion in the group two caused a significant decrease in sperm concentration and viability and significant increase in abnormal sperm rate compare with group one. The platelet rich plasma-treated group show significant decrease in abnormal sperm rate and increase in viability and concentration compare to group two. Morphometric analysis showed that in group two, seminiferous tubule diameter and epithelial thickness, significantly decreased

compare with group one and three. However, in group three, seminiferous tubule diameter and epithelial thickness increase compare to group two.

Conclusion: Our results show that platelet rich plasma has protective effects on testicular I/R damages. Platelet rich plasma improved sperm parameters in ischemia/reperfusion model. Therefore, its use as a protection against testicular ischemia/reperfusion is suggested.

Keywords: testicular torsion/detorsion, sperm morphology, sperm viability, seminiferous tubules

تاثیر پلاسمای غنی از پلاکت بر پارامترهای اسپرمی و تغییرات بافتی در مدل ایسکمی-ریپرفیوژن بیضه

سیامک یاری[1*]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

Email: yarisiamak@yahoo.com

چکیده

مقدمه: پیچش بیضه‌ایی یکی از حالت‌های اورژانسی سیستم ادراری است و اکثراً نوزادان، کودکان و افراد جوان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. مداخله‌ی جراحی و برطرف کردن پیچش یکی از روشهای اصلی کاهش آثار مخرب پیچش بیضه است. پیچش و واپیچش بیضه‌ایی منجر به شکل‌گیری ایسکمی-ریپرفیوژن بیضه‌ای می‌شود. مواد و استراتژی‌های مختلفی برای کاهش آثار مخرب ناشی از ایسکمی-ریپرفیوژن بیضه‌ایی بکار می‌رود. پلاسمای غنی از پلاکت، حاوی سطح بالایی از فاکتورهای رشد است. پلاسمای غنی از پلاکت تاثیر ترمیمی در مدلهای مختلف ایسکمی دارد. هدف از این مطالعه بررسی تاثیرات پلاسمای غنی از پلاکت بر پارامترهای اسپرمی نظیر غلظت، بقا و نسبت مورفولوژی غیرطبیعی و تغییرات هیستولوژیکی شامل قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و ضخامت اپیتلیوم اسپرم‌ساز، در مدل ایسکمی-ریپرفیوژن بیضه می باشد.

مواد و روش‌ها: بیست و یک موش بزرگ آزمایشگاهی نژاد ویستار آلبینو به سه گروه هفت تایی تقسیم شدند. شامل: گروه یک (شَم)، گروه دو (ایسکمی-ریپرفیوژن) و گروه سه (ایسکمی-ریپرفیوژن+پلاسمای غنی از پلاکت). پلاسمای غنی از پلاکت از خون آلوژنیک تهیه شد. پلاسمای غنی از پلاکت به روش درون صفاقی تزریق شد. در پایان آزمایشات، وزن بیضه و اپیدیدیم اندازه گیری شد. پارامترهای اسپرمی شامل: غلظت، نسبت مورفولوژی غیرطبیعی و بقا ارزیابی شد. شمارش اسپرم با استفاده از لام هموسیتومتر، مورفولوژی اسپرم‌ها با استفاده از رنگ امیزی ائوزین و بقای اسپرم با استفاده از رنگ آمیزی دو مرحله‌ایی ائوزین-نیگروزین انجام شد. برش‌های بافت بیضه با استفاه از هماتوکسیلین-ائوزین رنگ_آمیزی شد و بررسی‌های مورفومتریک با استفاده از نرم‌افزار Image J برای اندازه‌گیری قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و ضخامت اپیتلیوم اسپرم‌ساز انجام شد. نتایج با نرم‌افزار پریسم و با روش آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی تحلیل آماری شد.

نتایج: ایسکمی-ریپرفیوژن بیضه‌ایی در گروه دو منجر به کاهش معنی‌دار در غلظت و بقای اسپرم و افزایش معنی‌دار در نسبت اسپرم‌های غیرطبیعی نسبت به گروه یک شد. در گروه تیمار شده با پلاسمای غنی از پلاکت شاهد کاهش معنی‌دار در نسبت مورفولوژی غیرطبیعی نسبت به گروه دو بودیم. همچنین تیمار با پلاسمای غنی از پلاکت منجر به افزایش معنی‌دار تعداد و بقای اسپرم‌ها در گروه سه نسبت به گروه دو شد. آنالیز مورفومتریک نشان داد که در گروه دو، قطر و ضخامت اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز به شکل معنی‌دار نسبت به گروه یک و سه کاهش یافت. این در حالیست که، در گروه سه، قطر و ضخامت اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز نسبت به گروه دو، افزایش داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان داد که پلاسمای غنی از پلاکت تاثیرات حمایتی بر آسیب‌های بافتی ناشی از ایسکمی-ریپرفیوژن بیضه دارد. همچنین تیمار با پلاسمای غنی از پلاکت موجب بهبود پارامترهای اسپرمی در مدل ایسکمی-ریپرفیوژن می‌شود. لذا استفاده از آن به‌عنوان یک فاکتور حمایتی برای کاهش آسیب‌های ایسکمی-ریپرفیوژن توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: پیچش/واپیچش بیضه، مورفولوژی اسپرم، بقای اسپرم، لوله‌های اسپرم‌ساز

Study of correlation between oxidative stress and expression of CatSper1 gene and vital sperm parameters in asthenoteratospermia men

Fahimeh Naghi jalalabadi[1*] ; Ebrahim Cheraghi[2] ; Rahil Janatifar[3] ; Hamidreza Momeni[4]

1. Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak
2. Department of Biology, Faculty of Science, Qom University, Qom
3. Department of Reproduction Biology, Academic Center for Education, Culture and Research, Qom Branch
4. Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak

Email: h-momeni@araku.ac.ir

Abstrac

Background: According to the World Health Organization, the ratio of total infertility to male causes about 46%. Asthenoteratospermia is an effective disorder in male infertility. Increasd ROS levels of seminal fluid reduces the quality of sperm and causes various DNA damage. Genetic factors also play a role in male infertility. Recently, specific calcium channels called CatSper have been identified that are associated with sperm hyperactivity and are important in regulating Ca^{2+}. The aim of this study was to investigate the relationship between oxidative stress and sperm count, vital sperm parameters (motility, viability and mitochondrial membrane potential) and CatSper1 gene expression.

Materials and Methods: In this applied study 30 asthenoteratospermia men and 15 healthy individuals control group referred to the Infertility Treatment Center of Qom IVF center Were used using. Sperm samples were collected from the doners 3-5 days after sexual intercourse. Each sample was placed at room temperature for 20 minutes for liquefaction. Analysis of sperm parameters (number, motility, viability) was performed according to the World Health Organization (WHO) guidelines. Sperm mitochondrial membrane potential was assessed by rhodamine staining. Oxidative stress levels were measured by Were used using MDA (Malondialdehyde) & TAC (Total Antioxidant Capacity) tests. RT-PCR and real-time were used to evaluate the expression of CatSper1 gene.

Results: The results showed that in asthenoteratospermia men the mean percentage of sperm motility, viability, number and mitochondrial membrane potential as well as the TAC of semen had a significant decrease compared to the control group.The level MDA in asthenoteratosperm group showed a significant increase compared to the control group. In addition, CatSper1 gene expression in the asthenoteratospermia group showed a significant decrease compared to the control group.

Conclusion: Due to the destructive effect of oxidative stress on sperm and damage to the mitochondria that stimulate the apoptotic cascade, the expression of CatSper1 gene is reduced.

Keywords: Infertility, sperm motility, oxidative reactions

پارامترهای حیاتی اسپرم در مردان CatSper1بررسی ارتباط بین استرس اکسیداتیو و بیان ژن آستنوتراتواسپرم

فهیمه نقی‌جلال‌آبادی[۱]؛ دکتر ابراهیم چراغی[۲]؛ دکتر راحیل جنتی‌فر[۳]؛ دکتر حمیدرضا مومنی[۴]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، اراک
۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه قم، قم
۳- گروه پژوهشی بیولوژی‌تولیدمثل، واحد تحقیقات جهاد دانشگاهی قم، قم
٤- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک،اراک
Email: h-momeni@araku.ac.ir

چکیده

سابقه و هدف: براساس گزارش سازمان بهداشت جهانی نسبت کل ناباروری با علت مردانه حدود 46% است. آستنوتراتواسپرمی اختلالی موثر در ناباروری مردان است. افزایش سطح ROS: Reactive Oxygen Species مایع سمینال سبب کاهش کیفیت اسپرم و ایجاد آسیب‌های گوناگون DNA می‌شود. عوامل ژنتیکی نیز در ناباروری مردان موثرند. کانال‌های کلسیمی ویژه تحت عنوان CatSper اخیرا شناسایی شده‌اند که مرتبط با تحرک بیش‌ازاندازه (Hyperactivation) اسپرم بوده و در تنظیم Ca^{2+} حائز اهمیت هستند. هدف پژوهش حاضر آشکار ساختن ارتباط بین شاخص‌های استرس اکسیداتیو، تعداد اسپرم، پارامترهای‌حیاتی اسپرم از جمله تحرک، قابلیت حیات، پتانسیل غشای میتوکندری و میزان بیان ژن CatSper1 در مردان آستنوتراتواسپرم می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش یک مطالعه کاربردی بوده و پس از تایید طرح در کمیته اخلاق، رضایت‌نامه آگاهانه اخذ و اطلاعات بیماران به‌صورت محرمانه نگه‌داری شد. افراد مورد بررسی شامل گروه بیمار که ۳۰ فرد آستنوتراتواسپرم و گروه کنترل شامل ۱۵ نفر سالم مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم می‌باشند. نمونه‌های اسپرم افراد مورد آزمایش در فاصله ۳ - ۵ روز پس از مقاربت جنسی جمع‌آوری شد. هر نمونه۲۰ دقیقه، در دمای اتاق به‌منظور مایع سازی قرار گرفت. آنالیز پارامترهای اسپرمی (تعداد، تحرک، قابلیت حیات) طبق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (WHO 2010) انجام شد. سنجش پتانسیل غشا میتوکندری اسپرم توسط رنگ‌آمیزی رودامین انجام گردید. اندازه‌گیری سطح استرس اکسیداتیو توسط تست‌های MDA (Malondialdehyde) & TAC (Total Antioxidant Capacity) و روش الایزا صورت گرفت. سنجش میزان بیان ژن CatSper1 از RT-PCR و Real-time استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان داد که در افراد آستنوتراتواسپرم میزان میانگین درصد کل تحرک اسپرم، قابلیت حیات اسپرم و تعداد اسپرم، همچنین پتانسیل غشای میتوکندری اسپرم و میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی مایع منی کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل

داشت. سطح MDA در بیماران افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد. علاوه‌بر این بیان ژن CatSper1 در گروه آستنوتراتواسپرم کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه سالم نشان داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به تاثیر مخرب استرس اکسیداتیو بر روی اسپرم و آسیب وارده به میتوکندری که موجب تحریک آبشار آپوپتوزی می‌شود، درنتیجه میزان بیان ژن CatSper1 کاهش می‌یابد.

واژگان کلیدی: ناباروری، تحرک اسپرم، واکنش‌های اکسیداتیو

Evaluation of sperm cryopreservation on sperm fertility competence in the presence of Deep Eutectic Solvents

Haniyeh Saadat Maryan[1*]; Fatemeh Ghasemian[1]; Mohammad Hadi Bahadori[2]

1- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Guilan, Rasht
2- Department of Anatomy, Medical School, Guilan University of Medical Sciences, Rasht

haniyeh.saadat.76@gmail.com

Abstract

Background: Infertility means not getting pregnant after a certain period of trying to get pregnant with regular intercourse. The main cause of infertility in 40% of couples is male infertility. If a person has a specific disease such as cancer, diabetes or autoimmune disorders, the treatment process can affect a person's fertility potential; or in many cases, due to the reduction in the number and quality of sperms, there is a possibility of reducing the fertility potential of the individual, which can be used sperm freezing technique. Sperm freezing is done primarily to stop sperm metabolic processes and can be detrimental to sperm survival. Sperms experience stress in the form of cold shock, osmotic stress, and mainly oxidative stress during freezing, which leads to structural and functional damage to sperm and ultimately reduces sperm survival and fertility. Studies have shown that DES solvents, with their many advantages, can be an alternative to chemical agents that protect against freezing. The aim of this study was to investigate the effects of sperm freezing in the presence of Deep Eutectic solvents such as EtP and GlyP as freezing protectors and their relationship with semen quality and sperm parameters in normozoospermic samples.

Materials and Methods: In this study, male normozoospermic samples were used. Except for the control group, the rest of the normozoospermic samples were performed in the presence of 2 types of DES solvents and of course sperm freezing solution (3 groups), freeze-thaw process. Ethylene glycol and L-proline were used to prepare EtP and Glycerol and L-proline were used to prepare the GlyP. Subsequently, the samples were evaluated after thawing by eosin-negrosin (sperm membrane health), aniline blue (sperm chromatin density), toluidine blue (sperm chromatin health) and triple (survival and acrosomal reaction of sperm) staining were evaluated and studied.

Results: Studies in fertile men have shown that the presence of DES solvents as freeze protectors plays an important role in semen quality and various sperm parameters (motility, survival and chromatin integrity).

Conclusion: Today, sperm freezing technique is one of the most common techniques in infertility treatment centers. The importance of this technique in helping to treat infertility has led to a special focus on freeze protectors and their relationship to male fertility potential. Hence, extensive research has been done to obtain the most effective sperm freeze protectors to increase fertility potential and reduce infertility rates in men.

Keywords: Male infertility, Sperm freezing, Spermatozoa, Vitrification

ارزیابی حفظ انجمادی اسپرم بر شایستگی باروری اسپرم در حضور حلال‌های فرا زود گداز

حانیه سعادت مریان[۱*]؛ فاطمه قاسمیان[۱]؛ محمد هادی بهادری[۲]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت

۲- گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت

Email: Haniyeh.saadat.76@gmail.com

چکیده

مقدمه: ناباروری به معنای عدم بارداری پس از یک دوره‌ی مشخص تلاش برای باردار شدن با مقاربت منظم است. علت اصلی ناباروری در ۴۰٪ زوجین، ناباروری مردان است. اگر فرد به بیماری خاصی نظیر سرطان، دیابت یا اختلالات خودایمنی مبتلا باشد، روند درمان می‌تواند روی پتانسیل باروری فرد اثر بگذارد؛ یا در بسیاری از موارد به دلیل کاهش تعداد و کیفیت اسپرم‌ها، احتمال کاهش پتانسیل باروری فرد وجود دارد که می‌توان از تکنیک فریز اسپرم استفاده کرد. فریز اسپرم عمدتا به منظور متوقف کردن فرآیندهای متابولیک اسپرم انجام می‌شود و می‌تواند برای بقای اسپرم مضر باشد. اسپرم‌ها استرس را به صورت شوک سرمایی، استرس اسمزی و عمدتا استرس اکسیداتیو در هنگام فریز تجربه می‌کنند که منجر به آسیب ساختاری و عملکردی اسپرم و در نهایت کاهش بقا و باروری اسپرم می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که حلال‌های DES با دارا بودن مزیت‌های فراوان، می‌توانند جایگزینی برای عوامل شیمیایی محافظت‌کننده در برابر فریز باشند. هدف ما از این مطالعه، بررسی اثرات فریز اسپرم در حضور حلال‌های فرا زود گدازی مانند EtP و GlyPبه عنوان محافظ‌های فریز و ارتباط آن‌ها با کیفیت سیمن و پارامترهای اسپرم در نمونه‌های نرموزواسپرمی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از نمونه‌های نرموزواسپرمی مردان استفاده شد. بجز گروه کنترل، مابقی نمونه‌های نرموزواسپرمی در حضور ۲ نوع از حلال‌های DES (EtP وGlyP) و البته محلول فریز اسپرم (۳ گروه)، فرآیند فریز-ذوب بر روی آن‌ها انجام شد. برای تهیه‌ی EtP از اتیلن‌گلیکول و L-پرولین و برای تهیه‌ی GlyP از گلیسرول و L-پرولین استفاده شد. در ادامه، نمونه‌ها پس از ذوب از طریق رنگ‌آمیزی‌های ائوزین-نیگروزین (سلامت غشای اسپرم)، آنیلین بلو (تراکم کروماتین اسپرم)، تولوئیدین بلو (سلامت کروماتین اسپرم) و سه‌گانه (بقا و واکنش آکروزومی اسپرم) مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفتند.

نتایج: طبق مطالعات انجام شده بر روی مردان بارور، مشخص شد که وجود حلال‌های DES به عنوان محافظ‌های فریز نقش مهمی در کیفیت سیمن و پارامترهای مختلف اسپرم (تحرک، بقا و یکپارچگی کروماتین) دارد.

بحث: امروزه تکنیک فریز اسپرم یکی از متداول‌ترین تکنیک‌های مراکز درمان ناباروری به شمار می‌رود. اهمیت این تکنیک در کمک به درمان ناباروری، سبب شده است که نگاه ویژه‌ای به محافظ‌های فریز اسپرم و رابطه‌ی آن‌ها با پتانسیل باروری مردان صورت گیرد. از اینرو، تحقیقات گسترده‌ای برای دستیابی به کارامدترین محافظ‌های فریز اسپرم به منظور افزایش پتانسیل باروری و کاهش نرخ ناباروری در مردان صورت گرفته است.

واژگان کلیدی: ناباروری مردان، فریز اسپرم، اسپرماتوزوآ، انجماد شیشه‌ای

Application of the relationship between carbon to nitrogen ratio and carbon 13 isotope in coastal ecological studies

Nabiallah Kheirabadi[1*]; Mehdi Ghodrati Shojaei[1]

1- Department of Marine Biology, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor City

*nabi_kheriabadi@yahoo.com

Abstract

The C / N ratio can be a practical tool for understanding the origin of organic matter as well as the dynamics of organic matter in natural environments in sediments. The ratio of carbon to nitrogen is used by ecologists, biogeochemists and geologists as indicators for the origin of organic matter, the amount of nutritional value and the rate of biological changes of organic matter. The use of this ratio is important in the analysis of the source of organic carbon in sediments. The carbon source in sediments based on land sources (such as land plants) or marine origin (such as algae and phytoplankton) can be identified by using this ratio. The use of C / N ratio along with 13% carbon isotope percentage ($^{13}C\%\delta$) can provide us with higher accuracy regarding the origin of organic matter. In this study, we will investigate the application of C / N ratio and analyze the carbon isotope ($^{13}C\%\delta$) in sediments and various materials of land and marine origin. Coastal sediments receive organic matter from autochthonous sources (derived from non-displaced and endogenous sources, such as plants grown on the sediment surface) as well as allochthonous sources (organic matter transferred to sediment from other areas and methods, such as tides or River). In order to measure the C / N ratio, the samples are dried in a Freeze Dryer for 24 hours. The samples are then homogeneously powdered and at least one milligram of the sample is placed in a tin package. Samples are analyzed to measure δ13C and δ15N ratios using Isotope Ratio Mass Spectrometers. The C / N ratio of organic matter derived from marine phytoplankton is about 6 to 8 and is usually between 2 to 20 times lower than organic matter derived from terrestrial plants. However, the C / N ratio of marine phytoplankton-derived organic matter in oligotrophic environments or environments with limited nitrogen levels may be as high as 20 or even higher. Terrestrial vascular plants have a C / N ratio of more than 20. This is a significant difference in the C / N ratio of marine phytoplankton and terrestrial vascular plants due to the absence of cellulose, which has the chemical formula $(C_6H_{10}O_5)_n$, as well as higher amounts of protein in algae and phytoplankton (about 15% in Algae, 32% in Dinoflagellates and 63% in Diatoms) (relative to protein in vascular plants (about 1 to 8%). Organic-rich surface sediments in marine environments often develop on the coastal areas, such as areas with extensive vegetation (such as mangrove forests) that have high organic matter in the sediments. We will also discuss the applications of

this ratio in the study of areas prone to mangrove cultivation. In areas where there is a need to restore and rehabilitate mangrove forests, or where environmental policies and funding are available, there are 18 basic parameters for determining a suitable planting site. The C / N ratio is a very good indicator of the fertility of sediments in an area, so that if this ratio is low, it indicates the entry of organic matter and nutrients from the land source to this coastal area, and this coastal area in terms of fertility. It is considered suitable for cultivating mangrove forests.

Keywords: Coastal areas, Isotopes, Carbon, Nitrogen

کاربرد رابطه بین نسبت کربن به نیتروژن و ایزوتوپ کربن ۱۳ در مطالعات اکولوژیک سواحل

نبی اله خیرآبادی[1]*؛ مهدی قدرتی شجاعی[1]

۱- گروه زیست شناسی دریا، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، شهر نور
Email: Nabi_kheirabadi@yahoo.com

چکیده

نسبت C / N می‌تواند ابزاری کاربردی جهت درک منشأ مواد آلی و همچنین دینامیک ماده آلی در محیط‌های طبیعی موجود در رسوبات باشد. نسبت کربن به نیتروژن به عنوان شاخصی برای منشأ ماده آلی، میزان ارزش غذایی و میزان تغییرات بیولوژیکی ماده آلی مورد استفاده اکولوژیست‌ها، بیوژئوشیمیست‌ها و زمین شناسان قرار می‌گیرد. استفاده از این نسبت در تجزیه و تحلیل منشأ کربن آلی موجود در رسوبات حائز اهمیت است. با استفاده از این نسبت می‌توان منشأ کربن موجود در رسوبات مبتنی بر منابع خشکی (مانند گیاهان خشکی)، یا دارای منشأ دریایی (مانند جلبک‌ها و فیتوپلانکتون‌ها) را شناسایی نمود. استفاده از نسبت C/N به همراه در صد ایزوتوپ کربن ۱۳ ($\delta^{13}C\%$) می‌تواند دقت بالاتری در خصوص منشأ ماده آلی در اختیار ما قرار دهد. در این مطالعه به بررسی کاربرد نسبت C / N و تجزیه و تحلیل محتوای ایزوتوپ کربن ۱۳ ($\delta^{13}C\%$) در رسوبات و مواد مختلف با منشأ خشکی و منشأ دریایی خواهیم پرداخت. رسوبات ساحلی مواد آلی را از منابع Autochthonous (به دست آمده از منابع جابجا نشده و درون زا، مانند گیاهان رشد یافته در سطح رسوبات) و همچنین منابع Allochthonous (مواد ارگانیک منتقل شده به رسوب از مناطق و روش‌های دیگر، مانند جزر و مد یا رودخانه) دریافت می‌کنند. به منظور اندازه گیری نسبت C / N نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در فریز درایر خشک می شوند. سپس نمونه ها به صورت پودر همگن در آمده و حداقل یک میلی‌گرم نمونه در بسته‌بندی قلع قرار داده می‌شود. نمونه‌های به منظور اندازه‌گیری نسبت $\delta^{13}C$ و $\delta^{15}N$ با استفاده از طیف سنج جرمی نسبت ایزوتوپ مورد تجزیه و تحلیل قرار می گیرند. نسبت C / N مواد آلی مشتق شده از فیتوپلانکتون‌های دریایی در حدود ۶ تا ۸ بوده و معمولاً بین ۲ تا ۲۰ برابر کمتر از مواد آلی منشأ گرفته از گیاهان خشکی است. البته نسبت C / N مواد آلی مشتق شده از فیتوپلانکتون‌های دریایی در محیط‌های الیگوتروفیک و یا محیط‌هایی که میزان نیتروژن محدود است ممکن است به ۲۰ یا حتی بیشتر نیز برسد. گیاهان آوندی موجود در خشکی، دارای نسبت C / N بیشتر از ۲۰ هستند. این تفاوت معنی دار در نسبت C / N فیتوپلانکتون‌های دریایی و گیاهان آوندی خشکی ناشی از عدم وجود سلولز، که دارای فرمول شیمیایی $(C_6H_{10}O_5)_n$ و همچنین مقادیر بیشتر پروتئین موجود در جلبک‌ها و فیتوپلانکتون‌ها (حدود ۱۵٪ در جلبک‌ها، ۳۲٪ در دینوفلاژلها و ۶۳٪ در دیاتوم‌ها) به نسبت پروتئین موجود در گیاهان آوندی (که در حدود ۱ تا ۸ در صد است) می‌باشد. رسوبات سطحی غنی از مواد آلی در محیط‌های دریایی، اغلب در مرز بین دریا و خشکی توسعه می‌یابند، مانند مناطقی با پوشش گیاهی گسترده (همانند جنگل‌های حرا) که دارای مواد آلی زیاد در میان رسوبات هستند. همچنین به کاربردهای این نسبت در بررسی مناطق مستعد جهت کشت مانگرو خواهیم پرداخت. در مناطقی که نیاز به کشت دوباره و احیا جنگل‌های مانگرو وجود دارد و یا سیاست‌های زیست محیطی و بودجه لازم در این خصوص فراهم می‌شود ۱۸ پارامتر اساسی در خصوص تعیین محل کشت مناسب وجود دارد. نسبت C / N شاخص بسیار مناسبی در خصوص میزان حاصلخیزی رسوبات در یک منطقه است، به نحوی که اگر این نسبت کم باشد نشان از ورود مواد آلی و مواد غذایی از منشا خشکی به این ناحیه ساحلی است و این منطقه ساحلی از نظر میزان حاصلخیزی منطقه‌ای مستعد برای کشت جنگل‌های مانگرو در نظر گرفته می‌شود.

کلمات کلیدی: مناطق ساحلی، ایزوتوپ، کربن، نیتروژن

Evaluation of interleukin-12 gene expression in C121 lymphoblastic leukemia cells treated with *Sargassum tenerrimum* extract

Maryam Nourniaei[1]; Hoda Khaledi[2*]; Ali Khodadadi[3]; Gholamabbas Dinarvand[4]; Sadroddin GhaemMaghami[1], Seyedeh Maryam Mousavi[1]

1- Department of Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr
2- Institute of Marine Sciences, Iranian National Institute for Oceanography and Atmospheric Science, Tehran
3- Department of Immunology, Faculty of Medicine, Jondishapur University of Medical Sciences, Ahvaz
4- Department of Biochemistry, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Shooshtar Branch, Shooshtar
** Email: hodakhaledi@inio.ac.ir*

Abstract

Leukemia is the fifth most common cancer in the world. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignancy in infants. The majority (about 80%) of ALL cases are neonatal leukemias and are usually more common in men than women. Acute T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL) is a neoplastic disorder in T-cell-associated lymphoblasts. Like other types of cancer, efforts are underway to treat lymphoblastic leukemia, but no definitive treatment has yet been found. Newer cytotoxic drugs have made significant progress in treatment, but side effects such as heart and kidney problems, suppressed immune systems, and hematopoiesis is still major causes of death. In addition to existing chemical drugs, attention has been paid to natural resources and their compounds for the treatment of various types of cancer. One of these sources is seaweed, which is rich in biologically active compounds with different functions. Accordingly, the present study aimed to treat C121 cell cells (jurkat cells) with the extract of the algae *Sargassum tenerrimum* from Persian Gulf. For this purpose, after sampling the algae from the shores of Bushehr, transferring them to the laboratory, and morphological identification of the algae, extraction was performed using methanol, chloroform, and hydroalcoholic solvents. C121 cells were cultured in RPMI 1640 medium and treated with concentrations of 250, 500, and 750 µg/ml *Sargassum tenerrimum* extract for 24 hours. After this time, cell RNA was extracted and IL-12 gene expression was assessed using Real Time PCR. The results showed that IL-12 gene expression increased in the presence of all examined concentrations compared to the control group. Concentrations of 500 µg/ml of chloroform and methanolic extract had the greatest effect on increasing the expression of this gene. IL-12 has been shown to regulate innate (natural killer cells) and acquired (cytotoxic T lymphocytes) immunity in the treatment of cancer. This cytokine has been suggested as a potential new agent for development in cancer immunotherapy studies due to its dramatic antitumor effects in many animal models. Therefore, due to the increased expression of IL-12 under the extract of *Sargassum tenerrimum*, it can be concluded that the extract of this algae has anti-cancer potential, which requires further research to find the active compound in the extract and also to understand the mechanism involved in it.

Keywords: seaweed, anti-cancer, gene expression, lymphoblastic leukemia

ارزیابی بیان ژن اینترلوکین-۱۲ در سلول‌های C121 لوسمی لنفوبلاستیک تیمار شده با عصاره‌ی جلبک سارگاسوم تنریموم

مریم نورنیایی[۱]؛ هدی خالدی[۲*]؛ علی خدادادی[۳]؛ غلامعباس دیناروند[۴]؛ صدرالدین قائم‌مقامی[۱]، سیده مریم موسوی[۱]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر
۲- پژوهشکده علوم دریایی، پژوهشگاه ملی اقیانوس‌شناسی و علوم جوی، تهران
۳- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور، اهواز
۴- گروه بیوشیمی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، شوشتر
Email: hodakhaledi@inio.ac.ir

چکیده

سرطان خون یا لوسمی به عنوان پنجمین سرطان شایع در جهان شناخته می شود. لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) شایع ترین بدخیمی در نوزادان است. اکثریت (حدود ۸۰ درصد) موارد لوسمی نوزادی ALL هستند و معمولاً در مردان شایع‌تر از زنان است. لوسمی لنفوبلاستیک حاد سلول T (T-ALL) یک اختلال نئوپلاستیک در لنفوبلاست مرتبط به رده سلولی T است. مانند انواع دیگر سرطان، تلاش برای درمان لوسمی لنفوبلاستیک هم ادامه دارد اما هنوز راهکاری برای درمان قطعی آن یافت نشده است. داروهای سیتوتوکسیک جدید پیشرفت قابل توجهی در درمان داشته‌اند اما عوارض جانبی مانند مشکلات قلبی و کلیوی، سرکوب سیستم ایمنی و خونساز هنوز از علل مهم مرگ و میر هستند. در کنار داروهای شیمیایی موجود، توجه به منابع طبیعی و ترکیبات موجود در آن‌ها جهت درمان انواع سرطان جلب شده است. یکی از این منابع، جلبک‌های دریایی هستند که سرشار از ترکیبات فعال زیستی دارای عملکردهای مختلف می‌باشند. بر همین اساس هدف از تحقیق حاضر تیمار سلول‌های رده‌ی C121 (سلول‌های جورکت) با عصاره‌ی جلبک *سارگاسوم تنریموم* خلیج فارس بود. برای این منظور پس از نمونه‌برداری جلبک‌ها از سواحل بوشهر، انتقال آن‌ها به آزمایشگاه و شناسایی مورفولوژیک جلبک، عصاره‌گیری با استفاده از حلال‌های متانول، کلروفرم و هیدروالکل انجام شد. سلول‌های C121 در محیط کشت RPMI 1640 کشت داده شده و با غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره *سارگاسوم تنریموم* به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. پس از گذشت این زمان، RNA سلول‌ها استخراج شده و بیان ژن IL-12 با استفاده از روش Real Time PCR ارزیابی شد. نتایج حاصل نشان داد که بیان ژن IL-12 در حضور همه‌ی غلظت‌های مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل افزایش می‌یابد. بیشترین اثر را در افزایش بیان این ژن، غلظت‌های ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ی کلروفرمی و متانولی داشتند. ثابت شده است که IL-12 ایمنی ذاتی (سلول‌های کشنده طبیعی) و اکتسابی (لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک) را در درمان سرطان تنظیم می‌کند. این سایتوکاین به دلیل اثرات ضد توموری چشمگیر آن در بسیاری از مدل های حیوانی به عنوان یک عامل جدید بالقوه برای توسعه در مطالعات ایمونوتراپی سرطان پیشنهاد شده است. بنابراین با توجه به افزایش بیان IL-12 تحت اثر عصاره‌ی *سارگاسوم تنریموم* می‌توان نتیجه گرفت که عصاره‌ی این جلبک دارای پتانسیل ضد سرطانی است که نیاز به تحقیقات بیشتر در جهت یافتن ماده موثره موجود در عصاره و همچنین شناخت مکانیسم‌های دخیل در آن دارد.

واژگان کلیدی: جلبک دریایی، ضد سرطان، بیان ژن، لوسمی لنفوبلاستیک

Evaluation the neuroprotective effect of Rhus coriaria L.(Sumac) extract against focal cerebral ischemia in Rats

Malak Nezhadtabrizi[1*]; Akbar Hajizadeh Moghaddam[1]; Mohammadreza Bigdeli[2]; Fatemeh Mortazavi Mogaddam[2]

1- Department of biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
2- Faculty of Life Science and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

**malake.tabrizy@yahoo.com*

Abstract

Introduction: Stroke is one of the most common causes of death and long-term disability worldwide that can include minor paralysis, memory, thinking, language and movement problems. Stroke occurs due to disruption of blood flow to brain tissue due to blockage or rupture of cerebral vessels and leads to severe damage to the whole body. Following stroke, neurons are exposed to oxidative stress, inflammation, apoptosis and necrosis, leading to fatal brain damage. In this regard, antioxidants play an important role in the maintenance and survival of patients. Some plant ingredients reduce the risk of oxidative stress due to their antioxidant activity. Studies show that *Rhus coriaria L(Sumac)* extract has strong antioxidant compounds and free radical scavenging, which is effective in treating inflammatory diseases. Because of effective flavonoids in this plant, also its anti-apoptotic and anti-inflammatory activity, has the ability to protect the nervous system against diseases caused by neurological disorders. Therefore, the aim of this study was to investigate the protective effect of *sumac* extract against ischemic stroke injury.

Marerials & Methods: Rats were randomly distributed into three groups: Intact: the group without any drug and surgury, Ischemic: the group without drug but to induce ischemic stroke, the middle cerebral artery was occluded (MCAO) for 60 minutes with suture thread number 3-0 and followed by 24 houres reperfusion and *Sumac* extract: the group was injected intravenously into rats 1 hour before MCAO induction. 24 hours after MCAO induction, the brain was removed, placed in brain matrix to make coronal sections of the brain. Then the cortical infarct volume and catalas activity were evaluated.

Results: Our finding showed that MCAO increased the cortical infarct volume and decreased the catalase activity. However, pretreatment with *sumac* extract reduced cortical infarct volume ($P < 0.01$), Also significantly increased catalas activity ($P < 0.01$).

Conclusions: This study showed that pretreatment with *sumac* extract can effectively prevent infarct volume, catalas activity and oxidative stress caused by ischemi and is a good combination to reduce the negative effects of ischemi.

Keywords: Stroke, Oxidative stress, Inflamation, Infarct volume, Antioxidant

بررسی اثر محافظت عصبی عصاره سماق در برابر ایسکمی کانونی مغزی در موش صحرایی

ملک نژادتبریزی[1*]؛ اکبر حاجی زاده مقدم[1]؛ محمدرضا بیگدلی[2]؛ فاطمه مرتضوی مقدم[2]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر
۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی ، دانشگاه شهیدبهشتی ، تهران
Email: malake.tabrizy@yahoo.com

چکیده

مقدمه: سکته مغزی از شایع‌ترین عوامل مرگ و ناتوانی دراز مدت شامل فلج جزیی، مشکلات حافظه، تفکر، زبان و حرکت در کل دنیا محسوب می‌شود. سکته مغزی به دلیل اختلال در جریان خونرسانی به بافت مغز در اثر ایجاد لخته یا پارگی رگ‌های مغزی رخ می‌دهد و منجر به آسیب شدید به کل بدن می‌شود. به دنبال بروز سکته مغزی، سلولهای عصبی در معرض استرس اکسیداتیو و التهاب قرار می‌گیرند که آسیب‌های کشنده مغزی را در پی دارد. در این میان آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در حفظ و بقای بیماران بازی می‌کنند. برخی از گیاهان دارویی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند که منجر به کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو می‌شوند. مطالعات نشان می‌دهند عصاره سماق دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی قوی و یک فلاونوئید موثر گیاهی است که توانایی مهار رادیکال‌های آزاد را دارد. عصاره سماق به دلیل فعالیت ضد آپاپتوتیک و ضد التهابی خود توانایی محافظت عصبی در برابر بیماری‌های ناشی از اختلالات عصبی را دارد. از این رو هدف از این مطالعه بررسی اثر محافظتی عصاره سماق در برابر آسیب ناشی از بروز سکته مغزی ایسکمیک بود.

مواد و روشها: موش های صحرایی به ۳ گروه تقسیم شدند. گروه شاهد که دارو دریافت نکردند و جراحی نشدند. گروه ایسکمی که بدون دریافت دارو تحت عمل جراحی برای ایجاد سکته مغزی با انسداد شریان میانی مغزی (MCAO) توسط نخ بخیه ۳-۰ به مدت ۶۰ دقیقه و سپس ۲۴ ساعت خونرسانی قرار گرفتند و گروه پیش درمان با عصاره سماق که ۱ ساعت قبل از جراحی سکته دارو را به صورت تزریق وریدی دریافت کردند. ۲۴ ساعت بعد از جراحی، مغز را خارج کرده و با استفاده از برش‌های کرونال در ماتریس مغزی، حجم سکته در ناحیه کورتکس و میزان فعالیت آنزیم کاتالاز اندازه‌گیری شد.

نتایج: یافته‌ها نشان داد سکته مغزی منجر به افزایش حجم سکته در ناحیه کورتکس و کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز می‌شود. اما پیش تیمار با عصاره سماق منجر به کاهش حجم سکته در ناحیه کورتکس ($P<0.01$) و افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز ($P<0.01$) می‌شود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهند پیش‌تیمار با عصاره سماق به طور چشمگیری منجر به کاهش حجم سکته در ناحیه کورتکس و افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز و کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از بروز سکته مغزی می‌شود وترکیب مناسبی برای کاهش اثرات مخرب سکته مغزی محسوب می‌شود.

کلمات کلیدی: سکته مغزی، حجم سکته، التهاب، استرس اکسیداتیو، آنتی‌اکسیدان

Cryoprotectants in Overwintering Larvae of Leopard Moth

Samira Khodayari*

Department of Plant Prottion, Faculty of Agriculture, University of Maragheh

*khodayari@maragheh.ac.ir

Abstract

Leopard moth, *Zeuzera pyrina* L. (Lepidoptera: Cossidae) is considered as one of the most important xylophagous pests in Iran from 1990th as a result of increasing drouth. Its larvae begin boring into the shoots and gradually, as they develop, spread into branches throughout the entire plant, eventually causing the tree to wither and die. It attacks perennial fruit and ornamental trees mostly in their adult stages which takes many time to reach to that stage and sometimes their damage is irrecoverable. Among the hosts of this pest, walnut is one of the most important hosts which is grown in Maragheh city abundantly as this city is a pole for this crop production. According to the environmental conditions, this pest complete its generation during 2 years or have 2 generations in 3 years and overwinter as larva inside the galleries in trunk and main branches of walnut trees. In the middle of spring those larvae which have been completed their growth would become pupae and after two weeks the adults would appear and mate and oviposit their eggs on the tree shoots. Studying the overwintering larvae and their cryoprotectant compounds may help knowing this pest much better. Therefore in this study we determined the cryoprotectant compounds of overwintering larvae which have been collected during October 2020 to March 2021 monthly from walnut orchards of Maragheh city using HPLC to show how these larvae tolerate low temperatures. The results showed that trehalose and sorbitol were the most important cryoprotectants in this pest as their concentrations increased several times during winter. Trehalose and sorbitol concentration were 1.15±0.09 and 2.07±0.08 mg/g in October respectively and reached to 11.73±0.44 and 13.94±0.51 mg/g in January respectively, and then decreased to 3.16±0.14 and 6.93±0.30 mg/g in March respectively. Inositol was the other compound which its concentration was the highest in December and reached from 0.21±0.03 mg/g in October to 0.65±0.05 mg/g in December. Glucose concentration had fluctuations during the studied months and had no clear trend but the highest concentration occurred in December which was 8.36±0.38 mg/g.

Keywords: Zeuzera pyrina, antifreeze, trehalose, sorbitol

ترکیبات محافظ سرما در لاروهای زمستان گذران کرم خراط

سمیرا خدایاری*

گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه

Email: khodayari@maragheh.ac.ir

چکیده

کرم خراط یا پروانه فری با نام علمی *Zeuzera pyrina* L. (Lepidoptera: Cossidae) یکی از مهمترین آفات چوبخوار کشور است که خسارت آن از اواخر دهه ۷۰ به دلیل بروز خشکسالی‌های متوالی گسترش یافته است. خسارت آفت با نفوذ لاروهای سن یک به سرشاخه‌های غیرخشبی شروع شده و با گذر زمان و افزایش سن لارو افزایش می‌یابد و در نهایت منجر به خشکیدن گیاه می‌گردد. از آنجا که میزبان‌های اصلی این آفت جزو گیاهان دائمی مثمر و غیرمثمر هستند و رسیدن میزبان به آن مرحله از رشد زمان زیادی را می‌برد بنابراین خسارت وارده توسط این آفت گاها غیرقابل جبران است. در میان گیاهان دائمی مثمر، گردو مهمترین میزبان این آفت بوده و در شهرستان مراغه به عنوان یکی از قطب‌های تولید این محصول به فراوانی یافت می‌شود. این آفت بسته به شرایط هر سه سال ۲ نسل یا هر دو سال یک نسل دارد و زمستان را به صورت لاروهای سنین مختلف درون شاخه یا تنه درختان میزبان می‌گذراند. از اواسط بهار لاروهایی که رشدشان کامل شده تبدیل به شفیره شده و از حدود دو هفته بعد شب پره‌ها ظاهر می‌شوند، سپس جفتگیری کرده و بلافاصله تخمریزی می‌کنند. شناخت بیشتر این آفت با بررسی فرم زمستان گذران آن و تعیین ترکیباتی که برای مقابله با سرما استفاده می‌کند میسر خواهد شد. لذا در این تحقیق، ترکیب‌های محافظ سرما در لاروهای زمستان‌گذران جمع‌آوری شده از تنه درختان گردو در باغ‌های شهرستان مراغه طی ماه‌های آبان ۱۳۹۹ تا فروردین ۱۴۰۰ به کمک دستگاه HPLC شناسایی شد و روند تغییرات آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت تا چگونگی سرماسختی آن‌ها در دماهای پایین مشخص گردد. نتایج بررسی‌ها ترکیبات ترهالوز و سوربیتول را به عنوان مهمترین ضدیخ‌های این آفت نشان داد. غلظت این ترکیبات در ماه‌های دی، بهمن و اسفند چندین برابر افزایش یافت و در فروردین ماه کاهش پیدا کرد و به ترتیب از ۱/۱۵±۰/۰۹ و ۲/۰۷±۰/۰۸ میلی‌گرم بر گرم در آبان ماه به ۱۱/۷۳±۰/۴۴ و ۱۳/۹۴±۰/۵۱ میلی‌گرم بر گرم در بهمن ماه و ۳/۱۶±۰/۱۴ و ۰/۳۰± ۶/۹۳ میلی‌گرم بر گرم در فروردین رسید. اینوزیتول هم ترکیب دیگری بود که در دی ماه غلظت آن بیش از سایر ماه‌ها بود و از ۰/۲۱±۰/۰۳ میلی‌گرم بر گرم در آبان ماه به ۰/۶۵±۰/۰۵ میلی‌گرم بر گرم در دی ماه رسید. غلظت گلوکز در ماه‌های مختلف در نوسان بود ولی روند خاصی را نشان نداد و بیشترین آن در دی ماه مشاهده شد (۸/۳۶±۰/۳۸ میلی گرم بر گرم).

واژگان کلیدی: *Zeuzera pyrina*، ضدیخ، ترهالوز، سوربیتول

The effect of agriculture on reducing the biodiversity of earthworms

Atabak Roohi Aminjan[1*]; Robabeh Latif[2]

1- Department of Biology, Faculty of Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan
2- Farzanegan Campus, Semnan University, Semnan

* a.roohiaminjan@basu.ac.ir

Abstract

Earthworms (Annelida: Clitellata: Oligochaeta) are among the most abundant invertebrates in the soil. About 5,500 species of earthworms have been identified worldwide. Earthworms, commonly referred to as soil engineers, are important for soil quality and fertility. The performance of these animals improves the physical (porosity, density and texture of the soil), chemical (accumulation of heavy metals, cation exchange capacity, pH, soil organic matter and nitrogen concentration) and biological (effect on microbial biota, algal growth and fungal activity) properties of soils. Soils with degraded earthworm communities are identified with very unfavorable conditions such as low fertility, increased acidity and reduced biota. In this study, the effect of potato cultivation and using of fertilizers and pesticides in potato farmlands was investigated on earthworm biodiversity. Sampling was done mechanically by digging in potato fields and natural habitats along streams and rivers in Bahar city (Hamadan province). Quadrates of 50×50×25 cm were used for sampling. The adult earthworms were transferred to the laboratory within the habitat moist soil. Earthworm species were identified based on Bouché (1972), Perel (1979), Sims and Gerard (1999) and Csuzdi and Zicsi (2003). Number and weight of specimens of different species were measured. Four specimens of each species were fixed in 96% alcohol for further studies; the other specimens were returned to the habitats. Only *Apporectodea longa* was found in potato farmlands. In natural habitats, *A. caliginosa*, *A. longa*, *A. trapezoides*, *Dedrobaena hortensis*, *D. pentheri*, D. *semitica*, *Eisenia andrei* and *Perelia kaznakovi* were observed. The Margalef's species richness index for agricultural lands and natural habitats was 0 and 1.89, respectively; and the Shannon species diversity index was 0 and 1.96, respectively. Poultry manure and chemical fertilizers of nitrogen (urea), phosphate and potash are used in the studied potato farmlands. Also, various chemical toxins are used for fungicides, herbicides and pest control in these farmlands. Utilization of earthworm habitats for agricultural activities as well as the use of various pesticides may have been effective in eliminating some species. In particular, epigeic and endogeic species were not found in anthropogenic habitats.

Keywords: natural habitat, agricultural land, agrochemicals, biodiversity indices

تاثیر کشاورزی بر کاهش تنوع زیستی کرم‌های خاکی

اتابک روحی امینجان[1*]؛ ربابه لطیف[2]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
۲- پردیس فرزانگان، دانشگاه سمنان، سمنان
Email: a.roohiaminjan@basu.ac.ir
Email: r.latif@semnan.ac.ir

چکیده

کرم‌های خاکی از شاخه Annelida (Clitellata: Oligochaeta)، از فراوان‌ترین بی‌مهرگان در خاک هستند. در سراسر جهان در حدود ۵۵۰۰ گونه کرم خاکی شناسایی شده است. کرم‌های خاکی که در زبان عامیانه به آنها مهندسان خاک گفته می‌شود، در کیفیت و حاصلخیزی خاک اهمیت دارند. این جانوران با عملکرد خود، خواص فیزیکی (تخلخل، تراکم و بافت خاک)، شیمیایی (جذب فلزات سنگین، ظرفیت تبادل کاتیونی، اسیدیته، مواد آلی خاک و غلظت نیتروژن) و زیستی (اثر بر بیوتای میکروبی، رشد جلبک‌ها و فعالیت قارچ‌ها) خاک‌ها را اصلاح می‌کنند. تخریب جوامع کرم‌های خاکی باعث ایجاد شرایط بسیار نامطلوب مانند حاصلخیزی کم، افزایش اسیدیته و کاهش بیوتای خاک می‌شود. در این مطالعه تاثیر کشت سیب‌زمینی و کودها و سم‌های مورد استفاده در زمین‌های مورد کشت بر تنوع زیستی کرم‌های خاکی بررسی شد. نمونه‌برداری به روش مکانیکی، به کمک بیل و دست در زمین‌های کاشت سیب‌زمینی و زیستگاه‌های طبیعی حاشیه جویبارها و رودخانه‌ها در شهرستان بهار (استان همدان) انجام شد. برای نمونه‌برداری از کوادرات‌هایی به ابعاد ۲۵×۵۰×۵۰ cm استفاده شد. کرم‌های خاکی بالغ، به همراه خاک مرطوب از زیستگاه بصورت زنده به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه گونه کرم‌های خاکی براساس کلیدهای شناسایی نظیر Bouché (1972)، Perel (1979)، Sims and Gerard (1999) و Csuzdi and Zicsi (2003) شناسایی و تعداد و وزن نمونه‌های متعلق به گونه‌های مختلف ثبت شد. از هر گونه چهار نمونه برای مطالعات بیشتر در الکل ۹۶ درصد تثبیت شد و بقیه نمونه‌ها به محل برداشت برگردانده شدند. در زمین‌های کشاورزی مورد مطالعه فقط گونه Apporectodea longa یافت شد. در حالیکه در زیستگاه‌های طبیعی گونه‌های *A. caliginosa*، *A.* longa، *A.* trapezoides، Dedrobaena hortensis، *D.* pentheri، *D.* semitica، Eisenia andrei و Perelia *kaznakovi* مشاهده شدند. شاخص غنای گونه‌ای Margalef برای زمین‌های کشاورزی و زیستگاه‌های طبیعی به ترتیب برابر با ۰ و ۱/۸۹ بوده و شاخص تنوع گونه‌ای Shannon به ترتیب برابر با ۰ و ۱/۹۶ می‌باشد. در مزارع سیب زمینی بررسی شده از کود مرغی و کودهای شیمیایی ازته (اوره)، فسفاته و پتاسه استفاده می‌شود. همچنین، از سم‌های شیمیایی مختلف برای قارچ‌کشی، علف‌کشی و مبارزه با آفات استفاده می‌شود. احتمالا دستکاری زیستگاه کرم‌های خاکی به منظور فعالیت کشاورزی و همچنین استفاده از سموم مختلف در حذف برخی گونه‌ها موثر بوده است. به ویژه اینکه در زیستگاه دستکاری شده اثری از گونه‌های سطح‌زی مشاهده نشد.

واژگان کلیدی: زیستگاه طبیعی، زمین کشاورزی، سم‌های کشاورزی، شاخص‌های تنوع زیستی

Evaluation of antiobesity Effect of Hydroalcoholic Portulaca Oleracea Extract in Rats during Bisphenol A Toxicity

Davood Fazli[1*,] Barzegarzadeh Namarvar Behnaz[2], Alipour Olyaei Yousef[2]

[2-] Department of Biology, Payame Nour University(PNU), Tehran, Iran.
[3-] Department of Animal Biology, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz

**Corresponding Author Email address: Fazlibio57@gmail,com*

Abstract

Obesity is a major health concern and one of the major risk factors for various diseases such as cardiovascular disease and diabetes. Bisphenol A is a monomer of polycarbonate plastics and It is considered as an environmental obesogenic through promoting adipogenesis, lipid accumulation and endocrinal disrupting chemicals(EDCs) altering adipokine hormone release. Recently, protective effect of purslane extract on obesity and diabetes has been reported. In this study, the effects of hydroalcoholic extract of portulaca oleracea on serum concentrations of leptin and adiponectin in rats exposed to bisphenol A were investigated. Forty nine rats were randomly divided into 7 groups: control group, vehicle group (receiving 500 µg of corn oil / kg BW), group receiving toxin (500 µg of bisphenol A / kg BW), positive control (100 mg of hydroalcoholic extract of portulaca oleracea / kg BW), 3 treatment groups receiving purslane hydroalcoholic extract (500 µg of bisphenol A + 50, 100, 150 mg of hydroalcoholic extract of purslane hydroalcoholic extract/ kg BW, respectively). All injections are done by i.p rout in 14 consequently days. all animals were anesthetized with chloral hydrate and after dissection, serum was isolated to measure the tested factors. Data are analyzed in spss statistical software by one way ANOVA with Tukey post test. Our findings demonstrate that that portulaca oleracea extract significantly increased adiponectin levels in the bisphenol A group compared to the control group and decreased it in the portulaca oleracea treatment groups. Also, the level of leptin decreased in the bisphenol group compared to the control group and increased in the portulaca oleracea group compared to the bisphenol group. According to the results of this study, the hydroalcoholic extract of portulaca oleracea has a positive effect on weight control in rats exposed to bisphenol A.

Keywords: Adiponectin, leptin, Bisphenol A, Purslane

بررسی اثر ضد چاقی عصاره هیدروالکلی خرفه در موش صحرایی در طی سمیت با بیسفنول A

داود فضلی[1*]، بهناز برزگرزاده نمرور[2]، یوسف علیپور علیایی[2]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم- دانشگاه پیام نور، تهران
۲- گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز
Email: fazlibio57@gmail.com

چکیده

چاقی یک نگرانی عمده برای سلامتی و یکی از عوامل خطرساز بیماری های مختلفی مانند بیماری های قلبی ـ عروقی و دیابت است. بیسفنول A یک مونومر از پلاستیک های پلی کربنات است و بعنوان یک عامل چاق کننده محیطی از طریق تقویت چربی زایی، تجمع چربی و مواد شیمیایی مختل کننده غدد درون ریز (EDCs) تغییر دهنده ترشح هورمون آدیپوکین می باشد. لپتین و آدیپونکتین دو آدیپوکاینی مترشحه از بافت چربی اند که از تنظیم کننده های اصلی وضعیت التهابی و متابولیسم گلوکز و چربی به شمار میروند. در این تحقیق اثرات عصاره هیدروالکلی خرفه بر غلظت سرمی لپتین و ادیپونکتین رت های در معرض بیسفنول A، بررسی شده است.

در این مطالعه ۴۹ سر رت نر بالغ نژاد ویستار به صورت تصادفی در ۷ گروه ۷ تایی به شرح زیر تقسیم شدند: گروه کنترل، شاهد(دریافت کننده۵۰۰ میکروگرم روغن ذرت/کیلوگرم وزن بدن)، گروه دریافت کننده سم(۵۰۰ میکروگرم بیسفنولA/کیلوگرم وزن بدن)، کنترل مثبت (۱۰۰ میلی گرم عصاره هیدروالکلی گیاه خرفه/کیلوگرم وزن بدن)، ۳ گروه تیمار دریافت کننده خرفه (۵۰۰ میکروگرم بیسفنولA + ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی گرم عصاره هیدروالکلی گیاه خرفه/کیلوگرم وزن بدن). تزریق ها به صورت داخل صفاقی و به مدت ۱۴ روز پیاپی انجام گردید. پس از اتمام زمان تزریقات (۱۴ روز) تمامی حیوانات با کلرال هیدرات بیهوش شده و پس از تشریح، سرم برای سنجش فاکتور های مورد آزمایش جداسازی گردید. داده ها در نرم افزار اماری spss طی آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) با تست تعقیبی توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

آنالیز داده ها نشان داد عصاره خرفه به طور معنی داری سطح ادیپونکتین را در گروه بیسفنول نسبت به گروه کنترل افزایش و در گروه های تیمار با خرفه کاهش داد. همچنین سطح لپتین را در گروه بیسفنول نسبت به گزوه کنترل کاهش و در گروه تیمار با خرفه نسبت به گروه بیسفنول افزایش داد. بر اساس نتایج این تحقیق ا عصاره هیدروالکلی خرفه اثر مثبتی بر کنترل وزن رت های در معرض بیسفنول A دارد.

واژگان کلیدی: ادیپونکتین، لپتین، بیسفنول A، خرفه

Protective effect of eugenol in serum creatinine reduction during renal injury

Rezvaneh Moein Afshar[1]; Aghileh Mohammadzadeh[1]; Ali Gol[1*]

1- Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman.

email agol@uk.ac.ir

Abstract

Background and Purpose: The kidneys under certain conditions undergo ischemia-reperfusion, characterized by the cessation of renal blood flow followed by its restoration, such as cardiovascular surgery, trauma, circulatory arrest with renal resuscitation, and kidney transplantation. Reperfusion after ischemia results in the production of reactive oxygen species, mitochondrial insufficiency, endothelial dysfunction, and sterile inflammation. In this study, we decided to investigate the protective effect of eugenol against renal injury induced by renal ischemia reperfusion in male rats.

Materials and Methods: Forty adult male rats were randomly divided into five groups of 8 each: 1- Group Control, 2- Group right nephrectomy (right kidney removal), 3- Group right nephrectomy + eugenol 50 (50 mg / kg by orally by gavage), 4- Group ischemia reperfusion (through obstruction of the left kidney pedicle for 45 minutes and then 24 hours of blood flow), 5- Group ischemia reperfusion + eugenol 25 (25 mg / kg orally by gavage), 6- Group ischemia reperfusion + eugenol 50 (50 mg / kg orally by gavage), 7- Group ischemia reperfusion + eugenol 100 (100 mg / kg orally by gavage).

Results and Discussion: Ischemia reperfusion injury increases serum creatinine. The results of this study showed that serum creatinine levels in ischemia reperfusion, ischemia reperfusion + eugenol 50 and ischemia reperfusion + eugenol 100 groups increased significantly ($p<0.001$) and right kidney nephrectomy + eugenol 50 and ischemia reperfusion + Eugenol 25 groups had a significant increase of $p<0.01$ and $p<0.05$, respectively, compared to the Control group. However, serum creatinine in the groups of right nephrectomy, right nephrectomy + eugenol 50 and ischemia reperfusion + eugenol 25 showed a significant decrease $p<0.001$ and ischemia reperfusion + eugenol 50 group showed a significant decrease $p<0.01$ compared to ischemia reperfusion group.

Conclusion: The results of the present study confirm the hypothesis that eugenol can have a protective effect against renal injury caused by ischemic renal reperfusion in male rats. This protective effect of eugenol can probably occur due to its anti-oxidative and anti-inflammatory properties.

Keywords: Eugenol, Ischemia Reperfusion, Renal function

نقش محافظتی اوژنول در کاهش کراتینین سرم به هنگام آسیب کلیوی

رضوانه معین افشار[۱] ؛ عقیله محمد زاده[۱] ؛ علی گل[۱*]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان

Email agol@uk.ac.ir

چکیده

سابقه و هدف: کلیه ها در شرایط خاصی تحت ایسکمی ریپرفیوژن قرار می گیرند که مشخصه آن قطع جریان خون کلیوی و به دنبال آن خونرسانی مجدد است، مانند جراحی قلب و عروق، تروما، ایست گردش خون همراه با احیا و پیوند کلیه. خونرسانی مجدد پس از ایسکمی باعث ایجاد گونه های فعال اکسیژن، نارسایی میتوکندری، اختلال عملکرد اندوتلیال و التهاب استریل می شود. در این مطالعه تصمیم گرفتیم اثر محافظتی اوژنول در برابر آسیب کلیوی ناشی از ایسکمی ریپرفیوژن کلیه در موش صحرایی نر را مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش ها: چهل سر موش صحرایی نر بالغ به طور تصادفی به پنج گروه ۸ تایی تقسیم شدند: ۱- کنترل، ۲- نفرکتومی کلیه راست (برداشتن کلیه راست)، ۳- نفرکتومی کلیه راست+ اوژنول ۵۰ (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت گاواژ)، ۴- ایسکمی ریپرفیوژن (از طریق انسداد پدیکل کلیه چپ به مدت ۴۵ دقیقه و متعاقب آن ۲۴ ساعت خونرسانی)، ۵- ایسکمی ریپرفیوژن+ اوژنول ۲۵ (۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت گاواژ)، ۶- ایسکمی ریپرفیوژن+ اوژنول ۵۰ (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت گاواژ)، ۷- ایسکمی ریپرفیوژن+ اوژنول ۱۰۰ (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت گاواژ). در پایان آزمایش همه موش‌ها کشته و سرم آنها برای ارزیابی سطح کراتینین جمع‌آوری شد.

نتایج و بحث: ایسکمی ریپرفیوژن باعث افزایش کراتینین سرم می شود. یافته‌های این مطالعه نشان دادند که میزان کراتینین سرم در گروه‌های ایسکمی ریپرفیوژن، ایسکمی ریپرفیوژن + اوژنول ۵۰ و ایسکمی ریپرفیوژن+ اوژنول ۱۰۰ افزایش معنی‌داری ($p<0.001$) و گروه‌های نفرکتومی کلیه راست+اوژنول ۵۰ و ایسکمی ریپرفیوژن + اوژنول ۲۵ به ترتیب افزایش معنی‌داری ($p<0.01$) و ($p<0.05$) نسبت به گروه کنترل داشتند. با این حال میزان کراتینین سرم در گروه‌های نفرکتومی کلیه راست، نفرکتومی کلیه راست+ اوژنول ۵۰ و ایسکمی ریپرفیوژن+ اوژنول ۲۵ کاهش معنی‌داری ($p<0.001$) و گروه ایسکمی ریپرفیوژن + اوژنول ۵۰ کاهش معنی‌داری ($p<0.01$) را نسبت به گروه ایسکمی ریپرفیوژن نشان داد.

نتیجه گیری : نتایج مطالعه حاضر این فرضیه را تأیید می‌کنند که اوژنول می‌تواند باعث اثر محافظتی در برابر آسیب کلیوی ناشی از ایسکمی ریپرفیوژن کلیه در موش های صحرایی نر شود. این اثر محافظتی اوژنول احتمالا می تواند از طریق خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد التهابی اعمال شود.

کلمات کلیدی: اوژنول، ایسکمی ریپرفیوژن، عملکرد کلیه

Effect of quercetin on motility, viability and oxidative stress indicators of sperm during freezing and thawing

Samaneh Salimi[1*]; Hamidreza Momeni[1]; Tahereh Etemadi[1]; Ali Asghar Ghaffari Zadeh [2]

1- Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

2- Rastak infertility center, Arak, Iran

Email: h-momeni@araku.ac.ir

Abstract

Infertility is defined as the inability to conceive after an unprotected period. Due to the significant prevalence of infertility, the role of sperm freezing process in assisted reproductive techniques (ART) is very important. Fertility of sperm that stored at low temperatures reduces compared to fresh sperm because the cells may change during the freeze-thaw process. During the freezing process, following the change in mitochondrial membrane fluidity, sperm membrane potential is altered, releasing ROS (Reactive Oxygen Species). The release of ROS upsets the cell's antioxidant balance, called oxidative stress, which in turn has adverse effects on sperm function, including reduced motility and viability. One of the important ways to prevent or reduce the mentioned complications during the sperm freezing process is to add substances with antioxidant properties to the freezing medium. One of these substances is quercetin, which is a flavonoid.High quality human sperm samples were divided into three groups: 1) 0 hour sperm 2) Control group (slow freezing sperm) 3) Frozen sperm that were treated with Quercetin (50 µM). Motility and viability (eosin-nigrosine) were assessed according to the World Health Organization protocol staining. The total amount of antioxidant capacity of the sperm was measured by FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) test and the amount of lipid peroxidation was measured by MDA (Malondialdehyde). The results were analyzed by one-way analysis of variance and Tukey`s test.The results showed that freezing of human sperm significantly reduced motility, viability and total antioxidant capacity and significantly increased the rate of lipid peroxidation compared to 0 hour sperm. While, sperm treated with quercetin showed a significant increase in motility, viability and total antioxidant capacity compared to the control group. The rate of lipid peroxidation in the quercetin group was significantly reduced compared to the control group. Quercetin with its potent antioxidant effects by increasing the capacity of the antioxidant defense system and reducing oxidative stress has positive effects on the quality of human sperm.

Keywords: Quercetin, Human sperm, Motility

تاثیر کوئرستین بر قابلیت تحرک، حیات و شاخص‌های استرس اکسیداتیو اسپرم‌های تحت فریز و ذوب انسان

سمانه سلیمی*[۱]؛ حمیدرضا مومنی[۱]؛ طاهره اعتمادی[۱]؛ علی‌اصغر غفاری‌زاده[۲]

1-گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران

2-مرکز درمان ناباروری رستاک، اراک، ایران

Email: h-momeni@araku.ac.ir

چکیده

ناباروری به‌عنوان ناتوانی در بارداری پس از یک دوره محافظت نشده می‌باشد. با توجه به شیوع قابل توجه ناباروری، نقش فرایند فریز اسپرم در روش‌های کمک‌باروری یا ART (Assisted Reproductive Techniques) بسیار مورد توجه است. توانایی لقاح اسپرم که در دمای پایین نگه‌داری می‌شود نسبت به اسپرم تازه کاهش می‌یابد زیرا سلول‌ها ممکن است طی فرایند فریز-ذوب دستخوش تغییراتی شوند. طی فرایند فریز به‌دنبال تغییر سیالیت غشای میتوکندری، پتانسیل غشای آن دستخوش تغییر شده که سبب آزاد شدن ROS (Reactive Oxygen Species) می‌شود. آزاد شدن ROS باعث برهم خوردن توازن آنتی اکسیدانتی سلول شده که استرس اکسیداتیو نامیده می‌شود که خود اثرات سوئی در عملکرد اسپرم از جمله کاهش تحرک و قابلیت حیات آن می‌شود. یکی از استراتژی‌های مهم جهت جلوگیری یا کاهش عوارض ذکر شده در طی فرایند فریزاسپرم، افزودن موادی با خاصیت آنتی اکسیدانتی به محیط فریز است. یکی از این مواد کوئرستین (Quercetin) می‌باشد که یک فلاونوئید است .نمونه‌های اسپرم انسان با کیفیت بالا به سه گروه تقسیم شدند: ۱- اسپرم های لحظه صفر۲- گروه کنترل (اسپرم‌های فریز شده با روش انجماد آهسته) ۳- اسپرم‌های فریز شده که با کوئرستین (۵۰ میکرومولار) تیمار شدند. تحرک اسپرم و قابلیت حیات (رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین) طبق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی بررسی شدند. هم‌چنین سنجش میزان کل ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی اسپرم با تست Ferric) FRAP (Reducing Antioxidant powerو میزان پراکسیداسیون لیپیدی توسط تست MDA (Malondialdehyde) صورت گرفت. نتایج با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.نتایج نشان داد که فریز اسپرم انسان باعث کاهش معنی‌دار تحرک، حیات و میزان ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانتی و افزایش معنی‌دار در میزان پراکسیداسیون لیپیدی نسبت به لحظه صفر شد. در حالی‌که اسپرم‌هایی که با کوئرستین تیمار شده بودند در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری در تحرک، قابلیت حیات و میزان ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانتی نشان دادند. میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گروه کوئرستین در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت.کوئرستین با اثرات آنتی‌اکسیدانتی قوی خود با افزایش ظرفیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و کاهش استرس اکسیداتیو، اثرات مثبتی بر کیفیت اسپرم‌های انسانی دارد.

واژگان کلیدی: کوئرستین، اسپرم انسان، تحرک

The effect of human sperm cryopreservation on sperm membrane integrity in the presence of ChX and ChS deep eutectic systems

Fatemeh Jahanseir [1*]; Fatemeh Ghasemian [1]; Ziba Zahiri [2]

1- Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht
2- Obstetrics and Gynecolog Department, medical School, University of Medical Sciences Guilan , Rasht
** gmail: Jahanseir76@gmail.com*

Abstract

Background: Infertility is defined as 12 months of unprotected intercourse without achieving a successful pregnancy. Approximately 20-30% of infertility cases are due to male infertility that can result from a wide variety of disorders. In medical science, today, there are various methods for treatment of infertility in men, such as sperm freezing, which allows men to have fertility in the future. Deep eutectic system (DES) can be used as a green chemical agent to protect against frostbite in sperm freezing because the ice crystal physically destroys the cell membrane and subsequently causes apoptosis. The most common DES are based on choline chloride, carboxylic acids, and other hydrogen-bond donors, e.g., urea, citric acid and glycerol. Choline chloride Xylitol (ChX), Choline chloride D-Sorbitol (ChS) are two types of deep eutectic solvents based on choline chloride. our aim was to investigate, the possible application of ChS and ChX in cryopreservation process as new cryoprotective agents (CPA).
Materials and Methods: In this study, semen normozoospermia samples of couples referred to IVF center with female infertility factors were used. ChX was prepared from a combination of choline chloride, xylitol, distilled water and ChS from a combination of choline chloride, distilled water, sorbitol D. Sperm cryopreservation was performed in the presence of ChS and ChX. The freezed semen samples were used for assessment of sperm quality, including evaluation of sperm chromatin integrity (toluidine blue staining), chromatin condensation (aniline blue staining), sperm viability and acrosome reaction (triple staining), and evaluation of sperm membrane integrity (eosin nigrosine staining).
Results: In this study, the effect of human sperm cryopreservation on sperm health in the presence of ChX and ChS was investigated. After freezing in the presence of ChX and ChS, during the count of more than 200 sperm, the sperm chromatin densities were 81% and 72% , respectively, with normal status. 38% acrosomal reactions were observed in the presence of ChX and 30% acrosomal reactions in the presence of ChS. Sperm chromatin integrity was observed to be 77% and 90% normal in the presence of ChX and ChS, respectively. sperm membrane integrity was observed to be 85% and 95% normal in the presence of ChX and ChS, respectively.
Conclusion: Freezing is the most effective way to store sperm for a long time and will maintain sperm quality for future infertility treatment. The use of ChX and ChS as cold protectors is effective in maintaining sperm quality during freezing.

Keywords: Infertility, Male infertility, Sperm freezing, DES

اثر حفظ انجمادی اسپرم انسان بر سلامت غشای اسپرم در حضور حلال های فرا زودگداز ChX و ChS

فاطمه جهان سیر[۱*]؛ فاطمه قاسمیان [۱]؛ زیبا ظهیری [۲]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت
۲- گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت
gmail: Jahanseir76@gmail.com

چکیده

پیش زمینه: ناباروری ۱۲ ماه رابطه جنسی محافظت نشده بدون دستیابی به بارداری موفق تعریف می‌شود. تقریباً ۲۰ -۳۰ درصد از موارد ناباروری به دلیل ناباروری مردان است که می تواند ناشی از طیف گسترده ای از اختلالات باشد. در علم پزشکی، امروزه روش های مختلفی برای درمان ناباروری در مردان وجود دارد که از جمله آنها می توان به فریز اسپرم اشاره کرد که به مردان امکان باروری در آینده را می‌دهد. حلال های فرا زودگداز (DES) را می توان به عنوان یک عامل شیمیایی سبز برای محافظت در برابر سرمازدگی در انجماد اسپرم استفاده کرد زیرا کریستال یخ به طور فیزیکی غشای سلولی را تخریب می‌کند و متعاقبا باعث آپاپتوز می‌شود. شایع‌ترین DES بر پایه ی کولین کلراید، اسیدهای کربوکسیلیک و سایر دهندگان پیوند هیدروژنی، به عنوان مثال، اوره، اسید سیتریک و گلیسرول است. کولین کلراید زایلیتول (ChX) و کولین کلرایدD- سوربیتول (ChS) دو نوع از حلال‌های فرا زودگداز برپایه‌ی کولین کلراید هستند. هدف ما بررسی کاربرد احتمالی ChS و ChX در فرآیند انجماد به عنوان عوامل جدید محافظت کننده سرما (CPA) بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از نمونه های نرموزواسپرمی منی زوج های مراجعه کننده به مرکز IVF با فاکتورهای ناباروری زنانه استفاده شد ChX ازترکیب کولین کلراید، زایلیتول، آب مقطر و ChS از ترکیب کولین کلراید، D-سوربیتول، آب مقطر تهیه شد. فریز اسپرم در حضور ChS و ChX انجام شد. از نمونه‌های مایع منی منجمد برای ارزیابی کیفیت اسپرم از جمله ارزیابی یکپارچگی کروماتین اسپرم (رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو)، تراکم کروماتین (رنگ‌آمیزی آنیلین بلو)، بقای آکروزوم و واکنش آکروزومی (رنگ‌آمیزی سه‌گانه) و ارزیابی یکپارچگی غشای اسپرم (رنگ آمیزی ائوزین- نیگروزین) استفاده شد.

نتایج: در این مطالعه، اثرات انجماد اسپرم بر سلامت اسپرم در حضور ChX و ChS شناسایی شد. پس از انجماد در حضور ChX و ChS، در طی شمارش بیش از ۲۰۰ اسپرم، تراکم کروماتین اسپرم به ترتیب ۸۱٪ و ۷۲٪ با وضعیت طبیعی بود. ۳۸٪ واکنش‌های آکروزومی در حضور ChX و ۳۰٪ واکنش‌های آکروزومی در حضور ChS مشاهده شد. یکپارچگی کروماتین اسپرم در حضور ChX و ChS به ترتیب ۷۷٪ و ۹۰٪ طبیعی بود و یکپارچگی غشای اسپرم در حضور ChX و ChS به ترتیب ۸۵٪ و ۹۵٪ طبیعی بود.

نتیجه گیری: انجماد موثرترین راه برای نگهداری طولانی مدت اسپرم است و کیفیت اسپرم را برای درمان ناباروری در آینده حفظ می‌کند. استفاده از ChX و ChS به عنوان محافظ سرما در حفظ کیفیت اسپرم در هنگام فریز موثر می‌باشد.

واژگان کلیدی: ناباروری، ناباروری مردان، فریز اسپرم، DES

Effect of silymarin on viability, motility and oxidative stress indexes of frozen sperm

Zeinab Alaee kerahroudy*[۱]; Hamidreza Momeni[۱]; Tahereh Etemadi [۱]

[۱]-Biology Group.Faculty of Science. Arak University. Arak

Email: h-momeni@araku.ac.ir

Abstract

Infertility is one of problems related to couples, and about 70% of this problem is related to sperm quality. Sperm freezing is one of the best ways to store sperm for a long time in order to maintain fertility. However, cold shock in the sperm membrane causes the release of Reactive Oxygen Species (ROS). The release of ROS upsets the cell's antioxidant balance, which is called oxidative stress. Therefore, the use of antioxidants has been considered as a useful strategy to maintain sperm quality in the freezing and thawing process. Silymarin is an ellective substance obtained from the seed or fruit of *Silybum marianum*, which is a polyphenolic flavonoid compound with strong antioxidant properties. This study was performed to investigate the antioxidant effects of silymarin on some parameters of frozen and thawed sperm. High quality human sperm samples after washing were divided into three groups: 1) 0 hour. 2) Control group (Frezed sperm without Silymarin). 3) Sperm frozen with silymarin (50µM). motility, viability and oxidative stress indexes were examined in the above groups. motility and viability (eosin-nigrosin staining) were evaluated according to WHO (World Health Organization) guidelines. The lipid peroxidation of sperm was measured using malondialdehyde (MDA) index and the total antioxidant power of sperm was measured by FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) method. Statistical analysis of data was performed using one-way ANOVA and Tukey's test. The results of this study showed that freezing and thawing of human sperm caused a significant decrease in viability, motility and total antioxidant capacity and a significant increase in lipid peroxidation compared to 0 hour. While Silymarin caused a significant increase motility, viability and total antioxidant capacity of frozen and thawed sperm compared to the control group. Also, the rate of lipid peroxidation in the silymarin group was significantly reduced compared to the control group. silymarin as a potents antioxidant can increase the quality of sperm under freezing and thawing by increasing the capacity of the antioxidant defense system.

Keywords: Infertility treatment, ROS, Silymarin, Lipid peroxidation

تاثیر سیلیمارین بر قابلیت حیات، تحرک و شاخص‌های استرس اکسیداتیو اسپرم‌های تحت فریز و ذوب انسان

زینب علایی کرهرودی[1]*؛ دکتر حمیدرضا مومنی[1]؛ طاهره اعتمادی[1]

۱-گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک

Email: h-momeni@araku.ac.ir

چکیده

ناباروری یکی از مشکلات مربوط به زوجین می‌باشد که حدود ۷۰٪ آن مربوط به کیفیت اسپرم است. بر اساس دستورالعمل WHO کاهش تعداد اسپرم، زنده ماندن و تحرک به‌عنوان مهم‌ترین پارامترهای اسپرم بالغ در نظر گرفته می‌شود که نشان‌دهنده‌ی کیفیت ساختاری و عملکردی آن جهت حرکت به سوی تخمک برای لقاح موفق است. فریز اسپرم یکی از بهترین روش‌های نگه‌داری طولانی مدت اسپرم به‌منظور حفظ قدرت باروری می‌باشد. در فرایند فریز، دمای سلول یا بافت تا زیر صفر درجه سانتی‌گراد کاهش می‌یابد که به‌طور معمول این دما ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد است که در نیتروژن مایع یا LN2 (Liquid Nitrogen 1) انجام می‌شود با این حال شوک سرمایی در غشای اسپرم سبب آزاد شدن گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر(ROS (Reactive Oxygen Species می‌شود. آزاد شدن ROS باعث برهم خوردن توازن آنتی اکسیدانتی سلول شده که استرس اکسیداتیو نامیده می‌شود. بنابراین استفاده از آنتی اکسیدانت‌ها به‌عنوان یک استراتژی مفید برای حفظ کیفیت اسپرم در فرایند فریز و ذوب مورد توجه قرار گرفته است. سیلیمارین ماده‌ی موثر به‌دست آمده از دانه یا میوه‌ی گیاه خار مریم با نام علمی Silybum marianum که به‌عنوان یک ترکیب فلاونوئیدی پلی‌فنولی با خاصیت آنتی اکسیدانتی قوی می‌باشد. این مطالعه به‌منظور بررسی اثرات آنتی اکسیدانتی سیلیمارین بر روی برخی پارامترهای اسپرم‌های تحت فریز و ذوب انسان انجام شد. نمونه‌های اسپرم انسان با کیفیت بالا بعد از شستشو به سه گروه تقسیم شدند: ۱) اسپرم‌های لحظه‌ی زمانی صفر، ۲) اسپرم‌های گروه کنترل(اسپرم‌های تحت فریز بدون سیلیمارین)، ۳) اسپرم‌های تحت فریز با سیلیمارین (50µM). تحرک، قابلیت حیات و شاخص‌های استرس اکسیداتیو در گروه‌های فوق مورد بررسی قرار گرفت. بررسی تحرک و قابلیت حیات (رنگ‌آمیزی ائوزین_نیگروزین) بر اساس دستورالعمل WHO (World Health Organization) صورت گرفت. میزان پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم‌ها با استفاده از شاخص مالون دی آلدهید(MDA (Malondialdehyde و قدرت کل آنتی اکسیدانتی اسپرم‌ها با استفاده از روش FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) مورد سنجش قرار گرفت. آنالیز آماری داده‌ها با بهره از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA و تست توکی (TukeŷS test) صورت گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد فریز و ذوب اسپرم انسان باعث کاهش معناداری در قابلیت حیات، تحرک و ظرفیت کل آنتی اکسیدانتی و افزایش معنادار در پراکسیداسیون لیپیدی نسبت به لحظه صفر شد. در حالی‌که سیلیمارین باعث افزایش معنی‌دار در سه پارامتر تحرک، قابلیت حیات و ظرفیت کل آنتی اکسیدانتی اسپرم‌های تحت فریز و ذوب انسان نسبت به گروه کنترل شد. همچنین میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گروه سیلیمارین نسبت به

گروه کنترل کاهش معنی‌دار یافت. سیلیمارین به‌عنوان یک آنتی اکسیدانت قوی با افزایش ظرفیت سیستم دفاع آنتی اکسیدانتی، می‌تواند باعث افزایش کیفیت اسپرم‌های تحت فریز و ذوب انسان شود.

واژگان کلیدی: درمان ناباروری، ROS، آنتی‌اکسیدانت، پراکسیداسیون لیپیدی

The role of yttrium oxide nanoparticles in the treatment of cholestasis-induced memory impairment

Zeinab Amiri [1]; Delaram Eslami Esfahani [1]; Leila Dargahi [2]; Elmira Beyrami[1]

۱-Department of Animal Sciences, Faculty of Life Sciences, Kharazmi University, Tehran
۲-Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran

Email: Elmira.beirami@khu.ac.ir

Abstract

Introduction: Bile duct ligation (BDL) is a surgical model to induce cholestasis and liver function impairments. Cognitive dysfunction such as learning and memory impairment is one of the symptoms of cholestasis. Yttrium oxide nanoparticles are promising antioxidants for applications in medicine and recently, it has been reported that these nanoparticles are involved in cognitive processes. The aim of this study was to evaluate the effect of yttrium oxide nanoparticles on the cholestasis-induced memory impairment.

Methods: In this experimental study, the cholestatic model in male Wistar rats (weighing 200-250 g) was induced by BDL. Cholestatic rats were treated with different doses of yttrium oxide nanoparticles (0.1, 0.3 and 0.5 mg/kg; intraperitoneal) 24 h after cholestasis surgery for 21 days, and then their cognitive functions were assessed using elevated plus maze (EPM) and passive avoidance (PA) tasks.

Results: Our results showed that the cognitive functions significantly decreased in the cholestatic rats compared with the control group, while treatment with yttrium oxide nanoparticles, particularly the dose of 0.5 mg/kg, reduced cholestasis-induced cognitive impairments.

Conclusion: According to the findings, yttrium oxide nanoparticles had a protective effect on memory impairment induced by cholestasis.

Keywords: Cholestasis, Yttrium oxide nanoparticles, Memory impairment, Elevated plus maze test, Passive avoidance test

نقش نانوذرات اکسید ایتریم در درمان اختلال حافظه ناشی از کلستاز

زینب امیری[۱]؛ دلارام اسلیمی اصفهانی[۱]؛ لیلا درگاهی[۲]؛ المیرا بیرامی*[۱]

۱- گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران
۲- مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
Email: Elmira.beirami@khu.ac.ir

چکیده

مقدمه: بستن مجرای صفراوی یک مدل جراحی برای القاء کلستاز و اختلال در عملکرد کبد است. اختلال در عملکردهای شناختی مانند اختلال در یادگیری و حافظه، یکی از علائم کلستاز به شمار می‌رود. نانوذرات اکسید ایتریوم آنتی اکسیدان های امیدوارکننده ای برای کاربرد در پزشکی هستند و اخیراً گزارش شده است که این نانوذرات در فرآیندهای شناختی نقش مهمی دارند. هدف از این مطالعه بررسی اثر نانوذرات اکسید ایتریم در اختلال حافظه ناشی از کلستاز بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، مدل کلستاتیک در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم) توسط بستن مجرای صفراوی القاء گردید. موش‌های صحرایی کلستاتیک با دوزهای مختلف نانوذرات اکسید ایتریوم (۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم؛ داخل صفاقی) ۲۴ ساعت پس از جراحی کلستاز به مدت ۲۱ روز تحت درمان قرار گرفتند و سپس عملکردهای شناختی آنها با استفاده از ماز مرتفع و آزمون اجتنابی غیرفعال مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که عملکردهای شناختی در موش‌های صحرایی کلستاتیک نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشتند، در حالیکه درمان با نانوذرات اکسید ایتریم، به ویژه دوز ۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم، اختلالات شناختی ناشی از کلستاز را کاهش داد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های فوق نشان دهنده اثر محافظتی نانوذرات اکسید ایتریوم بر اختلال حافظه ناشی از کلستاز می باشند.

واژگان کلیدی: کلستاز، نانوذرات اکسید ایتریوم، اختلال حافظه، تست ماز مرتفع، آزمون اجتنابی غیرفعال

The evaluation of sperm cryopreservation on sperm fertility potential in the presence of deep eutectic solvents (DES)

Faezeh Kohzadi[1*]; Fatemeh Ghasemian[2]; Shirin Shahangian[3]

1- Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran
2- Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran
3- Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran

faeze.kz97@gmail.com

Abstract

Background: Millions of couples are involved with infertility in the reproductive age and infertility in men account for around half these cases. The first diagnostic step of infertility is the assessment of quantitative and qualitative parameters in semen samples such as concentration, morphology and motility. Sperm cryopreservation was introduced in the 1960s.This technique is an effective way to manage and maintain male fertility. Cytotoxic treatments such as chemotherapy, radiation therapy and surgery may lead to testicular failure or ejaculation disorders. In such cases, sperm freezing can be a good solution to maintain fertility but motility, plasma membrane function, acrosome integrity, and overall sperm viability after thawing are usually reduced compared to pre-cryopreservation. Unprotected cryopreservation is normally fatal to cells, and therefore the use of cryopreservation agents plays an important role in cell survival, as they prevent water from crystallizing and resulting in the formation of ice crystals. Deep eutectic solvents can act as a protective agent against freezing. In this study, the parameters of frozen semen samples in the presence and absence of deep eutectic solvents (DES) solution are compared and its effect on sperm viability and quality is investigated.

Material and methods: Normozoospermia semen samples were taken from IVF center and placed in liquid nitrogen vapor for 2-3 minutes and then transferred to liquid nitrogen for freezing. In case of freezing in the presence of DES solution, equal volumes of semen and two types of DES including ChG (consisting of choline chloride and glucose) and ChU (consisting of choline chloride and urea) were used. Samples were evaluated for sperm quality, including assessment of chromatin integrity under toluidine blue staining, chromatin condensation with aniline blue staining, survival and acrosome reaction with triple staining, and evaluation of sperm membrane integrity with eosin and nigrosin staining.

Results: It is shown that the quality of sperm under freezing in the presence of deep eutectic solvents did not differ much from the control group which was not undergo cryopreservation and freezing damages was prevented. So it was found that there is a significant relationship between sperm quality and using DES as a cryopreservation agent.

Keywords: sperm freezing, semen, infertility, male factor, cryopreservation agents

بررسی اثر حفظ انجمادی اسپرم بر پتانسیل باروری اسپرم انسان در حضور حلال های فرا زودگداز DES

فائزه کهزادی[1*]؛ فاطمه قاسمیان[2]؛ شیرین شاهنگیان[3]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت
۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت
۳- گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت
*Email: faeze.kz97@gmail.com**

چکیده

خلاصه: میلیون ها زوج در سنین باروری، با مشکلات ناباروری درگیر هستند. فاکتور مردانه در تقریبا نیمی از موارد ناباروری وجود دارد. اولین مرحله تشخیصی ناباروری ارزیابی پارامترهای کمی و کیفی در نمونه های منی مانند غلظت، مورفولوژی و تحرک است. فریز اسپرم ها در دهه ۱۹۶۰ به عنوان راهی برای حفظ باروری معرفی شد. این تکنیک یک راه موثر برای مدیریت و حفظ باروری مردان در انسان است. درمان های سیتوتوکسیک مانند شیمی درمانی، پرتودرمانی و همچنین جراحی ممکن است منجر به نارسایی بیضه یا اختلال در انزال شوند. در چنین شرایطی، فریز اسپرم می تواند راه حلی مناسب برای حفظ باروری باشد. با این وجود فریز اسپرم میتواند مشکلاتی را سبب شود. مطالعات متعددی آسیب سرمایی را در اسپرم های گونه های مختلف مورد بررسی قرار داده است. تحرک، عملکرد غشای پلاسمایی، یکپارچگی آکروزوم و زنده ماندن کلی اسپرم بعد از ذوب معمولاً در مقایسه با حالت قبل از انجماد کاهش می یابد. انجماد محافظت نشده به طور معمول برای سلول ها کشنده است و بنابراین استفاده از عوامل محافظ در برابر انجماد نقش مهمی در بقای سلول ها ایفا می کند، زیرا از تبلور آب و در نتیجه تشکیل کریستال یخ جلوگیری می کنند. DES می‌تواند نقش یک عامل محافظ در برابر انجماد را ایفا کند. در این پژوهش مقایسه پارامترهای نمونه های سیمن فریز شده در حضور و عدم حضور محلول DES و بررسی اثر آن بر زنده ماندن و کیفیت اسپرم صورت میگیرد.

روش انجام پژوهش: سیمن‌های نورموزواسپرمی از مرکز IVF گرفته شده و در بخار نیتروژن مایع به مدت ۲-۳ دقیقه قرار گرفتند و سپس به منظور فریز به نیتروژن مایع منتقل شدند. برای فریز در حضور محلول DES از حجم مساوی سیمن وDES های ChG (متشکل از کولین کلراید و گلوکز) و ChU (متشکل از کولین کلراید و اوره) استفاده شد. نمونه‌ها برای ارزیابی کیفیت اسپرم، از جمله ارزیابی یکپارچگی کروماتین تحت رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو، سنجش تراکم کروماتین رنگ‌آمیزی آنیلین بلو، بقا و واکنش آکروزوم رنگ‌آمیزی سه‌گانه و ارزیابی یکپارچگی غشای اسپرم تحت رنگ‌آمیزی ائوزین و نیگروزین قرار گرفتند.

نتایج: نشان داده شد که کیفیت اسپرم‌های فریز شده در حضور محلول DES در مقایسه با گروه کنترل (بدون فریز) فرق چندانی نکرده و از آسیب آن جلوگیری شده است.

واژگان کلیدی: فریز اسپرم، مایع منی، ناباروری مردان، فاکتور مرد، محافظ فریز

Evaluating the effect of Primrose (*Oenothera biennis* L.) seed oil on viability of oocytes isolated from NMRI mice in the *in vitro* culture condition

Zahra Teimuri Alilehsar[1]; Hanieh Jalali[2*]; Elaheh Amini[3]; Mohammad Nabiuni[4]

1- Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
2- Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
3- Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
4- Department of Cellular and Molecular Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

* *Email: jalali@khu.ac.ir*

Abstract

Introduction & Objective: Increasing fertility disorders, the prevalence of various diseases and increasing environmental stresses are factors that can force women to use assisted reproductive techniques such as in vitro fertilization. Oocyte culture conditions are a determining factor in the success of in vitro fertilization as well as embryo development. Therefore, optimizing oocyte culture conditions is essential to maintain the quality of oocytes in the environment outside the body. The use of natural antioxidants in the culture medium can be an option to minimize the negative effects of oxidative stress produced by the culture conditions. Evening primrose oil is a powerful source of antioxidants that has been shown to modulate harmful cell reactions. The aim of this study was to compare the effect of evening primrose oil in different concentrations on the viability of mice's oocytes. Methods: In this study, 28 female NMRI mice aged 5-6 weeks were selected and divided into 4 groups of 7. The mice were injected with PMSG hormone and 48 hours later the mice were killed by spinal cord dislocation and the oocytes were extracted from the ovary. The oocytes of the first group were the control group and did not receive any material. The second group received primrose oil with a concentration of 25%. The third group received primrose oil with a concentration of 50% and the fourth group received primrose oil with a concentration of 100% and was placed in the incubator. Sixteen hours later, the samples were examined under a reverse microscope. Results: Counting of dead and live oocytes showed that in the control group 56% of the oocytes, in the second group 54% of the oocytes, in the third group 90% of the oocytes and in the fourth group 89% of the oocytes were alive after 16 hours. The difference between the control group and the third and fourth groups was statistically significant ($P < 0.05$). Conclusion: The results showed that evening primrose oil can increase the viability of oocytes in the culture medium. As a result, it can be considered in assisted reproductive methods or in oocyte culture media.

Keywords: Ovary, medicinal plants, infertility, in vitro fertilization

بررسی اثر روغن دانه گل‌مغربی (Oenothera biennis L.) بر زنده‌مانی تخمک‌های جداسازی‌شده از موش سوری نژاد NMRI در محیط کشت آزمایشگاهی

زهرا تیموری‌الیله‌سر[۱]؛ هانیه جلالی[۲*]؛ الهه امینی[۳]؛ محمد نبیونی[۴]

۱-گروه علوم جانوری ، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی تهران ،ایران
۲- گروه علوم جانوری ، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی تهران ،ایران
۳- گروه علوم جانوری ، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی تهران ،ایران
۴-گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی تهران ،ایران
Email: jalali@khu.ac.ir

چکیده

مقدمه و هدف: افزایش مشکلات باروری، شیوع بیماری‌های مختلف و افزایش استرس‌های محیطی عواملی هستند که می‌توانند زنان را مجبور به استفاده از روش‌های کمک‌باروری نظیر لقاح آزمایشگاهی نمایند. شرایط کشت تخمک عاملی تعیین‌کننده در موفقیت لقاح آزمایشگاهی و همچنین رشد و نمو جنین است. لذا بهینه کردن شرایط کشت تخمک جهت حفظ کیفیت تخمک در محیط خارج از بدن امری ضروری است. استفاده ازآنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در محیط‌کشت می‌تواند یک گزینه برای به حداقل رساندن اثرات منفی استرس اکسیداتیو تولید شده توسط شرایط کشت باشد. روغن گل‌مغربی جزو منابع آنتی‌اکسیدانی قوی است که اثر آن در تعدیل واکنش‌های آسیب‌رسان به سلول اثبات شده است. مطالعه حاضر با هدف مقایسه اثر روغن گل‌مغربی در غلظت‌های مختلف بر زنده‌مانی تخمک‌های موش سوری انجام شد. روش‌کار: در این مطالعه ۲۸موش سوری ماده نژاد NMRI ۶-۵ هفته‌ای انتخاب شده و به ۴ گروه ۷تایی تقسیم شدند. به موشها هورمون PMSG تزریق شده و ۴۸ ساعت بعد موش‌ها به روش قطع نخاعی کشته شده و تخمک‌ها از تخمدان استخراج شدند. تخمک‌های گروه اول به عنوان گروه کنترل بودند و هیچ موادی دریافت نکردند.گروه دوم روغن گل‌مغربی با غلظت ۲۵درصد دریافت کردند.گروه سوم روغن گل‌مغربی با غلظت ۵۰ درصد و گروه چهارم روغن گل مغربی با غلظت ۱۰۰درصد دریافت کردند و در انکوباتور گذاشته شدند. ۱۶ساعت بعد نمونه‌ها در زیر میکروسکوپ معکوس بررسی شدند. نتایج: شمارش تخمک‌های مرده و زنده نشان داد که در گروه‌کنترل ۵۶ درصد از تخمک‌ها، در گروه دوم ۵۴ درصد از تخمک‌ها، در گروه سوم ۹۰ درصد از تخمک‌ها و در گروه چهارم ۸۹ درصد تخمک‌ها پس از طی ۱۶ ساعت زنده بودند. تفاوت مابین گروه کنترل با گروه‌های سوم و چهارم از لحاظ آماری معنادار بود ($P < 0.05$). نتیجه‌گیری: نتایج حاصل نشان داد که روغن گل‌مغربی می‌تواند موجب افزایش زنده‌مانی تخمک‌ها در محیط‌کشت شود؛ در نتیجه می‌تواند در روش‌های کمک‌باروری و یا در محیط‌های کشت تخمک مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: تخمدان، گیاهان‌دارویی، ناباروری، لقاح‌آزمایشگاهی

Comparative effect of primrose (Oenothera biennis L.) oil and mineral oil on the oocytes isolated from NMRI mice

Zahra Teimuri Alilehsar[1]; Hanieh Jalali*[2]; Elaheh Amini[3]; Mohammad Nabiuni[4]

1-Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
2- Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
3- Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
4-Department of Cellular and Molecular Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

Email: jalali@khu.ac.ir

Abstract

Introduction and aim: Increasing the age, the prevalence of various diseases and increased environmental stress are factors that can force women to use assisted reproductive techniques such as in vitro fertilization. Oocyte culture condition is a determining factor in the success of in vitro fertilization. Therefore, improving the oocyte culture condition and using compounds that can maintain the quality of oocytes outside the body, are fundamental subjects. The oil droplet culture system is widely used for the cultivation of mammalian gametes and embryos. Mammalian oocytes and embryos are usually cultured under the oil coating, which helps maintain the pH and osmolality in the culture medium. It is essential to minimize adverse metabolic effects on embryos and ultimately DNA and protein changes that cause osmotic stress. Beneficial effects of oil coatings include the removal of lipophilic substances collected from the culture medium such as some steroids during oocyte maturation. The most commonly used oil in the oocyte culture medium is mineral oil, which various tests have proven its positive effect on the oocyte culture condition. However, some of its limitations include changes in the composition of the culture medium. Primrose oil is a powerful source of antioxidants that have been shown to modulate harmful reactions to cells. The aim of this study was to compare the effect of Primrose oil and mineral oil on the viability of oocytes of mice.

Methods: In this study, 21 female 5-6 week old NMRI mice were selected and divided into 3 groups. The mice were injected with PMSG hormone and 48 hours later, the mice were killed by spinal cord dislocation and the oocytes were extracted from the ovary. The oocytes of the first group were the control group and did not receive any material. The second group received Primrose oil with a concentration of 100%. The third group received 100% mineral oil and were placed in an incubator. Sixteen hours later, the samples were examined under a light reverse microscope.

Results: Counting the dead and live oocytes showed that in the control group 56% of the oocytes, in the second group 89% of the oocytes and in the third group 54% of the oocytes were alive after 16 hours. There was a statistical difference between the second group with control and the third group ($P < 0.05$).

Conclusion: The results of the present study showed that primrose oil can increase the viability of oocytes in the culture medium and therefore can be considered as an alternative to mineral oil in oocyte cultivation methods.

Keywords: Ovary, medicinal plants, infertility, in vitro fertilization

بررسی اثر مقایسه‌ای روغن دانه گل‌مغربی(Oenothera biennis L.) و روغن مینرال بر زنده مانی تخمک‌های جداسازی شده از موش‌سوری نژاد NMRI

زهرا تیموری‌الیله‌سر[۱]؛ هانیه جلالی[۲*]؛ الهه امینی[۳]؛ محمد نبیونی[۴]

۱-گروه علوم جانوری ، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی تهران ،ایران
۲- گروه علوم جانوری ، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی تهران ،ایران
۳- گروه علوم جانوری ، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی تهران ،ایران
۴-گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی تهران ،ایران
Email: jalali@khu.ac.ir

چکیده

مقدمه و هدف: افزایش سن‌باروری، شیوع بیماری‌های مختلف و افزایش استرس‌های محیطی عواملی هستند که می‌توانند زنان را مجبور به استفاده از روش‌های کمک‌باروری نظیر لقاح آزمایشگاهی نمایند. شرایط کشت تخمک عاملی تعیین‌کننده در موفقیت لقاح آزمایشگاهی است؛ لذا بهینه کردن شرایط کشت تخمک و استفاده از ترکیباتی که بتوانند کیفیت تخمک در محیط خارج از بدن را حفظ نمایند ضروری به نظر می‌رسد. سیستم قطره‌گذاری روغن به طور گسترده برای کشت گامت‌ها و جنین‌های پستانداران استفاده می‌شود. تخمک‌ها و جنین‌های پستانداران معمولا زیر پوشش روغنی کاشته می‌شوند که به حفظ پایداری pH و اسمولاریته در محیط کشت کمک می‌کند. بنابراین به حداقل رساندن تاثیرات متابولیکی نامطلوب روی جنین‌ها و سرانجام تغییرات DNA و پروتئین که فشارهای اسمزی را باعث می‌شوند ضروری است. تأثیرات سودمند پوشش روغن شامل حذف مواد چربی دوست جمع‌آوری شده از محیط‌کشت به طور مشابه برخی استروئیدها در طی بلوغ تخمک توسط روغن است. روغنی که به طور متداول در محیط‌کشت تخمک استفاده می‌شود روغن مینرال است که آزمایشات مختلف تأثیر مثبت آن بر محیط کشت تخمک را ثابت کرده اند اما برخی از محدودیت‌های آن شامل تغییر در ترکیبات محیط کشت است. روغن گل‌مغربی جزو منابع آنتی‌اکسیدانی قوی است که اثر آن در تعدیل واکنش‌های آسیب‌رسان به سلول اثبات شده است. مطالعه حاضر با هدف مقایسه اثر روغن گل‌مغربی و روغن مینرال بر زنده‌مانی تخمک‌های موش سوری انجام شد.

روش‌کار: در این مطالعه ۲۱ موش سوری ماده نژاد NMRI ۶-۵ هفته‌ای انتخاب شده و به ۳ گروه ۷تایی تقسیم شدند. به موش‌ها هورمونPMSG تزریق شده و ۴۸ ساعت بعد به روش نخاعی کشته شده و تخمک‌ها از تخمدان استخراج شدند. تخمک‌های گروه اول به عنوان گروه کنترل هیچ موادی دریافت نکردند.گروه دوم روغن گل‌مغربی با غلظت ۱۰۰درصد دریافت کردند.گروه سوم روغن مینرال با غلظت ۱۰۰ درصد دریافت کردند و در انکوباتور گذاشته شدند. ۱۶ ساعت بعد نمونه‌ها در زیر میکروسکوپ نوری معکوس بررسی شدند.

نتایج: شمارش تخمک‌های مرده و زنده نشان داد که در گروه‌کنترل ۵۶ درصد از تخمک‌ها، در گروه دوم ۸۹ درصد از تخمک‌ها و در گروه سوم ۵۴ درصد از تخمک‌ها پس از طی ۱۶ ساعت زنده بودند. تفاوت مابین گروه دوم با گروه‌های سوم و کنترل از لحاظ آماری معنادار بود ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که روغن گل‌مغربی می‌تواند موجب افزایش زنده‌مانی تخمک‌ها در محیط‌کشت شود و در نتیجه می‌تواند به عنوان جایگزینی برای روغن مینرال در روش‌های کشت تخمک مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: تخمدان، گیاهان‌دارویی، ناباروری، لقاح‌آزمایشگاهی

Comparison and evaluation of memory after treatment with colistin antibiotic and lytic bacteriophage in male Wistar Laboratory rats

Zahra Tajiani, 1 Dr. Niloufar Darbandi *, 2 Dr. Majid Komijani 3

1- Master student of Biology Department, Faculty of Basic Sciences, Arak University

2- Assistant Professor of Biology, Arak University

3- Assistant Professor, Department of Biology, Arak University

Email: N-Darbandi@araku.ac.ir

Abstract

Introduction: Despite the beneficial effects of antibiotics in preventing the growth of bacteria and disease, these compounds can also damage host cells. Antibiotics damage mitochondria by reducing ATP, loss of respiratory capacity, oxidative stress due to ROS accumulation, and induction of cell death, and greatly contribute to the pathogenesis and progression of neurodegenerative diseases, including brain aging and Alzheimer's disease. Bacteriophages, on the other hand, are able to kill bacteria but have no effect on eukaryotic cells. in the present study, the therapeutic effect of colistin antibiotic and lytic bacteriophage against Pseudomonas aeruginosa on learning and memory was compared.

Materials and Methods: In this experimental study, adult male Wistar Laboratory rats weighing 250-220 g were divided into control (burn), phage lytic treatment (100 µl) and colistin antibiotic treatment (3,000,000 IU Colistin/Kg/day) groups. In all groups, after anesthesia, third degree burns were created in the lumbar region of the animals. In the two groups of phage and antibiotic treatment, 100 µl of Pseudomonas was diluted to half McFarland at the burn site and performed after one hour of treatment. Bacteriophage and antibiotic treatment with the mentioned doses were performed intraperitoneally for 6 consecutive days. At the end of the treatment, passive avoidance test and new object detection test were used to assess memory.

Results: In passive avoidance test, injection of colistin significantly reduced memory recall compared to the control group ($P < 0.05$). While phage treatment had no significant effect on passive avoidance memory compared to the control group ($P > 0.05$). In the new object detection test, there was a significant difference in memory assessment between the antibiotic treatment group and the control group ($P < 0.05$). While in the phage treatment group, there was no significant difference in the detection of a new object with the control group ($P > 0.05$).

Conclusion: The results of the present study show that phage therapy can have less adverse effects on memory process than antibiotics while treating infection.

Keywords: Colistin antibiotic, Laytic bacteriophage, Memory, Pseudomonas aeruginosa, Laboratory rats

مقایسه و ارزیابی حافظه پس از درمان با آنتی‌بیوتیک کولیستین و باکتریوفاژ لایتیک در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد ویستار

زهرا تاجیانی[1], دکتر نیلوفر دربندی *[2], دکتر مجید کمیجانی[3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه اراک
۲- استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه اراک
۳- استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه اراک
Email: N-Darbandi@araku.ac.ir

چکیده

علیرغم اثرات مفید آنتی‌بیوتیک‌ها در جلوگیری از رشد باکتری‌ها و ایجاد بیماری، این ترکیبات می‌توانند به سلول‌های میزبان نیز آسیب وارد کنند. آنتی‌بیوتیک‌ها با کاهش ATP، از دست دادن ظرفیت تنفسی، استرس اکسیداتیو ناشی از تجمع ROS و القای مرگ سلولی به میتوکندری آسیب وارد کرده و تا حد زیادی به پاتوژنز و پیشرفت بیماری‌های نورودژنراسیو از جمله پیری مغز و بیماری آلزایمر کمک می‌کند. از طرف دیگر باکتریوفاژها قادرند باکتری‌ها را از بین ببرند اما هیچ تاثیری در سلول‌های یوکاریوتی ندارند. بر این اساس در مطالعه حاضر به مقایسه اثر درمانی آنتی‌بیوتیک کولیستین و باکتریوفاژ لایتیک علیه سودوموناس آئروژینوزا بر یادگیری و حافظه پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر بالغ نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۲۰ گرم به گروه‌های کنترل (سوختگی)، درمان با فاژ لایتیک (۱۰۰ میکرولیتر) و درمان با آنتی‌بیتیک کولیستین(3000000 واحد بین المللی کولیستین/ کیلوگرم/ روز) تقسیم شدند. در همه گروه‌ها پس از بیهوشی، در ناحیه کمر حیوانات سوختگی درجه سه ایجاد شد. در دو گروه درمان با فاژ و آنتی‌بیوتیک ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون نیم مک‌فارلند باکتری سودوموناس آئروژینوزا در محل سوختگی قرار گرفت و پس از یک ساعت درمان انجام شد. تیمار با باکتریوفاژ و آنتی‌بیوتیک با دوزهای ذکر شده در ۶ روز متوالی به‌صورت درون صفاقی انجام شد. در پایان تیمار از آزمون اجتنابی غیرفعال و آزمون تشخیص شی جدید برای ارزیابی حافظه استفاده شد.

نتایج: در آزمون اجتنابی غیرفعال تزریق کولیستین بطور معنی‌داری بخاطرآوری حافظه را نسبت به گروه کنترل کاهش داد ($P<0/05$). درحالیکه درمان با فاژ اثر معناداری بر حافظه اجتنابی غیرفعال در مقایسه با گروه کنترل نداشت($P>0/05$). در آزمون تشخیص شی جدید نیز اختلاف معناداری در ارزیابی حافظه بین گروه درمان با آنتی‌بیوتیک و گروه کنترل دیده شد($P<0/05$). درحالیکه در گروه درمان با فاژ اختلاف معناداری در تشخیص شی جدید با گروه کنترل نشان نداد($P>0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان میدهد درمان با فاژ قادر است ضمن درمان عفونت نسبت به آنتی بیوتیک، تاثیرات سوء کمتری بر روند حافظه داشته باشد.

کلمات کلیدی: آنتی‌بیوتیک کولیستین، باکتریوفاژ لایتیک، حافظه، سودوموناس آئروژینوزا، موش بزرگ آزمایشگاهی

Applications of microwave technology in the food industries, with an emphasis on seafood processing

Mohadeseh Hosseini[1], Mina Esmaeili[1*], Sakineh Yeganeh[1]

1-Department of Fisheries, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari. Iran

*mina.smaily@gmail.com

Abstract

Heating is one of the most important and common methods of food processing. One of these methods of direct heating of food is microwave technology. This method has special properties that distinguish it from other heating methods. In microwave technology, electromagnetic waves with specific frequencies are used to heat food products. Food is usually processed by a microwave with two frequencies (2450MHz and 915MHz). Microwave technology is widely used in the processing of various aquatic and food products. Drying, cooking, thawing, sterilization, hydrolysis, extraction and bleaching are some of the applications of microwave technology. In the process of hydrolysis of proteins, it seems that microwave pretreatment leads to proper opening of the protein structure and improves the access of protease enzymes to the peptide bonds. These diverse applications have led to its widespread use in recent years. In general, the advantages of the microwave include less initial heating time, faster heating, higher energy efficiency, less space required, the possibility of process control, selective heating and production of food with higher nutritional quality. Microwave technology is also an environmentally friendly process. On the other hand, there are weaknesses in working with the microwave, such as non-uniformity in heating and the possibility of overcooking and hard texture of the products. In general, it can be said that the processing of various food products, including seafood by microwave, has several advantages in terms of product quality, nutritional value and environmental compatibility compared to conventional thermal methods.

Keywords: Novel technology, Food, Microwave, Heating, Seafood

کاربردهای فناوری مایکروویو در صنایع غذایی، با تأکید بر صنعت فرآوری آبزیان

سیده محدثه حسینی[۱]، مینا اسمعیلی خاریکی[۱*]، سکینه یگانه[۱]

۱. گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

mina.smaily@gmail.com

چکیده

حرارت‌دهی یکی از مهم‌ترین و متداول‌ترین روش‌های فرآوری مواد غذایی است. یکی از این روش‌های حرارت‌دهی مستقیم مواد غذایی، فناوری مایکروویو است. این روش دارای خصوصیات ویژه‌ای است که آن را از دیگر روش‌های حرارت‌دهی متمایز می‌کند. در تکنولوژی مایکروویو، امواج الکترومغناطیسی با فرکانس‌های خاص برای حرارت‌دهی محصولات غذایی استفاده می‌شود. به‌طور معمول فرآوری مواد غذایی توسط ماکروویو با دو فرکانس (2450MHz و 915MHz) صورت می‌گیرد. فناوری ماکروویو در زمینه فراوری آبزیان و مواد غذایی مختلف کاربرد گسترده‌ای دارد. خشک کردن، پختن، انجمادزدایی آبزیان، استریلیزاسیون، هیدرولیز، استخراج ترکیبات، حرارت‌دهی سوریمی ماهی و بلیچینگ از جمله کاربردهای فناوری ماکروویو می‌باشند. در فرآیند هیدرولیز پروتئین‌های دریایی، به نظر می‌رسد که پیش‌تیمار با مایکروویو منجر به باز شدن مناسب ساختار پروتئین‌ها و بهبود دسترسی آنزیم‌های پروتئاز به باندهای پپتیدی می‌گردد. این کاربردهای متنوع موجب گسترش استفاده از آن در سال‌های اخیر شده‌است. به طور کلی از مزایای مایکروویو می‌توان به زمان گرم شدن اولیه کمتر، ایجاد حرارت سریع‌تر، کارایی انرژی بالاتر، نیاز به فضای کمتر، امکان کنترل دقیق‌تر فرآیند، حرارت دهی انتخابی و تولید مواد غذایی با کیفیت تغذیه‌ای بالاتر اشاره کرد. همچنین فنآوری مایکروویو یک فرآیند سازگار با محیط زیست می‌باشد. در مقابل، نقاط ضعفی هم در کار با ماکروویو وجود دارد که می‌توان به عدم یکنواختی در حرارت‌دهی و احتمال پختن بیش از حد و بافت سفت محصولات اشاره کرد. در مجموع می‌توان بیان نمود که فرآوری محصولات غذایی مختلف ازجمله فرآورده‌های دریایی با ماکروویو نسبت به روش‌های متداول حرارتی، از نظر کیفیت فرآورده، ارزش غذایی و سازگاری با محیط زیست دارای مزایای متعددی می‌باشد.

کلمات کلیدی: مواد غذایی، فنآوری نوین، ماکروویو، حرارت‌دهی ، فرآورده‌های دریایی

The effect of different thawing methods (water immersion and microwave) on the thawing loss and cooking loss of common carp fillets (Cyprinus carpio)

Mohammadmehdi Asgari[1], Mina Esmaeili[*1], Abbas Zamani[2], Seyed Vali Hosseini[3]

1. Department of Fisheries, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
2. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Environment, Malayer University
3. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran

mina.smaily@gmail.com

Abstract

Defrosting frozen foods is a necessary step before processing and cooking, but a series of biochemical changes during thawing can lead to adverse effects on food quality. The extent of these qualitative changes in defrosted foods depends on several factors, including the method used for thawing. In order to maintain the quality of fish, it is necessary that the thawing process be controlled and done in the shortest possible time, and in this regard, choosing the appropriate method is very important. In the thawing process, there are two general methods of heat transfer to the product, the first and most widely used of which is heat transfer from the surface. Traditional thawing methods include thawing in air, vacuum thawing and immersion in water, which are very time consuming and sometimes lead to a decline in product quality. The second method of heating the product is to generate heat inside the product, which provides a more uniform thawing process. To overcome the limitations and disadvantages of traditional methods, new technologies such as ultrasound, high voltage electrostatic field, microwave, high pressure, pulsed electric field, radio frequency and ohmic thawing have been introduced. Therefore, in the present study, the effect of ultrasonic bath (US) and water immersion (Ws) thawing methods on the quality of frozen common carp (*Cyprinus carpio*) fillets was investigated. Frozen fillets were thawed by Us and Ws methods. The thawing loss was 1.06% and 1.49% for water immersion and ultrasonic bath thawing methods, respectively, and no significant difference was observed ($p > 0.05$).

Keywords: Thawing, Ultrasound, water immersion, Common carp

تاثیر روش‌های مختلف انجمادزدایی بر افت ناشی از انجمادزدائی و پخت فیله ماهی کپور معمولی (Cyprinus carpio)

محمدمهدی عسگری [۱] مینا اسمعیلی خاریکی[۱*]، عباس زمانی[۲]، سید ولی حسینی[۳]

۱-گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲- گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه ملایر

۳- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران

mina.smaily@gmail.com

چکیده

انجمادزدایی محصولات غذایی منجمد یک مرحله ضروری پیش از فرآوری و پخت آن است، اما یک سری تغییرات بیوشیمیایی در طی انجمادزدایی، ممکن است منجر به اثرات نامطلوب بر کیفیت ماده غذایی گردند. میزان این تغییرات کیفی در ماده غذایی انجمادزدایی شده به عوامل متعددی از جمله روش مورد استفاده برای انجمادزدایی بستگی دارد. ضروری است که جهت حفظ کیفیت ماهی، انجمادزدایی به شکل کنترل شده و در سریع‌ترین زمان ممکن صورت گیرد و در این راستا انتخاب روش انجمادزدایی مناسب بسیار مهم می‌باشد. در فرآیند انجمادزدایی دو شیوه کلی انتقال گرما به محصول وجود دارد که اولین و پرکاربردترین آن روش انتقال گرما از سطح می‌باشد. روش‌های سنتی انجمادزدایی شامل انجمادزدایی در هوا، انجمادزدایی تحت خلاء و غوطه‌وری در آب بوده که بسیار زمان‌بر هستند و گاهی منجر به افت کیفی محصول می‌شوند. شیوه دوم حرارت‌دهی به محصول، تولید گرما در داخل محصول می‌باشد که فرآیند انجمادزدایی یکنواخت تری را فراهم می‌کند. برای غلبه بر محدودیت‌ها و معایب روش‌های سنتی، فناوری‌های جدیدی همانند التراسوند، میدان الکترواستاتیک ولتاژ بالا، مایکروویو، فشار مافوق بالا، میدان الکتریکی پالسی، انجمادزدایی با فرکانس رادیویی و انجمادزدایی اهمیک معرفی شده‌اند که عمدتا از شیوه دوم حرارت‌دهی استفاده می‌شود. بنابراین، در پژوهش حاضر تأثیر روش‌های انجمادزدایی حمام التراسونیک (Us) و غوطه‌وری در آب (Ws) بر کیفیت فیله‌های منجمدشده‌ی ماهی کپور معمولی (Cyprinus carpio) مورد بررسی قرار گرفت. فیله‌های منجمد به روش‌های Us و Ws انجمادزدایی شدند. در آزمون افت ناشی از انجمادزدایی، این مقدار برای فیله‌های انجمادزدایی شده با روش غوطه‌وری و التراسونیک به ترتیب ۱/۰۶٪ و ۱/۴۹٪ بود و اختلاف معنی‌داری بین دو تیمار مشاهده نشد ($p>0.05$).

واژگان کلیدی: انجمادزدایی، التراسوند، غوطه‌وری در آب، کپور معمولی

The effects of astaxanthin on liver functional enzymes levels in male mice following long-time paclitaxel administration

Maryam Kholghi[1], Mehdi Banan Khojasteh[1], Gholamreza Hamidian[2*], Emad Khalilzadeh[2]

1- Department of animal biology, faculty of natural sciences, university of tabriz

2- Department of basic sciences, faculty of veterinary, university of Tabriz

Abstract

Paclitaxel (PT) is a phyto-alkaloid of taxane family, which is considered as one of the most important anti-cancer drugs in the clinic. Previous studies showed that taxane family drugs, such as paclitaxel cause structural and functional damage to liver tissue. One of the mechanisms involved in the complications of paclitaxel is the formation of mitochondrial ROS and the induction of apoptosis. Astaxanthin (AS) is a carotenoid that is an effective inhibitor of oxidative stress damage and has strong antioxidant properties as well as its anti-apoptotic effects are well known. The aim of this study was to evaluate the protective effect of AS on the side effects of PT in liver tissue of male mice. In the present study, 50 adult male mice were randomly divided into 5 groups of 10 animals, including control, PT, PT+AS50, PT+AS100, PT+AS150. Animals received 12.4 mg/kg/week PT intra-peritoneally and AS daily via oral gavage for 4 weeks. At the end of experiments, animals were anaesthetized and serum samples were evaluated for liver functional enzymes (ALP, AST, ALT). Data were analyzed by SPSS software and using ANOVA test and Tukey's post hoc to compare examined groups. Results showed that PT increased all enzymes significantly. It was indicated that As could inhibit this changes partially and reduced enzymes in a dose-dependent manner but it was non-significant compared to control only for ALP and ALT in high dose of AS treated animals. It can be concluded that long-time administration of PT has significant hepatotoxic effects and AS can be considered as a suitable therapeutic strategy for improvement of PT side effect in liver.

Keywords: Carotenoid, Taxane, ALT, AST, ALP

تاثیر آستاگزانتین بر سطح آنزیم های عملکردی کبد در موش های آزمایشگاهی نر متعاقب تجویز طولانی مدت پاکلی تاکسل

مریم خلقی۱، سید مهدی بانان خجسته۱، غلامرضا حمیدیان۲*، عماد خلیل زاده۲

۱- گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز
۲- گروه علوم پایه ، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز

چکیده

داروی پاکلی تاکسل یک آلکالوئید گیاهی از خانواده تاکسان است که به عنوان یکی از مهمترین داروهای کاربردی ضد سرطان در کلینیک به شمار می‌رود. مطالعات گذشته نشان می‌دهد که داروهای خانواده تاکسان از جمله پاکلی‌تاکسل موجب آسیب ساختاری و عملکردی به بافت کبد می‌شوند که یکی از مکانیسم های درگیر در عوارض ناشی از آن ها شکل‌گیری گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن میتوکندریایی و القای مرگ سلولی است. آستاگزانتین نوعی کاروتنوئید است که مهارکننده موثر آسیب‌های استرس اکسیداتیو بوده و خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی دارد و اثرات ضدآپوپتوزی آن نیز به خوبی شناخته شده است. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر حمایتی آستاگزانتین بر عوارض ناشی از تجویز پاکلی تاکسل در بافت کبد موش‌های آزمایشگاهی نر صورت گرفته است. در تحقیق حاضر ۵۰ موش آزمایشگاهی نر بالغ به طور تصادفی به ۵ گروه ۱۰ تایی شامل گروه کنترل، پاکلی‌تاکسل، پاکلی‌تاکسل+آستاگزانتین۵۰، پاکلی‌تاکسل+آستاگزانتین۱۰۰، پاکلی‌تاکسل+آستاگزانتین۱۵۰ تقسیم شدند. پاکلی‌تاکسل به میزان ۱۲/۴ mg/kg یک بار در هفته به صورت داخل صفاقی و آستاگزانتین روزانه به صورت گاواژ دهانی به مدت ۴ هفته تجویز شد. در پایان دوره پس از بیهوشی حیوانات خون گیری انجام شده و سطح سرمی آنزیم‌های عملکردی کبد (ALT، AST، ALP) اندازه‌گیری گردید. در نهایت داده‌ها با نرم افزار SPSS و آنالیز آماری ANOVA و پس آزمون توکی بین گروه های تحت تیمار مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تجویز پاکلی‌تاکسل باعث افزایش معنی‌دار سطح سرمی هر سه آنزیم گردید. همچنین مشخص شد که آستاگزانتین به صورت وابسته به دوز باعث مهار نسبی و کاهش معنی دار این تغییرات شد اما تنها در دوز بالای آستاگزانتین سطح سرمی ALP و ALT با گروه کنترل اختلاف معنی داری را نشان نداد. با توجه به نتایج حاصله می توان گفت که تجویز طولانی مدت پاکلی‌تاکسل اثرات هپاتوتوکسیک مشخصی دارد و مصرف آستاگزانتین می‌تواند یک استراتژی محافظتی مناسب برای بهبود عوارض پاکلی‌تاکسل در کبد باشد.

واژگان کلیدی: کارتنوئید، تاکسان، ALT، AST، ALP

Study on Scorpions (Arachnida: Scorpiones) in Southern part of Kerman province

Hossein Barahoei[1*], Mehran Shahi[2] and Moslem Adeli Sardou[3]
1- Institute of Agricultural Research, University of Zabol, Zabol
2- Health Institute, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas
3- Faculty of Public Health, Jiroft University of Medical Sciences, Jiroft
** Email: barahoei@uoz.ac.ir*

Abstract
So far, 19 species of scorpions belonging to 10 genera and three families have been reported from Kerman province. Sampling was done from Jiroft and Kahnooj counties in the south of Kerman province during 2017 and 2018. In total, 10 species of scorpions from three families were collected and identified as follows: Androctonus crassicauda, Androctonus sp., Hottentotta sistanensis, H. navidpouri, Mesobuthus eupeus, Odontobuthus baluchicus, Orthochirus kucerai and Sassanidothus gracilis from the family Buthidae; Hemiscorpius acanthocercus from the family Hemiscorpiidae and Scorpio maurus townsendi from the family Scorpionidae. Preliminary results indicate the existence of a new species of the genus Androctonus in this area. Due to the very diverse climatic conditions of this province, the possibility of the presence of more species as well as new species in the region is very likely. Dangerously poisonous species such as A. crassicauda, H. acanthocercus and O. baluchicus are spread in the region.

Keywords: Scorpion, new species, systematic, morphology, Kerman

Investigation of antioxidant activity in the natural and co-pigmented anthocyanins extracted from sour cherry and black cherry plum

Shahrbanu Molaeafard[1*]; Rashid Jamei[1]; Ahmad Poursattar Marjani[2]

1- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences and Chemistry, Urmia University, Urmia

2- Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, Urmia University, Urmia

** Email: sh.molaeafard@gmail.com*

Abstract

The sour cherry (*Prunus cerasus* L.) and black cherry plum (*Prunus cerasifera* Ehrh. cv. Pissardii nigra) are two popular species of the Rosacea family with attractive red and purple color because of their high levels of anthocyanins. In addition to the role of food coloring, anthocyanins have antioxidant properties that play an important role in the prevention of many degenerative diseases. Co-pigmentation reactions can improve the color stability and antioxidant activity of anthocyanins. In this research, anthocyanins extracted from fully ripened fruits of mentioned species were treated with six organic acids (caffeic, gallic, 4-hydroxybenzoic, malic, tannic, and vanillic acids) as co-pigments with a concentration of 1mg/1mL, and the rate of DPPH radical scavenging activity in the natural and co-pigmented anthocyanins was evaluated. The scavenging activity of the natural anthocyanins of sour cherry was higher than the black cherry plum and both of them were lower than co-pigmented models. The rate of scavenging activity in the co-pigmented sour cherry anthocyanins followed the order: malic acid > tannic acid > gallic acid > 4-hydroxybenzoic acid > vanillic acid > caffeic acid, and also in the black cherry plum anthocyanins followed the order: tannic acid > gallic acid > 4-hydroxybenzoic acid > caffeic acid > malic acid > vanillic acid. Hence, all added co-pigments significantly ($P \leq 0.05$) were led to increasing of antioxidant activity. Besides the dissimilar order of co-pigments effects can be due to the different structures of anthocyanins in the two species investigated.

Keywords: Sour cherry, Black cherry plum, Co-pigmentation, Organic acids, DPPH

بررسی فعالیت پاد اکسایشی در آنتوسیانین های طبیعی و کوپیگمنته استخراج شده از آلبالو و آلوچه سیاه

شهربانو مولائی فرد[1*]؛ رشید جامعی[1]؛ احمد پورستار مرجانی[2]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه و شیمی، دانشگاه ارومیه، ارومیه
۲ - گروه شیمی آلی، دانشکده شیمی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

** Email: sh.molaeafard@gmail.com*

چکیده

آلبالو (Prunus cerasus L.) و آلوچه سیاه (Prunus cerasifera Ehrh. cv. Pissardii nigra) دو گونه محبوب از خانواده رزاسه هستند، که به دلیل سطوح بالای آنتوسیانین دارای رنگ قرمز و ارغوانی جذاب هستند. آنتوسیانین ها علاوه بر نقش رنگ آمیزی مواد غذایی، دارای خاصیت پاداکسایشی هستند، که در پیشگیری از بسیاری از بیماری های دژنراتیو نقش بسزایی ایفا می کنند. واکنش های کوپیگمنتاسیون می توانند پایداری رنگ و فعالیت پاد اکسایشی آنتوسیانین ها را بهبود ببخشند. در این تحقیق ، آنتوسیانین های استخراج شده از میوه های کاملا رسیده با شش اسید آلی (اسید های کافئیک، گالیک، ۴-هیدروکسی بنزوئیک، مالیک، تانیک و وانیلیک) به عنوان کوپیگمنت با غلظت 1mg/1mL تیمار شده و میزان فعالیت جاروب سازی رادیکال DPPH در آنتوسیانین های طبیعی و کوپیگمنته ارزیابی شد. فعالیت جاروب سازی آنتوسیانین های طبیعی آلبالو بیشتر از آلوچه سیاه و هر دوی آنها کمتر از مدل های کوپیگمنته بودند. میزان فعالیت جاروب سازی در آنتوسیانین های کوپیگمنته آلبالو به ترتیب به صورت: مالیک اسید> تانیک اسید > گالیک اسید > ۴-هیدروکسی بنزوئیک اسید > وانیلیک اسید > کافئیک اسید، و همچنین در آنتوسیانین های آلوچه سیاه به ترتیب به صورت: تانیک اسید > گالیک اسید > ۴-هیدروکسی بنزوئیک اسید > کافئیک اسید > مالیک اسید > وانیلیک اسید، بود. از این رو، تمامی کوپیگمنت های افزوده شده به طور معنی داری ($P \leq 0.05$) منجر به افزایش فعالیت پاد اکسایشی شدند. علاوه بر این ترتیب متفاوت اثرات کوپیگمنت ها می تواند به دلیل وجود ساختارهای مختلف آنتوسیانین ها در دو گونه مورد بررسی باشد.

واژگان کلیدی: آلبالو، آلوچه سیاه، کوپیگمنتاسیون، اسید های آلی، DPPH

Micromorphological study of Phalaris (Poaceae) in Iran

Maryam Keshavarzi[1*]; Samaneh Mosaferi[1]; Zahra Barati[1]

1- Department of Plant Science, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran

*M.keshavarzi@alzahra.ac.ir

Abstract

The genus *Phalaris* is a genus of Poaceae family that includes annual and perennial plants of the tribe Aveneae. This genus, with 22 species in the world, is mainly distributed in the Mediterranean region, and 5 species are recorded from Iran as *Phalaris brachystachys*, *Ph. paradoxa*, *Ph. minor*, *Ph. aquatica*, *Ph. arundinacea* and *Ph. canariensis*. These species belong to the "Old World" group of species. These species, which are mainly distributed in the northern, southern and southwestern regions of Iran, are important fodder and weedy species. In the present study, 23 accessions of native taxa as *Phalaris minor*, *Ph. Paradoxa* and *Ph. brachystachys* were collected from nature at the appropriate growing season from 8 different provinces of Iran and evaluated for micromorphology. By examining the surface micromorphology of the lemma and palea by digital stereomicroscope and Scanning Electron Microscopy, the surface microstructural features of these parts were evaluated. Multivariate statistical analysis was performed using quantitative and qualitative traits and various methods of cluster analysis and ordination based on principal components were used. Micro-morphological study of lemma and palea representing variations between species studied. Micro-prickles and hooks were not found on the surface of these sections in any of the species. The length of long cells showed great variability. The possibility of presence of an ecotype in *Ph. minor* in Iran is suggested by previous studies, but the micro-morphological study did not support this kind of diversity. The results showed the diagnostic value of micro-morphological traits. The micro-morphology of lemma and palea showed that especially features such as prickle, papilla and long cells can provide suitable diagnostic traits in distinguishing species of this genus in Iran.

Keywords: Canary grass, Lemma, Palea, Diagnostic value

بررسی ریز ریخت شناسی گونه‌های Phalaris از تیره غلات در ایران

مریم کشاورزی[1*]؛ سمانه مسافری[1]؛ زهرا براتی[1]

1 - گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران

Email:m.keshavarzi@Alzahra.ac.ir

چکیده

جنس Phalaris از تیره غلات مشتمل بر گیاهانی یک ساله و چندساله از قبیله Aveneae است. این جنس که در دنیا با ۲۲ گونه عمدتا در مناطق مدیترانه‌ای رویش دارد در ایران ۵ گونه به نام‌های Ph. brachystachys، Ph. paradoxa، Ph. minor، Ph. aquatica، *Ph.* arundinacea و Ph. canariensis. گزارش شده‌اند. این گونه‌ها متعلق به گروه گونه‌های دنیای قدیم می‌باشند. این گونه‌ها که عمدتا در نواحی شمالی، جنوبی و جنوب غربی ایران پراکنش دارند دارای اهمیت علوفه‌ای و علف هرز هستند. در بررسی حاضر ۲۳ واحد جمعیتی از گونه های خودرویPhalaris minor ، Ph. Paradoxa و Ph. brachystachys از طبیعت در فصل مناسب رشد از ۸ استان مختلف ایران گردآوری و از جنبه ریز ریخت شناسی مورد ارزیابی واقع شدند. با بررسی ریز ریخت شناسی سطح پوشینه و پوشینک توسط استریومیکروسکوپ دیجیتال و میکروسکوپ الکترونی صفات ریز ریختی سطح این بخش‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. تحلیل آماری چند متغیره با استفاده از صفات کمّی و کیفی صورت گرفت و از انواع روش‌های تجزیه خوشه‌ای و رسته بندی بر مبنای مولفه های اصلی استفاده شد. بررسی ریز ریخت شناسی بشره پوشینه و پوشینک معرف تنوع بین گونه‌های مطالعه شده است. میکروپریکل و قلاب در سطح این بخش‌ها در هیچ یک از گونه‌ها دیده نشد. طول سلول‌های بلند تنوع زیادی نشان داد. مطالعات پیشین احتمال وجود اکوتیپ برای گونه Ph. minor در ایران را داده بود اما بررسی ریز ریخت شناسی چنین تنوعی را مشخص نساخت. نتایج حاکی از ارزش افتراقی صفات ریز ریختی مورد ارزیابی بود. ریز ریخت شناسی پوشینه و پوشینک نشان داد که خصوصا ویژگی‌هایی مانند پریکل، پاپیلا و سلول‌های بلند می‌تواند صفات افتراقی مناسبی را در تفکیک گونه‌های این جنس در ایران فراهم آورند.

واژگان کلیدی: علف بره، پوشینه، پوشینک، ارزش افتراقی

In vitro propagation of Impatiens

Behzad Kaviani*; Ava Almasi

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Rasht

*Email: b.kaviani@yahoo.com, kaviani@iaurasht.ac.ir

Abstract

Balsam (*Impatiens hawkeri Bull. cv. Sweeties Blue Star)*, in Balsaminaceae is an important species of ornamental plants and genus of *Impatiens* contains 400–850 species and is cultivated as spring pot and bedding plants. Impatiens is one of the most important bedding plant worldwide. Propagation by seed often encounters with some limitations and problems such as production of heterogeneous plants and time consuming with segregation of traits. Plant tissue culture is a potential alternative to overcome these limitations and problems. Micropropagation of species belonging to the *Impatiens* genus has been reported by various researchers using shoot tips, hypocotyl segments and cotyledons as explants and BA, BAP, TDZ, 2–iP, Kin, NAA, IBA and IAA as plant growth regulators (PGRs). There is no efficient protocol for micropropagation of balsam *(Impatiens hawkeri Bull. cv. Sweeties Blue Star),* an important ornamental plant. A factorial experiment in a completely randomized design was carried out. In this study, single nodes were germinated on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1-naphthaleneacetic acid (NAA; 0.00, 0.10 and 0.50 mg l^{-1}), 6-benzylaminopurine (BA; 0.00, 0.10, 0.50 and 1.00 mg l^{-1}) and kinetin (KIN; 0.00, 0.10, 0.50 and 1.00 mg l^{-1}). The shoot length was highest in medium containing 0.10 mg l^{-1} NAA and control. The largest number of shoots (14.06 and 14.00 per explant) was produced in media supplemented with 1.00 mg l^{-1} BA plus 0.50 mg l^{-1} NAA and 1.00 mg l^{-1} BA plus 0.10 mg l^{-1} NAA, respectively. The 0.10 mg l^{-1} NAA along with 1.00 mg l^{-1} BA was found to be superior for production of leaf (57.13). Maximum root length (33.80 mm) and root number (29.13) were obtained on medium supplemented with 0.10 mg l^{-1} NAA without BA and Kin. The regenerated plantlets from organogenesis media were harvested and transferred to pots containing a ratio of 1:1 (v/v) perlite:peat moss and irrigated with tap water every third day. The plantlets were maintained in a greenhouse (24–26°C, RH 70%, under natural photoperiod conditions) for acclimatization. Regenerated plantlets were morphologically identical with mother plants and did not show any phenotypic variation. Upon *ex vitro* transfer, 100% of plants survived.

Keywords: Balsaminaceae, Micropropagation, Organogenesis, Ornamentals, Plant growth regulators

تکثیر درون‌شیشه‌ای گل حنا

بهزاد کاویانی[1*]؛ آوا الماسی[1]

۱-گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت

*Email: b.kaviani@yahoo.com, kaviani@iaurasht.ac.ir

چکیده

گل حنا (Impatiens hawkeri Bull. *cv.* Sweeties Blue Star)، از خانواده Balsaminaceae، یک گونه مهم از گیاهان زینتی است و جنس *Impatiens* شامل ۴۰۰ تا ۸۵۰ گونه می‌باشد و به عنوان گیاهان گلدانی و پوششی بهاره کاشته می‌شود. گل حنا، یکی از مهم‌ترین گیاهان پوششی در سطح جهان است. تکثیر توسط بذر اغلب با برخی محدودیت‌ها و مشکلات مانند تولید گیاهان ناهمسان و زمان‌بر بودن با تفرق صفات همراه است. کشت بافت گیاهی یک راه حل بالقوه برای غلبه بر این محدودیت‌ها و مشکلات است. ریزازدیادی گونه‌های متعلق به جنس گل حنا توسط محققان مختلف با استفاده از سرشاخه‌ها، قطعات محور زیر لپه و لپه‌ها به عنوان ریزنمونه‌ها و ترکیبات BA، BAP، TDZ، 2-iP، Kin، NAA، IBA و IAA به عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (PGRs) گزارش شده است. یک دستورالعمل مؤثر برای ریزازدیادی گل حنا به عنوان یک گیاه زینتی مهم وجود ندارد. یک آزمایش فاکتوریل در یک طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. در این مطالعه، تک‌گره‌ها روی محیط موراشیگ و اسکوگ (MS) مکمل‌شده با ۱-نفتالین‌استیک اسید (NAA؛ ۰، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر)، ۶-بنزیل‌آمینوپورین (BA؛ ۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) و کینتین (Kin؛ ۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) جوانه زدند. طول شاخساره در محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و شاهد بالاترین بود. بالاترین تعداد شاخساره (۱۴/۰۶ و ۱۴ در ریزنمونه)، به ترتیب در محیط‌های مکمل‌شده با ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA تولید شد. مشخص شد که ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA همراه با ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA برای تولید برگ (۵۷/۱۳) برتر بود. بیشینه طول ریشه (۳۳/۸۰ میلی‌متر) و تعداد ریشه (۱۹/۱۳) روی محیط مکمل‌شده با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بدون BA و Kin به دست آمدند. گیاهچه‌های باززایی‌شده از محیط‌های اندام‌زایی، برداشت شدند و به گلدان‌های حاوی یک نسبت از ۱:۱ پرلیت:پیت‌موس منتقل گردیدند و هر سه روز یک‌بار با آب لوله‌کشی آبیاری شدند. گیاهچه‌ها در یک گلخانه (۲۴ تا ۲۶ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۰ درصد، تحت شرایط دوره نوری طبیعی) برای سازگاری نگهداری شدند. گیاهچه‌های باززایی‌شده از نظر ظاهری با گیاهان مادر مشابه بودند و هیچ تغییر فنوتیپی نشان ندادند. طی انتقال به شرایط برون‌شیشه‌ای، ۱۰۰ درصد گیاهان زنده ماندند.

واژگان کلیدی: بالزامیناسه، ریزازدیادی، اندام‌زایی، گیاهان زینتی، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی

Micropropagation of orchid Phalaenopsis (Phalaenopsis amabilis (L.) Blume var. Jawa)

Behzad Kaviani[1*]; Mozhdeh Asa[1]

[1]-Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Rasht

[*]*Email: b.kaviani@yahoo.com, kaviani@iaurasht.ac.ir*

Abstract

Phalaenopsis amabilis from the Orchidaceae is a beautiful tropical plant distributed throughout Southeast Asia that can be successfully kept indoors. Phalaenopsis orchids have high economic value in the floriculture industry due to their large, colorful, and durable flowers as well as their wider adaptability to indoor conditions. Phalaenopsis contains some species close to extinction. Orchids are one of the most diverse of the flowering plants families, containing 800 genera and 25000 species. Orchids are grown as ornamentals and are valued as cut flowers not only because of their exotic beauty but also for their long shelf life. A protocol was developed for high frequency in vitro multiplication of an ornamental orchid, Phalaenopsis amabilis (L.) Blume var. Jawa, using plant growth regulators (PGRs). Healthy and sterilized protocorm-like bodies (PLBs) of Phalaenopsis amabilis (L.) Blume var. Jawa was purchased from a plant tissue culture company in Austria (Orchid Wire Co.) and used as a source of explants. PLBs, as explants were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium fortified with various concentrations of kinetin (Kin) and indole-3-butyric acid (IBA), either individually or in combination. The experimental units were setup in a completely randomized block design. Each experiment was carried out in three replicates and each replicate includes four specimens (totally; 12 specimens for each treatment). Data on the measured characters were recorded from 192 explants after 60 days of culture. Statistical analysis was done by using Microsoft Excel 2013 and Statistical Package for Social Sciences (SPSS) v 16.0. The analysis of variance (ANOVA) procedure for a factorial experiment was used to test for significant effect of treatments, followed by LSD test for comparisons of different means of different treatments. A combination of 1.00 mg l^{-1} KIN + 1.00 mg l^{-1} IBA was found to be suitable for regeneration of most measured characteristics especially maximum PLBs regeneration (30.40/plantlet), leaf number (5.93/plantlet) and root number (8.36/plantlet) from protocorm explants. The maximum number of plantlet (11.66) was calculated on MS medium supplemented with 1.00 mg l^{-1} KIN + 0.50 mg l^{-1} IBA, followed by 1.00 mg l^{-1} KIN + 1.00 mg l^{-1} IBA (10.33). Plantlets were transplanted to pots filled with cocochips and sphagnum moss (70:30) for acclimatization and transferred to the greenhouse. Upon ex vitro transfer, 90% of plants survived.

Keywords: In vitro culture, ornamental plants, plant growth regulators, protocorm-like bodies

ریزازدیادی ارکید فالانوپسیس (*Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume var. Jawa)

بهزاد کاویانی[1*]؛ مژده آسا[1]

۱-گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت

*Email: b.kaviani@yahoo.com, kaviani@iaurasht.ac.ir

چکیده

فالانوپسیس (*Phalaenopsis amabilis*) از خانواده ارکیده یک گیاه گرمسیری زیبا است که در سراسر آسیای جنوبی گسترش دارد که می‌تواند به طور موفقیت‌آمیزی در فضاهای محدودشده نگهداری شوند. ارکیدهای فالانوپسیس به دلیل گل‌های بزرگ، رنگی و متنوع‌شان، همچنین سازگاری مناسب با شرایط فضای محدود، ارزش تجاری بالایی در صنعت گلکاری دارند. فالانوپسیس شامل برخی گونه‌های در معرض خطر انقراض است. ارکیدها یکی از متنوع‌ترین خانواده‌های گیاهی گلدار، شامل ۸۰۰ جنس و ۲۵۰۰۰ گونه می‌باشند. ارکیدها به عنوان گیاهان زینتی رشد داده می‌شوند و به عنوان گل‌های شاخه‌بریده نه تنها به دلیل زیبایی‌شان بلکه برای ماندگاری طولانی پس از برداشت قابل ارزش هستند. یک دستورالعمل برای پرآوری درون‌شیشه‌ای با فراوانی بالای یک ارکیده زینتی، فالانوپسیس رقم جاوا، با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (PGRs) توسعه یافت. اجسام شبه-پروتوکورم (PLBs) سالم و ضدعفونی‌شده فالانوپسیس رقم جاوا از یک شرکت کشت بافت گیاهی در اتریش (شرکت ارکید وایر) خریداری شد و به عنوان یک منبع ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفت. PLBs، به عنوان ریزنمونه‌ها روی محیط موراشیگ و اسکوگ (MS) غنی‌شده با غلظت‌های مختلف کینتین (Kin) و ایندول-۳-بوتیریک اسید (IBA)، یا انفرادی یا در ترکیب کشت شدند. واحدهای آزمایشی در یک طرح کاملاً تصادفی چیده شدند. هر آزمایش در سه تکرار انجام شد و هر تکرار حاوی ۴ نمونه (در مجموع؛ ۱۲ نمونه برای هر تیمار) بود. داده‌ها روی ویژگی‌های اندازه‌گیری‌شده از ۱۹۲ ریزنمونه بعد از ٦٠ روز کشت ثبت شدند. تجزیه آماری با استفاده از مایکروسافت اکسل ۲۰۱۳ و بسته آماری برای علوم اجتماعی (SPSS) نسخه ۱۶ انجام شد. روش تجزیه واریانس (ANOVA) برای یک آزمایش فاکتوریل برای آزمون اثر معنی‌داری تیمارها استفاده شد، سپس آزمون LSD برای مقایسه میانگین‌های مختلف تیمارهای مختلف به کار گرفته شد. یک ترکیب از ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin + ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA برای باززایی اغلب ویژگی‌های اندازه‌گیری‌شده به ویژه بیشینه باززایی PLBs (۳۰/٤٠ در گیاهچه)، تعداد برگ (۵/۹۳ در گیاهچه) و تعداد ریشه (۸/۳۶ در گیاهچه) از ریزنمونه‌های پروتوکورم مناسب تشخیص داده شد. بیشینه تعداد گیاهچه (۱۱/٦٦) روی محیط MS مکمل‌شده با ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin + ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA و بعد از آن ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin + ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA (۱۰/۳۳) محاسبه شد. گیاهچه‌ها به گلدان‌های پرشده با کوکوچیپس و خزه اسفاگنوم (۳۰:۷۰) برای سازگاری نشا شدند و به گلخانه منتقل گردیدند. طی انتقال برون‌شیشه‌ای، ۹۰ درصد از گیاهان بقا داشتند.

واژگان کلیدی: کشت درون‌شیشه‌ای، گیاهان زینتی، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، اجسام شبه-پروتوکورم

Introduction and compatibility of exclusive species in gypsum soils of Semnan, Iran

Fatemeh Rabizadeh [1] *, Farzaneh Bahadori[۲]
1- Farzanegan Campus, Semnan University, Semnan, Iran
2- Research Division of Natural Resources Department, Semnan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Semnan, Iran

*Correspondence: f.rabizade@semnan.ac.ir

Abstract
Existence of numerous gypsum mines in the west of Semnan has caused biological damage such as the destruction of gypsum mountains and gypsum plant cover. The study area with an area of about 30,000 hectares in gypsum habitats west of Semnan city and in the northern strips of the famous Iranian desert called Dasht-e Kavir between the three western regions of Momenabad with geographical coordinates of 35˚32 '38.96' North and 53˚17 ' 36.64 "east and north and east of Lasjerd with coordinates 35 ˚ 26 '27.33" north and 53 ˚ 05' 2.8 "east and south of After with coordinates 35 ˚ 35 '54.63" north and 53 ˚ 7' 18.63 "east Is. The study area has a hot and dry climate and the predominant cover of gypsum-loving plants and altitudes of 1100 to 2000 meters above sea level. Ecological adaptability in ecosystems such as gypsum plant communities in Semnan province leads to the biodiversity of monocotyledons. However, in the gypsum desert areas of Iran, limited studies have been conducted on gypsum vegetation. Therefore, it is necessary to study the conditions of exclusive species of gypsum areas and understand how they adapt, such as the native species of Semnan: *Astragalus semnanens, Astragalus fridae, Gypsophila mucronifolia, Moltkia gypsaceae, Nepeta eremokosmos and Euphorbia gypsicola.* Contrary to expectations, gypsum soils improve soil conditions for some plants to grow. The presence of sodium prevents these particles from coming closer to each other and prevents the formation of soil structure and granulation, which gypsum solves this problem and also improves the ratio of calcium to magnesium in the soil. The entry path of gypsum in these plants was investigated. After entering the plant, gypsum particles show their effects on the leaf parenchyma of these species, which were observed in the form of calcium oxalate crystals. The amount of these crystals is high and their focus is on the leaf surface and close to the bases of the hairs. In fact, the vegetative form and anatomical, morphological and micro-morphological characteristics of these gypsum species have been adapted for survival in dry climatic conditions of Semnan region. From the moment of vegetative form, these species have long roots with deep penetration. This study showed that there is a significant relationship between biodiversity indices with the altitude of the high seas and gypsum with sodium content, EC and pH of soil, which shows this compatibility in gypsum species.

Keywords: Calcium oxalate, sodium, biodiversity, morphology

معرفی و سازش پذیری گونه های انحصاری در خاکهای گچی سمنان، ایران

فاطمه ربیع زاده[1*]، فرزانه بهادری[2]

۱-استادیار پردیس فرزانگان، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۲-استادیار مرکز تحقیقات و آموزش و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان، سمنان، ایران

Email: f.rabizade@semnan.ac.ir

چکیده

وجود تعداد بی شماری از معادن گچ در غرب سمنان باعث تخریب های زیستی مانند تخریب کوه های گچی و پوشش های گیاهان گچزی شده است. منطقه مورد مطالعه با مساحتی حدود ۳۰،۰۰۰ هکتار در رویشگاه های گچی غرب شهر سمنان و در نوارهای شمالی از بیابان معروف ایران به نام دشت کویر بین سه منطقه غرب مومن آباد با مختصات جغرافیایی "38.96 ′32 °35 شمالی و "36.64 ′17 °53 شرقی و شمال و شرق لاسجرد با مختصات "27.33 ′26 °35 شمالی و "2.8 ′05 °53 شرقی و در جنوب افتر با مختصات "54.63 ′35 °35 شمالی و "18. 63 ′7 °53شرقی واقع شده است. منطقه مورد مطالعه دارای آب و هوای گرم و خشک و پوشش غالب گیاهان گچ دوست و ارتفاعات ۱۱۰۰ تا ۲۰۰۰ متری از سطح دریا است. سازش پذیری اکولوژیکی در اکوسیستم هایی مانند جوامع گیاهی گچزی استان سمنان به تنوع زیستی گیاهان انحصاری می انجامد. با این وجود اما درمناطق بیابانی گچزی ایران، مطالعات محدودی در ارتباط با پوشش های گیاهی گچزی صورت گرفته است. از این رو ضرورت مطالعه شرایط زیست گونه های انحصاری مناطق گچی و درک چگونگی سازش پذیری آنها مانند انواع گونه های بومی سمنان Astragalus semnanens، Astragalus fridae، Gypsophila mucronifolia، Moltkia gypsaceae، Nepeta eremokosmos و Euphorbia gypsicola وجود دارند. خاکهای گچی، بر خلاف انتظار، شرایط خاک را برای رویش بعضی گیاهان بهتر می کنند. وجود سدیم مانع نزدیک شدن این ذرات به یکدیگرشده و از تشکیل ساختار و دانه بندی خاک جلوگیری می کند که گچ این مشکل را باکاتیون کلسیم برطرف می کند و نیز نسبت کلسیم به منیزیم خاک را بهبود می بخشد. مسیر ورود گچ در این گیاهان بررسی شد. ذرات گچ پس از ورود به گیاه اثرات خود را در پارانشیم های برگ این گونه ها نشان می دهد که به صورت بلورهای اگزالات کلسیم مشاهده شدند. میزان این کریستالها زیاد است و تمرکز آنها به سمت سطح برگ و نزدیک به پایه های کرکها است. در واقع فرم رویشی وخصوصیات آناتومی، موفورلوژیکی و میکرومورفولوژیکی این گونه های گچزی برای بقا در شرایط خشک آب و هوایی منطقه سمنان سازش یافته است. از لحظ فرم رویشی این گونه ها دارای ریشه های بلند با نفوذ عمیق هستند. این مطالعه نشان داد ارتباط معنی داری بین شاخص های تنوع زیستی با ارتفاع منطقه از سطح دریاهای آزاد وگچ با محتوای سدیم، EC و pH خاک وجود دارد که این سازش پذیری را در گونه های گچزی نشان می دهد.

واژگان کلیدی: اگزالات کلسیم، سدیم، تنوع زیستی، مورفولوژی

Geographic distribution pattern of Scorzonera subg. Podospermum in Iran

Elham Hatami*

*Biology Department, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman

*elhamhatami88@yahoo.com

Abstract

Geographic distribution pattern of *Scorzonera* subg. *Podospermum* in Iran was analyzed using a database of 980 georeferenced records, with the purpose of determining the distribution areas and species richness hotspot regions. Members of this subgenus possessed diagnostic morphological characters including pinnatifid leaves, conspicuous carpopodium of achenes and black corniculate projections at the apex of phyllaries. The combination of these characters leads us to easily distinguish the species of this subgenus from the other species. Species of this subgenus are distributed in Europe, Southwest Asia (Iran, Turkey, Iraq, Afghanistan, and Pakistan), Central Asia and the Caucasus region. Subgenus *Podospermum* has 12 species distributed in Iran, of which 3 species are endemic. Species richness was mapped with the point-to-grid richness analysis tool DIVA-GIS, using a 10×10 kilometer grid cell and the circular neighborhood option with a 50 km radius. The results obtained from our geographic distribution analysis represented that species of this subgenus are mainly widespread in in north, northwest and west of Iran, and to a limited extent in northeast and southeast of Iran. Consequently, the region of central Albourz in north and caucasian region in northwest have the highest species richness. Ten species including *S. lachnostegia*, *S. laciniata*, *S. luristanica*, *S. armeniaca*, *S. grossheimii*, *S. cana*, *S. meyeri*, *S. radicosa*, *S. kandavanica* and *S. persepolitana* are geographically spanning in the north, northwest, and western parts of Iran, of which *S. kandavanica* is endemic to Hyrcanian district, and *S. persepolitana* and *S. luristanica* are endemic to the Kurd-Zagrosian sector in west of Iran. On the other hand, the species richness of this subgenus is decreased in central and eastern part of Iran, hence, our investigations of the specimens in the field or herbaria revealed the presence of only two species such as *S. songorica* and *S. meshhedensis* in this region. Moreover, members of this subgenus are observed in regions with humid climate, and growing mostly on highland, slopes of mountains, wet rangelands, sandy soils, rockey slopes, and wet margins of agricultural lands. Therefore, with regards to the geographic distribution of this subgenus, recent climate change and drought phenomenon occurred in Iran, it is necessary to define the regions with prioritization in conservation strategies, and also paying more attention to conserving the species, particularly rare and endemic ones.

Keywords: Podospermum, Iran, species richness, grid cell, conservation

بررسی پراکندگی جغرافیایی زیر جنس Podospermum از جنس Scorzonera در ایران

الهام حاتمی*

*گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان

Email: elhamhatami88@yahoo.com

چکیده

عرصه انتشار جغرافیایی زیر جنس Podospermum از جنس Scorzonera در ایران با هدف تعیین عرصه پراکنش و نقاط داغ غنای گونه های این زیر تیره و با استفاده از ۹۸۰ رکورد ژئورفرنس شده واکاوی گردید. گونه های متعلق به زیر جنس Podosperemum همگی دارای صفات تشخیصی از جمله برگهای شانه ای لوبدار، فندقه پایکدار و زوائد برجسته سیاه رنگ در نوک برگه های کاپیتول می باشند که ترکیب این صفات به تشخیص گونه های این زیرجنس از سایر گونه ها کمک می کند. گونه های این زیرجنس در اروپا، جنوب غربی آسیا (ایران، ترکیه، عراق، افغانستان، پاکستان)، آسیای مرکزی و منطقه قفقاز پراکنش دارند. . زیر جنس Podospermum دارای ۱۲ گونه در ایران می باشد که از این تعداد ۳ گونه اندمیک محسوب می شوند. نقشه غنای گونه ای این زیرجنس در ایران با استفاده از خانه گریدهای ۱۰×۱۰ کیلومتر و روش محدوده های دایره ای همسایه با شعاع ۵۰ کیلومتر در نرم افزار DIVA-GIS ترسیم شد نتایج به دست امده از پراکنش جغرافیایی نشان داد که گونه های این زیر جنس به طور عمده در شمال، شمال غرب و غرب و به طور محدودتر در شمال شرق و جنوب شرق ایران پراکنش دارند که در این میان ناحیه البرز مرکزی در شمال و ناحیه قفقازی در شمال غرب ایران دارای بیشترین غنای گونه ای هستند. گونه هایی که اغلب در مناطق شمال، شمال غرب و غرب ایران پراکنش دارند شامل ده گونه *S.* lachnostegia, S. laciniata, S. luristanica, S. armeniaca, S. grossheimii, S. cana, S. meyeri, S. radicosa, S. kandavanica , S. persepolitana می باشند که از این میان گونه *S. kandavanica* اندمیک ناحیه هیرکانی می باشد و گونه های S. persepolitana و S. luristanica انحصاری منطقه کرد-زاگرسی در غرب ایران هستند. از سوی دیگر نواحی مرکزی و شرقی ایران دارای غنای گونه ای بسیار پایینی هستند که اغلب بررسی های میدانی و هرباریومی حضور دو گونه S. songorica و S. meshehdensis در این را مناطق نشان می دهند. همچنین گونه های این زیر جنس گیاهانی رطوبت پسند هستند که بیشتر در مناطق مرتفع، مراتع کم وبیش مرطوب ، خاکهای شنی یا ماسه ای، شیب های سنگی یا صخره ای و حاشیه های مرطوب زمین های کشاورزی رویش دارند. بنابراین، با توجه به عرصه پراکنش گونه های این زیرجنس در ایران و تغییرات آب و هوایی و خشکسالی های اخیر، لزوم شناخت مناطق با اولویت حفاظت و همچنین توجه به حفاظت از گونه های موجود به خصوص گونه های نادر و اندمیک ضروری به نظر می رسد.

واژگان کلیدی: زیر جنس Podospermum، ایران، غنای گونه ای، خانه گرید، حفاظت

Ethnobotanical study of medicinal plants in Behbahan city

Nezam Armand[1*]; Alam paydar[1]

1- Department of Biology, Faculty of Basic Science, Behbahan Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan

*armandnezam@yahoo.com

Abstract

Throughout history, medicinal plants have always had a special relationship with humans and the effects of medicinal plants and their uses are not hidden from anyone, and one of the important reasons for this antiquity is the presence of deep-rooted beliefs of people in different lands about the use of medicinal plants. Although the interest, companionship and attention to these beneficial plants has been low in recent years, but fortunately has recently received more attention. Due to the side effects of chemical drugs, The use of medicinal plants, due to their medicinal properties, are used to treat many different diseases and improve human health. Behbahan city has 60 known species of medicinal plants in terms of medicinal plants. This study was design for understanding the culture of the traditional use of herbs in Behbahan city in order to treat disease and to know their spending priorities. Ethnobotanical information such as local name, traditional uses, how to use, chemical compounds and medicinal properties of plants were collected by referring to people specializing in traditional medicine and natives with sufficient knowledge of medicinal plants and perfumes of Behbahan city using a questionnaire and in Tables were compiled. In this study, 31 species belonging to 24 families were identified. Families *Lamiaceae, Apiaceae, Rhamnaceae, Cruciferaceae, Lythraceae, Zingiberaceae* in the area of the most widely used medicinal species were attending. Also, most of the medicinal plants in the studied plants of this region are for the treatment of diseases of the respiratory and gastrointestinal tract and problems caused by hot temper. *Crocus sativus* plant for its antidepressant, sedative and natural food coloring, *Peganumharmala* as a disinfectant and prevent eye sores, *Cumin cyminum* as the best spice and anti-flatulence for digestive problems, the most widely used among the general public. have. Given the importance of traditional medicine in the treatment of diseases, the current use of this method depends on people's knowledge and beliefs. The introduction of medicinal plants can determine the potential of the study area in terms of genetic resources And provide a good platform for future research activities. Therefore, the necessary measures should be taken to preserve and prevent the extinction of medicinal species in the region by the executive agencies. Also, the results of this research can provide a good basis for better use of medicinal plants in Behbahan city for marketing and production of effective medicinal products.

Keywords*: Nitriariace, Zingiberaceae, Crocus sativus*, Antidepressant, Respiratory problems

مطالعه اتنوبوتانی گیاهان دارویی شهرستان بهبهان

نظام آرمند[۱*]؛ احلام پایکار[۱]
۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه دانشگاه صنعتی خاتم الانبیا بهبهان، بهبهان
Email: armandnezam@yahoo.com

چکیده

گیاهان دارویی درطول تاریخ همیشه با انسان قرابت خاصی داشته و آثار دارویی و موارد استفاده آن بر هیچکس پوشیده نیست و یکی از دلایل مهم این قدمت حضور باورهای ریشه دار مردم سرزمین های مختلف در خصوص استفاده از گیاهان دارویی است اگر چه علاقه، همدمی و توجه به این گیاهان مفید در سالهای گذشته ناچیز بوده ولی خوشبختانه اخیراً مورد عنایت و توجه بیشتری قرار گرفته است. با توجه به عوارض جانبی داروهای شیمیایی استفاده از گیاهان دارویی به علت خصوصیات دارویی آنان برای درمان بسیاری ازبیماریهای مختلف و بهبود سلامت بشر مورد استفاده قرار میگیرند. شهرستان بهبهان از لحـاظ گیاهـان دارویی دارای ۶۰ گونه گیاه دارویی شناخته شده می باشد. با هدف آشنایی با فرهنگ استفاده سنتی از گیاهان دارویی شهرستان بهبهان جهت معالجه بیماریها و همچنین آشنایی با اولویت های مصرف آنها صورت گرفته است.

اطلاعات اتنوبوتانی از قبیل نام محلی، مصارف سنتی، نحوه کاربرد، ترکیبات شیمیایی و خواص دارویی گیاهان با مراجعه به افراد متخصص در طب سنتی و افراد بومی دارای شناخت کافی از گیاهان دارویی و عطاری های شهرستان بهبهان با استفاده از پرسشنامه جمع آوری گردید و در جدول هایی تدوین شد.

در این پژوهش ۳۱ گونه گیاهی متعلق به ۲۴ تیره شناسایی شد. خانواده های Lamiaceae، Apiaceae، Rhamnaceae، Cruciferaceae، Lythraceae، Zingiberaceae در این منطقه از پرکاربردترین گونه های دارویی مورد استفاده مراجعه کنندگان بودند. همچنین بیشترین مصرف دارویی در گیاهان مورد مطالعه این منطقه جهت درمان بیماری های دستگاه تنفسی و دستگاه گوارشی و مشکلات ناشی از گرم مزاجی بدن می باشد. گونه ی گیاهی زعفران Crocus sativus به خاطر داروی ضد افسردگی، آرام بخش و رنگ غذایی طبیعی، اسپند peganumharmala به عنوان ضدعفونی کننده و جلوگیری از چشم زخم، زیره سبز Cuminum cyminum به عنوان بهترین ادویه و ضدنفخ برای مشکلات گوارشی بیشترین مصرف را در بین عموم دارند.

با توجه به اهمیت طب سنتی در درمان بیماری‌ها، در حال حاضر میزان استفاده از این شیوه بستگی به شناخت و باور مردم دارد. معرفی گیاهان دارویی می تواند پتانسیل منطقه مورد مطالعه را از نظر ذخایر ژنتیکی مشخص ساخته و بستر مناسبی را برای بسط فعالیت‌های تحقیقاتی در آینده فراهم کند. بنابراین بایستی اقدامات لازم در خصوص حفظ و جلوگیری از انقراض گونه‌های دارویی منطقه توسط دستگاه‌های اجرایی انجام شود. همچنین نتایج این تحقیق می‌تواند زمینه مناسبی را برای استفاده بهتر از گیاهان دارویی شهرستان بهبهان برای بازاریابی و تولید فرآورده‌های موثر دارویی فراهم کند.

واژگان کلیدی: نیتراریاسه، زنجبیلیان، زعفران، ضد افسردگی، مشکلات تنفسی

Used medicinal plants in Shadegan city of Khuzestan province

Nezam Armand[1*]; Somaye Horobi[1]

1- Department of Biology, Faculty of Basic Science, Behbahan Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan

*armandnezam@yahoo.com

Abstract

In recent decades, with the emergence of side effects, chemical drugs, the use of herbal medicines has been increasing. Today, a large percentage of the drugs used are of plant origin. In many developed countries, people use herbal remedies to treat diseases. Ethnobotanical studies play a very effective role in the proper utilization of plants for sustainable development by discovering plant potentials in each region. This study aims to get acquainted with the culture of traditional use of medicinal plants in Shadegan, It has been done to treat diseases and also to get acquainted with their consumption priorities. In this study, using a questionnaire, information of people referring to Attari on the use of medicinal plants was collected. And the resulting data are listed in special tables. For this purpose after collecting data on plants in the area simultaneously Local name, Persian name, genus, chemical compounds in medicinal plants, medicinal properties and other information related to the species have been collected. In this study, 37 plant species belonging to 27 genera were identified. Among these medicinal plants, families *Zingiberaceae*, *Lamiaceae*, *Burseraceae*, *Nitrariaceae*, *Apiaceae*, *Lythraceae* 14, 13.7, 7, 7, 6.7, 5.5, 5% of the medicinal plants sold during the research period, respectively. Also, most of the medicinal uses in the studied plants of this region are related to the treatment of diseases of the respiratory system, including colds and nasal congestion, nervous system and gastrointestinal tract, including elimination of bad breath, flatulence and gastric ulcers. The tendency of the world community to natural medicines, proving the destructive and side effects of chemical drugs on the one hand And the creation of environmental pollution that threatens the planet is on the other hand. Medicinal plants are part of natural resources And many countries have more or less such genetic resources The type, number and variety of plant species vary according to the conditions and geographical location of each region. Keywords: ethnobotany, Shadegan, traditional medicine, medicinal plants

Keywords: Ethnobotany, Lamiaceae, Zingiberaceae, Peptic ulcers

گیاهان دارویی پر کاربرد در شهرستان شادگان استان خوزستان

نظام آرمند[1]*؛ سمیه حروبی[1]

1 - گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه دانشگاه صنعتی خاتم الانبیا بهبهان.، بهبهان

Email: armandnezam@yahoo.com

چکیده

در دهه های اخیر با مشخص شدن عوارض جانبی داروهای شیمیایی استفاده از داروهای گیاهی روبه افزایش است. امروزه درصد زیادی از داروهای مورد استفاده منشاء گیاهی دارند، به طوری که در بسیاری از کشورهای پیشرفته مردم برای درمان بیماری‌ها، از داروهای گیاهی استفاده می‌کنند.

مطالعات اتنوبوتانیک با کشف پتانسیل های بالقوه گیاهی در هر منطقه نقش بسیار موثری در جهت بهره برداری صحیح از گیاهان در راستای توسعه پایدار ایفا می کند. این مطالعه با هدف آشنایی با فرهنگ استفاده سنتی از گیاهان دارویی شهرستان شادگان جهت معالجه بیماریها و همچنین آشنایی با اولویت های مصرف آنها صورت گرفته است.

در این تحقیق با استفاده از پرسشنامه، اطلاعات افراد مراجعه کننده به عطاری در زمینه استفاده از گیاهان دارویی جمع آوری گردیده و داده های حاصل در جدول های مخصوص درج شده است. برای این منظور پس از جمع آوری داده های مربوط به گیاهان منطقه به طور همزمان نام محلی، اسم فارسی، تیره، ترکیب های شیمیایی موجود در گیاهان دارویی، خواص دارویی و سایر اطلاعات مربوط به گونه ها گردآوری شده است .

در این پژوهش ۳۷ گونه گیاهی متعلق به ۲۷ تیره شناسایی شد. که در بین این گیاهان دارویی، خانواده هایZingiberaceae ، Lamiaceae، Burseraceae، Nitrariaceae، Apiaceae، Lythraceae به ترتیب ۱۴، ۱۳/۷، ۷، ۷، ۶/۷، ۵/۵، ۵ درصد از گیاهان دارویی به فروش رفته در مدت تحقیق را شامل میشوند. همچنین بیشترین موارد مصرف دارویی در گیاهان مورد مطالعه این منطقه مربوط به درمان بیماری های دستگاه تنفسی از جمله سرماخوردگی و رفع گرفتگی بینی، دستگاه عصبی و دستگاه گوارشی از جمله رفع بوی بد دهان، بادشکن و زخم معده می باشد.

گرایش جوامع جهانی به داروهای طبیعی، اثبات اثرات مخرب و جانبی داروهای شیمیایی از یک طرف و ایجاد آلودگی های زیست محیطی که کره زمین را تهدید می کند از سوی دیگر است. گیاهان دارویی جزء ذخایر و منابع طبیعی هستند و بسیاری ازکشورها کم و بیش از چنین منابع ژنتیکی برخوردارند که نوع، تعداد و تنوع گونه‌های گیاهی بر اساس شرایط و موقعیت جغرافیایی هر منطقه متفاوت است.

واژگان کلیدی: اتنوبوتانی، نَعناعیان، زنجبیل، زخم های گوارشی

Highly consumed medicinal plants in Shush city, Khuzestan province

Nezam Armand[1*]; MinaMaki[1]

1- Department of Biology, Faculty of Basic Science, Behbahan Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan

*armandnezam@yahoo.com

Abstract

Secondary metabolites of plants that are the result of the biosynthesis of primary metabolism, It does not play a vital role in the plant life cycle and the production of these compounds is done only to regulate the plant's adaptation to environmental stresses. These beneficial natural substances are found in cells, The glands and secretory ducts of different organs of the plant are scattered, including a wide range of chemical compounds such as alkaloids, glycosides, essential oils or bitter substances, etc. Medicinal plants that are sold after drying, without making any changes in shops and perfumeries. And over the years, their benefits have been proven to be uncomplicated or uncomplicated. The purpose of this study is to investigate the ethnobotany of medicinal plants in one of the northwestern regions of Khuzestan province, Shush city. Using a questionnaire, information about perfumers and indigenous people on the use of medicinal plants was collected. And compiled in tables. The results showed that the Ocimum basilicum for weight loss, treatment of coughs and colds, Zizyphus vulgaris for the treatment of colds and chest pain, From sorrel to solve digestive problems, From Descurainia Sophia for bloating and digestive problems, From Borago officinalis L to calm the nerves, From Carum carvi L for stomach problems and from Zataria multiflora for treating bloating, stomach problems, reducing cough They have been used and consumed the most However, many uses of plants in the field of respiratory, gastrointestinal and neurological problems were observed. Active ingredients and chemical compounds of egg syrup with the local name of Badrouj as the most widely used medicinal plant in this region These include protein, iron, potassium and calcium, At the same time, people who have difficulty absorbing calcium, a mineral called boron in Ocimum basilicum causes calcium to transfer to the bones. This plant is used to treat digestive disorders such as stomach pain, bloating, constipation, indigestion and intestinal dysfunction. It seems that the type, number and variety of plant species vary according to the conditions and geographical location of each region. On the other hand, there is still no proper way to prepare and use medicinal plants. And this is the need to inform sellers and consumers.

Keywords: Ocimum basilicum, Zizyphus vulgaris, Borago officinalis L, common cold

تنوع و خواص درمانی گیاهان دارویی پر مصرف در شهرستان شوش

نظام آرمند[1]*؛ مینا مکی[1]

1 - گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه دانشگاه صنعتی خاتم الانبیا بهبهان.، بهبهان

Email: armandnezam@yahoo.com

چکیده

متابولیت های ثانویه ی گیاهان که ثمره ی بیوسنتز متابولیسم اولیه در آنها می باشند، نقش حیاتی در چرخه ی زندگی گیاه نداشته و تولید این ترکیبات، صرفا جهت تنظیم سازگاری گیاه با تنش های محیطی صورت می پذیرد. این مواد طبیعی سودمند که در سلول ها، غده ها و مجاری ترشحی اندام های متفاوت گیاه پراکنده می باشند، طیف گسترده ای از ترکیبات شیمیایی نظیر آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، اسانس ها و یا مواد تلخ و ... را شامل می شوند.گیاهان دارویی که پس از خشکاندن، بدون ایجاد هرگونه تغییری در مغازه‌ها و عطاری‌ها به فروش می‌رسد. و طی سالیان دراز فواید و بی عارضه یا کم عارضه بودن شان به اثبات رسیده است. هدف از این تحقیق، بررسی و پژوهش در مورد اتنوبوتانی گیاهان دارویی یکی از مناطق شمال غرب استان خوزستان، شهرستان شوش می باشد .با استفاده از پرسشنامه، اطلاعات عطاری و افراد بومی در زمینه استفاده از گیاهان دارویی جمع آوری گردید. و در جدول هایی تدوین شد. نتایج نشان داد که از تخم شربتی جهت لاغری، درمان سرفه و سرماخوردگی، عناب جهت درمان سرماخوردگی و سینه درد، از خاکشیر جهت رفع مشکلات گوارشی، از نعناع جهت نفخ و مشکلات گوارشی، از گل گاو زبان جهت آرامش اعصاب، از زیره سیاه جهت مشکلات معده و از آویشن جهت درمان نفخ، مشکلات معده، کم کردن سرفه بیشترین کاربرد و مصرف را داشته اند اگر چه موارد مصرف گیاهان زیادی در زمینه های رفع مشکلات تنفسی، گوارشی و عصبی مشاهده شد. مواد موثر و ترکیبات شیمیایی تخم شربتی با نام محلی بادروج به عنوان پرمصرفترین گیاه دارویی در این منطقه می توان به پروتئین، آهن، پتاسیم و کلسیم اشاره کرد، در عین حال افرادی که در جذب کلسیم مشکل دارند یک ماده معدنی به نام بورون در تخم شربتی باعث انتقال کلسیم به استخوان‌ها می‌شود. از این گیاه برای درمان ناراحتی‌های گوارشی مانند درد معده، نفخ، یبوست، سوءهاضمه و بی نظمی کارکرد روده‌ها استفاده می‌شود. به نظر می رسد نوع، تعداد و تنوع گونه‌های گیاهی بر اساس شرایط و موقعیت جغرافیایی هر منطقه متفاوت است. از طرفی هنوز شیوه صحیح تهیه و مصرف گیاهان دارویی وجود ندارد. و این نیاز به آگاهی دادن به فروشندگان و مصرف کنندگان می باشد.

واژگان کلیدی: تخم شربتی، عناب، گل گاو زبان، سرماخوردگی

Optimization of callus induction in triploid Paulownia 9503

Maryam Mazaheri-Tirani[1*]; Soleyman Dayani [2]

1-Department of Biology, Faculty of Science, University of Jiroft, Jiroft 78671-61167, Iran
2- Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University (IKIU), Qazvin, Iran,

**Corresponding Author: mazaheri@ujiroft.ac.ir*

Abstract

Paulownia 9503 is a triploid hybrid tree species (Paulownia fortunei× Paulownia kawakamii ×Paulownia elongate). It is an extremely fast growing, deciduous tree species with high adaptation to various ecological conditions (e.g. altitude, temperature, water and soil conditions) that have high economic potential. The leaves of the plant are suitable for animal feed. The precious plant's wood is very light-weighted, with highest strength to weight, and it is named the aluminum of timber. Paulownia is a suitable plant for afforestation and to produce timber and wood paste. Unfortunately, in Iran, this valuable plant has been introduced as an invasive species due to its small and winged seeds. However, root cutting propagation is still the main culture method for the species worldwide. Therefore, the application of tissue culture techniques could contribute to mass propagation and breeding programs to sterilize the seeds of the species. In this study, the effect of different concentrations of 2-4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and benzylaminopurine (BAP) on callus induction in triploid Paulownia 9503 was studied. The experiment was performed in factorial format based on a completely randomized design. Internode explants from Paulownia seedlings were disinfected and cultured on MS medium containing concentrations of 0, 1, 2, 3 and 4 mg / l of 2,4-D and concentrations of 0, 0.1, 0.25 and 0.5 mg / l of BAP with three replications and each replicate with three explants. The results showed that all Paulownia internode explants cultured on 2,4-D medium at concentration of 1 mg / l in all BAP levels, and also 3 mg / l 2,4-D with 0.1 mg / l BAP induced callus. The highest callus induction occurred in MS culture medium containing 1 mg / l 2,4-D with 0.5 mg / l BAP. However, MS medium containing 1 mg / l 2,4-D with 0.25 mg / l BAP induced both calli and differentiated roots. Other combinations of BAP and 2,4-D treatment showed no tissue differentiation. Therefore, MS medium containing 1 mg / l 2,4-D and 0.5 mg / l BAP is suitable for callus induction from internode explants of triploid Paulownia 9503.

Keywords: plant mass propagation, industrial tree, tissue culture, callus induction, MS medium

بهینه‌سازی القای کالوس درگیاه پائولونیا تریپلوئید ۹۵۰۳

مریم مظاهری تیرانی[۱*]؛ سلیمان دیانی[۲]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جیرفت، جیرفت
۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین

Email: mazaheri@ujiroft.ac.ir - mtmb_83@yahoo.com

چکیده

گیاه پائولونیا رقم ۹۵۰۳، درختی هیبرید تریپلوئید حاصل از تلاقی سه گونه از پائولونیا فورتونی، پائولونیا کاواکامی و پائولونیا الونگاتا است. درختی خزان‌دار با رشد فوق العاده سریع و سازگار با شرایط اکولوژیکی متنوع (از نظر ارتفاع از سطح دریا، دما، آب و خاک) و ارزش اقتصادی بسیار بالاست. برگ این گیاه مناسب تغذیه دام می‌باشد. چوب گرانقیمت این درخت بسیار سبک، مقاوم و خوشرنگ می باشد و به چوب آلومینیوم معروف است . پائولونیا گیاهی مناسب برای جنگل کاری و تولید الوار و خمیر چوب برای صنایع کاغذسازی است. علیرغم آنکه در ایران این گیاه ارزشمند به دلیل ریز و بالدار بودن بذرهای آن جزء گونه‌های مهاجم معرفی شده است، اما همچنان تکثیر انبوه آن با روش قلمه ریشه انجام می شود. بنابراین استفاده از تکنیک‌های کشت بافت می تواند به توسعه تولید انبوه، و به‌نژادی در جهت عقیم‌سازی بذرهای این گونه مورد توجه قرار گیرد. در این پژوهش اثر غلظت‌های مختلف ۲- ۴ دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) و بنزیل آمینوپورین (BAP) بر کالوس‌زائی پائولونیا هیبرید تریپلوئید مورد مطالعه قرار گرفت. آزمایش در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام شد. میانگره‌های نهال پائولونیا پس از ضد عفونی، بر روی محیط کشت MS حاوی غلظت‌های صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر از 2,4-D و غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از BAP با سه تکرار و هر تکرار حاوی سه ریزنمونه کشت گردید. نتایج نشان داد که تمام ریزنمونه‌های میانگره پائولونیا که روی محیط 2,4-D با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر در تمام سطوح BAP و همچنین۳ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP کشت شدند، سبب القا کالوس گردید. به طوری که بیشترین میزان القای کالوس در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP تعلق داشت. اما محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP افزون بر کالوس زایی، منجر به القا ریشه تمایز یافته نیز گردید. سایر سطوح تیماری هیچ تمایز بافتی را نشان ندادند. بنابراین محیط کشت MS حاوی۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP برای کالوس‌زائی ریزنمونه‌های میانگره پائولونیا هیبرید تریپلوئید مناسب می‌باشد.

واژگان کلیدی: تکثیر انبوه گیاهی، درخت صنعتی، کشت بافت، کالوس زایی، محیط کشت MS

The study of explant types and growth regulators effect on callus induction of Ajwain (Trachyspermum ammi L.) in MS culture medium

Maryam Mazaheri-Tirani [1*]; Soleyman Dayani [2]

1-Department of Biology, Faculty of Science, University of Jiroft, Jiroft 78671-61167, Iran

2- Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University (IKIU), Qazvin, Iran,

**Corresponding Author: mazaheri@ujiroft.ac.ir*

Abstract

Ajwain (Trachyspermum ammi L. or Carum capticum) belongs to Apiaceae family and is a medicinal plant. It is an annual plant species native to Iran, Egypt, India and Iraq. Ajwain plant has antimicrobial, antispasmodic, antifungal, antioxidant and anti-inflammatory properties. Specific secondary metabolites (Such as thymol) and oil content make this plant a valuable commercial plant. Therefore, new methods of extracting secondary metabolites based on tissue culture are important. In this study, Ajwain seeds were surface-sterilized with 70% ethyl alcohol for 60 s, then transferred in 2.5% (w/v) sodium hypochlorite solution for 15 min, and washed out with sterile deionized-water. The sterilized seeds were cultured to ½-strength MS media. The seeds were performed in a controlled greenhouse with an approximate range of 24–27°C temperature during 14 h light photoperiod and 18–20°C during 8 h darkness. The 45 days old seedlings were used as explant source. Then, the effect of explant type and growth regulators on callus induction is investigated. Experimental factorial in a completely randomized design with three factors including naphthalene acetic acid (NAA) with 0.5, 1, 1.5 and 2 mg / l, kinetin (Ki) with 0.1, 0.2, 5 0 and 1 mg / l, and three explant types (leaves, roots and stems) were applied in three replications. After one month, callus formation was assessed. The results showed that the interaction effect of NAA, Ki and explant type in MS culture medium on callus formation was significant at 5% level. The highest amount of callus was observed in MS medium containing 1 mg / l NAA and 1 mg / l Ki from all explant types, with a white color callus. All concentrations of 1 mg / l kinetin in MS culture medium caused 100% callus formation from leaf and stem explants, and the calli were brown and black. MS medium containing 1 mg / l NAA, 0.5 mg / l Ki, and 2.5 mg / l NAA, 0.5 mg / l Ki produced low quantity of calli from root and stem explants. Therefore, MS culture medium containing 1 mg / l naphthalene acetic acid and 1 mg / l kinetin is optimal for callus induction of ajwain plants.

Keywords: medicinal plant, tissue culture, callus induction, MS medium

مطالعه اثر نوع ریزنمونه و سطوح تنظیم کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی گیاه زنیان (Trachyspermum ammi L.) در محیط کشت MS

مریم مظاهری تیرانی[1*]؛ سلیمان دیانی[2]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جیرفت، جیرفت
۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین

Email: mazaheri@ujiroft.ac.ir-mtmb_83@yahoo.com

چکیده

گیاه دارویی زنیان (Trachyspermum ammi L. یا Carum capticum) متعلق به خانواده چتریان، گیاهی یکساله، بومی ایران، مصر ، هند و عراق است. زنیان دارای خواص ضدمیکروبی، ضد اسپاسم، ضد قارچ، آنتی اکسیدانی و ضد التهابی است. ارزش تجاری این گیاه به دلیل متابولیت‌های ثانویه خاص (نظیر تیمول) و روغن آن می‌باشد. ازاینرو، روش‌های نوین استخراج متابولیت‌های ثانویه بر پایه کشت بافت برای این گیاه مهم است. در این تحقیق ابتدا بذرهای گیاه زنیان به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰٪ قرار داده. در مرحله بعد با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه ضد عفونی شدند، در نهایت با آب دیونیزه استریل شستشو داده شدند. بذرهای استریل شده در ۱/۲ محیط MS کشت داده شدند. بذرها در یک گلخانه با محدوده دمایی تقریبی ۲۴ تا ۲۷ درجه سانتی‌گراد در طول دوره نوری ۱۴ ساعته و ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد در طول ۸ ساعت تاریکی قرار داده شده است.گیاهچه‌های ۴۵ روزه برای تهیه ریزنمونه استفاده شد. سپس اثر نوع ریزنمونه و تنظیم کننده رشد بر کالوس‌زایی گیاه بررسی شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه فاکتور نفتالین استیک اسید (NAA) با سطوح ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر، کینتین (Ki) با سطوح ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر و ریزنمونه برگ، ریشه و ساقه با سه تکرار اجرا شد. پس از یک ماه وضعیت کالوس زائی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اثر متقابل NAA، Ki و ریزنمونه در محیط کشت MS بر کالوس‌زائی در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. به طوری که بیشترین مقدار کالوس در ترکیب تیماری محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر Ki در تمام ریزنمونه‌ها مشاهده شد، و کالوس‌های این ترکیب هورمونی سفید بود. همچنین تمام غلظت‌های ۱ میلی‌گرم بر لیتر کینتین در محیط کشت MS سبب کالوس‌زائی صد در صد در ریزنمونه‌های برگ و ساقه شد و کالوس‌های تولید شده به رنگ قهوه‌ای و سیاه بودند. محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Ki و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Ki ریزنمونه‌های ریشه و ساقه کالوس کمی مشاهده شد. بنابراین محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید و ۱ میلی‌گرم بر لیتر کینتین برای کالوس زائی گیاه زنیان پیشنهاد می گردد.

واژگان کلیدی: گیاه دارویی، کشت بافت، تولید کالوس، محیط کشت MS

Study of growth regulators effect on callus induction in Indian jujube plants

1-Department of Biology, Faculty of Science, University of Jiroft, Jiroft 78671-61167, Iran

2- Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University (IKIU), Qazvin, Iran,

**Corresponding Author: mazaheri@ujiroft.ac.ir*

Abstract

Indian jujube (*Ziziphus mauritiana* Lam.) belongs to the genus Rhamnaceae. It is a perennial, fast-growing, fruit tree. The plant is rich in vitamin C, carotene, vitamin A and fatty acids. The Indian jujube is resistant to drought and salinity stress, which can be suitable for reverse desertification, and providing employment in arid and semi-arid regions. Because of the ecological and economic importance of the species, and the need for its cultivation in Iran, mass production through tissue culture techniques is important. This study was performed to propose a protocol for callus induction. First, the explants from Indian jujube seedlings were sterilized disinfection with 70% ethanol for 1 min and 2.5% sodium hypochlorite for 20 min and then were washed with sterile deionized water 6 to 7 times. The sterilized explants were cultured on MS medium containing 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) with concentrations of zero, 1, 2, 3 and 4 mg / l and kinetin (Ki) with concentrations of 0, 0.1, 0.25 and 0.5 mg / l, with three replications containing three explants in each replicate. The experiment was performed as a factorial in a completely randomized design. After two months of dark incubation, callus formation and callus color were examined. The results showed that explants in MS medium containing 1 mg / l 2,4-D and 0.5 mg / l Ki had the highest callus induction. Most internode explants grown on 2,4-D medium (except 4 mg / L) produced calli in the cutting region. But the calli produced were very small, brittle and cream-colored. At concentrations of 3 mg / l, callus color was black. Therefore, it seems that MS culture medium containing 2,4- dichlorophenoxy acetic acid and kinetin with the concentrations applied in this study is not suitable for callus formation of this species. However, it is possible to improve the condition of the calluses by adding other plant growth regulations.

Keywords: desert fruit tree, mass propagation, tissue culture, 2,4-D hormone

مطالعه اثر تنظیم کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی گیاه کنار هندی (*Ziziphus mauritiana* Lam.)

مریم مظاهری تیرانی[۱*]؛ سلیمان دیانی[۲]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جیرفت، جیرفت
۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی(ره)، قزوین

Email: mazaheri@ujiroft.ac.ir;mtmb_83@yahoo.com

چکیده

کنار هندی یا Indian jujube (Ziziphus mauritiana Lam.) متعلق به تیره Rhamnaceae درختی چند ساله، مثمر، سریع الرشد، سرشار از ویتامین C، دارای کاروتن، ویتامین A و اسیدهای چرب است. گیاه کنار هندی مقاوم به تنش خشکی و شوری است که می‌تواند برای بیابان‌زدایی و اشتغال‌زایی در مناطق خشک و نیمه خشک مناسب باشد. با توجه به اهمیت اکولوژیکی و اقتصادی و همچنین نیاز به گسترش کشت این گونه در ایران، تکثیر از طریق کشت بافت برای تولید و تکثیر تجاری آن می‌تواند حائز اهمیت باشد. این مطالعه به منظور تهیه پروتکلی برای القای کالوس کنار هندی صورت گرفت. در این تحقیق ابتدا ریزنمونه‌های میانگره‌های نهال کنار هندی پس از ضد عفونی با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه با آب دیونیزه استریل ۶ الی ۷ مرتبه شستشو داده شدند. سپس ریزنمونه‌های استریل شده بر روی محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف ۲ ، ۴ -دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) با غلظت‌های ۰، ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر و هورمون کینیتن (Ki) با غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر با سه تکرار و در هر تکرار حاوی سه ریزنمونه کشت گردید. آزمایش در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام شد. پس از دو ماه انکوباسیون تاریک کالوس‌زائی و رنگ کالوس مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. نتایج نشان داد که ریزنمونه‌های میانگره کنار هندی در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Ki بیشترین میزان القای کالوس را داشت. اکثر ریزنمونه‌های میانگره کنار هندی که روی محیط 2,4-D (به جزء ۴ میلی‌گرم بر لیتر) کشت شدند، در ناحیه بریدگی کالوس ایجاد شد. اما کالوس‌های ایجاد شده از ریزنمونه‌های میانگره کنار هندی خیلی کم، شکننده و کرم رنگ بودند. در غلظت‌ها ۳ میلی‌گرم در لیتر رنگ کالوس ایجاد شده سیاه بود. بنابراین به نظر می‌رسد محیط کشت MS حاوی هورمون‌های توفوردی و کینتین با غلظت‌ها مورد استفاده در این تحقیق برای کالوس‌زایی گیاه کنار هندی مناسب نمی‌باشد. با این وجود، ممکن است با اضافه نمودن سایر تنظیم کننده‌های رشد وضعیت کالوس‌ها را بهبود بخشید.

واژگان کلیدی: درخت مثمر بیابانی، تکثیر انبوه، کشت بافت، هورمون 2,4-D

Evaluation of quantity and quality of essential oil of Thymus kotschyanus in natural habitat and agronomic conditions

Farzane Bahadori[1*]; Fatemeh Rabizadeh[2]

1 - Forests and Rangelands Research Department, Semnan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Semnan, Iran

2- Farzanegan Campus, Semnan University, Semnan, Iran

*farbahadori@gmail.com

Abstract

An experiment was conducted to evaluate the quality and quantity of essential oil of *Thymus kotschyanus* in natural and agricultural ecosystems. For this purpose, the collected seeds from its habitat in Jashlobar were used to produce seedlings. The seedlings were transferred to a research farm in Shahmirzad in May of the following year and essential oil was evaluated on biennial plants located in the field. The natural ecosystem was considered in the Jashlobar located in the north of Shahmirzad, which was the main habitat of *Thymus kotschyanus* in Semnan province. Plants were harvested at 70% flowering stage for both ecosystems. Three replicates with 6 observations harvested from each ecosystem. After drying the samples in the shade, the essential oil was extracted by water distillation and using a Clevenger apparatus. In order to study the constituents of essential oils of plants harvested in different ecosystems, samples related to 3 replications of each treatment were mixed together for analysis by gas chromatography (GC-MS). Due to the fact that the error rate of the device in the analysis of essential oil is very small, the average of the constituents of the essential oil in each treatment was obtained. Data were analyzed in a completely randomized design with three replications using SPSS software version 19. The main constituents of essential oil (compounds more than 3%) included: thymol, carvacrol, linalool, p-Cymene, *a*-pinene and *a*-terpinene. The results showed that the highest essential oil with 1.23% was related to the agricultural ecosystem, which showed an increase of about 20% compared to the natural ecosystem with 1.03%. The highest components included thymol with 27.5, carvacrol with 15.4, linalool with 13.2 p-Cymene with 14.8, *a*-pinene with 15.9 and a- terpinene with 11.7% under natural ecosystem. The results of this study showed that the amount of essential oil in the agricultural ecosystem was higher than the natural ecosystem but the quality of essential oil of *Thymus kotschyanus* was higher in the natural ecosystem.

Keywords: Agricultural ecosystem, natural ecosystem, Thymol, Carvacrol, Linalool

ارزیابی کمیت و کیفیت اسانس آویشن کوهی (Thymus kotschyanus) در رویشگاه طبیعی و شرایط زراعی

فرزانه بهادری[1*]، فاطمه ربیع زاده[2]

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

۲- استادیار آموزشی، دانشکده فرزانگان، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
Email: farbahadori@gmail.com

چکیده

آزمایشی به منظور ارزیابی کمیت و کیفیت اسانس گیاهان آویشن کوهی (Thymus kotschyanus) در اکوسیستم زراعی و طبیعی در سال زراعی ۱۳۹۰-۱۳۸۹ در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان انجام شد. بدین منظور بذور جمع آوری شده آویشن کوهی از رویشگاه آن در جاشلوبار برای تولید نشا در گلخانه استفاده شد. نشاها در اردیبهشت سال بعد به مزرعه تحقیقاتی در بخش شهمیرزاد از شهرستان مهدیشهر منتقل شده و ارزیابی اسانس در سال دوم بر روی گیاهان دوساله آویشن کوهی مستقر شده در مزرعه انجام شد. کرت‌های آزمایشی در شرایط زراعی به ابعاد ۳ در ۴ متر بودند. گیاهان نیز با فاصله بین ردیف ۵۰ و روی ردیف ۳۰ سانتی‌متر کشت مستقر شدند. ده پلات هر کدام با ابعاد ۲ متر مربع و فاصله ۳ متر از یک دیگر در اکوسیستم طبیعی در ارتفاعات جاشلوبار واقع در شمال شهمیرزاد که رویشگاه اصلی آویشن کوهی استان سمنان بود در نظر گرفته شد. برداشت سرشاخه گلدار گیاهان در زمان ۷۰ درصد گلدهی برای هر دو اکوسیستم زراعی و طبیعی انجام شد. از هر اکوسیستم سه تکرار و در هر تکرار ۶ بوته برداشت شد. پس از خشک کردن نمونه‌ها در سایه، استخراج اسانس به روش تقطیر با آب و به وسیله دستگاه کلونجر صورت گرفت. درصد اسانس بر اساس وزن خشک سرشاخه گلدار در هر تیمار و تکرار محاسبه شد. به منظور بررسی اجزاء متشکله اسانس گیاهان برداشت شده در اکوسیستم‌های مختلف، نمونه‌های مربوط با دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC-MS) ارزیابی شدند. میانگین ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس در هر تیمار بدست آمد. داده‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار با نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ آنالیز شدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که دو اکوسیستم زراعی و طبیعی از لحاظ کمیت و کیفیت اسانس با یکدیگر اختلاف معنی‌دار آماری داشتند. ترکیبات عمده اسانس آویشن کوهی (ترکیبات بیش از ۳ درصد) شامل: تیمول، کارواکرول، لینالول، پاراسیمن، آلفا-پینن و آلفا-ترپینن بودند. نتایج نشان داد که بیشترین بازده اسانس با ۱/۲۳ درصد مربوط به اکوسیستم زراعی بود که حدود ۲۰ درصد نسبت به اکوسیستم طبیعی با بازده ۱/۰۳ افزایش نشان داد. بیشترین تیمول با ۲۷/۵، کارواکرول با ۱۵/۴، لینالول با ۱۳/۲، پاراسیمین با ۱۴/۸، آلفا- پینن با ۱۵/۹ و آلفا- ترپینن با ۱۱/۷ درصد در شرایط اکوسیستم طبیعی اندازه‌گیری شد. با توجه به افزایش چشمگیر و معنی‌دار درصد اسانس در اکوسیستم زراعی علی‌رغم کاهش درصد ترکیبات اسانس، عملکرد نهایی ترکیبات هدف مانند تیمول و کارواکرول ن در این اکوسیستم نسبت به اکوسیستم طبیعی افزایش نشان داد. بنابراین کشت آویشن کوهی در شرایط زراعی افزون بر حفظ رویشگاه طبیعی این گیاه، دارای مزیت اقتصادی نیز می‌باشد.

واژگان کلیدی: اکوسیستم زراعی، اکوسیستم طبیعی، تیمول، کارواکرول، لینالول

Investigation of phytochemical compounds of Arctium lappa extracts and their biological activities.

Parichehr Hanachi[1*]; Zahra Adibi[2]; Zahra Gharari[3];
1- Biotechnology Department, Biological Sciences Faculty, Alzahra university, Tehran, Iran
2- Biotechnology Department, Biological Sciences Faculty, Alzahra university, Tehran, Iran
3- Biotechnology Department, Biological Sciences Faculty, Alzahra university, Tehran, Iran
**Corresponding Author Email address: p.hanachi@alzahra.ac.ir*

Abstract

Introduction: *Arctium lappa* or Baba Adam extract has had many therapeutic uses for a long time. This advantage is probably due to the presence of antioxidants, phytochemicals and specific enzymes in the extract of this plant. With the high prevalence of cancer and antibiotic-resistant bacteria in Iran and the world, the need for drugs with fewer side effects and better therapeutic effects has been considered by researchers. Today, more than 60% of anti-cancer and antimicrobial compounds for the treatment of patients are obtained from plant sources, marine and microorganisms. The aim of this study was to investigate the phytochemical content of *Arctium lappa* and its biological antimicrobial effects.

Materials and Methods: In this study, leaves and flowers of *Arctium lappa* plant were collected, then Aquatic, acetone, ethanolic and methanolic extracts were prepared from the aerial parts including stem, leaves and flowers of *Arctium lappa* plant Using the maceration method and then Phytochemical content The of this extract was determined by using, Folin ciocalteau methods and aluminum chloride colorimetric method, And then determining the adsorption of these extracts at wavelengths of 415 nm and 765 nm. then the data were statistically analyzed to determine the relationship between the properties and different types of the extract.

Results: The results showed that ethanolic extracts of leaves and flowers with mean absorption of 0.48 and 0.32, respectively, at 415 nm wavelength and standard deviation of 0.035 and 0.038, respectively, have the highest flavonoid content, while Acetonic extracts of The leaves and flowers of *Arctium lappa* plant with absorption of 0.36 and 0.39 at 765 nm wavelength and standard deviation of 0.07 and 0.008, respectively, have the highest phenolic content. Analyzes showed that in both experiments, the solvent type had a significant effect on phenolic and flavonoid content (p value = 0.01) and Acetonic extracts had the highest phenolic content and ethanolic extracts had the highest flavonoid content. It can be said that extracts that have a high flavonoid content also have a relatively high phenolic content. Discussion and Results: Due to the fact that the flavonoid content have anti-inflammatory, anti-cancer and anti-mutation properties, Therefore the ethanolic extracts of the leaves and flowers of *Arctium lappa* plant probably have anti-inflammatory and anti-cancer properties.Also, due to the fact that phenolic compounds have strong anti-inflammatory and antimicrobial properties, it is possible that the Acetonic extracts of the flowers and leaves of *Arctium lappa* plant have strong antimicrobial properties.

Keywords: Antimicrobial, Anti-inflammatory, *Arctium lappa* plant, flavonoid, phenolic compounds, Phytochemical compounds

بررسی محتوی فیتوشیمیایی عصاره گیاه Arctium lappa و اثرات ضد میکروبی و بیولوژیک آن

پریچهر حناچی[1*]؛ زهرا ادیبی[2]؛ زهرا قراری[3]

۱- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا ، تهران، ایران
۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا ، تهران، ایران
۳- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا ، تهران، ایران

Email: p.hanachi@alzahra.ac.ir

چکیده

مقدمه: گیاه Arctium lappa یا بابا آدم از دیرباز کاربردهای درمانی فراوانی داشته است. این مزیت احتمالا به واسطه وجود آنتی اکسیدان ها و فیتوکمیکال ها و آنزیم هایی خاص در عصاره این گیاه هستند. با شیوع بسیار زیاد سرطان و باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک نیاز به داروهایی با عوارض جانبی کمتر و اثرات درمانی بهتر مورد توجه قرار گرفته است. به طوری که امروزه بیش از ۶۰ درصد ترکیبات ضد سرطانی و ضد میکروبی برای از منابع گیاهی به دست می آیند. هدف این مطالعه بررسی محتوی فیتوکمیکالی گیاه باباآدم و بررسی اثرات بیولوژیک آن است.

مواد و روش ها: در این مطالعه برگ و گل گیاه موردنظر جمع آوری شد و با کمک روش ماسراسیون عصاره های آبی، اتانولی، استونی و متانولی از بخش های هوایی (ساقه، برگ و گل) گیاه بابا آدم تهیه شد و سپس با استفاده از روش هایFolin-ciocalteau و روش رنگ سنجی آلومینیوم کلراید و سپس بررسی جذب این عصاره ها در طول موج های ۴۱۵ نانومتر و ۷۶۵ نانومتر ، محتوای فیتوکمیکالی این عصاره ها تعیین شد و سپس داده ها بررسی آماری شدند تا ارتباط بین خواص و انواع عصاره مشخص شود.

یافته: پژوهش ها نشان دادند که عصاره های اتانولی برگ و گل با میانگین جذب به ترتیب ۰.۴۸ و ۰.۳۲ در طول موج ۴۱۵ نانومتر و انحراف معیار به ترتیب ۰.۰۳۵ و ۰.۰۳۸ ، به طور معنی داری دارای بالاترین محتوی فلاونوئیدی هستند، درحالی که عصاره های استونی برگ و گل گیاه بابا آدم با جذب به ترتیب ۰.۳۶ و ۰.۳۹ در طول موج ۷۶۵ نانومتر و انحراف معیار به ترتیب ۰.۰۷ و ۰.۰۰۸ به طور معنی داری دارای بالا ترین محتوی فنلی هستند. آنالیز ها نشان داد که در هردو آزمایش نوع حلال به طرز چشم گیری در میزان محتوی فنلی و فلاونوئیدی تاثیرگذار است (p value= 0/01) و عصاره های استونی دارای بالاترین محتوی فنلی و عصاره های اتانولی دارای بالاترین محتوی فلاونوئیدی هستند.

بحث و نتایج: با توجه به اینکه محتوی فلاونوئیدی دارای خواص ضد التهابی و ضد سرطانی و ضد جهش می باشند پس احتمالا عصاره های اتانولی برگ و گل گیاه بابا آدم دارای خاصیت ضد التهابی و ضد سرطان هستند. همچنین با توجه به اینکه ترکیبات فنولی دارای خاصیت ضد التهابی و ضد میکروبی قوی می باشند پس احتمالا عصاره های استونی گل و برگ گیاه بابا آدم دارای خواص ضد میکروبی قوی می باشند.

کلیدواژه ها: ترکیبات فیتوشیمیایی، فلاونوئید، فنل، گیاه بابا آدم، ضد میکروب، ضد التهاب

Fatty Acids profile Prepared from two Species of the genus Scrophularia from Scrophulariaceae family in Iran

Zahra Azami[1], Kazem Mehdiqli[1] *, Farideh Attar[1]

Department of Plant Sciences, Faculty of Biology, Campus of Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

*kmahdigholi@ut.ac.ir**

Abstract

Species Scrophularia, is largest among Scrophulariaceae family. This genus is distributed with 60 species in different regions of Iran and And the Latin word Scrophula (scrofulaire disease) is derived from the plant Scrophularia nodosa used in ancient times to treat khonazir disease and the rhizomes and branches of this plant contain glucosides, scrofularine, resins, saponins, pectins and organic acids that are used to treat swollen glands, infectious wounds, earaches, hemorrhoids and wounds that heal slowly. The fatty acid profiles of Scrophularia frigida species and three populations of Scrophularia variegata species were studied by GC-MS method, and 4 types of fatty acids including Linoleic acid, Oleic acid, Stearic acid and Palmitic acid were identified. Species Frigida are collected from two regions farahzad Valley and Chalous Road then samples from region Variegata located in the heights of Central Alborz were collected and identification and kept in the central herbarium of the University of Tehran. The highest amount of fatty acids of linoleic acid (72.45) in the population Imamzadeh Davood belongs to the species Variegata and the lowest amount of fatty acids stearic acid (١،٤٠) in the population Chalous Road (kandevan) or species Frigida.The highest and lowest palmitic acid amount are observed in the population Chalous Road (kandevan) and Imamzadeh Davood respectively. The presence of the highest amount of essential fatty acids linoleic acid and oleic acid indicates the medicinal and nutritional importance of the seeds of this plant for future.

Keywords: GC-MS ،Linoleic acid ،Stearic acid ،*Variegata* ،*Frigida*

پروفایل اسیدهای چرب دو گونه از جنس Scrophularia از خانواده گل میمونیان در ایران

زهرااعظمی، کاظم مهدیقلی*، فریده عطار

۱- گروه علوم‌گیاهی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس‌علوم، دانشگاه‌تهران، تهران، ایران

۲- گروه علوم‌گیاهی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس‌علوم، دانشگاه‌تهران، تهران، ایران

kmahdigholi@ut.ac.ir

چکیده

جنس .Scrophularia L بزرگترین جنس از خانواده گل میمونیان است. این جنس با 60 گونه در مناطق مختلف ایران پراکنش دارد و از واژه لاتینی Scrophula (بیماری خنازیر) گرفته شده است، گویا از گیاه Scrophularia nodosa در قدیم برای معالجه بیماری خنازیر استفاده شده‌است وریزوم‌ها و سرشاخه‌های این گیاه حاوی نوعی گلوکوزید، اسکروفولارین، رزین، ساپونین‌ها، پکتین ها و اسیدهای آلی هستند برای مداوای غدد متورم، زخم‌های عفونی، گوش درد، بواسیر و زخم‌هایی که دیر التیام می‌یابند استفاده می‌شوند.این گیاه عسل دهنده‌ی بسیار خوبی نیز می‌باشد. پروفایل اسیدهای چرب در گونهScrophularia Variegata و سه جمعیت از گونه Scrophularia Frigida به روش GC-MS مورد مطالعه قرار گرفت و ۴ نوع از اسیدهای چرب شامل Linoleic acid ، Oleic acid ، Stearic acid و Palmitic acid مورد شناسایی قرار گرفتند .گونه Frigida از دو منطقه دره فرحزاد و جاده چالوس و نمونه *Variegata* از منطقه دره فرحزاد واقع در ارتفاعات البرز مرکزی جمع آوری و پس از شناسایی در هرباریوم مرکزی دانشگاه تهران نگهداری می شوند.بیشترین مقدار اسید های چرب از نوع اسید لینولئیک (72.45) در جمعیت امامزاده داوود متعلق به گونه Variegata و کمترین مقدار از اسیدهای چرب را اسید استئاریک (1.40) در جمعیت جاده چالوس(پیچ کندوان) یا گونه Frigida مشاهده میشود. بیشترین مقدار و کمترین اسید پالمتیک به ترتیب در جمعیت جاده چالوس(پیچ کندوان) و امامزاده داوود مشاهده می شود.وجود بیشترین مقدار از اسید چرب ضروری لینولئیک اسید و اولئیک اسید بیان کننده اهمیت دارویی و غذایی بذر های این گیاه در آینده می باشد.

واژگان کلیدی:GC-MS، اسید لینولئیک، اسید استئاریک، Variegata، Frigida

Multi-walled carbon nanotubes: a useful tool to improve the production of polyphenolic compounds in Melissa officinalis L.

Sorayya Ebrahimi[1], Parvaneh Abrishamchi[2*], Tayebeh Radjabian[3], Azra Saboora[4]

[1] Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad.

[2] Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad.

[3] Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran.

[3] Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran.

[*]*Corresponding author email: abrisham@um.ac.ir*

Abstract

Lemon balm (Melissa officinalis L.) is an aromatic herbaceous plant of the Lamiaceae, containing many medicinal properties, which are attributed to the presence of polyphenolic compounds in this species. Phenolic compounds are bioactive secondary metabolites that play a key role in plant growth and developmental processes and adaptation to stressful environmental conditions. These compounds have many applications in medicine, and in the pharmaceutical, food, health and cosmetics industries. Treatment of plants with biotic and abiotic elicitors, induces the production and accumulation of various phenolic compounds. In this study, the effects of foliar application of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) on the total content of phenols, phenolic acids and flavonoids as well as the amount of some polyphenolic compounds including rosmarinic acid, salvanolic acid B, apigenin and kaempferol in lemon balm shoots were evaluated. The sterilized seeds were planted in pots, containing soil and sand in a ratio of 1:1 (w/w), at 23±2 °C and 16/8 h (light/dark) photoperiod (600 µmol $m^{-2}s^{-1}$ photons provided by cool white fluorescent lamps) in a culture room. At the 16-leaf stage, the aerial parts of plants were sprayed with different concentrations (50, 100 and 250 mg/l) of MWCNT, and plants were harvested 2 and 3 weeks after the treatment. Extraction of shoot samples was performed by ultrasonic method with 80% methanol. Total contents of phenols, phenolic acids and flavonoids were measured by spectrophotometry, and the amounts of rosmarinic acid, salvianolic acid B, apigenin and kaempferol were determined by HPLC technique. Based on the results, the amounts of all studied compounds were significantly increased ($P \leq 0.05$) by 50 and 100 mg/l MWCNT after 2 and 3 weeks. The highest amounts of rosmarinic acid (4.86±0.28 mg/g DW) and salvianolic acid B (1.95±0.15 mg/g DW) were observed 3 weeks after treatment with 100 mg/l MWCNT (2.09 and 1.68 times higher than the control, respectively). The maximum amounts of apigenin (695.47±23.38 µg/g DW) and kaempferol (451.45±21.42 µg/g DW) were also obtained in the same treatment (2.82 and 1.93 times of the control, respectively). The concentration of 250 mg/l, is toxic and by increasing the production of free radicals causes structural damage to cells and organs and reduces the growth and accumulation of secondary metabolites. According to the present study, application of MWCNT can increase the production of polyphenolic compounds and improve the

biological and medicinal properties of lemon balm, and it is recommended to use in the basic and applied researches.

Keywords: Elicitor, Flavonoid, HPLC, Lemon balm, Phenolic acid

نانولوله‌های کربنی چندجداره: ابزاری مفید برای بهبود تولید ترکیبات پلی‌فنلی در گیاه بادرنجبویه

ثریا ابراهیمی[۱]، پروانه ابریشم‌چی[۲*]، طیبه رجبیان[۳]، عذرا صبورا[۴]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
۲. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
۳. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران
۴. گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران

ایمیل نویسنده مسئول: abrisham@um.ac.ir

چکیده

بادرنجبویه (Melissa officinalis L.) گیاهی علفی از تیره نعناعیان (Lamiaceae)، و واجد خواص دارویی فراوانی است که بسیاری از آن‌ها، به حضور ترکیبات پلی‌فنلی در این گونه نسبت داده می‌شوند. ترکیبات فنلی متابولیت‌های ثانویه زیست‌فعالی هستند که نقش کلیدی در فرآیندهای رشد و نموی و سازگاری گیاهان با شرایط تنش‌زای محیطی ایفا می‌کنند. این ترکیبات کاربردهای متعددی در صنعت دارو و درمان و صنایع غذایی، بهداشتی و آرایشی دارند. تیمار گیاهان با الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی، منجر به تحریک تولید و انباشت ترکیبات فنلی در بافت‌های مختلف می‌شود. در این مطالعه، تأثیر محلول‌پاشی با غلظت‌های مختلف (۵۰ ، ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر) نانولوله‌های کربنی چند جداره (MWCNT) بر محتوای فنل، اسیدفنلی و فلاونوئید تام و همچنین مقدار برخی ترکیبات پلی‌فنلی شامل رزمارینیک اسید، سالویانولیک اسید B، آپیژنین و کامفرول در بخش هوایی گیاه بادرنجبویه مورد ارزیابی قرار گرفت. بذرهای سترون، در گلدان‌های حاوی خاک و ماسه به نسبت (w/w) ۱:۱، در شرایط فیتوترون (دمای ۲۳±۲ °C، شدت نور ۶۰۰ µmol m^{-2} s^{-1}، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی)، کشت داده شدند. در مرحله ۱۶ برگی، بخش هوایی گیاهان با غلظت‌های مختلف MWCNT اسپری شد. برداشت گیاهان ۲ و ۳ هفته پس از تیمار انجام شد. عصاره‌گیری از بخش هوایی با متانول ۸۰ درصد و به روش فراصوت صورت گرفت. محتوای کل ترکیبات فنلی، اسیدهای فنلی و فلاونوئیدها به روش اسپکتروفتومتری و مقدار رزمارینیک‌اسید، سالویانولیک‌اسیدB، آپیژنین و کامفرول، با تکنیک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تعیین شد. بر اساس نتایج، مقدار تمام ترکیبات مورد بررسی، ۲ و ۳ هفته پس از تیمار با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر MWCNT، به طرز معنی‌داری ($P\leq0.05$) افزایش یافت. بیشترین مقدار رزمارینیک اسید (4.86±0.28 mg/g DW) و سالویانولیک اسید B (1.95±0.15 mg/g DW)، ۳ هفته پس از تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر MWCNT مشاهده شد (به‌ترتیب ۲/۰۹ و ۱/۶۸ برابر شاهد). حداکثر مقدار آپیژنین (695.47±23.38 µg/g DW) و کامفرول (451.45±21.42 µg/g DW) نیز، در تیمار فوق به‌دست آمد (به ترتیب ۲/۸۲ و ۱/۹۳ برابر شاهد). غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر

از نانولوله، برای گیاه بادرنجبویه سمی بوده و با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد باعث آسیب ساختاری در سلول‌ها و اندامک‌ها و کاهش رشد و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شود. بر اساس پژوهش حاضر، استفاده از MWCNT، راهکاری مناسب برای افزایش تولید ترکیبات پلی‌فنلی، به‌ویژه رزمارینیک اسید، در گیاه بادرنجبویه است که می‌تواند به بهبود خواص زیستی و دارویی آن کمک کند و به‌کارگیری آن در مطالعات علمی/کاربردی توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: اسیدهای فنلی، الیسیتور، فلاونوئید، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، Melissa officinalis L.

Study of Rootstock and Apple Cultivar Interaction on some biochemical Characteristics of Fruit under Mashhad Climatic Conditions

Elaheh Hosseini Sanavi[1]; Bahram Abedy[1*]; Tahereh Parvaneh[2]

1- Department of Horticulture and Green Space Engineering, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2- Instructor, Horticulture Crops Research Department, Agricultural and Natural Resources Research Center of Semnan Province (Shahrood)

Email: abedy@um.ac.ir

Abstract

Numerous studies have been performed on the effect of rootstock and cultivar on biochemical traits of apple fruit and the results have shown different effects of these two factors and due to the role of rootstock and cultivar on phenolic compounds, the need to identify the best rootstock and cultivar in terms of nutritional value, especially phenolic compounds based on geographical conditions seems necessary. In order to study three vegetative rootstocks on some qualitative characteristics of apple cultivars "Golden Delicious" and "Red Delicious", an experiment in factorial design based on randomized complete blocks with four replications in orchard of Mashhad Agricultural Research Center was performed in 2021. The Fruit were harvested at full maturity and to measure traits transferred to the Horticulture laboratory of the Ferdowsi university of Mashhad. Fruit qualitative characteristics: firmness, total soluble solids, phenol content, antioxidant properties and anthocyanin was measured. Results showed that in the interaction of rootstock and scion had a significant effect on the phenol content and anthocyanin. The highest amount of total phenol (652.9 $\mu g.g^{-1}FW$) and anthocyanin (35.9 $mg.g^{-1}FW$) was measured in "Red delicious" on M9 rootstock. The simple effect of the rootstock on traits such as firmness, antioxidant properties and phenol content and simple effect of cultivar on traits such as total soluble solids and antioxidant properties of the tested fruits was significant. The highest amount of total soluble solids was measured in "Red delicious" (15.58 B). The highest amount of antioxidant properties (23.01%) at "Red delicious" was measured. The highest amount of fruit firmness (5/64 $kgcm^{-3}$) and antioxidant properties (20.14%) in M9 rootstock was observed. The two M9 and MM106 rootstock have the highest total phenol content respectively 632.4 and 609.1 $\mu g.g^{-1}FW$. Accumulation of phenol compounds in apples depends on the rootstock genotype and among different apple rootstocks, the highest accumulation is related to dwarf rootstocks. One of the reasons that phenol content is higher in dwarf apple rootstocks is because the phenyl Propanoid pathway is more inclined towards the synthesis of flavonoids. The fruits on the M9 rootstock had more firmness compared to the other two rootstock. M9 rootstock by the biochemical Characteristics such anthocyanin, total phenol and antioxidant properties is better than two other

rootstocks. "Golden Delicious" cultivars, it was superior to "Red Delicious" rejection in terms of total soluble solids. Therefore, the proper choice of rootstock and cultivar should be based on the type of need and no just on the superiority of an attribute and depending on the purpose of gardener, different grafting compounds can be recommended. Cultivars on M9 rootstock with highest amount of total phenol and anthocyanin was suggested as a valuable grafting compounds in terms of health benefits under Mashhad climatic conditions.

Keywords: anthocyanin, antioxidant properties, firmness, total soluble solids, qualitative characteristics

بررسی برهمکنش پایه و رقم سیب بر برخی صفات بیوشیمیایی میوه در شرایط آب و هوایی مشهد

الهه حسینی ثانوی[۱]؛ بهرام عابدی[۱*]؛ طاهره پروانه[۲]

۱- گروه مهندسی و علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

۲- گروه تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان، شاهرود

Email: abedy@um.ac.ir

چکیده

مطالعات زیادی در مورد تأثیر پایه و رقم بر صفات بیوشیمیایی سیب صورت گرفته و نتایج تأثیرگذاری متفاوت این دو عامل را نشان داده‌اند و به دلیل نقش پایه و رقم بر ترکیبات فنلی، لزوم شناسایی بهترین ترکیب پایه و رقم از لحاظ ارزش غذایی مخصوصا ترکیبات فنلی بر اساس شرایط جغرافیایی ضروری به نظر می‌رسد. به منظور ارزیابی اثر سه پایه رویشی M7، M9 و MM106 بر برخی صفات کیفی میوه سیب ارقام گلدن‌دلیشز و رددلیشز، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در مرکز تحقیقات کشاورزی مشهد در اواخر تابستان ۱۴۰۰ اجرا شد. میوه‌ها در زمان رسیدگی کامل برداشت و جهت اندازه‌گیری صفات بلافاصله به آزمایشگاه گروه علوم باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد انتقال یافتند. صفات کیفی میوه شامل سفتی، مواد جامد محلول، محتوای فنلی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتوسیانین اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد برهمکنش پایه و رقم بر میزان فنل کل و آنتوسیانین تاثیر معنی‌داری داشت. بر اساس نتایج بیشترین مقدار فنل کل (۶۵۲/۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و آنتوسیانین (۳۵/۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در ترکیب رقم رددلیشز روی پایه M9 مشاهده شد. اثر ساده پایه بر صفاتی مانند سفتی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنل کل و اثر ساده رقم بر مواد جامد محلول و فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه‌های مورد آزمایش معنی‌دار بود. در میان ارقام بیشترین مقدار مواد جامد محلول در رقم گلدن‌دلیشز (۱۵/۵۸ درجه بریکس) مشاهده شد. رقم رددلیشز با میانگین ۲۳٪/۰۱ بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را به خود اختصاص داد. در بین پایه‌ها بیشترین سفتی (۵/۶۴ کیلوگرم بر سانتی‌متر مکعب) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۲۰/۱۴٪) در پایه M9 مشاهده شد. دو پایه M9 و MM106 به ترتیب با میانگین ۶۳۲/۴ و ۶۰۹/۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بیشترین میزان فنل کل را به خود اختصاص دادند. تجمع ترکیبات فنلی در سیب به ژنوتیپ پایه بستگی دارد و در بین پایه‌های مختلف سیب، بیشترین تجمع فنل مربوط به پایه‌های پاکوتاه می‌باشد و یکی از دلایل بالاتر بودن محتوای فنلی در پایه‌های پاکوتاه به دلیل این است که مسیر فنیل پروپانوئید گرایش بیشتری به سمت سنتز فلاونوئیدها دارد. میوه‌های روی پایه M9 در مقایسه با دو پایه دیگر از سفتی بیشتری برخوردار بودند. از نظر صفات بیوشیمیایی مانند آنتوسیانین، فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پایه M9 در جایگاه بالاتری قرار گرفت. در بین ارقام گلدن‌دلیشز از نظر مواد جامد محلول نسبت به رددلیشز برتری داشت. بنابراین انتخاب مناسب پایه و رقم بایستی بر اساس نوع نیاز و نه صرفا بر اساس بالاتربودن یک صفت، صورت گیرد و بسته به هدف باغدار می‌توان ترکیبات پیوندی گوناگونی را توصیه نمود. ارقام بر روی پایه M9 با داشتن ترکیبات فنلی و آنتوسیانین زیاد از نظر فواید سلامتی به عنوان ترکیب پیوندی ارزشمند در شرایط آب و هوایی مشهد پیشنهاد گردید.

واژگان کلیدی: آنتوسیانین، سفتی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، صفات کیفی، مواد جامد محلول

Identification of chemical compounds of *Rosa pulverulenta* M.Bieb. (Rosaceae) in Iran

Sareh Seyedipour[1*] and Kazem Mahdigholi[2]

1- Department of Plant Science, School of Biology, College of Science, University of Tehran, P.O. Box 14155-6455, Tehran, Iran
2- Department of Plant Science, School of Biology, College of Science, University of Tehran, P.O. Box 14155-6455, Tehran, Iran

*s.seyedipour@ut.ac.ir

Abstract

The genus *Rosa* L. is one of the most important members of the family Rosaceae. Species of the genus *Rosa* have always been known for their beauty, healing properties and nutritional value. Flowers and fruits of different *Rosa* species are very important in the food and pharmaceutical industries due to their variety of flavonoids, vitamins as well as antioxidant characteristics. *Rosa pulverulenta* is one of the wild rose species distributed in the north, northwest and center of Iran. The aim of this study was to identify the chemical compounds present in different organs of *Rosa pulverulenta* and compare them between different organs to identify the main components of each organ and evaluate their importance in terms of nutrition and medicine. For this purpose, samples were collected in two stages of vegetative (leaf) and reproductive (petals, seeds and hypantium) in spring and summer. All chemical compounds were recovered by the rotary evaporator and further analysed by Gas chromatography–Mass spectrometry (GC-MS) analysis. The phytochemical analysis showed that the extract of leaves contained 40 identified chemical components, representing 95.83% of the total compounds. The major contents reported in leaves were Stearic acid, 2-hydroxyethyl ester palmitate (Area%=11.68 ،RT=39.882), Methyl oleate (Area%=10.68 ، RT=28.524) and Squalene (Area%=7.08 ،RT=38.004). petal extracts contain 47 compounds (98.63%), seed extracts contain 37 compounds (95.10%) and 19 compounds reported for hypanthium (96.58%). In seed sample, Linoleic acid, methyl ester (Area%=23.10 ،RT=28.368) and Oleic acid, methyl ester (Area%=27.11 ،RT=28.498), In hypanthium sample, Bis(2-ethylhexyl) phthalate (Area%=14.00 ،RT=34.366) and Prehnitol (Area%=11.86 ،RT=9.684) were characterized as the main compounds. Among the reported phytochemical compounds, Eicosane was present in all organs and Squalene was observed in leaves, petals and seeds. Squalene is a natural lipid belonging to the terpenoid family and a precursor of cholesterol biosynthesis. squalene is extensively used as an excipient in pharmaceutical formulations for disease management and therapy. Since this triterpene is well absorbed orally, it has been used to improve the oral delivery of therapeutic molecules. squalene acts as a protective agent and has been shown to decrease chemotherapy induced side effects. Although it is a weak inhibitor of tumor cell

proliferation, it contributes either directly or indirectly to the treatment of cancer due to its potentiation effect.

Keywords: Rosa, extract, GC-MS, Rosaceae, phytochemistry

شناسایی ترکیبات شیمیایی اندام‌های مختلف گونه *Rosa pulverulenta* M.Bieb. از گلسرخیان در ایران

ساره سیدی پور[1]* و کاظم مهدیقلی[2]

1 - دانشجوی دکتری گروه علوم گیاهی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تهران، تهران

2 - استادیار گروه علوم گیاهی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تهران، تهران

Email: s.seyedipour@ut.ac.ir

چکیده

سرده گل‌سرخ از مهمترین اعضای تیره Rosaceae به‌شمار می‌رود. گونه‌های مختلف این سرده از ارزشمندترین سرده‌های دارویی موجود در تیره گل‌سرخ هستند که به دلیل زیبایی, خواص درمانی و ارزش غذایی آنها از قدیم شناخته شده هستند. گل‌ها و میوه های گونه‌های مختلف *Rosa* به دلیل داشتن انواع فلاونوئیدها، ویتامین‌ها و همچنین خصوصیات آنتی‌اکسیدانی اهمیت زیادی در صنایع غذایی و دارویی دارند. *Rosa pulverulenta* از گونه‌های رز وحشی در ایران است. پراکندگی این گونه در شمال، شمال غرب و مرکز ایران است. این مطالعه با هدف شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در اندام‌های مختلف گونه *Rosa pulverulenta* و مقایسه آن ها بین اندام‌های مختلف جهت شناسایی ترکیبات اصلی هر اندام و ارزیابی اهمیت آنها از نظر دارویی و تغذیه‌ای صورت گرفت. برای این منظور جمع آوری نمونه‌ها در دو مرحله از چهاراندام رویشی (برگ) و زایشی (گلبرگ، بذر و هیپانتیوم) در فصل‌های بهار و تابستان انجام شد. عصاره گیری از نمونه‌ها به روش روتاری انجام شد و ترکیبات شیمیایی آن‌ها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی طیف سنجی جرمی (GC-MS) شناسایی شدند. در مجموع تعداد ۴۰ ترکیب شیمیایی برای اندام برگ (۹۵.۸۳٪)، ۴۷ ترکیب برای گلبرگ (۹۸.۶۳٪)، ۳۷ ترکیب برای بذر (۹۵.۱۰٪) و ۱۹ ترکیب برای هیپانتیوم (۹۶.۵۸٪) شناسایی و گزارش شد. مهمترین ترکیبات اصلی گزارش شده در برگ Stearic acid, 2-hydroxyethyl ester palmitate (RT=39.882 ،Area%=11.68) ، Methyl oleate (RT=28.524 ،Area%=10.68) و Squalene (RT=38.004 ،Area%=7.08)، در گلبرگ-.gamma Sitosterol(RT=43.742 ،Area%=12.25)، Heptadecane, 9-octyl- (RT=36.717 ،Area%=10.62) و Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)- (RT=18.261 ،Area%=7.21) ، در بذر Linoleic acid, methyl ester (Area%=23.10، RT=28.368) و Oleic acid, methyl ester (RT=28.498 ،Area%=27.11) و در هیپانتیوم Bis(2-ethylhexyl) phthalate (Area%=14.00، RT=34.366) و Prehnitol (RT=9.684 ،Area%=11.86) است. از بین ترکیبات فیتوشیمیایی گزارش شده ترکیب Eicosane در بین همه اندام‌ها به طور مشترک حضور داشت و Squalene در هر سه اندام برگ، گلبرگ و بذر مشاهده شد. Squalene یک لیپید طبیعی متعلق به خانواده ترپنوئیدها و پیش‌ساز بیوسنتز کلسترول است. این ترکیب به طور گسترده به‌عنوان یک ماده کمکی در فرمولاسیون‌های دارویی برای مدیریت و درمان بیماری استفاده می‌شود. با توجه به اینکه این تری‌ترپن از طریق خوراکی به‌خوبی جذب می‌شود، برای بهبود انتقال مولکول‌های درمانی خوراکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. Squalene به‌عنوان یک عامل محافظ عمل می‌کند و عوارض جانبی ناشی از شیمی‌درمانی را کاهش می‌دهد. همچنین یک مهارکننده ضعیف تکثیر سلول‌های تومور است اما به دلیل اثر تقویتی خود به طور مستقیم یا غیرمستقیم در درمان سرطان نقش دارد.

واژگان کلیدی: گل‌سرخ، عصاره، GC-MS، Rosaceae، فیتوشیمی

Investigation of changes in the amount of essential oil during flowering of sage under well-watered and drought stress conditions

Ramez Esmaeili[1], Mehdi Joudi[1*], Leila Ghaffarzade Namazi[1], Noraddin Hoseinpour Azad[1]

Meshgin-Shahr Faculty of Agriculture-University of Mohaghegh Ardabili

Email: mehdijoudi@gmail.ccom

Abstract

Drought stress is one of the most important factors limiting the growth and yield of plants. In order to investigate the changes in the amount of essential oil during flowering of sage, an experiment was conducted in the research farm of Meshginshahr Faculty of Agriculture-University of Mohaghegh Ardabili under well-watered and drought stress conditions during 1398-1399. In the first year, sage seedlings were planted in two separate plots (well-watered and drought stress) with three replications and all necessary care was taken. The plants had vegetative growth in the first year and entered the reproductive phase (flowering) in the second year when their cold needs (vernalization) were met. Flowering of plants continued about two weeks and drought stress was applied in this developmental stage. Well-watered plants were irrigated in early, mid and late flowering, while droughted plants were irrigated only in late flowering. During irrigation of droughted plants, symptoms of stress including wilting and drooping leaves were observed in plants. To measure the amount of essential oil, plant branches (including the upper part of the flowering stem, leaves and flowers on it) were sampled at early, mid and late flowering and transferred to the laboratory. After drying in the shade, the essential oil of the samples was extracted by Clevenger apparatus. The results showed that under water conditions, the highest amount of essential oil was observed at the beginning of flowering. However, with the completion of flowering, the amount of essential oils was reduced and the lowest amount of it was obtained at the end of flowering. Under well-watered conditions, the amount of essential oil decreased by 25% from early to late flowering. Under drought stress conditions, the amount of essential oil was the same at the beginning and middle of flowering and was at its peak. But, from the middle to the end of flowering, the amount of essential oil in stressed plants dropped sharply and reached its lowest level. When water conditions and drought stress was compared, it was found that the amount of essential oil at the beginning of flowering was the same under both conditions. At mid-flowering, the amount of essential oil in stressed plants was about 13% higher than well-watered plants. But at the end of flowering and with the continuation of drought stress, the amount of essential oil in stressed plants became less than well-water plants.

Keywords: Drought, reproductive stage, sage, secondary metabolite

بررسی روند تغییرات مقدار اسانس در طی گلدهی گیاه مریم گلی در شرایط آبی و تنش خشکی

رامز اسماعیلی[۱]، مهدی جودی[۱*]، لیلی غفار زاده نمازی[۱]، نورالدین حسین‌پور آزاد[۱]

۱- گروه علوم گیاهی و گیاهان داروئی-دانشکده کشاورزی مشگین شهر-دانشگاه محقق اردبیلی

Email: mehdijoudi@gmail.com

چکیده

تنش خشکی از مهمترین عوامل محدود کننده رشد و تولید عملکرد در گیاهان می باشد. به منظور بررسی روند تغییرات مقدار اسانس در طی گلدهی گیاه مریم گلی، آزمایشی در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی مشگین شهر- دانشگاه محقق اردبیلی تحت شرایط آبی و تنش خشکی در طی سالهای زراعی ۱۳۹۸-۱۳۹۹انجام شد. در سال اول آزمایش، نشاءهای مریم گلی در دو کرت مجزا (کرت آبی و کرت تنش خشکی) و با سه تکرار کاشته و کلیه مراقبتهای لازم انجام شد. گیاهان مریم گلی در سال اول، رشد رویشی داشته و با برطرف شدن نیاز سرمایی آنها (بهاره شدن)، در سال دوم وارد فاز زایشی (گلدهی) شدند. گلدهی گیاهان حدود دو هفته طول کشیده و تنش خشکی در این مرحله نموی اعمال گردید. گیاهان آبی در اوایل، اواسط و اواخر گلدهی آبیاری شده، در حالیکه گیاهان تنش تنها در اواخر گلدهی آبیاری شدند. در زمان آبیاری گیاهان تنش، علائم تنش شامل پژمردگی و افتادگی برگها در گیاهان مشاهده شد. جهت اندازه گیری مقدار اسانس، سرشاخه‌های گیاهان (شامل قسمت بالای ساقه گل‌دهنده، برگها و گلهای روی آن) در اوایل، اواسط و اواخر گلدهی نمونه گیری شده و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. نمونه ها پس از خشک شدن در سایه، توسط دستگاه کلونجر اسانس‌گیری شدند. نتایج آزمایش نشان داد تحت شرایط آبی، بیشترین مقدار اسانس در اوایل گلدهی مشاهده شد. اما با تکمیل گلدهی، از مقدار اسانس گیاهان آبی کاسته شده و کمترین مقدار اسانس در اواخر گلدهی بدست‌آمد. تحت این شرایط (آبی)، مقدار اسانس از اوایل تا اواخر گلدهی، ۲۵ درصد کاهش یافت. در شرایط تنش خشکی، مقدار اسانس در اوایل و اواسط گلدهی یکسان و در بیشترین مقدار خود قرار داشت. اما از اواسط تا اواخر گلدهی، مقدار اسانس در گیاهان تنش دیده به شدت افت کرده و به کمترین مقدار خود رسید. زمانی که شرایط آبی و تنش خشکی با یکدیگر قیاس شدند، مشخص گردید که مقدار اسانس در اوایل گلدهی تحت هر دو شرایط یکسان بود. در اواسط گلدهی، مقدار اسانس در گیاهان تنش دیده حدود ۱۳ درصد بیشتر از گیاهان آبی بود. اما در اواخر گلدهی و با تداوم تنش خشکی، مقدار اسانس در گیاهان تنش دیده کمتر از گیاهان آبی شد.

واژگان کلیدی: خشکی، متابولیت‌ثانویه ، مرحله زایشی، مریم گلی

Effect of probiotic bacteria and arbuscular mycorrhizae and their combinations on Rhizoctonia root rot disease and the growth of common bean

Nahid Moarrefzadeh[1*], Hadi Khateri[1], Rouhallah Sharifi[1]
Department of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran.

** Email: n.moarrefzadeh@razi.ac.ir*

Abstract

Common bean (Phaseolus vulgaris) is one of the most important sources of protein for human. Rhizoctonia solani, the causal agent of root rot, is one of the most important soil-borne fungal pathogens in most bean growing areas around the world and plays an important role in reducing its yield. Biocontrol is one of the best environmentally friendly options for the integrated management of plant diseases. In this study, the effects of separate and combined application of four probiotic bacteria including Bacillus subtilis BS (Bs), Alcaligenes faecalis 1624 (Alca), Bacillus velezensis JPS19 (B.vele) and Azotobacter vinelandii (Azoto) and two species of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) namely Funneliformis mosseae (F.moss) and Glomus claroideum (G.clar) on the severity of root rot caused by R. solani and the growth traits of common bean plants were evaluated in the presence of the pathogen. The experiment was done in pots in a completely randomized design with 16 treatments and 5 replications in greenhouse. With the exception of separate applications of Alca and B.vel and combinations of B.s+F.moss, B.vel+F.moss and B.s+G.cla, other treatments significantly reduced the disease index compared to the diseased control. Compared to the diseased control, the fresh weight and shoot dry weight were significantly increased in all separate and combined treatments and an increase was seen in shoot length in separate applications of Alca and B.s and the combination of B.vel+G.cla and Alca+G.cla. In all treatments, a significant increase was observed in root fresh weight (except B.s+F.moss and B.vel) and root dry weight (except for the two mentioned treatments and the combinations of Azoto+G.cla, Azoto+F.moss and B.vel+F.moss). F.moss, B.s, Alca and Azoto significantly increased root length and B.s and Alca increased this factor compared to healthy control. Among the combined treatments, Alca+G.cla and Alca+F.moss compared to the separate application of Alca and also G.cla+B.vel compared to the separate application of B.vel reduced the severity of the disease. G.cla+B.vel also showed a better effect on the length and fresh weight of shoots and fresh and dry weight of roots than separate application of B.vel. Overall, separate application of B. subtilis BS showed the best effect in inhibiting Rhizoctonia root rot (36.5 % disease reduction) and improving all growth traits of common bean plants, and compared to their separate application, only in few cases the dual combinations of bacteria with AMF had synergistic effects in plant growth promotion and reducing disease severity.

Keywords: Biocontrol, Rhizoctonia solani, Growth promotion, Disease severity

اثر باکتری‌های پروبیوتیک و میکوریزهای دارسانه‌ای و ترکیب آن‌ها بر بیماری بوته‌میری رایزوکتونیایی و رشد لوبیا

ناهید معرف‌زاده[1*]؛ هادی خاطری[1]؛ روح‌اله شریفی[1]
1 - گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

Email: n.moarrefzadeh@razi.ac.ir

چکیده

گیاه لوبیا (Phaseolus vulgaris) یکی از منابع مهم تأمین‌کننده پروتئین انسان است. قارچ Rhizoctonia solani عامل بوته‌میری و از مهم‌ترین بیمارگرهای قارچی خاک‌زاد در اکثر مناطق کشت لوبیا در سراسر جهان بوده و نقش مهمی در کاهش عملکرد آن دارد. کنترل زیستی یک از بهترین گزینه‌های سازگار با محیط زیست در مدیریت تلفیقی بیماری‌های گیاهی است. در این تحقیق اثر کاربرد جداگانه و ترکیبی چهار باکتری پروبیوتیک Bacillus subtilis BS (B.s)، Alcaligenes faecalis 1624 (Alca)، Bacillus velezensis JPS19 (B.vele) و Azotobacter vinelandii (Azoto) و دو گونه میکوریز دارسانه‌ای (AMF) شامل Funneliformis mosseae (F.moss) و Glomus claroideum (G.clar) بر شدت بیماری بوته‌میری ناشی از *R. solani* و صفات رشدی لوبیا در حضور بیمارگر بررسی گردید. آزمایش به صورت گلدانی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۶ تیمار و ۵ تکرار در گلخانه انجام شد. به استثنای کاربردهای جداگانه Alca و B.vel و ترکیب‌های B.s+F.moss، B.vel+F.moss و B.s+G.cla، سایر تیمارها سبب کاهش معنی‌دار شاخص بیماری نسبت به شاهد بیمار گردیدند. در مقایسه با شاهد بیمار، افزایش معنی‌دار وزن تر و وزن خشک اندام هوایی در کلیه تیمارهای جداگانه و ترکیبی و افزایش طول اندام هوایی در کاربردهای جداگانه Alca و B.s و ترکیب B.vel+G.cla و Alca+G.cla مشاهده شد. همچنین در کلیه تیمارها افزایش معنی‌دار وزن تر ریشه (به استثنای B.s+F.moss و B.vel) و وزن خشک ریشه (به‌جز دو تیمار مذکور و ترکیب Azoto+G.cla، Azoto+F.moss و B.vel+F.moss) ثبت گردید. تیمارهای F.moss، B.s، Alca و Azoto سبب افزایش معنی‌دار طول ریشه گردیدند و دو تیمار B.s و Alca این فاکتور را نسبت به شاهد سالم نیز افزایش دادند. در این پژوهش در میان تیمارهای جداگانه و ترکیبی بررسی شده، ترکیب Alca+G.cla و Alca+ F.moss نسبت به کاربرد جداگانه Alca و ترکیب G.cla+B.vel در مقایسه با کاربرد جداگانه B.vel شدت بیماری را کاهش دادند و ترکیب اخیر، اثر بهتری در افزایش طول و وزن تر اندام هوایی و وزن تر و خشک ریشه نسبت به کاربرد جداگانه B.vel نشان داد. در مجموع کاربرد جداگانه B. subtilis BS بهترین اثر را در مهار بوته‌میری رایزوکتونیایی (کاهش ۳۶/۵ درصدی بیماری) و بهبود کلیه صفات رشدی لوبیا نشان داد و تلفیق دوگانه باکتری‌ها و AMF نسبت به کاربرد جداگانه آنها، فقط در برخی موارد اثر هم‌افزایی در تحریک رشد گیاه و کاهش شدت بیماری داشت.

واژه‌های کلیدی: کنترل زیستی، Rhizoctonia solani ، تحریک رشد، شدت بیماری

Study of Genetic diversity of the genus *Sorghum* L. in Iran using molecular markers

Negar Karimi[1]; Hojjatollah Saeidi[1*]

1- Department of Plant and Animal Biology, Faculty of Biological Sciences and Technology, University of Isfahan, Isfahan

**Corresponding Author Email address: ho.saeidi@sci.ui.ac.ir*

Abstract

Genus *Sorghum* L. belonging to the family Poaceae is mainly distributed through tropical and subtropical regions of the world. *S. bicolor* was introduced to Asia almost about 3000 B.C. from Africa and two weedy species; *S. halepense* and *S. propinquum* are naturally distributed in Iran. The existence of *S. bicolor* as the fifth most important crop and its close wild relatives; *S. halepense* and *S. propinquum* makes the Sub-genus *Eu-sorghum* as an important subject to genetic diversity and breeding programs. Taking into account the mentioned importance, considering lack of knowledge on the existent germplasm of the genus in Iran the current study was done. Accordingly, to assess the genetic diversity of the genus, 80 accessions including 400 individuals were collected nearly from all distribution regions of Iran and studies were performed using 8 IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) markers. According to the results of molecular analysis and the results of the percentages of molecular variance (AMOVA) the highest variance was calculated among the species of the genus (79%). Among the species the highest polymorphism ratio (80/44%) was calculated for *S. bicolor*, which could be defined as a result of different selections by human body based on different environmental habitats or ethnic tendencies which has led to the domestication of separate varieties of weedy sorghums and finally to a high polymorphism in the species. *S. halepense*, showing also a high level of polymorphism (71/11%), formed 5 distinct sub-gene pools in the country. The existence of the mentioned high polymorphism and separate sub-gene pools of the species in Iran makes the species, *S. halepense*, as an important genetic resource in terms of breeding programs to find probable suitable traits. Because of the examined high diversity of the genus *Sorghum* in Iran, the taxa count as an important gene pool and target for the next studies considering breeding and searching for suitable alleles.

Keywords: Molecular markers, Genetic diversity, Poaceae, Germplasm, Retrotransposon

بررسی تنوع وراثتی جنس .Sorghum L در ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی

نگار کریمی[1]؛ حجت اله سعیدی[1*]

1 - گروه زیست شناسی گیاهی و جانوری، دانشکده علوم و فناوری های زیستی دانشگاه اصفهان، اصفهان

Email: ho.saeidi@sci.ui.ac.ir

چکیده

جنس سورگوم (Sorghum L.) متعلق به خانواده غلات بوده و با تعداد ۲۵ گونه شناخته شده در نواحی گرم و نیمه استوایی جهان پراکنده است. در آسیا گونه زراعی *S. bicolor* حدود ۳۰۰۰ سال قبل از میلاد از آفریقا به هند وارد شده و دو گونه S. halepense و S. propinquum به عنوان گونه‌های خودرو پراکنده‌اند. جنس *Sorghum* به واسطه گونه زراعی S. bicolor دارای اهمیت اقتصادی است و گونه‌های خودروی آن نظیر S. halepense و S. propinquum، به عنوان خویشاوندان نزدیک گونه زراعی، در مطالعات مربوط به اصلاح نباتات و جستجو برای آلل های مفید حائز اهمیت می‌باشند. با توجه به اهمیت جنس مذکور و با توجه به عدم وجود اطلاعات کامل در رابطه با وضعیت ژرم‌پلاسم جنس در ایران، در این مطالعه سعی شد وضعیت تنوع وراثتی موجود در اعضا با استفاده از نشانگر مولکولی IRAP در مجموع ۸۰ نمونه و ۴۰۰ فرد جمع‌آوری شده از نقاط پراکنش مختلف جنس در ایران بررسی شود. از نقطه نظر تنوع وراثتی با توجه به نتایج حاصل از توزیع تنوع مولکولی (AMOVA)، بیشترین مقدار تنوع (۷۹٪) در جنس سورگوم مربوط به تنوع درون گونه‌ای بود. از بین سه گونه مطالعه شده بیشترین میزان پلی مورفیسم بدست آمده از مطالعات مولکولی مربوط به گونه زراعی S. bicolor با مقدار ۸۰/۴۴٪ بود. گونه S. halepense نیز با میزان پلی مورفیسم نسبتاً بالا (۷۱/۱۱) و ایجاد پنج خزانه وراثتی مجزا در کشور به عنوان یک ژرم پلاسم با ارزش جهت جستجوی آلل‌های مناسب برای اصلاح وراثتی گونه زراعی معرفی گردید. با توجه به تنوع وراثتی بالای جنس در ایران به نظر می رسد آرایه‌های جنس سورگوم در ایران ذخیره وراثتی مناسبی برای کاوش‌های بعدی در زمینه اصلاح نباتات و جست و جو برای یافتن آلل‌های مفید و کاربردی باشند.

واژگان کلیدی: نشانگر مولکولی، تنوع ژنتیکی، گندمیان، ژرم پلاسم، رتروترانسپوزون

Study of diversity of the genus Sorghum L. in Iran using morphological characters

Negar Karimi1; Hojjatollah Saeidi1*

1- Department of Plant and Animal Biology, Faculty of Biological Sciences and Technology, University of Isfahan, Isfahan

**Corresponding Author Email address: ho.saeidi@sci.ui.ac.ir*

Abstract

The genus *Sorghum* L. belongs to the family Poaceae. This genus occurs in Iran with subgenus *Eu-sorghum* and includes three species; *S. bicolor*, *S. halepense* and *S. propinquum*. The only cultivated species of the genus (*S. bicolor*) ranks as the fifth most economically important crop after wheat, barley, corn and rice. The importance of this species has caused its cultivars to enter Iran long time ago and to be cultivated in different regions. Various cultivars are used as livestock fodder and also its grains are used to prepare bread flour in some parts of the country. Wild species of the genus are also found as weeds in different parts of the country. Among them *S. halepense* with creeping rhizomes and high ability to adapt to different ecological conditions and tolerance of drought and water shortage is known as the tenth most harmful and annoying weed in the world and as the closest relatives of *S. bicolor* is of great importance in terms of plant breeding studies to search for important and functional alleles in terms of creating new traits in cultivated sorghums. The aim of this study was to investigate the morphological diversity of the genus *Sorghum* in Iran. Therefore, different individuals were collected from different distribution areas in Iran and herbarium samples were placed in the herbarium of the University of Isfahan. Statistical analyzes of 75 morphological traits such as analysis of variance (AMOVA) and principal component analysis (PCoA) were performed using Gene Alex software to compare and to observe variations between different taxa cladistic software such as NTsys, PowerMarker and Tree view were used. The UPGMA clustering method was performed to reconstruct trees. The results of the study of 75 morphological traits related to vegetative and reproductive characteristics showed high inter-species diversity (95.7%) among studied taxa. It was also found that among members of the genus, *S. bicolor* has a noticeable diversity (98.13%) among its different individuals. Among the studied traits, 15 traits related to the characteristics of inflorescences, glumes and seeds had the highest diversity. Based on the observations, it seems that the genus *Sorghum* has a relatively high morphological diversity in Iran and therefore is a valuable taxonomic unit with the aim of molecular and allelic studies for plant breeding strategies and to search for functional genes.

Keywords: Morphological markers, Poaceae, cultivated sorghum, weedy sorghum

بررسی تنوع جنس .Sorghum L در ایران با استفاده از صفات ریخت شناختی

نگار کریمی[1]؛ حجت اله سعیدی[1*]

1 - گروه زیست شناسی گیاهی و جانوری، دانشکده علوم و فناوری های زیستی دانشگاه اصفهان، اصفهان

Email: ho.saeidi@sci.ui.ac.ir

چکیده

جنس .Sorghum L متعلق به خانواده گندمیان (Poaceae) است. این جنس با زیرجنس Eu-sorghum و در برگیرنده سه گونه *S.* bicolor، *S.* halepense و *S.* propinquum به گونه‌ی Sorghum miliaceum اشاره‌ای نکردید؟؟؟در مناطق مختلف ایران پراکنش دارد. تنها گونه زراعی این جنس (*S. bicolor*) از لحاظ اقتصادی پنجمین غله مهم بعد از گندم، جو، ذرت و برنج محسوب می شود. اهمیت این گونه باعث شده انواع ارقام زراعی آن از دیرباز وارد ایران شده و در مناطق مختلف کشت و پرورش داده شوند. از انواع ارقام زراعی جنس برای تهیه علوفه دام استفاده شده و هم‌چنین در برخی از مناطق ایران از دانه‌های آن برای تهیه آرد نان استفاده می‌شود. گونه‌های خودروی جنس نیز در مناطق مختلف کشور به صورت علف هرز مشاهده می‌شوند. گونه خودروی S. halepense در بین انواع وحشی با داشتن ریزوم‌های خزنده و توانایی بالا در سازش‌پذیری به شرایط اکولوژیک مختلف و تحمل شرایط خشکی و بحران‌های کم آبی به عنوان دهمین علف هرز مضر و مزاحم جهان شناخته شده و به عنوان نزدیک‌ترین خویشاوندان خودروی S. bicolor، دارای اهمیت بالایی در مطالعات مربوط به اصلاح نباتات و جست و جو برای آلل‌های مهم و کاربردی از نقطه نظر ایجاد صفات جدید در انواع زراعی جنس سورگوم می‌باشند. هدف مطالعه پیش رو بررسی تنوع ریخت شناختی جنس Sorghum در ایران بود. از این‌رو افراد مختلف مربوط به جنس از نواحی پراکنش مختلف در ایران جمع آوری شد و نمونه‌های هرباریومی تهیه شده در هرباریوم دانشگاه اصفهان قرار گرفت. آنالیزهای آماری مربوط به ۷۵ صفت ریختی نظیر تحلیل واریانس (AMOVA) و آنالیز مولفه‌های اصلی (PCoA) با استفاده از نرم افزار Gene Alex انجام شد و به منظور بررسی مقایسه‌ای و مشاهده تنوعات بین آرایه‌های مختلف از نرم‌افزارهای کلادیستیک نظیر NTsys، PowerMarker و Tree view و روش خوشه‌بندی UPGMA استفاده شد. نتایج مطالعه ۷۵ صفت ریختی مربوط به ویژگی‌های رویشی و زایشی بیانگر تنوع بالای بین گونه‌ای (۹۵.۷٪) در بین آرایه‌های مورد بررسی بود. هم‌چنین مشخص شد از بین اعضای این جنس گونه *S.* bicolor دارای تنوع قابل مشاهده ای (۹۸.۱۳٪) در بین افراد مختلف است. از بین صفات مورد بررسی ۱۵ صفت مربوط به ویژگی‌های گل‌آذین، گلوم‌ها و دانه‌ها بیشترین تنوع را به خود اختصاص دادند. براساس مشاهدات به نظر می‌رسد جنس Sorghum در ایران دارای تنوع ریخت شناختی نسبتا بالا بوده و بنابراین واحد تاکسونومیک با ارزشی با هدف مطالعات مولکولی و آللی به جهت اصلاح نباتات و جست و جو برای ژن‌های کاربردی باشد.

واژگان کلیدی: ماکرهای ریختی، گندمیان، سورگوم زراعی، سورگوم خودرو

Effect of Fe_3O_4 nanoparticles on growth and total carbohydrates content of suspension-cultured hazel (Corylus avellana L.) cells

Mina Abousaedi [1*], Faezeh Ghanati[۲] and Mitra Jamshidi[1]

[۱]-*Department of Plant Biology, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran-Iran*

2- *Department of Plant Biology, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran-Iran*

3- *Department of Plant Biology, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran-Iran*

E.mail: m.abuosaedi@modares.ac.ir*

Abstract

Nanoparticles can enter cells and reach the plasma membrane due to their small diameter and high surface-to-volume ratio. *Fe_3O_4* nanoparticles (*Fe_3O_4-NPs*) can stimulate some specific metabolic pathways in plants by producing reactive oxygen species (ROS) as an elicitor through the Fenton and Haberweise reaction(Production of free radicals of hydrogen peroxide and hydroxyl using two and three-valent iron ions). In this paper, suspension-cultured hazel cells (*Corylus avellana* L.) were treated with different concentration of Fe_3O_4-NPs (0, 2.5, 5, 7.5 and 10 ppm), in their logarithmic growth phase (d7) and were harvested after 1 week. The role of Fe_3O_4-NPs in production of hydrogen peroxide (*H_2O_2*) as the long lasting ROS and activity of superoxide dismutase (*SOD*)and,(*CAT*) and (*POX*) in the cells were evaluated. The results showed that *Fe_3O_4-NP*s decreased the growth and viability of the cells in all concentration. The lowest growth was observed at the highest applied concentration (10ppm) of *Fe_3O_4-NP*. The highest activity of *SOD* and *CAT* and *POX* was observed in 10 ppm Fe_3O_4-NPs treatments. This treatment also showed the highest contents of *H_2O_2* and malon dialdehyde (*MDA*) as well as the highest contents of total carbohydrates (8.2 µg/g FW). While in comparison with control cells, treatment with 2.5 ppm *Fe_3O_4-NP*s resulted in the lowest growth reduction and also had a second place of the highest content of total carbohydrates. This is evidenced by the results presented here, since at lowest concentrations of *Fe_3O_4-NP*s (2.5 ppm) tolerable amount of *H_2O_2* was produced and the sustainable amounts of total carbohydrates was also observed in the cells. The results emphasizes that the content of *H_2O_2* can be speculated as a central point which determines further direction of the cells fate, toward death or be live.

Keywords: Hydrogen peroxide (H_2O_2), Anti-oxidant

اثر نانوذرات اکسید آهن بر رشد ومحتوای کربوهیدرات در سلول های فندق(*Corylus avellena.L*) درکشت تعلیقی

مینا ابوسعیدی[1*] ، فائزه قناتی[۲] و میتراجمشیدی[۳]

۱- گروه علوم گیاهی ، دانشکده .علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، نام شهر تهران
۲- گروه علوم گیاهی ، دانشکده .علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، نام شهر تهران
۳- گروه علوم گیاهی ، دانشکده .علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، نام شهر تهران

Email: m.abuosaedi@modares.ac.ir

چکیده

نانوذرات به دلیل قطر کوچک و نسبت سطح به حجم بالا به راحتی می توانند وارد سلول ها شده و به غشای پلاسمایی برسند. نانوذرات اکسید آهن می‌توانند از طریق واکنش فنتون- هابروایس (تولید رادیکال های آزاد پراکسید هیدروژن و هیدروکسیل با استفاده از یون های دو و سه ظرفیتی آهن) سبب تولید گونه‌های فعال اکسیژن شده و به عنوان الیستور برخی مسیرهای متابولیت خاص را درگیاهان تحریک کنند. در این مطالعه، سلول‌های فندق در کشت تعلیقی با غلظت های مختلف نانوذرات اکسید آهن (0 2.5 , 5 , 7.5 , 10 ppm) تیمار شده و سپس در فاز رشد لگاریتمی خود در روز هفتم تیمار نمونه برداری شدند. نقش نانوذرات اکسید آهن در تولید پراکسید هیدروژن به عنوان گونه فعال اکسیژن طولانی مدت و فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) ، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز(POX) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نانوذرات اکسید آهن رشد و زنده ماندن سلول‌ها را در تمام غلظت ها کاهش می دهد. کمترین رشد در بالاترین غلظت نانوذرات اکسید آهن (10 ppm) مشاهده شد. بیشترین فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) ، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (*POX*) در غلظت (10 ppm) مشاهده شد. همچنین تیمار سلول های فندق در بالانرین غلظت (10 ppm) نانوذرات بیشترین محتویات پراکسید هیدروژن(H_2O_2) و مالون دی آلدئید (MDA) و همچنین بیشترین محتویات کربوهیدرات های کل (۸/۲ میکرو گرم در گرم FW) را نشان داد. درحالی‌که در مقایسه با سلول شاهد غلظت (2.5 ppm) نانوذرات اکسید آهن منجر به کمترین کاهش رشد شد. همچنین بالاترین محتوای کل کربوهیدرات‌ها را نیز نشان داد. در پایین‌ترین غلظت نانوذرات اکسیدآهن (2.5 ppm) مقدار قابل تحمل پراکسید هیدروژن تولید شد و مقادیر پایدار کربوهیدرات های کل نیز در سلول ها مشاهده شد. نتایج تاکید می کند که محتوای پراکسید هیدروژن را می توان به عنوان یک نقطه مرکزی حدس زد که سرنوشت سلول به سمت مرگ یا زنده بودن را تعیین می کند.

واژگان کلیدی: آنتی اکسیدان و پراکسید هیدروژن

Study on Scorpions (Arachnida: Scorpiones) in Southern part of Kerman province

Hossein Barahoei[1*], Mehran Shahi[2] and Moslem Adeli Sardou[3]

1- Institute of Agricultural Research, University of Zabol, Zabol
2- Health Institute, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas
Faculty of Public Health, Jiroft University of Medical Sciences, Jiroft

** Email: barahoei@uoz.ac.ir*

Abstract

So far, 19 species of scorpions belonging to 10 genera and three families have been reported from Kerman province. Sampling was done from Jiroft and Kahnooj counties in the south of Kerman province during 2017 and 2018. In total, 10 species of scorpions from three families were collected and identified as follows: *Androctonus crassicauda*, *Androctonus* sp., *Hottentotta sistanensis*, *H. navidpouri*, *Mesobuthus eupeus*, *Odontobuthus baluchicus*, *Orthochirus kucerai* and *Sassanidothus gracilis* from the family Buthidae; *Hemiscorpius acanthocercus* from the family Hemiscorpiidae and *Scorpio maurus townsendi* from the family Scorpionidae. Preliminary results indicate the existence of a new species of the genus *Androctonus* in this area. Due to the very diverse climatic conditions of this province, the possibility of the presence of more species as well as new species in the region is very likely. Dangerously poisonous species such as *A. crassicauda*, *H. acanthocercus* and *O. baluchicus* are spread in the region.

Keywords: Scorpion, new species, systematic, morphology, Kerman

مطالعه عقرب ها (Arachnida: Scorpiones) در جنوب استان کرمان

حسین براهوئی[1*]، مهران شاهی[2] و مسلم عادلی ساردو[3]

۱- پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل
۲- پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندر عباس
دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی جیرفت، جیرفت

Email: barahoei@uoz.ac.ir

چکیده

تاکنون ۱۹ گونه عقرب متعلق به ۱۰ جنس و سه خانوه از استان کرمان گزارش شده است. نمونه‌برداری از شهرستان‌های جیرفت و کهنوج در جنوب استان کرمان طی سال‌های ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ انجام شد. درکل ۱۰ گونه عقرب از سه خانواده به شرح زیر جمع‌آوری و شناسایی شد: گونه‌های Androctonus crassicauda، Androctonus sp.، Hottentotta sistanensis، H. navidpouri، Mesobuthus eupeus، Odontobuthus baluchicus، Orthochirus kucerai و Sassanidothus gracilis از خانواده Buthidae؛ گونه Hemiscorpius acanthocercus از خانواده Hemiscorpiidae و گونه Scorpio maurus townsendi از خانواده Scorpionidae. نتایج اولیه وجود گونه جدید از جنس Androctonus در این منطقه را نشان می‌دهد. با توجه به شرایط آب و هوایی بسیار متنوع این استان، احتمال حضور گونه‌های بیشتر و همچنین گونه جدید در منطقه بسیار محتمل است. گونه‌های دارای زهر خطرناک مانند *A.* crassicauda، *H.* acanthocercus و *O.* baluchicus نیز در منطقه انتشار دارند.

واژگان کلیدی: عقرب، گونه جدید، سیستماتیک، مورفولوژی، کرمان

Effect of harvest time of *Thymus kotschyanus* on photosynthetic pigments, anthocyanins, phenol and flavonoids of leaves and essential oil content in field condition

Farzane Bahadori[1*]; Mohammad Reza Alipour[2]; Abolfazl Nejatian[3]

1 and 3- Forests and Rangelands Research Department, Semnan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Semnan, Iran

2- Save Azad University, Iran

*farbahadori@gmail.com

Abstract

In this study, the effect of two harvest times of *Thymus kotschyanus*, harvest at the peak of vegetative growth and harvest at 70% of flowering with three replications was evaluated in a completely randomized design. The seeds of thyme were collected from its habitat in Jashlobar area in Semnan province. In March, seeds were planted in the greenhouse of the Agricultural and Natural Resources Research Center of Semnan. The seedlings produced in May 2010 were transferred from the greenhouse to the Semnan natural resource research field at Shahmirzad with spacing of 50 cm between and 30 cm within the rows. Trait evaluation in established plants was performed in 2011 (biennial plants). The studied characteristics included the evaluation of chlorophyll b and a, total chlorophyll and the ratio of two chlorophylls and carotenoids, anthocyanin, flavonoids and total phenol and the percentage of essential oil of aerial herbs. Results showed that the highest chlorophyll a, b and total were observed with 19.70, 12.90 and 36.60 mg.g-1 dry weight at full flowering time, respectively, compared to the vegetative period with 17.93, 9.72 and 27.65 mg.g^{-1} dry weight showed a significant increase. Leaf anthocyanin at the time of flowering showed a significant decrease compared to the growing period (decreasing from 22.75 to 18.06 mg.g^{-1} dry weight). Leaf flavonoids also showed a decreasing trend from 3.61 mg.g^{-1} dry weight in the growing season to 2.93 mg.g^{-1} dry weight in full flowering. The essential oil yield of aerial herbs was significantly affected by harvest time. The highest essential oil was at 1.23% at full flowering, which more than doubled compared to the growing period with 0.56%. In general, in the flowering stage, the amount of photosynthetic pigments and essential oil in *Thymus kotschyanus* increases and the amount of flavonoid and anthocyanin compounds decreases.

Keywords: Agricultural ecosystem, chlorophyll, phenology, essential oil, Thymus kotschyanus

اثر زمان برداشت گیاه آویشن کوهی(Thymus kotschyanus) بر میزان رنگیزه های فتوسنتزی، آنتوسیانین، فنل و فلاونویید برگ و درصد اسانس در شرایط زراعی

فرزانه بهادری[1*]، محمد رضا علیپور[2]؛ ابوالفضل نجاتیان[3]

۱و۳- استادیار و کارشناس پژوهشی، بخش تحقیقات جنگل و مرتع، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، سمنان، ایران

۲- کارشناس ارشد مهندسی کشاورزی، دانش آموخته دانشگاه آزاد اسلامی ساوه
Email: farbahadori@gmail.com

چکیده

در این پژوهش اثر دو زمان برداشت اندام هوایی آویشن کوهی (*Thymus kotschyanus*)، برداشت در زمان اوج رشد رویشی و برداشت در ۷۰ درصد گلدهی با سه تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفت. بذر گیاه آویشن کوهی از رویشگاه آن در منطقه جاشلوبار استان سمنان جمع‌آوری شد. در اسفند ماه بذور در بستر گلخانه مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان کشت شدند. نشاهای تولید شده در اردیبهشت ماه ۱۳۸۹ از گلخانه به پایلوت تحقیقاتی در بخش شهمیرزاد از شهرستان مهدیشهر با فاصله بین ردیف ۵۰ سانتی‌متر و فاصله روی ردیف ۳۰ سانتی‌متر در کرت‌های ۳ در ۴ متری منتقل شدند. مراحل آبیاری و وجین مکانیکی علف‌های هرز برای تمامی کرت‌ها به صورت مشابه انجام شد. ارزیابی صفات در گیاهان مستقر شده، در سال ۱۳۹۰ (گیاهان دوساله) انجام شد. ویژگی‌های مورد بررسی شامل ارزیابی میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل: کلروفیل *a* و *b*، کلروفیل تام و نسبت دو کلروفیل و کاروتنوئیدها، رنگیزه آنتوسیانین، میزان ترکیبات فلاونوئیدی و فنلی برگ و همچنین درصد اسانس سرشاخه گلدار آویشن کوهی بود. نتایج تجزیه واریانس اختلاف معنی‌دار دو زمان برداشت را در صفات مورد بررسی نشان داد. مقایسه میانگین‌ها مشخص کرد که بیشترین کلروفیل *a*، *b* و تام به ترتیب با ۱۹/۷۰، ۱۲/۹۰و ۳۶/۶۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در زمان گلدهی کامل مشاهده شد که نسبت به دوره رویشی به ترتیب با ۱۷/۹۳، ۹/۷۲ و ۲۷/۶۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک افزایش معنی‌دار نشان دادند. آنتوسیانین برگ در زمان گلدهی نسبت به دوره رویشی کاهش معنی‌دار نشان داد و از ۲۲/۷۵ به ۱۸/۰۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در زمان گلدهی رسید. فلاونوئید برگ نیز روند کاهشی نشان داد بطوریکه از ۳/۶۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در دوره رویشی به ۲/۹۳ میلی گرم بر گرم وزن خشک در گلدهی کامل تنزل کرد. بازده اسانس اندام هوایی برداشت شده تحت تاثیر زمان برداشت تغییرات معنی‌دار داشت. بیشترین اسانس در زمان گلدهی کامل با ۱/۲۳ درصد بود که نسبت به دوره رویشی با ۰/۵۶ درصد بیش از دو برابر افزایش نشان داد. به طورکلی در مرحله گلدهی میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و اسانس در آویشن کوهی افزایش و میزان ترکیبات فلاونوئیدی و آنتوسیانین کاهش می‌یابد. نتایج این پژوهش مشخص کرد در با توجه به ترکیب هدف می‌توان در مورد زمان برداشت مناسب در گیاه بومی آویشن کوهی برنامه ریزی کرد.

واژگان کلیدی: اکوسیستم زراعی، کلروفیل، فنولوژی، اسانس، آویشن کوهی



مقالات کامل

(سلولی و مولکولی)

دبیرخانه:
استان گلستان، شهرستان گنبد کاووس، دانشگاه گنبد کاووس، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، گروه زیست‌شناسی

Investigation of Concentration Effects of Talc Clayn on Fluorescence Properties of Marine Collagen

Mohammad Darbazi[1]; Fatemeh Elmi[2*]; Maryam Mitra Elmi[3]

1- Master of Marine Chemistry, Department of Marine Chemistry, Faculty of Marine and Environmental Sciences, University of Mazandaran
2- Assistant professor, Department of Marine Chemistry, Faculty of Marine and Environmental Sciences, University of Mazandaran
3- Associate professor, Research Center of Cellular and Molecular Biology, Health Research Center, Babol University of Medical Sciences

*Corresponding Author Email address: f.elmi@umz.ac.ir

Abstract

Collagen protein is one of the most abundant organic macromolecules in the body of living organisms. Due to their high tensile strength, they play many important structural roles in the body, especially in connective tissue. Collagen from marine sources is pathogen-free compared to other sources. In this study, collagen was extracted from Caspian white fish scales and exposed to different concentrations of talc clay. According to the fluorimetry results, fluorescence intensity of collagen increased in presence of talc with respect to pure collagen. In collagen/talc, talc is a fluorescence enhancer agent for collagen protein. These results show the interaction of talc with tyrosine amino acids in collagen. In conclusion, the use of talc as a fluorescence enhancing collagen could be an effective method for future biomolecular studies. Increasing fluorescence of collagen could be considered in future biological materials.

Keywords: Talc, Collagen, Fluorescence, Fish Scale

بررسی اثرات غلظتی کانی تالک در خصوصیات فلورسانسی کلاژن دریایی

محمد دربازی[۱]؛ فاطمه علمی[۲*]؛ مریم میترا علمی[۳]

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه شیمی دریا، دانشکده علوم دریایی و محیطی، دانشگاه مازندران

۲-دانشیار گروه شیمی دریا، دانشکده علوم دریایی و محیطی، دانشگاه مازندران

۳-دانشیار بیوفیزیک، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: *f.elmi@umz.ac.ir*

چکیده

پروتئین کلاژن از فراوان‌ترین ماکرو مولکول‌های آلی در بدن جانداران می‌باشد. به علت استحکام کششی بالا، نقش ساختاری متعدد و مهمی در بدن، به خصوص در بافت همبند ایفا می‌کند. کلاژن حاصل از منابع دریایی نسبت به سایر منابع، عاری از عوامل بیماری‌زا می‌باشد. در این پژوهش استخراج کلاژن از پولک ماهی سفید دریای خزر انجام شد و معرض غلظت‌های مختلفی از کانی تالک قرار گرفت. با توجه به نتایج فلوریمتری، در حضور کانی تالک، شدت فلورسانت کلاژن/تالک نسبت به کلاژن خالص افزایش یافت. در کلاژن/تالک، کانی تالک به عنوان عامل افزایش‌دهنده فلورسانس برای پروتئین کلاژن می‌باشد. این نتایج، برهم‌کنش کانی تالک را با اسیدهای آمینه تیروزین در پروتئین کلاژن نشان می‌دهد. در نتیجه ، استفاده از تالک به عنوان کلاژن تقویت کننده فلورسانس می تواند یک روش سودمند برای مطالعات زیست مولکولی آینده باشد.

واژگان کلیدی: تالک، کلاژن، فلورسانس، پولک ماهی

۱.مقدمه

کلاژن تقریباً ۳۰ درصد از تمام پروتئین‌های اصلی بدن مهره‌داران را شامل می‌شود. بیش از ۹۰ درصد پروتئین‌های خارج سلولی در تاندون و استخوان و بیش از ۵۰ درصد آن در پوست شامل کلاژن است. کلاژن به علت زیست سازگاری، پایداری و فعالیت زیستی، به‌عنوان یک ماده زیستی در استحکام بخشی به سلول و فاکتور رشد، پانسمان زخم، تقویت بافت نرم، مکمل غذایی و غیره استفاده‌ی فراوانی دارد (Chan et al., 2020; Tanaka et al., 2009). با توجه به اینکه اغلب، کلاژن استخراج شده از پستاندارانی مانند خوک و گاو، بیماری‌زا است و کاربرد آن‌ها محدودیت‌هایی را در پی دارد. لذا یافتن منابع جایگزین مناسب برای استخراج کلاژن از اهمیت ویژه‌ای در صنایع غذایی، دارویی، آرایشی و غیره برخوردار است.

تحقیقات علمی در مورد منابع جایگزین مختلف و عملکردهای نوین کلاژن در طی ۱۰ تا ۱۵ سال گذشته به‌طور قابل توجهی گسترش پیدا کرده است. بخشی از آن به دلیل توجه زیاد به ارزش‌گذاری اقتصادی در محصولات صنعتی (از گوشت و صنعت ماهی) و مدیریت زیست محیطی زباله‌های صنعتی بوده‌است (Subhan, 2021). جهت استخراج کلاژن مواد خامی نظیر پوست، استخوان، تاندون و غضروف رایج هستند. منابع کلاژنی حاصل از ماهی‌ها نیز در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (Lutfee., 2021، نصیری امیری، ۱۳۹۵).

طیف‌سنجی فلورسانس یک روش بسیار حساس جهت مطالعه دینامیک پروتئین‌ها می‌باشد. برای مثال این روش به حرکات چرخشی زنجیره‌های پروتئین، اتصالات مولکولی و تغییرات ساختاری آن حساس است. نشر فلورسانس پروتئین‌ها ناشی از حضور آمینواسیدهای تریپتوفان[1] ($C_{11}H_{12}N_2O_2$)، تیروزین[2] ($C_9H_{11}NO_3$) و فنیل‌آلانین[3] ($C_9H_{11}NO_2$) است. از این خاصیت می‌توان جهت بررسی تغییرات ناشی از واکنش پروتئین‌ها با نانوذرات بهره‌مند شد (Su et al., 2012). فلورسانس تریپتوفان به محیط داخلی بسیار حساس است. در محیطی با قطبیت ضعیف، بیشینه نشر تریپتوفان ۳۲۰ nm است. در صورت دناتوره شدن پروتئین، فلورسانس نشری تریپتوفان تا ۳۵۵ nm جابجا می‌شود. در پروتئین‌ها، فلورسانس تریپتوفان قوی‌تر است. فلورسانس تیروزین ضعیف و فلورسانس فنیل‌آلانین از انتقال انرژی به تریپتوفان و یا اسیدهای آمینه همسایه ناشی می‌شود. فرآیند خاموش‌سازی فلورسانس در نتیجه‌ی برهم‌کنش بین فلوروفور و ماده خاموش‌کننده است. مکانیسم‌هایی که در این فرآیند دخالت دارند شامل برخورد بین مولکول‌ها، تشکیل ترکیب جدید، واکنش‌های حالت برانگیخته و انتقال انرژی هستند. معمولاً دو نوع مکانیسم خاموشی ایستا و خاموشی دینامیک در واکنش‌های خاموش‌سازی رخ می‌دهند (Sakura and Fujimoto, 1984). خاموش‌سازها در لحظه‌ی برخورد با فلوروفور درونی یا در زمان تشکیل کمپلکس غیر فلورسانس با فلوروفور درونی موجب القای خاموشی فلورسانس باقی‌مانده‌های اسیدهای آمینه تیروزین، تریپتوفان و فنیل‌آلانین می‌شوند. خاموش‌سازی دینامیک به تشکیل کمپلکس نمی‌انجامد. خاموش‌ساز و فلوروفور با هم برخورد می‌کنند، کاهش انرژی در فلوروفور القاء می‌گردد.

از میان مواد پرکننده مورد استفاده در صنعت پلیمر، کانی تالک به علت زیست تخریب پذیری، هزینه کم و کارایی بالا بیشتر مورد توجه است. به علت اینکه لایه‌های سازنده‌ی کانی تالک با پیوندهای واندروالسی ضعیفی به هم متصل هستند، این کانی نسبت به سایر پرکننده‌های دیگر خاصیت پخش شدگی بالایی داشته و در اتصال به ماتریس‌های پلیمری تمایل بیشتری دارد (Post et al., 2021). لذا می‌توان از آن جهت بهینه‌سازی خصوصیات کلاژن استفاده نمود و هدف از این پژوهش بررسی دینامیک و برهمکنش های تالک با کلاژن استخراج شده از پولک ماهی سفید دریای خزر می‌باشد.

۲.مواد و روش‌ها

۲-۱- استخراج کلاژن از پولک ماهی

جهت حذف پروتئین‌های سطحی پولک‌ها در محلولی حاوی EDTA[4] ۲۰ میلی مولار، NaCl ۱ مولار و تریس-HCl ۰/۰۵ مولار در pH=۷/۵ به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت. غیر معدنی کردن پولک‌ها با استفاده از EDTA در pH=۷/۴ انجام شد. سپس جهت استخراج کلاژن محلول، پولک‌ها در محلول استیک اسید ۰/۵ مولار به مدت ۳ روز قرار گرفت و در مرحله بعد به محلول صاف شده پولک‌ها، NaCl ۰/۹ مولار اضافه شد. محلول حاوی پروتئین به‌وسیله سانتریفیوژ ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت یک ساعت سانتریفیوژ شد.

[1] Tryptophan
[2] Tyrosine
[3] Phenylalanine
[4] Ethylenediaminetetraacetic acid

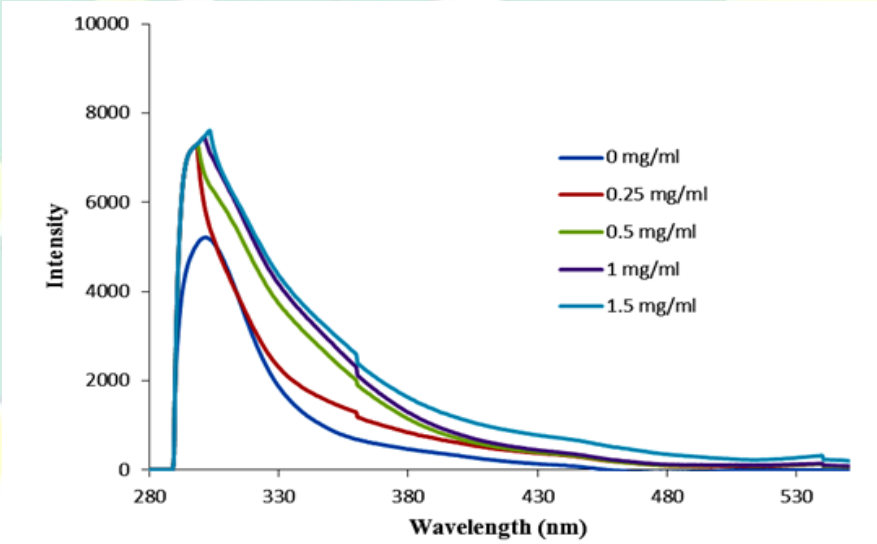
رسوب حاصل در استیک اسید ۰/۵ مولار حل شده و پس از دیالیز و نمک زدایی در برابر استیک اسید ۰/۱ مولار، در سرما خشک شد. همه مراحل استخراج در دمای ۴ °C انجام شد.

۲-۲- آماده‌سازی نمونه‌ها برای آزمون فلوریمتری

جهت تهیه محلول‌های مورد نیاز از پودر تالک، کلاژن نوع I استخراج شده از پولک ماهی سفید و محلول ۱۰ x PBS استفاده شد. محلول شاهد با افزودن ۱۵ ml محلول ۱۰ x PBS و ۵ ml استیک اسید ۰/۵ M در pH =۷/۲ به‌دست آمد. ۵ محلول دیگر با اضافه نمودن کلاژن با غلظت ۰/۵ mg/ml برای همه‌ی محلول‌ها و غلظت‌های تالک به ترتیب ۰/۲۵ mg/ml، ۰/۵ mg/ml، ۱ mg/ml و ۱/۵ mg/ml تهیه شدند. این محلول‌ها در دمای ۴ °C، ۸ °C و ۱۴ °C تهیه شده و داخل انکوباتور در دماهای مورد نظر به مدت ۸ روز قرار گرفتند تا به دستگاه فلورسانس تزریق شوند (su et al., 2012; Suryawanshi et al., 2016).

۳. نتایج و بحث

در این پژوهش در شرایط آزمایشگاهی طیف نشری کلاژن در حضور غلظت‌های مختلفی از کانی تالک مطالعه شد. همان‌طور که در شکل ۱دیده می‌شود، با افزایش غلظت تالک در محلول شامل کلاژن، شدت فلورسانس کلاژن افزایش می‌یابد. در اکثر مطالعاتی که تاکنون انجام شده است، ماهیت مولکول‌های خارجی اضافه شده به سیستم فلورسنت به گونه‌ای بوده‌است که سبب خاموشی شدت فلورسانس آن شده‌است (Veselsky et al., 1988; Veselsky and Ratsimandresey, 1979; Chi et al., 2010).



شکل ۱: طیف نشری فلورسانس کلاژن در حضور غلظت‌های مختلفی از کانی تالک. غلظت کلاژن برابر ۰/۵ mg/ml، دما برابر با ۱۴ °C و pH =۷/۲.

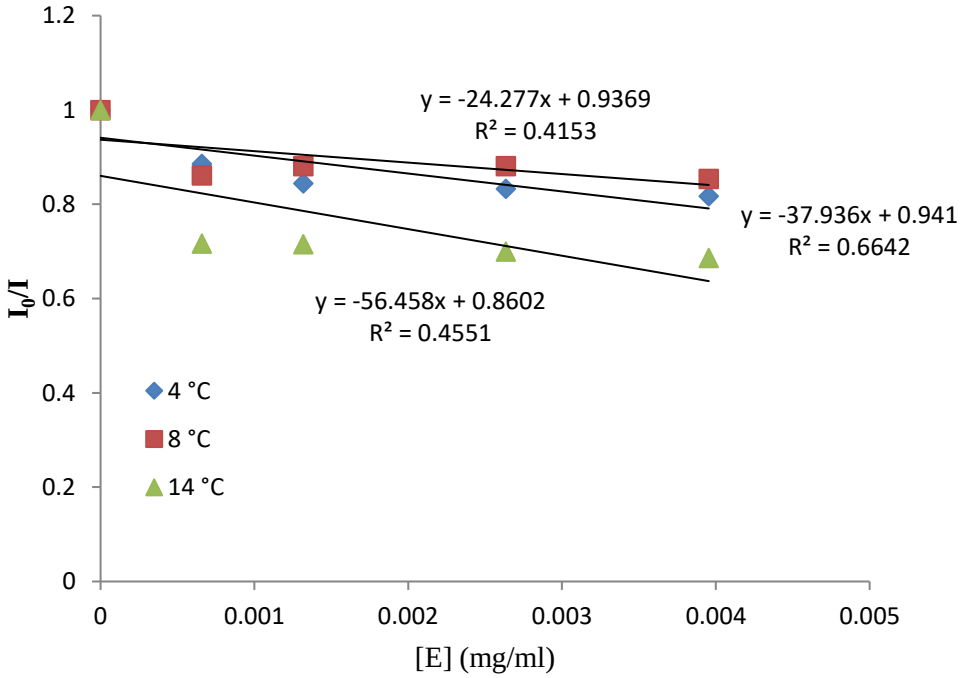
در این پژوهش با افزودن کانی تالک به پروتئین کلاژن در دماهای مذکور و در pH=۷/۲، شدت فلورسانت کلاژن نسبت به کلاژن خالص افزایش یافت. در واقع می‌توان گفت کانی تالک مانند فلوروفور بیرونی برانگیخته‌ای است که می‌تواند در لحظه برخورد با کلاژن (فلوروفور درونی) یا در زمان تشکیل کمپلکس با کلاژن سبب افزایش فلورسانس آن شود. می‌توان گفت افزایش‌دهنده و فلوروفور با هم برخورد می‌کنند و افزایش انرژی در کلاژن القاء می‌شوند. در پروتئین کلاژن، تمامی یا بخشی از اسید آمینه تیروزین که آب‌گریز

است، درون پروتئین مدفون است. برخورد مؤثرانه تالک و کلاژن باعث می‌شود تا به‌طور لحظه‌ای اسید آمینه‌های تیروزین بیشتری در کلاژن/تالک نسبت به پروتئین کلاژن خالص به سمت بیرون (محیط آب‌دوست) جهت‌گیری نمایند. برای فرآیند افزایش فلورسانس برخوردی می‌توان رابطه ۱ را نوشت.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_E[E] \qquad (۱)$$

I_0 و I به ترتیب شدت فلورسانس بدون حضور افزایش‌دهنده و با افزایش‌دهنده هستند. K_E ثابت افزایش فلورسانس است. $[E]$ غلظت افزایش‌دهنده است. با رسم $\frac{I_0}{I}$ بر حسب $[E]$، خطی با شیب برابر K_E به‌دست می‌آید.

شکل ۲ نمودارهای I_0/I را برای پروتئین کلاژن در مقابل غلظت‌های مختلفی از کانی تالک در دماهای ۴ °C، ۸ °C و ۱۴ °C نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، نتایج از رابطه خطی ۱ انحراف نشان می‌دهد.



شکل ۲: نمودارهای I_0/I مطابق با رابطه ۱ برای پروتئین کلاژن در مقابل غلظت‌های مختلفی از کانی تالک.

برای توضیح رابطه‌ای که با نتایج تجربی سازگاری داشته‌باشد، از مدلی استفاده می‌شود که همان اصول پیشنهاد شده توسط بوآز[5] و رولفسن[6] را در مورد مدل پیشنهادی برای انحراف از رابطه اشترن-ولمر در برمی‌گیرد (Boaz and Rollefson, 1950). مدلی مدنظر قرار می‌گیرد که در آن افزایش‌دهنده و فلورسنت به‌طور پیاپی به یکدیگر برخورد می‌کنند و از هم دور می‌شوند که می‌توان مطابق رابطه ۲ آن‌را نمایش داد.

[5] Boaz
[6] Rollefson

$$M + L^* \rightleftarrows M...L^*; K_1 = {(M...L^*)}/{(M)(L^*)} \quad (۲)$$

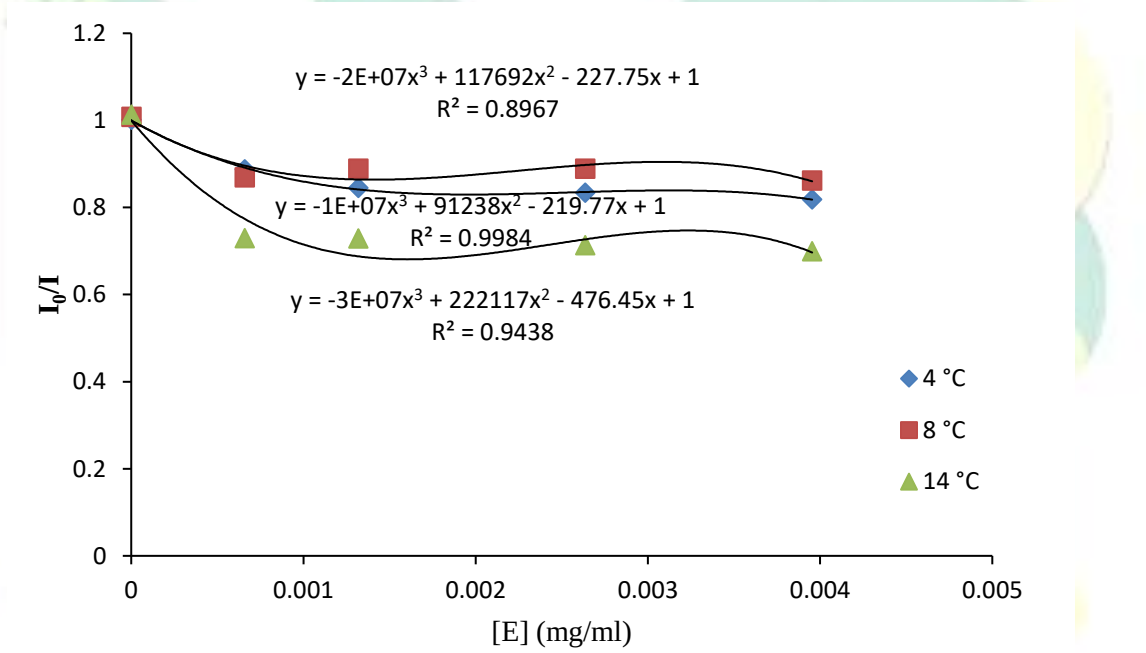
M…L* جفت افزایش‌دهنده‌ی برانگیخته و فلورسنت در یک قفس حلال است. K_1 ثابتی است که مشخصه برخورد و جدا شدن M و L* است. با توجه به داده‌های تجربی از طیف‌سنجی فلورسانس در دماهای مورد مطالعه و با فرض این‌که فلورسنت با دو یا چند افزایش‌دهنده در یک قفس حلال قرار دارد، می‌توان رابطه‌ی ۳ را نوشت.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + (K_E + K_1)[L] + K_1(K_E + K_2)[L]^2 + K_E K_1 K_2 [L]^3 \quad (۳)$$

که در آن ثابت K_2 برابر با رابطه ۴ می‌باشد.

$$K_2 = \frac{(L^*...M...L^*)}{(L^*...M)(L^*)} \quad (۴)$$

همان‌طور که در شکل ۳ مشخص است، مکانیسم پیشنهادی با داده‌های تجربی موافقت دارد.



شکل۳- نمودارهای I_0/I برای پروتئین کلاژن در مقابل غلظت‌های مختلفی از کانی تالک .

۴. نتیجه‌گیری

نتایج فلوریمتری، پدیده افزایش فلورسانس را برای کلاژن نشان داد. در این پدیده، کانی تالک به عنوان عامل افزایش‌دهنده فلورسانس برای پروتئین کلاژن می‌باشد. در واقع حضور کانی تالک، شدت فلورسانت نانوکامپوزیت کلاژن/تالک را نسبت به کلاژن خالص افزایش یافت. این پدیده، افزایش فلورسانس نامیده شد. مکانیسم پیشنهادی می تواند نتایج فلوریمتری را با موفقیت توجیه کند .در نتیجه ،

افزایش فلورسانس با حضور کانی تالک به عنوان تقویت کننده، می‌تواند روش مفیدی برای تحقیقات زیستی مولکولی آینده باشد و در سنتز بیومواد جدید مد نظر قرار گیرد.

منابع

۱- نصیری‌امیری، ف. ۱۳۹۵. مطالعه عوامل مؤثر نظیر غلظت، دما، قدرت یونی و pH بر میزان خودتجمعی کلاژن استخراج شده از پولک ماهی سفید. رشته‌ی شیمی دریا، دانشگاه مازندران: ایران.

2- **Boaz, H., and Rollefson, G. K. 1950**. The quenching of fluorescence. Deviations from the Stern-Volmer law. Journal of the American Chemical Society, 72 (8): 3435-3443.

3- **Chan, W.W., Yeo, D.Ch.L., Tan, V., Choudhurt, D., and Naing, M.W.2020.** Additive biomanufacturing with collagen inks . Bioengineering, 7(3):66.

4- **Subhan, F., Hussain, Z., Tauseef, H., Shehzad, A., and Wahid, F. 2021.** A review on recent advances and applications of fish collagen, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 61(6), 1027-1037.

5- **Lutfee, T., Alwan, N. F., Alsaffar, M. A., Ghany M.A.R.A., Mageed, A.K., and AbdulRazak, A.A. 2021.** Extraction methods, characterization and biomedical applications of collagen: a review, Chemical Papers, 75:6025-6033.

6- **Nagai, T. and N. Suzuki, 2000**. Isolation of collagen from fish waste material skin, bone and fins. Food Chemistry, 68(3): 277-281.

7- **Post, W., Kuijpers, L.J., Zijlstra, M., Zee, M.V.D., and Molenveld, K. 2021.** Effect of mineral fillers on the mechanical properties of commercially available biodegradable polymers, Polymers 13 (3):394.

8- **Sakura, S., and Fujimoto, D. 1984**. Absorption and fluorescence study of tyrosine derived crosslinking amino acids from collagen. Photochemistry and Photobiology, 40 (6): 731-734.

9- **Su, D., Wang, C., Cai, S., Mu, C., Li, D., and Lin, W. 2012**. Influence of palygorskite on the structure and thermal stability of collagen. Applied Clay Science, 62 (6): 41-46.

10- **Suryawanshi, V. D., Walekar, L. S., Gore, A. H., Anbhule, P. V., and Kolekar, G. B. 2016**. Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. Journal of Pharmaceutical Analysis, 6 (1): 56-63.

11- **Tanaka, M., Y.-i. Koyama, and Y. Nomura, 2009**. Effects of collagen peptide ingestion on UV-B-induced skin damage. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 73(4): 930-932.

12- **Van Oss, C. J., Wu, W., Giese, R. F., and Naim, J. O. 1995**. Interaction between proteins and inorganic oxides -Adsorption of albumin and its desorption with a complexing agent. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 4 (3): 185-189.

13- **Veselsky, J. C., Kwiecinska, B., Wehrstein, E., and Suschny, O. 1988**. Determination of uranium in minerals by laser fluorimetry. Analyst. 113 (3): 451-455.

14- **Veselsky, J. C., and Ratsimandresey, Y. 1979.** An investigation of quenching effects in the direct fluorimetric determination of uranium in minerals. Analytica Chimica Acta. 104 (2): 345-353.

Evaluation of IGM and IGG in COVID19

Mohammad Javad Nazari[1*]; Yasser Arefzadeh[2]; Mohammad Reza Jafarpour[3]

1-BS student in Biology Education, Farhangian University, Shahid Rajaei, Urmia
2-Master student of Systematic Plant Biology and Ecology, Ilam University
3-BS student in Biology Education, Farhangian University, Shahid Bahonar, Isfahan

**Corresponding Author Email address: javad.ilam78@gmail.com*

Abstract

Humans have been fighting the epidemic of coronary heart disease for nearly two years. The virus has caused many problems, including threats to human health. Patients with COVID-19 have clinical symptoms such as fatigue, fever, shortness of breath, Myalgia, an unproductive cough, is very similar to the symptoms of other coronavirus infections, including SARS CoV and MERS-CoV. Numerous studies have been performed on patients who have been successful in some cases. To combat this disease, immunoglobulins play an important role in the fight against this disease by their extensive activity in the body of the infected person. Both types of immunoglobulins mentioned in the fight against this disease Diseases are involved, but the role of type G immunoglobulin is greater than the other and they have a longer shelf life in the body for approximately more than 12 weeks. Also, type G immunoglobulin is the largest antibody among other antibodies and is the first antibody in Contact with the corona virus appears and counteracts it, IgG is approximately 75% It shows serum antibodies in humans, so it is higher than other circulating antibodies, which is why it plays a key role in fighting pathogens. In addition, drugs such as chloroquine phosphate or hydroxychloroquine (HCQ) have been able to play a positive role in the treatment and recovery of patients with COVD. Has issued 19. Immunoglobulins are specifically secreted by type B cells against antigens and fall into five major groups: IgM, IgG, IgA, IgD, IgE, and IgG, each of which has specific properties and structures that have a specific type of function. Determines them in the fight against viral agents and antigens.

Keywords: Immunoglobulin, epidemiology of COVID19, structure of COVID19

بررسی IGM و IGG در بیماری COVID19

محمد جواد نظری[۱*]؛ یاسر عارف زاده[۲]؛ محمد رضا جعفرپور[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی آموزش زیست شناسی دانشگاه فرهنگیان شهید رجایی ارومیه

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی گیاهی سیستماتیک و بوم شناسی دانشگاه ایلام

۳- دانشجوی کارشناسی آموزش زیست شناسی دانشگاه فرهنگیان شهید باهنر اصفهان

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: javad.ilam78@gmail.com

چکیده

نزدیک به دو سال است که بشر در حال مبارزه با بیماری همه گیر کرونا می باشد.این ویروس باعث بروز مشکلات عدیده ای از جمله تهدید سلامت انسان ها گشته است ، بیماران مبتلا به COVID-19 علائم بالینی مانند خستگی ، تب ، تنگی نفس ، میالژی ، سرفه غیرمولد از خود نشان می دهند که بسیار شبیه به علائم عفونت دیگر ویروس ها از گروه کرونا ، از جمله SARS CoV و MERS-CoV است.تا کنون اقدامات گسترده ای برای مقابله با این بیماری نظیر تولید واکسن و استفاده از دارو های متعدد برای بیماران صورت گرفته است که در مواردی موفق بوده اند.برای مقابله با این بیماری ایمونوگلوبولین ها با فعالیت گسترده خود در بدن فرد آلوده نقش مهمی را در مبارزه با این بیماری ایفا می کنند.هر دو نوع ایمونوگلوبولین ذکر شده در مبارزه با این بیماری نقش دارند ولی نقش ایمونوگلوبولین نوع G بیشتر از دیگری می باشد و ماندگاری بیشتری در بدن به مدت تقریبی بیش از ۱۲ هفته دارند همچنین ایمونوگلوبولین نوع G بزرگ ترین آنتی بادی در میان سایر آنتی بادی ها می باشد و اولین آنتی بادی می باشد که در تماس با ویروس کرونا ظاهر می شود و با آن مقابله می کند ، IgG تقریباً ۷۵٪ آنتی بادی های سرم را در انسان نشان می دهد ، بنابراین از سایر آنتی بادی های در گردش خون بالاتر است که همین موضوع سبب شده است نقش اصلی را در مبارزه با عوامل بیماری زا ایفا کند. در ضمن دارو هایی مانند کلروکین فسفات یا هیدروکسی کلروکین (HCQ) توانسته اند نقش مثبتی در درمان و بهبودی بیماران مبتلا به کوید ایفا کنند از طرفی رمدسیور هم دارو موثری شناخته شده دیگری است که سازمان بهداشت جهانی مجوز مصرف آن برای افراد بیمار مبتلا به کوید ۱۹ صادر کرده است. ایمونوگلوبولین ها به طور خاص توسط سلول های نوع B در برابر آنتی ژن ها ترشح می شوند و شامل پنج گروه عمده : IgM، IgG، IgA، IgD، IgE و IgG می باشند که هرکدام ویژگی های مخصوص و ساختار ویژه ای دارند که نوع عملکرد آنها را در مبارزه با عوامل ویروسی و آنتی ژن ها تعیین می کند.

واژگان کلیدی: ایمونوگلوبولین، اپیدمیولوژی COVID19، ساختار COVID19.

۱.مقدمه

در دو دهه گذشته ، از ابتدای قرن ۲۱ ، بشر به میکروب های آلوده به ویروس کرونا آلوده شده است. به عنوان مثال ، SARS و COVID19. بنابراین ، این ویروس ها امروزه مشکلات زیادی را برای انسان ایجاد کرده اند. COVID19 در دستگاه تنفسی انسان باعث بیماری می شود. میزان انتقال بیماری از انسان به انسان واقعاً زیاد است ، بنابراین ویروس تا زمانی که واکسن در دسترس نباشد در جوامع انسانی مسئله ساز است (۱). در دسامبر ۲۰۱۹ ، کمیسیون بین المللی طبقه بندی ویروس اعلام کرد ویروس کرونا ویروس ۲ (سندرم حاد تنفسی) (SARS_COV_2) نامیده می شود (۲). در حال حاضر ، COVID-19 در بسیاری از کشورهای جهان گسترش یافته است (۳). اولین علائم این بیماری در اواخر دسامبر ۲۰۱۹ مشاهده شد ، زمانی که بیماران مبتلا به سرفه ، تب و تنگی نفس با سندرم دیسترس تنفسی حاد (ARDS) گزارش شد که یک عفونت میکروبی ناشناخته در ووهان ، چین دارند (۴).

۱-۱ انواع متداول ویروس کرونا

ویروس های کرونا ویروس از زیر خانواده Coronavirinae در خانواده Coronaviridae هستند. شیوع و میزان شیوع آن در ویروس های کرونا متفاوت است. در حال حاضر هفت نوع ویروس کرونا کشف شده است که قادر به آلوده سازی انسان هستند.

۱. E۲۲۹ (نوع آلفا)

۲. NL63 (نوع آلفا)

۳. OC43 (نوع بتا)

۴. HKU1 (نوع بتا)

COVID 19 نیز بخشی از این خانواده است و اخیراً در جوامع شروع به گردش کرده است (۵).

۲. نتایج و بحث

۲-۱ علائم بیماری و اپیدمیولوژی

بیماران مبتلا به COVID-19 علائم بالینی مانند خستگی ، تب ، تنگی نفس ، میالژی ، سرفه غیرمولد ، کاهش تعداد لکوسیت ها و شواهد رادیوگرافی از علائم مشابه ذات الریه را نشان دادند (۶). که بسیار شبیه به علائم عفونت ویروس کرونا ، از جمله SARS CoV و MERS-CoV است (۷). اولین علائم این بیماری در بازار غذاهای دریایی دریای چین جنوبی در ووهان بود ، بنابراین اعتقاد بر این بود که COVID-19 احتمالاً از حیوانات وحشی فروخته شده در بازار گرفته شده است (۸). از ۵ ژوئن سال ۲۰۲۰ ، بیش از شش میلیون مورد در سراسر جهان دیده ایم. با آلوده شدن دستگاه تنفسی ، ویروس در نهایت علائمی شبیه خفگی و در نهایت مرگ ایجاد می کند. با از بین بردن سلولهای دیواره ریه ، باعث خفگی تدریجی می شوند. ریه سفید نشان داد که فرد آلوده است و نیاز به درمان فوری دارد (۹).

۲-۲ ساختار

شناخت ساختار ویروس می تواند به ما کمک کند تا واکسن یا درمان موقتی را بدست آوریم ، بنابراین با مطالعه ساختار آن می توان به خواص فنوتیپی و بیماری زایی آن دست یافت. ساختار COVID-19 متعلق به تیره بتاکوروناویروس است که توالی COVID19 آن شباهت زیادی به ویروس های کرونا ویروس مرتبط با سندرم حاد تنفسی (SARSr-CoV) دارد. (۱۰) COVID-19 یک ذره پر شکل است که حاوی یک RNA تک رشته با نوکلئوپروتئین در داخل یک کپسید متشکل از پروتئین ماتریس است. سایر ویروسهای کرونا نیز در ساختار خود حاوی پروتئین آگلوتینین استراز (HE) هستند (۱۱). انواع مختلفی از توالی های پروتئینی در ژنوم های ویروسی شناسایی شده است که پروتئین های مختلف ساختاری و غیر ساختاری را رمزگذاری می کنند. پروتئین های غیر ساختاری مانند ORF3a، ORF7a و ORF8 به عنوان پروتئین های محیطی در پاتوژنز ویروسی عمل می کنند. پروتئین های ساختاری مانند RNA پلیمراز به RNA (RdRp) ، پروتئین سنبله (S) ، پروتئین پاکت (E) ، پروتئین غشایی (M) ، پروتئین نوکلئوکپسید ، ۵ 'UTR و ۳' UTR بستگی دارد (۱۲). رفتار واکسیناسیون احتمالاً بهترین گزینه برای کنترل COVID-19 است. بررسی اپی تلیوم ، mRNA و واکسن ها بر اساس ساختار پروتئین RBD به طور گسترده آغاز شده است و ما به طور طبیعی منتظر نتیجه ای در این زمینه هستیم (۱۳ ، ۱۴). برای ساخت واکسن ، SARS-CoV-2 به سرعت با استفاده از یک بستر ژنتیکی مصنوعی بازسازی می شود و این پیشرفت فنی گامی موثر در تولید واکسن است (۱۵). تا به امروز ، ۵ ژوئن ۲۰۲۰ ، هیچ واکسن یا داروی مثری برای درمان ویروس شناسایی نشده است ، اگرچه برخی از داروهای گزارش شده مانند کلروکین تأثیر مثبتی بر بیماران داشته اند (۱۶). امروزه واکسن های مختلفی از جمله واکسن ها در حال آزمایش هستند. برخی از SARS-CoV-2 در حال حاضر تحت آزمایشات بالینی قرار دارند. تهیه واکسن دشوار است و ممکن است طولانی شود (۱۷ ، ۱۸). از جمله داروهای توصیه شده برای درمان COVID19 می توان به کلروکین ، رامسدر ، لپیناویر ، ریباویرین یا ریتوناویر اشاره کرد. نشان داده شده است که عفونت استافیلوکوک در مهار اولین مرحله از چرخه ویروسی MERS coronarivus در سلولهای انسانی مثر است. (۱۹) از بین داروهای پیشنهادی برای این ویروس ، کلروکین فسفات یا هیدروکسی کلروکین (HCQ) بیشترین تأثیر مثبت را بر روی بیماران داشت ، به طوری که در مراحل اولیه بیماری عملکرد قابل قبول تری نسبت به سایر داروها نشان داد. کلروکین همچنین ممکن است از پیشرفت شدید بیماری جلوگیری کند (۲۰).

ایمونوگلوبولین ها گروهی از مولکول های بیولوژیکی هستند که در سیستم ایمنی بدن فعال هستند. ایمونوگلوبولین ها به طور خاص توسط سلول های نوع B در برابر آنتی ژن ها ترشح می شوند. ایمونوگلوبولین ها بر اساس خواص فیزیکی ، شیمیایی و ایمنی بدن به پنج گروه اصلی تقسیم می شوند (۲۱). این پنج گروه عبارتند از: IgM، IgG، IgA، IgD و IgE. IgG را می توان به چهار زیر کلاس IgG1، IgG2، IgG3 و IgG4 تقسیم کرد که هر یک از آنها دارای ویژگی های بیولوژیکی خاص خود هستند (۲۲).

۲-۳ ایمونوگلوبولین چیست؟

ایمونوگلوبولین می تواند از خون افراد گرفته شود تا بتواند از طریق سرم انسان (سرمی که از خون حداقل ۱۰۰۰ اهدا کننده خون گرفته می شود) به صورت داخل وریدی تصفیه شود. خون آنها از نظر HIV، HBV و HCV آزمایش می شود. این محصول باید

حداقل ۹۰٪ IgG سالم داشته باشد و دارای غلظت های زیر گروه IgG در غلظت فیزیولوژیکی و همچنین توانایی صحیح اسپونی شدن باشد. علاوه بر این ، باید آلاینده هایی مانند آنزیم های وازوآکتیو ، IgA ، کمپلکس های پروتئینی ، اندوتوکسین ها و عوامل عفونی در طی فرآیند تولید از بین بروند (۲۳ ، ۲۴). ایمونوگلوبولین G (IgG) نوعی آنتی بادی است. IgG تقریباً ۷۵٪ آنتی بادی های سرم را در انسان نشان می دهد ، بنابراین از سایر آنتی بادی های در گردش خون بالاتر است (۲۵). انواع IgG بیش از ۳۲٪ شبیه به توالی اسیدهای آمینه است ، اما هر زیر کلاس دارای ویژگی های منحصر به فردی در تشکیل مجتمع های ایمنی ، فعال سازی مکمل ، اتصال به آنتی ژن ها ، فعال سازی سلول های اجرایی ، نیمه عمر و عبور از جفت است (۲۶) . ایمونوگلوبولین M (IgM) یکی از پنج گروه ایمونوگلوبولین های تولید شده توسط مهره داران است. IgM بزرگترین آنتی بادی در میان سایر آنتی بادی ها است و اولین آنتی بادی است که در تماس با آنتی ژن ها ظاهر می شود (۲۷ ، ۲۸). در انسان و سایر پستانداران ، محل اصلی تولید IgM طحال و سلولهای پلاسما مسئول تولید آنتی بادی است (۲۹ ، ۳۰). ساختار IgM و IgG: به طور کلی ، ایمونوگلوبولین ها از دو زنجیره اسید آمینه سبک و سنگین تشکیل شده اند. از نظر تعداد اسیدهای آمینه ، مثال IgM را می توان ۵۷۶ اسید آمینه در یک زنجیره سنگین بیان کرد (۳۱).

۲-۴ عملکرد IgG و IgM در برابر بیماری COVID19

ایمونوتراپی با استفاده از ترکیبی از داروهای ضد ویروسی و igG می تواند هم در درمان و هم در تقویت پاسخ ایمنی انسان به ویروس موثر باشد (۳۲/۳۳). Iggs شامل دو جز functional عملکردی است: 2 (′ ab) F. وظیفه آن شناسایی آنتی ژن و قسمت بلوری (Fc) است که مسئول فعال سازی پاسخ ایمنی است. علاوه بر این ، واکسن ها و میکروارگانیسم ها مانند COVID19 در تولید IgG برای مبارزه با میکروارگانیسم های مختلف موثر هستند (۳۴). به طور معمول ، IgG در برابر ویروس کرونا افزایش می یابد و تا زمان سرکوب بیماری زیاد است. روز ۷ در دوره ۱۵-۳۹ روزه به ۴۵.۵٪ کاهش می یابد (۳۵). مشاهدات و برخی معاینات کمکی ، مانند تشخیص اسید نوکلئیک ، سی تی اسکن ، سطح igg و igm می تواند در تشخیص بالینی این ویروس به ما کمک کند. طبق مشاهدات ، ماندگاری IgG بالاتر از IgM است به طوری که IgM پس از ۱۲ هفته ناپدید می شود ، بنابراین آنتی بادی های IgG می توانند از نظر زمان عملکرد بهتری نسبت به IgM داشته باشند (۳۶) آنتی بادی IgM و IgG برای SARS-CoV2 را می توان با روش IC تشخیص داد (۳۷) .

دستگاه تنفسی تحتانی تصور می شودبیشتر توسط IgG محافظت می شود ، و دستگاه تنفسی فوقانی بیشتر توسط IgA ترشحی محافظت می شود. عفونت طبیعی با ویروس های تنفسی هم پاسخ ایمنی سیستمیک و هم پاسخ ایمنی مخاطی را ایجاد می کند که به ترتیب تحت تأثیر IgG و IgA است(۳۸).

۳. نتیجه‌گیری

با توجه به این نکته که ویروس کرونا انواع مختلفی مانند نوع آلفا و بتا دارد به این نتیجه رسیدیم که این تنوع می تولند برای دستیابی به یک واکسن ثابت مشکل ساز و سخت باشد ولی با توجه نمونه های مشابه این ویروس مانند ویروس سارس و تشابهات آن با COVID 19 می توان به دستیابی به واکسن موثر امیدوار بود.برای مقابله فرد بیماری که به این ویروس مبتلا شده است درمان های مختلفی وجود دارد که می توان به ایمنوتراپی با استفاده از دارو های ضد ویروسی و IGG اشاره کرد ایمنوگلوبولین ها نقش اساسی را در مبارزه با این ویروس و خنثی سازی آن دارند بطوری که بعد از مقابله آنها با آنتی ژن باعث دی اکتیو شدن آنها می گردند همچنین این ایمنوگلوبولین های ساخته شده تا حدود ۱۲ هفته در بدن فرد حضور دارند و از ابتلای مجدد فرد به ویروس کرونا ممانعت می کنند.

.

منابع

1. P. Zhou, X.L. Yang, X.G. Wang, et al., A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin, Nature (2020), https://doi.org/ 10.1038/s41586-020-2012-7.
2. E. de Wit, N. van Doremalen, D. Falzarano, et al., SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses, Nat. Rev. Microbiol. 14 (2016) 523e534, https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.81.

3. J.T. Wu, K. Leung, G.M. Leung, Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study, Lancet (2020), https://doi.org/10.1016/ S0140-6736(20)30260-9.
4. characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding, Lancet (2020), https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
5. Unhale, S. S., Ansar, Q. B., Sanap, S., Thakhre, S., & Wadatkar, S. (2020). a Review on Corona Virus (Covid-19). World J. Pharm. Life Sci, 6(4), 109-115.
6. C. Huang, Y. Wang, X. Li, et al., Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China, Lancet (2020), https://doi.org/10.1016/ S0140-6736(20)30183-5.
7. J.S. Peiris, Y. Guan, K.Y. Yuen, Severe acute respiratory syndrome, Nat. Med. 10 (2004) S88eS97, https://doi.org/10.1038/nm1143.

8. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature. 2020;579(7798):270-273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.
9. Convissar, D., Gibson, L. E., Berra, L., Bittner, E. A., & Chang, M. G. (2020). Application of Lung Ultrasound During the Coronavirus Disease 2019 Pandemic: A Narrative Review. Anesthesia and Analgesia.
10. . Seah I, Agrawal R. Can the coronavirus disease 2019 (COVID-19) affect the eyes? A review of coronaviruses and ocular implications in humans and animals. Ocul Immunol Inflamm 2020: 1e5.
11. . de Haan CAM, Kuo L, Masters PS, Vennema H, Rottier PJM. Coronavirus particle assembly: primary structure requirements of the membrane protein. J Virol 1998;72(8):6838e50.
12. Zhu N, Zhang D, Wang et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. N Engl J Med 2020;382:727– 33.
13. Sun, C.; Chen, L.; Yang, J.; Luo, C.; Zhang, Y.; Li, J.; Yang, J.; Zhang, J.; Xie, L. SARS-CoV-2 and SARS-CoV Spike-RBD Structure and Receptor Binding Comparison and Potential Implications on Neutralizing Antibody and Vaccine Development. bioRxiv 2020. [CrossRef].

14. Abdelmageed, M.I.; Abdelmoneim, A.H.; Mustafa, M.I.; Elfadol, N.M.; Murshed, N.S.; Shantier, S.W.; Makhawi, A.M. Design of multi epitope-based peptide vaccine against E protein of human 2019-nCoV: An immunoinformatics approach. bioRxiv 2020. [CrossRef].
15. NhuThao, T.T.; Labroussaa, F.; Ebert, N.; V'kovski, P.; Stalder, H.; Portmann, J.; Kelly, J.; Steiner, S.; Holwerda, M.; Kratzel, A.; et al. Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. bioRxiv 2020. [CrossRef].
16. : A. Cortegiani, G. Ingoglia, M. Ippolito, et al., A systematic review on the efficacy and safety of chloroquine for the treatment of COVID-19, Journal of Critical Care, https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2020.03.005.
17. Ministry of National Defense of the People's Republic of China. The Military Successfully Developed a Recombinant SARS-CoV-2 Vaccine. Available online: http://www.mod.gov.cn/topnews/2020-03/17/content_ 4862066.htm: (accessed on 17 March 2020).
18. American Moderna Vaccine enters Clinical Trial. Available online: https://www.modernatx.com/modernaswork-potential-vaccine-against-covid-19 (accessed on 23 March 2020).
19. Baron, S. A., Devaux, C., Colson, P., Raoult, D., & Rolain, J. M. (2020). Teicoplanin: an alternative drug for the treatment of coronavirus COVID-19. Int J Antimicrob Agents, 105944(10.1016).
20. Rajib Dutta. "COVID-19 Treatment-Review of All Published Literatures till Date". Acta Scientific Microbiology 3.4 (2020): 215-219.
21. Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 6th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2009 . p. 131-50.S.A. Fattah, T.M. Fahim, N. El-Fatih, Egyptian Journal of Hospital Medicine (Oct. 2011), 45 (2011) 415.
22. Schroeder Jr, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 125(2), S41-S52.
23. ASHP commission on therapeutics. ASHP therapeutic guidelines for intravenous immunoglobulin. Clin Pharm 1992; 11: 117-36.
24. Steele R, Burks W, Williams L. Intravenous immunoglobulin, New clinical application. Ann Allergy 1988; 60: 89- 95.
25. Vidarsson, Gestur; Dekkers, Gillian; Rispens, Theo (2014). "IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions". Frontiers in Immunology. **5**: 520. doi:10.3389/fimmu.2014.00520. ISSN 1664-3224. PMC 4202688. PMID 25368619
26. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. Front Immunol. Frontiers Media SA 2014; 5: 520.
27. "Immunoglobulin M". The American Heritage Dictionary of the English Language (Fourth ed.). Houghton Mifflin Company. 2004. ISBN 978-0618082308
28. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Walter, P.; Raff, M.; Roberts, K. (2002). "Chapter 24". Molecular Biology of the Cell (4th ed.). Routledge. ISBN 978-0-8153-3288-6.
29. Capolunghi, F.; Rosado, M. M.; Sinibaldi, M.; Aranburu, A.; Carsetti, R. (2013). "Why do we need IgM memory B cells?". Immunology Letters. **152** (2): 114–20. doi:10.1016/j.imlet.2013.04.007. PMID 23660557.
30. Williams, N.; O'Connell, P. R. (2008). "Chapter 62". Bailey & Love's Short Practice of Surgery (25th ed.). CRC Press. p. 1102. ISBN 9780340939321.
31. Monica, T. J.; Williams, S. B.; Goochee, C. F.; Maiorella, B. L. (1995). "Characterization of the glycosylation of a human IgM produced by a human-mouse hybridoma". Glycobiology. **5**(2): 175–185. doi:10.1093/glycob/5.2.175. PMID 7780192.
32. Pyrc, K.; Bosch, B.J.; Berkhout, B.; Jebbink, M.F.; Dijkman, R.; Rottier, P.; van der Hoek, L. Inhibition of human coronavirus NL63 infection at early stages of the replication cycle. Antimicrob. Agents Chemother. 2006, 50, 2000–2008, doi:10.1128/AAC.01598-05.

33. Rao, S.; Sasser, W.; Diaz, F.; Sharma, N.; Alten, J. Coronavirus Associated Fulminant Myocarditis Successfully Treated With Intravenous Immunoglobulin and Extracorporeal Membrane Oxygenation. Crit. Care 2014, 146, 336A, doi:https://doi.org/10.1378/chest.1992018.
34. Jawhara, S. (2020). Could Intravenous immunoglobulin collected from recovered coronavirus patients protect against COVID-19 and strengthen the immune system of new patients?. International journal of molecular sciences, 21(7), 2272.
35. Jacofsky, D., Jacofsky, E. M., & Jacofsky, M. (2020). Understanding Antibody Testing for COVID-19. The Journal of Arthroplasty.
36. Li, X., Geng, M., Peng, Y., Meng, L., & Lu, S. (2020). Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. Journal of Pharmaceutical Analysis.
37. Imai, K., Tabata, S., Ikeda, M., Noguchi, S., Kitagawa, Y., Matuoka, M., ... & Maeda, T. (2020). Clinical evaluation of an immunochromatographic IgM/IgG antibody assay and chest computed tomography for the diagnosis of COVID-19. Journal of clinical virology, 128, 104393.
38. Aygün, D., Önal, P., Apaydın, G., & Çokuğraş, H. (2021). Coronavirus infections in childhood and vaccine studies. Turkish Archives of Pediatrics, 56(1), 10.

Studying the role of KNOX/BELL transcription factors in activation of cytokinin signaling in nodules

Mahboobeh Azarakhsh[1*]

۱-Assistant professor, cell and molecular biology department, faculty of basic science, Kosar University of Bojnord

*mahboobeazarakhsh@gmail.com

Abstract

KNOX transcription factors belong to the TALE protein superfamily and play an important role in maintaining meristem activity. In Shoot Apical Meristem (SAM), KNOX transcription factors often act by interacting with another group of TALE proteins called the BELL protein family. KNOX transcription factors in SAM are involved in the activation of cytokinin biosynthesis genes. Cytokinin also plays an important role in the formation of nitrogen-fixing nodules on the roots. It was shown that activation of cytokinin signaling during nodule formation can occur similar way to SAM, i.e. through KNOX transcription factors. The aim of this study was to investigate the possibility of KNOX and BELL interaction during nodule formation in Medicago truncatula. So the expression of different BELL genes during nodule formation was and the possibility of their coexpression with KNOX3 gene in different nodule regions was investigated. The results show activation of expression of two genes Medtr8g078480, Medtr8g098815 during nodule formation. The expression pattern of these genes as well as their interaction using molecular docking methods show that these two proteins can interact with each other and thus activate cytokinin signaling during nodule formation.

Keywords: TALE proteins, Transcription factors, KNOX, BELL and Cytokinin

مطالعه نقش فاکتورهای رونویسی KNOX/BELL در فعال کردن سیگنالینگ سیتوکینین در گره‌های تثبیت نیتروژن

محبوبه آذرخش[1]*

[1]- استادیار گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کوثر بجنورد

mahboobeazarakhsh@gmail.com *

چکیده

فاکتورهای رونویسی KNOX به ابرخانواده پروتئین‌های TALE تعلق دارند و نقش مهمی در حفظ فعالیت مریستم دارند. در مریستم راسی, فاکتورهای رونویسی KNOX غالبا از طریق برهمکنش با گروه دیگری از پروتئین‌های TALE به نام خانواده پروتئین‌های BELL عمل می‌کنند. فاکتورهای رونویسی KNOX در مریستم راسی, در فعال شدن ژن‌های بیوسنتز سیتوکینین نقش دارند. هورمون سیتوکینین همچنین در تکوین گره‌های تثبیت نیتروژن (نودول) در ریشه نقش مهمی دارند. نشان‌داده‌شده که فعال شدن سیگنالینگ سیتوکینین در طی تکوین نودول می‌تواند مشابه مریستم راسی از طریق فاکتورهای رونویسی KNOX اتفاق بیفتد. هدف از این پژوهش بررسی احتمال برهمکنش پروتئین‌های KNOX و BELL در طی تکوین نودول در گیاه Medicago truncatula می‌باشد. با این هدف بیان ژن‌های مختلف BELL در طی تکوین نودول مورد ارزیابی قرار گرفت و امکان بیان همزمان آنها با ژن KNOX3 در نواحی مختلف نودول بررسی شد. نتایج حاصله افزایش بیان دو ژن Medtr8g078480, *Medtr8g098815* را در طی تکوین نودول نشان می‌دهند. الگوی بیان مشابه این ژن‌ها و همچنین برهمکنش آنها به کمک روش های داکینگ مولکولی نشان می‌دهد که این دو پروتئین می‌توانند در طی تکوین نودول با هم برهمکنش داشته‌باشند و از این طریق باعث فعال شدن سیگنالینگ سیتوکینین شوند.

واژگان کلیدی: پروتئین‌های TALE, فاکتورهای رونویسی, KNOX, BELL و سیتوکینین

۱.مقدمه

ابر خانواده فاکتورهای رونویسی TALE (three-amino-acid-loop-extension) پروتئین‌های حاوی هومئودومین هستند که نقش مهمی در تنظیم فعالیت مریستم دارند. این خانواده شامل فاکتورهای رونویسی KNOX (KNOTTED-like) و BELL (BEL1-like) می‌باشد. فاکتورهای رونویسی KNOX غالبا به صورت هترودیمر با پروتئین‌های BELL و یا به صورت همودیمر در تنظیم جنبه‌های مختلفی از مورفوژنز گیاه نقش‌دارند (Hay et al., 2010 ; Bellaoui et al., 2001). برهمکنش بین KNOX و BELL در قرارگرفتن آنها در داخل هسته (nuclear localization), تمایل آنها برای اتصال به DNA نقش‌دارند (Smith et al., 2002; Rutjens et al., 2009; Kim et al., 2013). ژن‌های KNOX در حفظ حالت غیر تمایز یافته سلول‌های مریستمی از طریق تنظیم هورمون‌های جیبرلین و سیتوکینین نقش‌دارند (Sakamoto et al., 2001; Chen et al., 2004; Jasinski et al., 2005). هورمون

سیتوکینین همچنین نقش مهمی در تکوین گره‌های تثبیت نیتروژن (نودول) دارند, به طوری که افزایش بیان ژن رسبتور سیتوکینین باعث ایجاد نودول خودبخودی در غیاب باکتری می‌شود (Tirichine et al., 2007). در پژوهش‌های قبلی مان نشان دادیم که فعال‌شدن سیگنالینگ سیتوکینین در طی تکوین نودول می‌تواند از طریق فاکتورهای رونویسی KNOX صورت‌پذیرد (Azarakhsh et al., 2015; Azarakhsh et al., 2020). بر اساس مطالعات صورت گرفته, از بین ژن‌های *KNOX* در گیاه Medicago truncatula بیان ژن KNOX3 بیشتر از سایر انواع KNOX در طی تکوین نودول افزایش نشان می‌دهد (Azarakhs et al.,2015). بعلاوه افزایش بیان ژن (Over expression) KNOX3 باعث افزایش بیان ژن‌های بیوسنتز سیتوکینین (IPT: isopentenyl transferase) و ایجاد نودول خودبخودی در غیاب باکتری می‌شود (Azarakhsh et al., 2015) از طرفی کاهش بیان ژن KNOX3 نیز باعث کاهش بیان ژن‌های بیوسنتز سیتوکینین می‌شود. بعلاوه هومئودومین فاکتور رونویسی KNOX3 قادراست تا به توالی‌های تنظیمی در پروموتر این ژن‌های بیوسنتز سیتوکینین متصل شوند (Azarakhsh et al., 2020). نشان داده شده که فاکتورهای رونویسی KNOX در مریستم از طریق برهمکنش با پروتئین‌های خانواده BELL به توالی تنظیمی در پروموتر ژن‌های هدف متصل میشود (Hay et al., 2010). بر همین اساس در این مطالعه علاوه بر بررسی بیان ژن‌های BELL در گیاه Medicago truncatula, امکان بیان همزمان این ژن ها با ژن KNOX3 و همچنین امکان برهمکنش میان آنها به کمک روش‌های بیوانفورماتیکی مورد بررسی قرار گرفت.

۲.مواد و روش‌ها

۲-۱-آنالیز بیان ژن به کمک داده های ترانسکریپتوم و Real time PCR

آنالیز داده‌های ترانسکریپتوم در پایگاه دادهای اطلس بیان ژن Medicago truncatula (https://mtgea.noble.org/v3/experiments.php) و همچنین در سیمبیمیکس (https://iant.toulouse.inra.fr/symbimics/) انجام شد.

ریشه‌های گیاه Medicago truncatula بوسیله باکتری Sinorhizobium meliloti تلقیح شدند و به فواصل زمانی مختلف (dpi: day post inoculation) ریشه‌های تلقیح شده جمع آوری شدند. به عنوان کنترل, ریشه‌هایی که تلقیح باکتری برای آنها انجام نشد, مورد استفاده قرار گرفتند. استخراج RNA از نمونه‌های جمع آوری شده به کمک RNeasy Plant Mini Kit (Qiagene, Germany) صورت گرفت. حذف DNA به کمک Rapid Out DNA Removal Kit (Thermo Fisher Scientific, United States) صورت گرفت. سنتز cDNA به کمک Revert Aid Reverse Transcriptase kit (Thermo Fisher Scientific, United States) انجام شد.

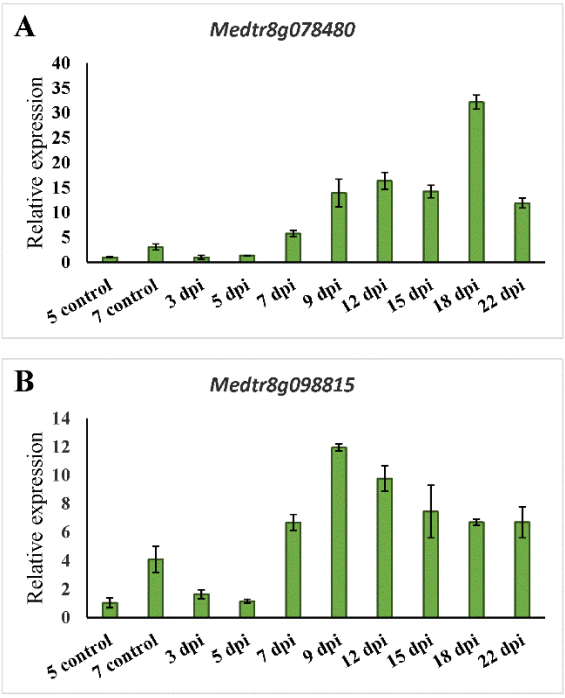
واکنش زنجیره ای پلیمراز به کمک دستگاه Real time PCR CFX-96 (BioRad, US) انجام شد. داده‌های حاصل به کمک روش $\Delta\Delta Ct$-۲ (Livak and Schmittgen 2001) مورد آنالیز قرار گرفتند.

۳. نتایج و بحث

۳-۱-شناسایی ژن‌های BELL در گیاه Medicago truncatula و آنالیز بیان آنها

به کمک توالی ژن‌های BELL در گیاه آرابیدوپسیس(Smith et al., 2014) و به کمک الگوریتم Blast در پایگاه داده ای فیتوزوم (https://phytozome.jgi.doe.gov), توالی ۱۴ ژن BELL شناسایی شدند. بیان این ژن‌ها به کمک آنالیز داده‌های ترانسکریپتوم

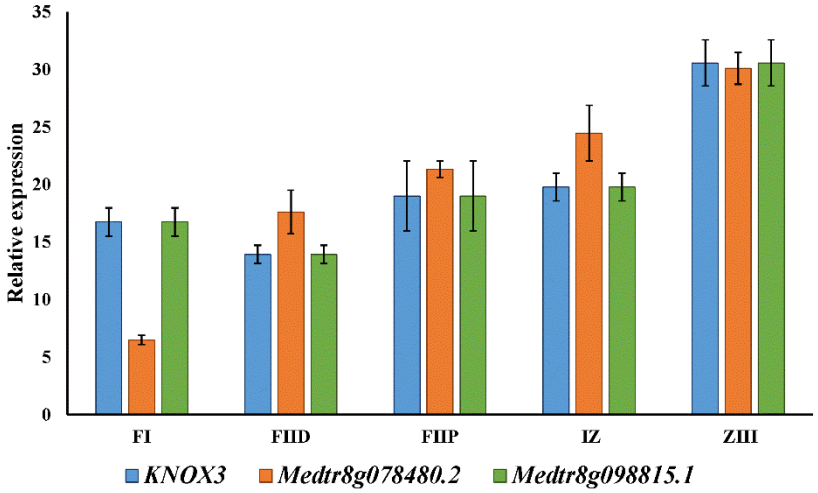
مورد ارزیابی قرار گرفت. در تمام آزمایشات از بین این ۱۴ ژن, افزایش بیان سه ژن Medtr8g078480, Medtr8g098815 و Medtr7g106320 در طی تکوین نودول در مقایسه با ریشه مشاهده شد. در مرحله بعد بیان این ژن‌ها به کمک تکنیک real time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت و افزایش بیان دو ژن Medtr8g078480, Medtr8g098815 تایید شد (شکل ۱).



شکل ۱: بررسی بیان ژن‌های Medtr8g078480, Medtr8g098815 در مراحل مختلف تکوین نودول (dpi: day post inoculation) در مقایسه با ریشه (control).

۲-۳-بررسی بیان همزمان ژن KNOX3 با ژن‌های BELL

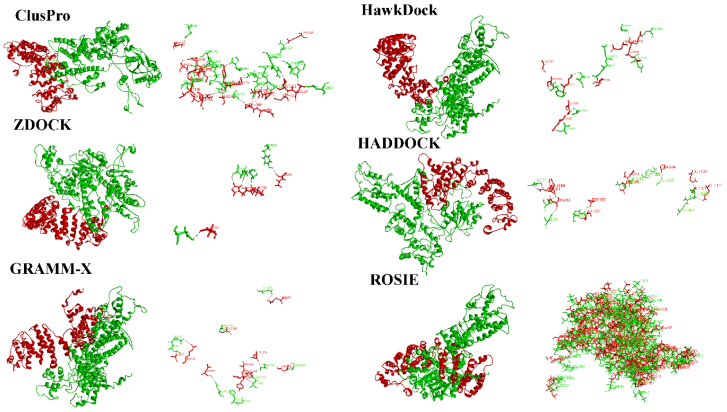
بررسی ژن‌هایی که به صورت همزمان با ژن KNOX3 بیان می‌شوند (https://mtgea.noble.org/v3/correlation_search_form.php) نشان داد که در بین این ژن‌ها, ژن Medtr8g078480 که بیشترین افزایش بیان در نودول را در این مطالعه نشان داده است, دیده می‌شود. علاوه بر این بررسی بیان ژن‌های KNOX3, Medtr8g078480 و Medtr8g098815 در پایگاه داده ای سیمبیمیکس (https://iant.toulouse.inra.fr/symbimics/) نشان داد که این سه ژن الگوی بیانی مشابهی را در مناطق مختلف نودول (Meristematic zone (FI), distal and proximal infection zone (FIId and FIIp), inter-zone (IZ) and fixation zone (ZIII).)) نشان می‌دهند (شکل ۲).



شکل ۲: بررسی بیان همزمان ژن KNOX3 و ژن‌های BELL در نواحی مختلف نودول شامل Meristematic zone (FI), distal and proximal infection zone (FIId and FIIp), inter-zone (IZ) and fixation zone (ZIII).

۳-۳-بررسی امکان برهمکنش پروتئین‌های KNOX3 و BELL (*Medtr8g078480*)

از آنجایی که اطلاعاتی در خصوص ساختار سه بعدی پروتئین KNOX3 و Medtr8g078480 وجود ندارد, ساختار سه بعدی این پروتئین‌ها به کمک سرور I-TASSER بدست آمد (zhang et al., 2008). احتمال برهمکنش دو پروتئین به کمک متدهای داکینگ مختلف شامل ClusPro (Kozakov et al., 2017), ZDOCK (Pierce BG et al., 2014), HawkDock (Weng et al.,2019), HADDOCK (Dominguez et al., 2003; van Zundert et al., 2016), GRAMM-X (Tovchigrechko et al., 2006), ROSETTA (Lyskov et al., 2013) مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳). پیوندهای هیدروژنی موجود به کمک نرم افزار BIOVIA Discovery Studio Visualizer شناسایی شدند.



شکل ۳ : برهمکنش بین دو پروتئین KNOX3 و Medtr8g078480 با استفاده از سرورهای داکینگ مختلف و نمایش پیوندهای هیدروژنی بین دو پروتئین در هر مدل

به جهت ارزیابی انرژی پیوند بین دو پروتئین روش‌های مختلفی برای پیشبینی انرژی پیوند بین دو پروتئین شامل PPA-Pred (Yugandhar et al., 2014), PRISM (Tuncbag et al., 2011; Baspinar et al., 2014) و PRODIGY (Xue et al., 2016; Vangone et al., 2015) برای محاسبه انرژی آزاد گیبس مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱).

جدول ۱: تغییرات در انرژی آزاد گیبس ($\Delta\Delta G$) برای هترودیمر $KNOX_3$-BELL

	ΔΔG (binding free energ) kcal/mol					
Protein-Protein	PPA-Pred	PRISM	PRODIGY			
			ClusPro	ZDOCK	HADDOCK	ROSIE
MtKNOX3-BELL(Medtr8g078480)	-15.07	-31.7	-16.8	-15.1	-14.4	-169.5

۴. نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج بدست آمده در خصوص نحوه بیان ژن Medtr8g078480 و بیان همزمان آن با ژن KNOX3 در طی مراحل تکوین نودول و همچنین در نواحی مختلف نودول و همچنین آنالیز برهمکنش آن با پروتئین KNOX3 به کمک روش‌های داکینگ مولکولی و محاسبه انرژی پیوند آنها, می‌توان نتیجه گیری کرد که مشابه مریستم راسی, برهمکنش پروتئین‌های KNOX3 و Medtr8g078480 در طی تکوین نودول می‌توانند باعث فعال شدن سیگنالینگ سیتوکینین شود.

سپاسگزاری

این پروژه با حمایت مالی مرکز مطالعات و همکاری های علمی بین المللی وزارت علوم تحقیقات و فناوری انجام شده است.

منابع

1. Azarakhsh, M., Kirienko, A. N., Zhukov, V. A., Lebedeva, M. A., Dolgikh, E. A., & Lutova, L. A. (2015). KNOTTED1-LIKE HOMEOBOX 3: a new regulator of symbiotic nodule development. Journal of experimental botany, 66(22), 7181-7195.
2. Azarakhsh, M., Rumyantsev, A. M., Lebedeva, M. A., & Lutova, L. A. (2020). Cytokinin biosynthesis genes expressed during nodule organogenesis are directly regulated by the KNOX3 protein in Medicago truncatula. PloS one, 15(4), e0232352.

3. Bellaoui, M., Pidkowich, M. S., Samach, A., Kushalappa, K., Kohalmi, S. E., Modrusan, Z., ... & Haughn, G. W. (2001). The Arabidopsis BELL1 and KNOX TALE homeodomain proteins interact through a domain conserved between plants and animals. *The Plant Cell*, *13*(11), 2455-2470.
4. Baspinar, A., Cukuroglu, E., Nussinov, R., Keskin, O., & Gursoy, A. (2014). PRISM: a web server and repository for prediction of protein–protein interactions and modeling their 3D complexes. *Nucleic acids research*, *42*(W1), W285-W289.
5. Chen, H., Banerjee, A. K., & Hannapel, D. J. (2004). The tandem complex of BEL and KNOX partners is required for transcriptional repression of ga20ox1. *The Plant Journal*, *38*(2), 276-284.
6. Dominguez, C., Boelens, R., & Bonvin, A. M. (2003). HADDOCK: a protein− protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *Journal of the American Chemical Society*, *125*(7), 1731-1737.
7. Hay, A., & Tsiantis, M. (2010). KNOX genes: versatile regulators of plant development and diversity. Development, 137(19), 3153-3165.
8. Jasinski, S., Piazza, P., Craft, J., Hay, A., Woolley, L., Rieu, I., ... & Tsiantis, M. (2005). KNOX action in Arabidopsis is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Current Biology*, *15*(17), 1560-1565.
9. Kim, D., Cho, Y. H., Ryu, H., Kim, Y., Kim, T. H., & Hwang, I. (2013). BLH 1 and KNAT 3 modulate ABA responses during germination and early seedling development in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *75*(5), 755-766.
10. Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., ... & Vajda, S. (2017). The ClusPro web server for protein–protein docking. *Nature protocols*, *12*(2), 255-278.
11. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. *methods*, *25*(4), 402-408.
12. Lyskov, S., Chou, F. C., Conchúir, S. Ó., Der, B. S., Drew, K., Kuroda, D., ... & Das, R. (2013). Serverification of molecular modeling applications: the Rosetta Online Server that Includes Everyone (ROSIE). *PloS one*, *8*(5), e63906.
13. Pierce, B. G., Wiehe, K., Hwang, H., Kim, B. H., Vreven, T., & Weng, Z. (2014). ZDOCK server: interactive docking prediction of protein–protein complexes and symmetric multimers. *Bioinformatics*, *30*(12), 1771-1773.
14. Rutjens, B., Bao, D., Van Eck-Stouten, E., Brand, M., Smeekens, S., & Proveniers, M. (2009). Shoot apical meristem function in Arabidopsis requires the combined activities of three BEL1-like homeodomain proteins. *The Plant Journal*, *58*(4), 641-654.
15. Smith, H. M., Boschke, I., & Hake, S. (2002). Selective interaction of plant homeodomain proteins mediates high DNA-binding affinity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(14), 9579-9584.
16. Smith, H. M., Campbell, B. C., & Hake, S. (2004). Competence to respond to floral inductive signals requires the homeobox genes PENNYWISE and POUND-FOOLISH. Current Biology, 14(9), 812-817.
17. Sakamoto, T., Kamiya, N., Ueguchi-Tanaka, M., Iwahori, S., & Matsuoka, M. (2001). KNOX homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem. *Genes & development*, *15*(5), 581-590.
18. Tirichine, L., Sandal, N., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Albrektsen, A. S., Sato, S., ... & Stougaard, J. (2007). A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. Science, 315(5808), 104-107.
19. Tovchigrechko, A., & Vakser, I. A. (2006). GRAMM-X public web server for protein–protein docking. *Nucleic acids research*, *34*(suppl_2), W310-W314.
20. Tuncbag, N., Gursoy, A., Nussinov, R., & Keskin, O. (2011). Predicting protein-protein interactions on a proteome scale by matching evolutionary and structural similarities at interfaces using PRISM. *Nature protocols*, *6*(9), 1341-1354.
21. Van Zundert, G. C. P., Rodrigues, J. P. G. L. M., Trellet, M., Schmitz, C., Kastritis, P. L., Karaca, E., ... & Bonvin, A. M. J. J. (2016). The HADDOCK2. 2 web server: user-friendly
22. Vangone, A., & Bonvin, A. M. (2015). Contacts-based prediction of binding affinity in protein–protein complexes. *elife*, *4*, e07454.
23. Weng, G., Wang, E., Wang, Z., Liu, H., Zhu, F., Li, D., & Hou, T. (2019). HawkDock: a web server to predict and analyze the protein–protein complex based on computational docking and MM/GBSA. *Nucleic acids research*, *47*(W1), W322-W330.

24. Xue, L. C., Rodrigues, J. P., Kastritis, P. L., Bonvin, A. M., & Vangone, A. (2016). PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein–protein complexes. *Bioinformatics*, *32*(23), 3676-3678.
25. Yugandhar, K., & Gromiha, M. M. (2014). Protein–protein binding affinity prediction from amino acid sequence. *Bioinformatics*, *30*(24), 3583-3589.
26. Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC bioinformatics*, *9*(1), 1-8.

Application of DPI-VTK dual-peptide in Bone tissue engineering

Hoda Fakhr[1]; Behnaz Bakhshandeh[1*]; Elahe Asadollahi[2]

1- Department of Biotechnology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran
2- Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

* *b.bakhshandeh@ut.ac.ir*

Abstract

Regenerative medicine and tissue engineering attempt to achieve the most effective treatment strategies. Using biodegradable scaffold, appropriate cells, inductive growth factors and suitable mediator molecules is vital to repair and regenerate an organ or tissue in vitro. Cell adhesion is a critical factor in tissue engineering. Increasing the specificity of cell adhesion can increase the effectiveness of cell-based therapies. Application of tissue-specific biomolecules and tissue-specific cells, lead to mimic the extracellular matrix and the regeneration of a living and functional tissue. Previous studies have shown that DPI peptide increases cell division, proliferation, and differentiation, all of which are essential for tissue regeneration.

Other researches have shown that the VTK peptide helps ossification of human mesenchymal stem cells as well as the deposition of mineral biomaterials into ECM. Bone mineralization is basically made of apatite crystals, which ultimately cause the deposition and mineralization of calcium and phosphorus ions on the bone matrix secreted by osteoblasts, and play an important role in bone repair and ossification in vivo. Human bone marrow stem cells and induced pluripotent stem cells are important cellular sources for bone tissue regeneration. Studies have shown that the DPI-VTK dual-peptide is able to anchor to a biomimetic surface and specifically increases the adhesion of these special cells. On the other hand, DPI-VTK dual-peptide is short in length and doesn't stimulate immune responses, as well as it can perform better and more specifically than a full-length protein containing multifunctional domains. Other advantages are easy synthesis, low cost and minimal changes in conformation.

High affinity of DPI-VTK dual-peptide to bone cells, in addition to specific mineralization at the bone injury site, improves differentiation and proliferation of bone cells and mineralization of bone tissue. Due to the increasing demand for bone grafts and the prevalence of bone-related diseases, strategies aimed at producing this dual peptide in the extracellular matrix by bone tissue cells will increase efficiency in bone tissue engineering.

Keywords: DPI-VTK dual-peptide, Regenerative medicine, Stem cell, Bone tissue engineering

در مهندسی بافت استخوان DPI-VTK کاربرد پپتید دوگانه

فخر۱؛ هدی بهناز بخشنده* ؛ الهه اسداللهی۲

۱- گروه زیست فناوری، دانشکدگان علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

b.bakhshandeh@ut.ac.ir *

چکیده

فناوری‌هایی مانند پزشکی بازساختی و مهندسی بافت در تلاش اند تا به موثرترین استراتژی‌های درمانی دست پیدا کنند. فرآیند بازسازی یک بافت در آزمایشگاه با به کارگیری ساختارهای زیست تخریب پذیر به عنوان داربست، گونه‌های سلولی مورد نظر، فاکتورهای رشد و مولکول‌های پیام‌رسان مناسب انجام می‌شود و هدف نهایی آن ترمیم و بازسازی یک اندام یا یک بافت است. چسبندگی سلولی یک هدف مهم در اصلاح زیست مواد برای اهداف مهندسی بافت است. افزایش اختصاصیت چسبندگی سلولی می‌تواند اثربخشی درمان‌های بر پایه سلول را افزایش دهد. تقلید ساختار ماتریکس خارج سلولی و به کارگیری مولکول‌های زیستی القایی ویژه هر بافت و نیز حضور انواع سلول‌های خاص بافت، به بازسازی یک بافت زنده، فعال و دارای عملکرد منجر می شود. طبق مطالعات انجام شده پپتید DPI نه تنها برای چسبندگی سلولهای بنیادی مزانشیمی اختصاصی است، بلکه موجب افزایش توزیع سلولی، تکثیر و تمایز آن‌ها نیز می‌شود که همه این موارد برای بازسازی بافت ضروری می‌باشند. تحقیقات دیگر نشان دادند که پپتید VTK، به تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی به سمت استخوانی شدن و نیز رسوب مواد زیستی معدنی کمک می‌کنند. اصولا ماده معدنی استخوان از کریستال‌های آپاتیت ساخته شده است که در نهایت موجب رسوب و مینرالیزه شدن کلسیم و یون‌های فسفر بر روی ماتریکس استخوانی که از استئوبلاست‌ها ترشح شده است، می‌شود و نقش مهمی در ترمیم استخوان و استخوان زایی در بالین ایفا می‌کند.

سلول‌های بنیادی مغز استخوان انسان و سلول‌های بنیادی پرتوان القایی، منابع سلولی قابل ملاحظه‌ای برای بازسازی بافت استخوان هستند. مطالعات نشان داده‌اند که پپتید دوگانه DPI-VTK قادر به لنگراندازی به یک سطح زیست تقلید است و به طور اختصاصی چسبندگی سلول‌های مذکور را افزایش می‌دهد. از طرف دیگر این پپتید دوگانه، طول کوچکی دارد، پاسخ‌های ایمنی را تحریک نمی‌کند و نسبت به یک پروتئین با طول کامل و شامل دمین‌های چندعملکردی، می‌تواند عملکردی بهتر و اختصاصی‌تر داشته باشد. به علاوه سنتز آسان، هزینه پایین و تغییرات کم در صورتبندی، از دیگر مزایای آن به شمار می‌رود.

حضور پپتید دوگانه DPI-VTK با تمایل اختصاصی به منابع سلول‌های خاص استخوان ساز و به طور همزمان تمایل اتصال به ماده معدنی تشکیل دهنده بافت استخوان در محل آسیب‌های استخوانی، موجب تمایز و تکثیر سلول‌های سازنده استخوان و همچنین مینرالیزه شدن این بافت دارای ساختار و عملکرد ویژه می‌شود. با توجه به افزایش تقاضا برای پیوندهای استخوانی و شیوع بیماری‌های مرتبط با استخوان، استراتژی‌هایی با هدف تولید این پپتید دوگانه در ماتریس خارج سلولی توسط سلولهای بافت استخوان، موجب افزایش کارایی در مهندسی بافت استخوان می‌شود.

واژگان کلیدی: پپتید دوگانه **DPI-VTK**، پزشکی بازساختی، سلول بنیادی، مهندسی بافت استخوان

استخوان و فرآیندهای استخوان زایی

استخوان از نظر ساختاری و عملکردی، بافتی بسیار پویا و متنوع است. سیستم اسکلتی انسان شامل بیش از ۲۰۰ استخوان می‌باشد که ساختار ماکروسکوپی و ویژگی‌های مکانیکی آن‌ها با توجه به ظرفیت تحمل بارشان، بر نوع استخوان بسیار موثر است (Amini et al., 2012). استخوان طبیعی شامل سلول‌ها، ماتریکس خارج سلولی (از گرد هم آمدن فیبرهای کلاژن و هیدروکسی آپاتیت) و همچنین مواد معدنی استخوانی است. تخمین زده شده که کلاژن و هیدروکسی آپاتیت در کنار هم حدود ۹۵٪ از استخوان را در بخش خشک استخوانی می‌سازد (Qu et al., 2019).

هیدروکسی آپاتیت، یک کلسیم آپاتیت طبیعی است که فرمول شیمیایی آن $Ca10(PO4)6(OH)2$ می‌باشد. آپاتیت‌ها، ازطریق فسفرشان پیوند شیمیایی دیگری با یون‌های هیدروکسیل (-OH)، کلرید (-Cl) یا فلوئورید (-F) برقرار می‌کنند. وزن مولکولی هیدروکسی آپاتیت ۱۰۰۴.۶ g/mol می‌باشد. هیدروکسی آپاتیت نقش مهمی را در ترمیم استخوان در بالین ایفا می‌کند. اصولا ماده معدنی استخوان از کریستال‌های آپاتیت ساخته شده است که موجب رسوب و مینرالیزه شدن کلسیم و یون‌های فسفر بر روی ماتریکس استخوانی که از استئوبلاست‌ها ترشح شده است، می‌شود (Li et al., 2019).

مکانیسم مینرالیزه شدن در استخوان به شرح زیر است: ابتدا وزیکول‌های ماتریکس درون سلولی از استئوبلاست‌ها جوانه می‌زنند و پیش ماده‌های فسفات کلسیم را به صورت گرانول‌هایی با شکل کروی به حد فاصل نواحی ماتریکس کلاژنی می‌رسانند. سپس فسفات کلسیم موجود در وزیکول‌ها به ماتریکس کلاژنی نفوذ پیدا کرده و گرانول‌های فسفات کلسیم در حد فاصل این نواحی رسوب می‌کنند. تبدیل گرانول‌های فسفات کلسیم به آپاتیت استخوانی موازی محور طولی کلاژن انجام می‌شود و به طور کامل تبدیل و بلوغ آپاتیت رخ داده و ماتریکس کلاژنی مینرالیزه شده شکل می‌گیرد (Lotsari et al., 2018).

پزشکی بازساختی و مهندسی بافت

تکنولوژی‌هایی مانند پزشکی بازساختی و مهندسی بافت در تلاش برای توسعه روش‌های امیدبخش برای بیماری‌های علاج ناپذیر مختلف از طریق رویکردهای پزشکی مورد قبول است تا به موثرترین استراتژی‌های درمانی دست پیدا کند. فرآیند بازسازی یک بافت در آزمایشگاه با به کارگیری ساختارهای زیست تخریب پذیر به عنوان داربست، گونه‌های سلولی مورد نظر، فاکتورهای رشد و مولکول‌های پیام‌رسان مناسب انجام می‌شود و هدف نهایی آن ترمیم و بازسازی یک ارگان یا یک بافت است (Payab et al., 2018). پزشکی بازساختی شامل دو روش است که یکی سلول درمانی بدون استفاده از داربست و دیگری مهندسی بافت است که در آن از داربست به عنوان حامی برای بازسازی بافت استفاده می‌شود (Ikada, 2006).

تعریف مورد توافق برای مهندسی بافت، به کارگیری روش‌های مهندسی و علوم زیستی به منظور درک عملکرد و رابطه ساختار و عملکرد در بافت و ارگان‌ها بود. در سال‌های اولیه، مهندسی بافت بر پایه سلول و بافت بود. این سازه مصنوعی، ویژگی‌ها و عملکردهای بافت طبیعی را داشت که به هدف جایگزینی ساخته شده بود. در نهایت به سه عامل اصلی و کلیدی در آن رسیدند که شامل داربست‌ها، سلول‌ها و فاکتورهای رشد بود که برای بازسازی یک بافت جدید دارای عملکرد ضروری بود (Payab et al., 2018). داربست‌ها به عنوان ساختارهایی سه بعدی استفاده می‌شوند که در آن سلول‌ها می‌توانند رشد و تکثیر کنند و به انواع مختلفی از سلول‌ها تمایز پیدا کنند. فاکتورهای رشد به این داربست‌ها وارد می‌شوند که بر رفتار سلولی نظارت کنند. این نظارت تمایل سلول‌ها را به سمت تولید ارگان دارای عملکرد تام و بافت‌هایی با توانایی رشد و بازسازی و نیز مناسب برای کاشت در بدن می‌برد (Hasan et al., 2018).

مسیرهای پیام رسان و نیز همکاری و هماهنگی بین سلول‌ها، فاکتورهای رشد و ماتریکس خارج سلولی (به عنوان یک داربست درون تنی با ساختار سه بعدی مناسب بافت‌های خاص)، ویژگی‌های هر بافت را تعیین می‌کند. به همین منظور، تقلید ساختار ماتریکس خارج سلولی و به کارگیری مولکول‌های زیستی القایی ویژه هر بافت و نیز با حضور انواع سلول‌های خاص، به بازسازی یک بافت زنده، فعال و دارای عملکرد منجر می‌شود. علم زیست مواد و علوم مهندسی تلاش می‌کنند با تقلید از ریزمحیط‌های بافت، داربست‌های سه بعدی با استحکام مکانیکی، زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، دارای قابلیت رسانندگی الکتریکی، مورفولوژی مناسب، ویژگی‌های مکانیکی مناسب و نیز آسان از نظر ساخت طراحی کنند تا به بافت هدف مناسب دست پیدا کنند (Lynch et al., 2021; Payab et al., 2018).

حوزه مهندسی بافت استخوان حدود سه دهه پیش آغاز شد. مهندسی بافت استخوان بر پایه درک ساختار استخوان، مکانیک استخوان و تشکیل بافت استوار است که هدفش تحریک بافت‌های استخوانی جدید دارای عملکرد است (Amini et al., 2012). اگرچه بافت استخوان به طور ذاتی توانایی ترمیم را دارا است، مواردی مانند عدم جوش خوردن استخوان در محل شکستگی، پوکی استخوان، التهاب استخوان و سرطان‌ها وجود دارند که ترمیم استخوان موثر نیست. در این موارد، درمان‌هایی از جمله جراحی استفاده می‌شود که می‌تواند به تنهایی و یا به همراه عوامل زیست فعال، موجب ترغیب ترمیم بافت و کنترل عوارض بالینی مرتبط با آن شود. جهت بهبود اثر عوامل زیست فعال، اغلب به حامل‌هایی نیاز است که به همراه زیست مواد بتواند نقش موثری ایفا کند (Zeng et al., 2019). بیش از نیم میلیون نفر از مردم آمریکا سالانه ترمیم‌هایی برای آسیب‌های استخوانی دریافت می‌کنند که هزینه آن ۲.۵ میلیارد دلار تخمین زده شد و این میزان تا سال ۲۰۲۰ دو برابر شده است. در آمریکا، استخوان بعد از خون، دومین بافتی است که پیوند زده می‌شود و افزایش تقاضا برای پیوندهای استخوانی و زیر مجموعه‌های آن، با سود ۳.۳ میلیارد دلار در سال ۲۰۱۳ تخمین زده شده است که نسبت رشد آن حدود ۱۳.۸٪ بین سال ۲۰۰۶ و ۲۰۱۳ بوده است (Marew and Birhanu, 2021).

استفاده از پپتیدها در مهندسی بافت

استفاده از اپی‌توپ‌های پپتیدی، روش امیدوار کننده‌ای در درمان‌های بر پایه پروتئین و یا سلول می‌باشد که موجب کاهش هزینه، کنترل کانفورماسیون، اختصاصیت سلول و سرعت تخریب پذیری می‌شود. پپتیدهای مشتق شده از جایگاه‌های فعال پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی، به عنوان راهنمایی برای تمایز لاین‌های سلول‌های بنیادی و اجدادی به سمت شکل‌گیری بافت استخوانی هستند (Shekaran and García, 2011;Lutolf et al., 2003; LeBaron and Athanasiou, 2000). روش انتقال این سیگنال‌ها بر روی یک زیست ماده و اصلاح این پپتیدها نقش مهمی به عنوان میانجی در پاسخ‌های سلولی ایفا می‌کند. ترکیبات پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی که اینتگرین‌های خاصی را مورد هدف قرار می‌دهند، مختص به یک نوع سلول خاص نیستند(Shekaran and García, 2011;LeBaron and Athanasiou, 2000;Hern and Hubbell, 1998;Benesch et al., 2008). تفاوت در اختصاصیت در اتصال به رسپتورهای اینتگرین می‌تواند منجر به تغییرپذیری ترمیم بافت در محیط درون تنی شود (Gilbert et al., 2000; Hennessy et al., 2009). علاوه بر استفاده از ترکیباتی از پپتیدهای ماتریکس خارج سلولی شناخته شده، پپتیدهای جدیدی که از کلاژن مشتق شده‌اند، ویژگی‌های رسانش ماتریس خارج سلولی و بافت را بهبود می‌بخشند (Agrawal et al., 2011; Agrawal, J. Kelly et al., 2011).

ارتقای توانایی چسبندگی سلول‌ها به سطح یک زیست ماده و لذا ایجاد سیگنال‌های درون سلولی معین، می‌تواند ترمیم و بازسازی بافت را بهبود بخشد (LeBaron and Athanasiou, 2000). به علاوه عرضه صحیح این سیگنال‌ها می‌تواند موجب بهبود اختصاصیت اتصال سلولی، تکثیر و تمایز شود. بسیاری از پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی دمین‌های چندگانه‌ای دارند که در ترکیب با یکدیگر برای عرضه به رسپتورهای سطح سلولی فعالیت می‌کنند (Lee et al., 2009; Lee et al., 2010). بنابراین توانایی طراحی پپتیدهای

ویژه و عرضه مناسب آن‌ها به رسپتور سطح سلولی، می‌تواند بازسازی بافت را بهبود بخشد. تکنیک نمایش فاژی از طریق معرفی پپتیدهای خاص به روش‌ها و محصولات حوزه بازسازی بافت کمک نموده است. برای افزایش رسوب فیزیکوشیمیایی مواد معدنی زیستی بر روی زیست مواد و انتقال فاکتورهای رشد به سطح زیست مواد مینرالیزه شده، از پپتیدهایی با تمایل اختصاصی به ماده مورد نظر استفاده می‌شود (Jin et al. 2013; Alvarez et al. 2015).

اگرچه ذرات ماده معدنی می‌تواند به طور مستقیم برای پر کردن آسیب‌های استخوانی و دندانی به کار رود و جوش‌خوردن استخوان را بهبود بخشد (Geesink, 2002)، لکن القا شکل‌گیری استخوان معمولا نیازمند اصلاحات اضافی به وسیله مولکول‌های زیستی است (Alsberg et al., 2001). اصلاح سطوح ایمپلنت‌ها با پپتیدهای زیست فعال، رویکرد دیگری برای طراحی مواد زیست تقلید است. بنابراین تقاضا برای توالی‌های پپتیدی که ترجیحا به سطح ماده معدنی می‌چسبد رو به افزایش است. به علاوه، در مقایسه با پروتئین‌هایی با طول کامل، پپتیدهای زیست فعال کوچکتر مناسبترند زیرا سریعتر تولید می‌شوند، آسانتر خالص سازی می‌شوند و نیاز به جداسازی از منابع حیوانی ندارد (Shin et al., 2004; Fujisawa et al., 1997).

پپتید VTK

در سال ۲۰۰۹، با استفاده از تکنیک نمایش فاژی، پپتید VTK با توالی‌های VTKHLNQISQSYشناسایی شد که تمایل اتصال قوی و اختصاصی به مولکول هیدروکسی آپاتیت (HA) و مواد شبه استخوانی داشت. مطالعات بیشتر نشان داد که زیست مواد اصلاح شده با پپتید VTK، به تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی به سمت استخوانی شدن و نیز رسوب مواد زیستی معدنی کمک می‌کند. جالب توجه است که بار شبکه توالی پپتید VTK مثبت است. Addison و همکارانش تاکید کردند که فسفریله شدن آمینواسیدهای سرین موجود در توالی پپتید VTK بر انرژی اتصال آن‌ها برای واکنش با آپاتیت لازم است. به علاوه شناسایی آمینواسیدهای لازم برای اتصال به کریستال‌های هیدروکسی آپاتیت توسط مدل‌سازی محاسباتی تایید شده است (Rotman et al., 2018). الحاق پپتید VTK با ابریشم نیز بر ویژگی‌های این ماده و کانی سازی آن اثرگذار است (Dinjaski et al., 2017). فسفریله شدن باقی‌مانده‌های سرین در پروتئین‌ها رایج است و در مینرالیزه‌شدن زیستی هم مورد بحث واقع می‌شود. VTK شامل دو ریشه سرین با قابلیت فسفریله شدن است. فسفریله شدن می‌تواند شرایطی را برای بهبود جذب سطحی پپتید و تغییر پاسخ‌های سلولی در مقابل پپتیدها را فراهم کند (Addison et al., 2010).

پپتید DPI

از طرف دیگر، با استفاده از تکنیک نمایش فاژی و در نتیجه آنالیز داده‌ها به کمک RELIC و IHC، توالی پپتید DPI به عنوان یک توالی اتصالی قوی به سلول‌های بنیادی مزانشیم شناسایی شد (Segvich, 2008). گروه تحقیقاتی که مسئول شناسایی VTK (پپتید متصل شونده به آپاتیت و انواع دیگر فسفریله شده آن) بودند پپتید DPI با توالی DPIYALSWSGMA را شناسایی کردند. این پپتید موجب بهبود گسترش و کشت سلولی بر روی بستر در محیط آزمایشگاهی شد. پپتید DPI از طریق اینتگرین‌ها با سلول‌های بنیادی تعامل برقرار می‌کند (Davidson et al., 2020).

پپتید دوگانه DPI-VTK

پپتید دوگانه DPI-VTK بدون بار است، اندازه کوچکی دارد و می‌تواند به یک سطح زیست تقلید لنگر اندازد و به طور خاص موجب اتصال سلول‌های بنیادی مزانشیم به سطح گردد (Ramaraju et al., 2017). این دو پپتید به شکل ترکیب شده‌ی DPI-VTK تمایل اتصال بیشتری برای سطوح آپاتیت نسبت به VTK، pVTK و VTK-RGD دارند (Davidson et al., 2020). پپتید DPI و پپتید VTK (به عنوان توالی اتصال به آپاتیت)، برای ترکیب شدن با هم، از ریشه‌های گلایسین استفاده می‌کنند و در نهایت توالی پپتید دوگانه(DPI-VTK) GGDPIYALSWSGMAGGGSVTKHLNQISQSY را می‌سازند که می تواند همزمان منجر به تمایل بیشتر

سلول‌ها به آپاتیت زیست تقلید و ترغیب توزیع و چسبندگی بهتر سلول‌ها شود (Ramaraju, 2015). پپتیدهای دوگانه عملکردی می‌توانند در اتصال و تمایز سلولی نقش موثری داشته باشند که این امر در نهایت می‌تواند موجب افزایش کمیت و کیفیت ترمیم و بازسازی بافت در محیط درون‌تنی شود. همچنین این دی‌پپتیدها می‌توانند موجب بهبود کانی‌سازی شدن اجزاء ایمپلنت‌ها در محیط درون‌تنی شوند (Ramaraju, 2015).

مطالعات نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مقایسه با انواع سلول‌های دیگر، به طور موثری اتصال قوی‌تری به DPI-VTK دارند. همچنین توزیع سلول‌های بنیادی بر روی سطوح پوشیده شده با DPI-VTK در مقایسه با سلول‌های پیشساز استخوانی و فیبروبلاست‌ها افزایش می‌یابد. تکثیر سلول‌های بنیادی کشت شده بر فیلم‌های آپاتیتی پوشیده شده با DPI-VTK، در مقایسه با نمونه‌های کنترل بیشتر گزارش شده است. پپتید DPI-VTK به منظور بازسازی آسیب‌های استخوانی در توسعه روش‌های طراحی زیست مواد نقش مهمی دارد (Ramaraju et al., 2017).

علاوه بر افزایش کمیت بافت، افزایش یکنواختی بافت بازسازی شده در سرتاسر بخش آسیب دیده، یک هدف مهم در طراحی است. افزایش اتصال و یکسانی/یکنواختی iPS-MSC در توزیع سه بعدی با استفاده از این پپتیدها، کمیت و یکنواختی بافت بازسازی شده را افزایش می‌دهد و رگزایی را در محیط درون‌تنی هدایت خواهد کرد (Ramaraju and Kohn, 2019).

حضور توالی لینکر (اتصال دهنده) در بین دمین‌های متصل شونده به سلول و ماده معدنی، می‌تواند در بهبود اتصال ماده معدنی کاربرد داشته باشد. توالی‌ها و طول لینکرها (که انحلال و پایداری کانفورماسیون را مهیا می‌کند) به منظور بهبود تمایل آپاتیت و اتصال سلولی نقش دارند (Elineni and Gallant, 2011).

بررسی خاصیت القا استخوانی دی‌پپتید DPI-VTK در تقویت نفوذ سلول میزبان و القاء تشکیل استخوان در مدل‌های دارای آسیب با سایز قابل توجه می‌تواند بینش وسیع‌تری را به سوی دست‌یابی بالینی برای کاربردهای پیوند استخوان بدهد (Ramaraju, 2015).

بحث و نتیجه گیری

آسیب‌های استخوانی از جمله بیماری‌های شایع است و بازسازی بافت استخوان از طریق فرآیندهای مهندسی بافت می‌تواند به آن کمک شایانی نماید. یکی از راه‌های بازسازی بافت، طراحی پپتیدهای خاص و اتصال آن‌ها به گیرنده‌های سطح سلولی است. توانایی طراحی پپتیدهای ویژه و حضور موثر آن‌ها به سمت رسپتور سطح سلولی، می‌تواند بازسازی بافت و حتی انتقال سیگنال‌های سلولی را بهبود بخشد. به علاوه بهبود تمایل اتصالی پپتیدها به سلول‌ها و مواد معدنی، می‌تواند تکثیر، تمایز و مینرالیزه شدن بستر خارج سلولی را بهبود بخشد. از طرفی، پپتیدهای سنتزی کوچک با طول بین ۹ تا ۳۰ آمینواسید سودمند هستند زیرا پاسخ‌های ایمنی را تحریک نمی‌کنند و نسبت به یک پروتئین با طول کامل و شامل دمین‌های چندعملکردی، می‌توانند عمکرد ویژه‌ای داشته باشند. علاوه بر این، سنتز پپتیدهای کوچک آسان‌تر و به صرفه‌تر است و کمتر دستخوش تغییراتی در صورتبندی‌شان می‌شوند.

پپتید دوگانه DPI-VTK به بازسازی آسیب‌های استخوانی کمک می‌کند. این پپتید از جایگاه های فعال پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی مشتق شده‌اند. این جایگاه‌های اتصال سلولی دمین‌های پروتئین ماتریکس خارج سلولی، تمایلات اتصالی متفاوتی به رسپتورهای اینتگرینِ مختلف دارند. بهبود تمایل اتصال پپتیدهای متصل شونده به سلول به وسیله اتصال آن‌ها به توالی‌های متصل شونده به ماده معدنی، تکثیر، تمایز سلولی و مینرالیزه شدن را بهبود می دهد. استراتژی ایجاد سلول اختصاصی به منظور تولید این پپتیدهای کوچک، می‌تواند موجب توسعه استراتژی‌های موجود برای ترمیم بافت استخوان شود و تکنیک‌های مختلفی برای طراحی این پپتیدهای خاص وجود دارد که نمایش فاژی یکی از آن‌ها است. بهبود پتانسیل استخوان زایی در محیط درون‌تنی از طریق DPI-VTK، تحقیقات بیشتری را درباره مکانیسم عمل می‌طلبد. همچنین تنظیم کانفورماسیون DPI زمانی که در حضور توالی VTK متصل شونده به ماده است، می‌تواند باعث بهبود بیشتر پتانسیل استخوان زایی این پپتیدها شوند.

تداخل منافع: نویسندگان اعلام می کنند که تداخل منافعی وجود ندارد.

منابع

1. Addison, W. N., S. J. Miller, J. Ramaswamy, A. Mansouri, D. H. Kohn and M. D. McKee (2010). "Phosphorylation-dependent mineral-type specificity for apatite-binding peptide sequences." Biomaterials **31**(36): 9422-9430.
2. Agrawal, V., J. Kelly, S. Tottey, K. A. Daly, S. A. Johnson, B. F. Siu, J. Reing and S. F. Badylak (2011). "An isolated cryptic peptide influences osteogenesis and bone remodeling in an adult mammalian model of digit amputation." Tissue engineering Part A **17**(23-24): 3033-3044.
3. Agrawal, V., S. Tottey, S. A. Johnson, J. M. Freund, B. F. Siu and S. F. Badylak (2011). "Recruitment of progenitor cells by an extracellular matrix cryptic peptide in a mouse model of digit amputation." Tissue engineering Part A **17**(19-20): 2435-2443.
4. Alsberg, E., E. Hill and D. Mooney (2001). "Craniofacial tissue engineering." Critical Reviews in Oral Biology & Medicine **12**(1): 64-75.
5. Alvarez, L. M., J. J. Rivera, L. Stockdale, S. Saini, R. T. Lee and L. G. Griffith (2015). "Tethering of epidermal growth factor (EGF) to beta tricalcium phosphate (βTCP) via fusion to a high affinity, multimeric βTCP-binding peptide: Effects on human multipotent stromal cells/connective tissue progenitors." PLoS One **10**(6): e0129600.
6. Amini, A. R., C. T. Laurencin and S. P. Nukavarapu (2012). "Bone tissue engineering: recent advances and challenges." Critical Reviews™ in Biomedical Engineering **40**(5).
7. Benesch, J., J. F. Mano and R. L. Reis (2008). "Proteins and their peptide motifs in acellular apatite mineralization of scaffolds for tissue engineering." Tissue Engineering Part B: Reviews **14**(4): 433-445.
8. Davidson, T. A., S. J. McGoldrick and D. H. Kohn (2020). "Phage Display to Augment Biomaterial Function." International Journal of Molecular Sciences **21**(17): 5994.
9. Dinjaski, N., R. Plowright, S. Zhou, D. J. Belton, C. C. Perry and D. L. Kaplan (2017). "Osteoinductive recombinant silk fusion proteins for bone regeneration." Acta biomaterialia **49**: 127-139.
10. Elineni, K. K. and N. D. Gallant (2011). "Regulation of cell adhesion strength by peripheral focal adhesion distribution." Biophysical journal **101**(12): 2903-2911.
11. Fujisawa, R., M. Mizuno, Y. Nodasaka and K. Yoshinori (1997). "Attachment of osteoblastic cells to hydroxyapatite crystals by a synthetic peptide (Glu7-Pro-Arg-Gly-Asp-Thr) containing two functional sequences of bone sialoprotein." Matrix biology **16**(1): 21-28.
12. Geesink, R. G. (2002). "Osteoconductive coatings for total joint arthroplasty." Clinical Orthopaedics and Related Research® **395**: 53-65.
13. Gilbert, M., W. J. Shaw, J. R. Long, K. Nelson, G. P. Drobny, C. M. Giachelli and P. S. Stayton (2000). "Chimeric peptides of statherin and osteopontin that bind hydroxyapatite and mediate cell adhesion." Journal of Biological Chemistry **275**(21): 16213-16218.
14. Hasan, A., M. Morshed, A. Memic, S. Hassan, T. J. Webster and H. E.-S. Marei (2018). "Nanoparticles in tissue engineering: applications, challenges and prospects." International journal of nanomedicine **13**: 5637.
15. Hennessy, K. M., B. E. Pollot, W. C. Clem, M. C. Phipps, A. A. Sawyer, B. K. Culpepper and S. L. Bellis (2009). "The effect of collagen I mimetic peptides on mesenchymal stem cell adhesion and differentiation, and on bone formation at hydroxyapatite surfaces." Biomaterials **30**(10): 1898-1909.
16. Hern, D. L. and J. A. Hubbell (1998). "Incorporation of adhesion peptides into nonadhesive hydrogels useful for tissue resurfacing." Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials **39**(2): 266-276.
17. Ikada, Y. (2006). "Challenges in tissue engineering." Journal of the Royal Society Interface **3**(10): 589-601.
18. Jin, H.-E., W.-J. Chung and S.-W. Lee (2013). "Phage display for the discovery of hydroxyapatite-associated peptides." Methods in enzymology **532**: 305-323.

19. LeBaron, R. G. and K. A. Athanasiou (2000). "Extracellular matrix cell adhesion peptides: functional applications in orthopedic materials." Tissue engineering **6**(2): 85-103.
20. Lee, J. S., J. S. Lee, A. Wagoner-Johnson and W. L. Murphy (2009). "Modular peptide growth factors for substrate-mediated stem cell differentiation." Angewandte Chemie International Edition **48**(34): 6266-6269.
21. Lee, J. S., A. J. Wagoner Johnson and W. L. Murphy (2010). "A modular, hydroxyapatite-binding version of vascular endothelial growth factor." Advanced Materials **22**(48): 5494-5498.
22. Li, X., Q. Zou, H. Chen and W. Li (2019). "In vivo changes of nanoapatite crystals during bone reconstruction and the differences with native bone apatite." Science advances **5**(11): eaay6484.
23. Lotsari, A., A. K. Rajasekharan, M. Halvarsson and M. Andersson (2018). "Transformation of amorphous calcium phosphate to bone-like apatite." Nature communications **9**(1): 1-11.
24. Lutolf, M. P., F. E. Weber, H. G. Schmoekel, J. C. Schense, T. Kohler, R. Müller and J. A. Hubbell (2003). "Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices." Nature biotechnology **21**(5): 513-518.
25. Lynch, C. R., P. P. Kondiah and Y. E. Choonara (2021). "Advanced Strategies for Tissue Engineering in Regenerative Medicine: A Biofabrication and Biopolymer Perspective." Molecules **26**(9): 2518.
26. Marew, T. and G. Birhanu (2021). "Three dimensional printed nanostructure biomaterials for bone tissue engineering." Regenerative Therapy **18**: 102-111.
27. Payab, M., K. Falahzadeh, B. Arjmand and L. Afshar (2018). "An overview of ethical issues in Tissue Engineering." Journal of Applied Tissue Engineering **5**(1): 12-20.
28. Qu, H., H. Fu, Z. Han and Y. Sun (2019). "Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review." RSC advances **9**(45): 26252-26262.
29. Ramaraju, H. and D. H. Kohn (2019). "Cell and Material-Specific Phage Display Peptides Increase iPS-MSC Mediated Bone and Vasculature Formation In Vivo." Advanced healthcare materials **8**(9): 1801356.
30. Ramaraju, H., S. J. Miller and D. H. Kohn (2017). "Dual-functioning peptides discovered by phage display increase the magnitude and specificity of BMSC attachment to mineralized biomaterials." Biomaterials **134**: 1-12.
31. Ramaraju, S. (2015). Peptide Design for Mesenchymal Stem Cell Specific Attachment on Apatite Surfaces for Bone Tissue Regeneration.
32. Rotman, S., D. Grijpma, R. Richards, T. Moriarty, D. Eglin and O. Guillaume (2018). "Drug delivery systems functionalized with bone mineral seeking agents for bone targeted therapeutics." Journal of controlled release **269**: 88-99.
33. Segvich, S. J. (2008). Design of peptides with targeted apatite and human bone marrow stromal cell adhesion for bone tissue engineering, University of Michigan.
34. Shekaran, A. and A. J. García (2011). "Extracellular matrix-mimetic adhesive biomaterials for bone repair." Journal of biomedical materials research Part A **96**(1): 261-272.
35. Shin, H., K. Zygourakis, M. C. Farach-Carson, M. J. Yaszemski and A. G. Mikos (2004). "Attachment, proliferation, and migration of marrow stromal osteoblasts cultured on biomimetic hydrogels modified with an osteopontin-derived peptide." Biomaterials **25**(5): 895-906.
36. Zeng, Y., J. Hoque and S. Varghese (2019). "Biomaterial-assisted local and systemic delivery of bioactive agents for bone repair." Acta biomaterialia **93**: 152-168.

Effect of emulsion of *Ficus carica* latex and olive oil on the expression of matrix metalloproteinase-2 in MKN-45 cells

Sara bakhshnia[1*]; Pooyan mehrabanjoubani[2] ; poorya biparva[3]

1- Master student of Cellular and Molecular Biology, Department of Basic Sciences, Sari, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Mazandaran,

2-Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Mazandaran

3- Associate Professor, Department of Basic Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Mazandaran

**Corresponding author: sara.bakhshnia23@gmail.com*

Abstract

Subject: Cancer is one of the major challenges in the modern medical system, which begins with disruption of cell proliferation and gradually progresses to metastasis. Inhibition of cancer metastasis is essential for various pathological conditions and it can prevent tumor growth. Matrix metalloproteinases (MMP) are a family of zinc-dependent endopeptidases (zn) that increase in cancer cells. MMP are involved in many physiological and pathological processes that cause extracellular matrix destruction including tumor growth, invasion and metastasis. In general, the use of chemical inhibitors of plants to target signaling pathways of metastatic is a good method to prevent the progression of cancers. Fig (*Ficus carica* L.) is a species of the Moraceae family that the fruit, roots, leaves and latex of this plant is used as a traditional medicine for the treatment of various diseases including respiratory diseases, cardiovascular diseases, inflammation and cancer. Olive (*Olea europaea* L.) is an evergreen tree and belongs to the oleaceae family. Phenolic compounds in olives oil, such as tyrosol and hydroxytyrosol and their derivative forms as secoroids are uptake in the human intestine and have anti-cancer and antioxidant properties and are able to scavenge intracellular free radicals.

Objectives: The aim of this study was to evaluate the effect of emulsion of fig latex and olive oil on changes in expression of matrix metalloproteinase-2 on MKN-45 line as gastric cancer Cells. Materials and methods: Extract of fig latex and olive oil was prepared as emulsion and then was treated at concentrations of 0.001, 0.01 and 0.1 mg/ml for 24 hours on MKN-45 cells and the expression of *MMP-2* gene was evaluated by real-time PCR.

Results: The results showed that emulsion of fig latex and olive oil has significant anti-metastatic effects. This combination reduced the expression of *MMP-2* gene and probably it can as suitable candidates in food and medicine for the Inhibition of cancer metastasis stages.

Keywords: Gastric cancer, MKN-45, *MMP-2*, Fig, Olive oil

اثر شیرابه انجیر و روغن زیتون بر بیان ژن ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ در سلول‌های MKN-45 معده

سارا بخش‌نیا[۷*]؛ پویان مهربان[۲]؛ پوریا بی پروا[۳]

۱*-دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران

۲- استادیار گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران

۳- دانشیار گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران

*ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: sara.bakhshnia23@gmail.com

چکیده

موضوع: سرطان یکی از چالش‌های عمده در سیستم پزشکی مدرن محسوب می‌شود که اغلب با برهم خوردن چرخه سلولی و بروز اختلال در روند تکثیر سلول‌ها شروع شده و به تدریج به مرحله متاستاز می‌رسد. مهار متاستاز در حالات مختلف پاتولوژیک امری ضروری است و سبب توقف رشد تومور می‌شود. ماتریکس متالوپروتئینازها (MMP) خانواده‌ای از اندوپپتیدازهای وابسته به عنصر روی (zn) هستند که بیان آنها در سلول‌های سرطانی افزایش می‌یابد. این آنزیم‌ها در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک مانند رشد تومور، تهاجم و متاستاز که سبب تخریب ماتریکس خارج سلولی می‌شود، نقش دارند. به طور کلی استفاده از ترکیبات بازدارنده شیمیایی در گیاهان برای هدف قرار دادن مسیرهای سیگنالی متاستاز، روش مناسبی برای جلوگیری از پیشرفت سرطان‌هاست. انجیر با نام علمی *Ficus carica* L. گیاهی از تیره moraceae می‌باشد که میوه، ریشه، برگ و شیره این گیاه به عنوان یک داروی سنتی برای درمان انواع بیماری‌ها از جمله بیماری‌های تنفسی، بیماری‌های قلبی-عروقی، التهاب و سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد. زیتون با نام علمی *Olea europaea* L. شناخته می شود. درختی همیشه سبز و متعلق به خانواده oleaceae می‌باشد. ترکیبات فنلی موجود در زیتون نظیر تیروزول، هیدروکسی تیروزول و سکوروئیدها، در روده انسان جذب می‌شوند و خاصیت ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی دارند و قادرند رادیکال‌های آزاد درون سلولی را از بین ببرند.

اهداف مطالعه: این مطالعه با هدف بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره انجیر و زیتون بر تغییرات بیان ژن ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ در سلول‌های MKN-45 معده انجام شد.

روش تحقیق: عصاره توام شیره انجیر و روغن زیتون به صورت نانوامولیسیون تهیه و سپس با غلظت‌های ۰/۰۰۱، ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای ۲۴ ساعت بر روی سلول‌های MKN-45 اثر داده شد و پس از اتمام مدت تیمار و استخراج RNA بیان ژن MMP-2 به عنوان ژن موثر در فرآیند متاستاز با روش time-real-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

7

نتایج: نتایج نشان داد که عصاره شیره انجیر و روغن زیتون اثرات ضد متاستاز قابل توجهی دارد. عصاره در حالت وابسته به دوز مانع مهاجرت سلول‌های MKN-45 شد و هم چنین بیان ژن mmp2 را کاهش داد. این یافته‌ها این دو گیاه را به عنوان کاندیدای مناسب در مصارف غذایی و دارویی برای مقابله با پیشرفت مراحل متاستاز معرفی می‌کند.

واژه‌های کلیدی: سرطان معده، MKN-45، MMP-2، انجیر، زیتون

۱. مقدمه

سرطان نوعی بیماری است که با برهم خوردن چرخه سلولی و تکثیر خارج از کنترل سلول‌ها ایجاد می‌شود. روند تومورزایی چند مرحله‌ی مختلف را شامل می‌شود. این فرایند با تغییر شکل سلول‌ها آغاز شده و با تکثیر بی رویه سلول، کسب توانایی حرکت، رگ‌زایی و در نهایت تهاجم و متاستاز، ادامه می‌یابد (Monteagudo & Santos, 2014). سرطان معده پنجمین سرطان رایج و سومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان است (Rawla and Barsouk 2019). براساس سیستم TNM، سرطان معده در ۴ مرحله (Stage) طبقه‌بندی می‌شود که در مرحله چهارم آن متاستاز روی داده و در نهایت منجر به مرگ فرد مبتلا می‌گردد (Jiang et al., 2016). تهاجم و متاستاز یکی از اصلی‌ترین خصوصیات تومورهای بدخیم بوده و علت عمده‌ی مرگ و میر ناشی از سرطان است. روندی است که طی آن سلول‌های سرطانی به سراسر بدن مهاجرت می‌کنند و در واقع فرآیندی داینامیک است که در آن سلول‌ها تحت تاثیر عوامل اتوکراین یا پاراکراین تحریک شده و پس از ترک محیط اولیه و انتقال به نواحی دیگر بدن تکثیر می‌یابند (Massagué & Obenauf, 2016). فرآیند متاستاز از چند مرحله تشکیل می‌شود که شامل جدا شدن سلول‌های توموری از یکدیگر، تخریب ماتریکس خارج سلولی، مهاجرت و در نهایت تشکیل تومور در ناحیه‌ای دیگر است (Seyfried and Huysentruyt, 2013). سلول‌ها برای تهاجم نیازمند ژن‌های مختلفی می‌باشند. دسته‌ای از ژن‌های دخیل در فرآیند متاستاز شامل خانواده‌ی ماتریکس متالوپروتئینازها[8] هستند. این خانواده، اندوپپتیدازهای وابسته به روی (Zn) هستند و بیش از ۲۰ عضو مختلف را شامل می‌شوند که در چند گروه ژلاتیناز، کلاژناز، استروملیسین[9]، ماتریلیزین[10] و ماتریکس متالوپروتئازهای نوع غشایی، دسته‌بندی می‌گردند (Ewald et al., 2007). MMP2 یا ژلاتیناز A با تجزیه ماتریکس خارج سلولی نقش بسیار مهمی در متاستاز تومور دارند و بیان بیش از حد آن‌ها در تومورهای بدخیم قابل مشاهده است (Huang, 2018). مطالعات نشان می‌دهد که استفاده از رژیم غذایی که در آن از گیاهان استفاده شده باشد، می‌تواند از ایجاد انواع سرطان جلوگیری کند. آزمایشات زیادی روی اجزای غذاهای گیاهی انجام شده که نشان می‌دهد این اجزا دارای خواص ضد متاستازی هستند (Pei et al.,2015). انجیر گیاهی از خانواده Moraceae است و با نام علمی *Ficus carica* L. (جنس Ficus و گونه carica) شناخته می‌شود. گیاه انجیر به علت دارا بودن ترکیبات فنلی، دارای ویژگی‌های فارماکولوژیکی زیادی می‌باشد. این گیاه به عنوان دارویی متابولیک در درمان بیماری‌های تنفسی و قلبی به عنوان یک داروی ضد التهاب استفاده می‌شود (Hashemi et al., 2011). همچنین این گیاه دارای ترکیبات فلانوئیدی به نام لوتئولین[11] می‌باشد که دارای اثرات ضدسرطانی و ضدمتاستازی است (Lopez-Lazaro, 2009). زیتون با نام علمی *Olea europaea* L. به علت داشتن ترکیبات

[8] Matrix metalloproteinase (mmp)
[9] Stromelysin
[10] Matrilysin
[11] Luteolin

فنلی دارای خاصیت ضداکسیدانی است و می‌تواند از ایجاد بیماری‌های قلبی-عروقی و انواع سرطان‌ها جلوگیری کند و همچنین دارای نقش ضدالتهابی هم می‌باشد (Lorenzi, Maury, Casanova, & Berti, 2006).

۲. مواد و روش‌ها

برای جمع آوری شیرابه انجیر، ابتدا با شکستن ساقه درخت انجیر در فصل بهار شیرابه این گیاه به صورت قطره قطره جمع آوری و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. روغن زیتون استفاده شده در آزمایش به صورت تازه از مرکز تحقیقات زیتون رودبار تهیه شد. سلول‌های سرطانی معده از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری و با محیط RPMI 1640 حاوی ۲۰ درصد سرم جنین گاوی در داخل فلاسک کشت داده شد.

۲-۱. استخراج RNA

پس از پر شدن حدود ۷۰ تا ۸۰ درصد از سطح فلاسک، سلول‌ها شمارش شده و تعداد ۳×۱۰^{۵} سلول در حجم نهایی ۴ میلی لیتر در هر چاهک از پلیت ۶ خانه کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری، سلول‌ها با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از ترکیب عصاره انجیر و روغن زیتون برای ۲۴ ساعت تیمار شدند. پس از گذشت زمان مورد نظر، چاهک‌ها تخلیه شدند و ۱ میلی لیتر ترایزول به هر چاهک اضافه شد. سپس هر چاهک به یک ویال ۲ انتقال یافت و ویال حاوی سلول ۵ تا ۱۰ ثانیه ورتکس شده و ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به هر ویال اضافه شد و ۱۵ ثانیه به‌خوبی مخلوط شد. میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد و سپس با RPM ۱۲۰۰۰ در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی شناور حاوی RNA در یک ویال جدید ریخته شد. به مایع شفاف به اندازه برابر با آن ایزوپروپانول اضافه شده و این ترکیب به آرامی مخلوط شد و ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از آن مخلوط در RPM ۱۲۰۰۰ در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. فاز رویی به آرامی دور ریخته شد. ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد به رسوب اضافه و مدت خیلی کوتاهی ورتکس انجام گرفت. فاز رویی دور ریخته شد و میکروتیوب حاوی رسوب به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت تا خشک شود. پس از آن به رسوب ۲۰ تا ۳۰ میکرولیتر آب DEPC اضافه شد. برای حل شدن رسوب میکروتیوب به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

۲-۲. سنتز cDNA

کیت cDNA از شرکت پارسوز خریداری شد سنتز cDNA از RNA مطابق پروتکل شرکت سازنده‌ی کیت انجام شد. به این صورت که ۲ master mix به شرح جدول (۱) ساخته شد (همه‌ی مراحل اضافه شدن واکنش‌گرها بر روی یخ انجام گرفت.). ۱۰ میکرولیتر از RNA تیمار شده با Dnase با غلظت نانوگرم بر میکرولیتر را درون میکروتیوب ۰/۲ ریخته و ۱۰ میکرولیتر از محلول کیت سنتز cDNA به آن اضافه و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و به دنبال آن ۶۰ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد درون ترموسایکلر قرار داده شد. سپس میکروتیوب روی یخ خنک شده و به منظور انجام qPCR در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

جدول 1: اجزای مستر میکس کیت سنتز cDNA

۲ Master mix

نام ماده	مقدار
RNA نمونه	۱µg
پرایمرRandom hexamer	۱µL
DEPC water	۱۰µL
بافر 5X	۴ µL
RiboLock RNase Inhibitor	۱ µL
Dntp	۲ µL
RevertAid M-MuLV RT	۱ µL
µL حجم نهایی: ۲۰	

۲-۳. بررسی کیفیت و کمیت cDNA

برای بررسی کیفیت cDNA مناسب‌ترین روش استفاده از PCR است، که ما در این پژوهش از پرایمر اختصاصی ژن خانه داری استفاده کردیم. از cDNA ساخته شده رقت‌های۰/۱ ، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه و با پرایمر مذکور PCR انجام شد تا هم کیفیت و هم رقت مناسب برای مراحل بعدی مشخص شود.

۲-۴. ساخت و رقیق کردن پرایمرها

طراحی پرایمر برای ژن MMP-2 به‌عنوان ژن هدف و β-actin به‌عنوان ژن مرجع جهت انجام ریل تایم با استفاده از نرم‌افزار Oligo صورت گرفت. توالی پرایمرهای طراحی شده و دمای اتصال آن‌ها در جدول (۲) آمده است.

جدول 2: ویژگی پرایمرها

نام پرایمر	توالی پرایمر	دمای اتصال (سانتیگراد)
β – actin	Forward Primer CACCATTGGCAATGAGCGGTTC Reverse Primer AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT	۶۲/۱۲
MMP-2	Forward Primer GATAACCTGGATGCCGTCGTG Reverse Primer CCTAGCCAGTCGGATTTGATG	۶۲/۳

۲-۵- نحوه انجام واکنش Real-Time PCR

این واکنش با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. برای تهیه مخلوط این واکنش باید به این موضوع دقت شود که Master Mix به نور و دما حساس بوده و باید تا حد امکان در نور کم و روی یخ کار شود. مقادیر به‌کار رفته برای این واکنش در جدول (۳) آمده است.

جدول 3: مقادیر مصرفی برای واکنش qRT-PCR

Master mix	
نام ماده	مقدار
2X Real-Time PCR Master Mix Sybergreen	µL۱۰
Fپرایمر	µL۰.۵
Rپرایمر	µL۰.۵
cDNA	µg۱
آب مقطر استریل	µL۸
حجم نهایی: µL۲۰	

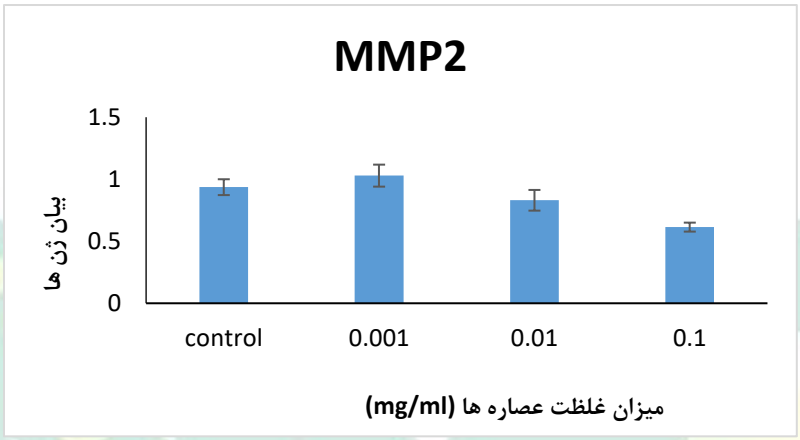
پس از ریخته شدن مواد در چاهک‌ها سطح آن‌ها با چسب شفاف مخصوص پلیت پوشانده شد. سپس پلیت در دستگاه قرار داده شد و برنامه دمایی و زمانی اجرا گردید. به منظور آنالیز و تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها از نرم افزار Excel و SAS استفاده شد .

۳. نتایج و بحث

فرآیند متاستاز از چند مرحله تشکیل می‌شود که شامل جدا شدن سلول‌های توموری از یکدیگر، تخریب ماتریکس خارج سلولی، مهاجرت و در نهایت تشکیل تومور در ناحیه‌ای دیگر است (Seyfried & Huysentruyt, 2013). ماتریکس متالوپروتئازها، اینتگرین‌ها و برخی میکروRNAها، از جمله ژن‌های دخیل در فرآیند متاستاز هستند (Baranwal & Alahari, 2010). هنگ و همکاران نشان دادند که IL-1β می‌تواند موجب ایجاد اختلال در ژن p38 شود و از این طریق میزان بیان و فعالیت mmp2 در رده سلول‌های سرطانی MKN-45 را افزایش دهد (Q. Huang et al., 2014). اختلال در ژن MMP-2 باعث کاهش تولید آنژیواستاتین که یک عامل ضدرگزایی است می‌شود و درنتیجه رگزایی و متاستاز رخ می‌دهد (Donizy et al., 2015) (Yan & Huang, 2012). پی و همکاران تاثیر نوعی داروی گیاهی چینی[12] از گیاه بارهنگ را بر فعالیت *MMP-2* در سرطان سینه‌ی انسان بررسی کرده و نتیجه گرفتند که این گیاه فعالیت این دو آنزیم را کاهش می‌دهد و از تکثیر، مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 پیشگیری می‌کند (Pei et al., 2015). عصاره‌ی میوه‌ی انجیر روی گیرنده‌های دارای استروژن سلول‌های MCF-7 سرطان پستان اثرات ضد انعقادی غیرسمی دارد (Rtibi et al., 2018). پلی فنول‌های موجود در زیتون باعث تعدیل سطح گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)[13] شده و از این طریق سلول‌های mkn-45 را به صورت انتخابی از بین می‌برند (Nowdijeh et al., 2019). اولئوروپئین موجود در زیتون می‌تواند با تاثیر بر بیان ژن Cox-2 و کاهش آن از افزایش بیان *MMP-2* جلوگیری کرده و سرطان‌زایی و متاستاز را مهار کند (Kimura & Sumiyoshi, 2009). بررسی تاثیر سایتوتوکسیسیتی پلی فنل‌های زیتون، که دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌پرولیفراتیو[14] هستند، بر سلول‌های رده MKN-45 نشان داد که این ترکیبات باعث کاهش رشد و زنده‌مانی این سلول‌ها می‌گردند. همچنین در این بررسی نشان داده شد که اثرات داروی سیتارابین (یک آنتی‌متابولیت ضد سرطان) توسط پلی‌فنل‌های روغن زیتون تقویت می‌شود و این پلی فنل‌ها به عنوان عوامل ضد التهابی عمل کرده و از پیشرفت سرطان جلوگیری می‌کنند (Chander, 2018). در این پژوهش ضمن تاکید بر مطالعات پیشین مبنی بر کاهش رشد و متاستاز سلول‌های سرطانی تحت تاثیر تیمارهای متفاوت، بیان ژن متاستازی MMP-2 در

[12] Plantmajoside
[13] Reactive oxygen species
[14] Anti-proliferative

رده سلولی mkn-45 با استفاده از آزمون real time PCR بررسی شد. بدین صورت که پس از استخراج RNA و تبدیل آن به cDNA آزمون ریل تایم انجام گرفت. تفاوت در مقادیر سیکل آستانه (CT) ژن *MMP-2* نسبت به ژن β-actin (ژن کنترل داخلی) محاسبه و میزان بیان آن بر اساس فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد و داده‌ها با نرم افزارهای Excel و SAS آنالیز شدند. براساس شکل (۱) بیان ژن *MMP-2* در رده سلولی ذکر شده، در اثر تیمار با عصاره توام شیره انجیر و روغن زیتون، نسبت به گروه تیمار نشده، به طور معنی‌داری کاهش یافته است.



شکل 1: تغییرات بیان ژن MMP-2 در رده سلولی mkn-45 پس از ۲۴ ساعت تیمار با عصاره توام شیره انجیر و روغن زیتون.

۴. نتیجه گیری

با توجه به اینکه امروزه تحقیقات بر روی عملکرد اختصاصی داروها بر سلول‌های سرطانی متمرکز شده است بنابراین اثرگزاری این دو گیاه بر کاهش بیان ژن متاستازی MMP-2 و پیشگیری از متاستاز، بسیار مهم بوده و می‌تواند در آینده به عنوان داروی پیشنهادی برای درمان سرطان مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

1. Baranwal, S., & Alahari, S. K. (2010). miRNA control of tumor cell invasion and metastasis. *International journal of cancer*, *126*(6), 1283-1290.

2. Chander, M. (2018). Anticancer efficacy of some plant Phenolics-a recent scenario. *Int J Curr Microbiol App Sci*, *7*(10), 1746-1768.

3. Donizy, P., Rudno-Rudzinska, J., Kaczorowski, M., Kabarowski, J., Frejlich, E., Kielan, W., . . . Halon, A. (2015). Disrupted balance of MMPs/TIMPs in gastric carcinogenesis–paradoxical low MMP-2 expression in tumor and stromal compartments as a potential marker of unfavorable outcome. *Cancer investigation*, *33*(7), 286-293.

4. Hashemi, S., Abediankenari, S., Ghasemi, M., Azadbakht, M., Yousefzadeh, Y., & Dehpour, A. (2011). The effect of fig tree latex (Ficus carica) on stomach cancer line. Iranian Red Crescent Medical Journal, 13(4), 272.

5. Huang, H. (2018). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a cancer biomarker and MMP-9 biosensors: Recent advances. Sensors, 18(10), 3249.

6. Huang, Q., Lan, F., Wang, X., Yu, Y., Ouyang, X., Zheng, F., Xie, F. (2014). IL-1β-induced activation of p38 promotes metastasis in gastric adenocarcinoma via upregulation of AP-1/c-fos, MMP2 and MMP9. *Molecular cancer*, *13*(1), 1-15.

7. Jiang, W. L., Zhang, P. F., Li, G. F., Dong, J. H., Wang, X. S., & Wang, Y. Y. (2016). Oct-4 is associated with gastric cancer progression and prognosis. Once Targets and therapy, 9, 517.

8. Kimura, Y., & Sumiyoshi, M. (2009). Olive leaf extract and its main component oleuropein prevent chronic ultraviolet B radiation-induced skin damage and carcinogenesis in hairless mice. *The journal of nutrition*, *139*(11), 2079-2086.

9. López-Lázaro, M. (2009). Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. Mini reviews in medicinal chemistry, 9(1), 31-59.

10. Lorenzi, V., Maury, J., Casanova, J., & Berti, L. (2006). Purification, product characterization and kinetic properties of lipoxygenase from olive fruit (*Olea europaea* L.). Plant Physiology and Biochemistry, 44(7-9), 450-454.

11. Massagué, J., & Obenauf, A. C. (2016). Metastatic colonization by circulating tumour cells. Nature, 529(7586), 298-306.

12. Monteagudo, Á., & Santos, J. (2014). Studying the capability of different cancer hallmarks to initiate tumor growth using a cellular automaton simulation. Application in a cancer stem cell context. Biosystems, 115, 46-58.

13. Nowdijeh, A. A., Moosavi, M. A., Hosseinzadeh, S., Soleimani, M., Sabouni, F., & Hosseini-Mazinani, M. (2019). Anti-oxidant and Selective Anti-proliferative Effects of the Total Cornicabra Olive Polyphenols on Human Gastric MKN45 Cells. *Iranian journal of biotechnology*, *17*(1).

14. Page-McCaw, A., Ewald, A. J., & Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. Nature reviews Molecular cell biology, 8(3), 221.

15. Pei, S., Yang, X., Wang, H., Zhang, H., Zhou, B., Zhang, D., & Lin, D. (2015). Plantamajoside, a potential anti-tumor herbal medicine inhibits breast cancer growth and pulmonary metastasis by decreasing the activity of matrix metalloproteinase-9 and-2. BMC cancer, 15(1), 1-12.

16. Rawla, P., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. Przeglad gastroenterologiczny, 14(1), 26.

17. Rtibi, K., Grami, D., Wannes, D., Selmi, S., Amri, M., Sebai, H., & Marzouki, L. (2018). Ficus carica aqueous extract alleviates delayed gastric emptying and recovers ulcerative colitis-enhanced acute functional gastrointestinal disorders in rats. *Journal of ethnopharmacology*, *224*, 242-249.

18. Seyfried, T. N., & Huysentruyt, L. C. (2013). On the origin of cancer metastasis. *Critical Reviews™ in Oncogenesis*, *18*(1-2).

19. Yan, J., & Huang, Q. (2012). Genomics screens for metastasis genes. *Cancer and Metastasis Reviews*, *31*(3), 419-428.

Studying the Genotoxic effects of methanolic extract of *Teucrium persicum* on Colorectal cancer cell line (SW-480)

Parvaneh Hajipour[1], Majid Tafrihi[2*], Maryam Mohadjerani[3]

1- M.Sc. student, Molecular & Cell Biology Research Lab, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Mazandaran, Iran

2- Assistant professor, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of basic Sciences. University of Mazandaran, Babolsar, Mazandaran, Iran

3- Associate professor, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of basic Sciences. University of Mazandaran, Babolsar, Mazandaran, Iran

E-Mail: m.tafrihi@umz.ac.ir

Abstract

Plants have high potential for the treatment of many diseases, including cancer, due to their phytochemicals. Raw extracts or phytochemicals extracted from some plants have anti-cancer potentials. *Teucrium persicum* is an Iranian endemic plant belonging to the Lamiaceae family that grows in Fars province and is used in traditional medicine to relieve headaches and abdominal pains. The aim of this study was to evaluate the cell viability of methanolic extract of *T. persicum* in colorectal cancer cell line (SW-480). MTT results showed that methanolic extract of *T. persicum* potentially inhibited the life of SW-480 cells (IC50 = 7). DNA fragmentation assays showed that treatment of cells with concentrations of 2, 5, 7, 8 µg/l of the extract caused a smear pattern in the electrophoretic movement of genomic DNA. However, no such pattern was observed in DNA extracted from control (untreated) cells. Also, treatment of SW-480 cells with concentrations of 5, 7, 8, 10 and 12 µg / ml of the extract caused the formation of micronuclei in the cells. The results of this study suggest that *T. persicum* may be a suitable candidate for future anti-cancer studies as a medicinal plant.

Keywords: *Teucrium persicum* , Cancer , Cytotoxicity, Genotoxic effects

بررسی اثرات ژنوتوکسیک عصاره متانولی گیاه مریم نخودی شیرازی بر سلول‌های سرطانی کولورکتال(SW-480)

پروانه حاجی پور[1] ، مجید تفریحی[2*]، مریم مهاجرانی[3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه مازندران

۲- استادیار، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه مازندران

۳- دانشیار، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه مازندران

E-Mail: m.tafrihi@umz.ac.ir

چکیده

گیاهان به دلیل داشتن ترکیبات فیتوکمیکال، پتانسیل بالایی در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان را دارا می‌باشند. عصاره‌های خام یا مواد شیمیایی گیاهی به دست آمده از برخی گیاهان دارای خواص ضد سرطانی بالقوه هستند. گیاه مریم نخودی شیرازی یا Teucrium persicum یک گیاه بومی ایرانی متعلق به خانواده Lamiaceae است که در استان فارس رشد می‌کند که در طب سنتی برای تسکین سردرد و دردهای شکمی استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه ارزیابی کشندگی سلولی، عصاره متانولی گیاه *T.* persicum بر رده‌ی سلولی سرطانی روده بزرگ (SW-480) است. نتایج MTT نشان داد که عصاره‌ی متانولی گیاه T. persicum حیات سلول‌های SW-۴۸۰ را به طور بالقوه مهار می‌کند (IC_{50}=7). آزمایش قطعه قطعه شدن DNA نشان داد تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۲، ۵، ۷، ۸ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره موجب ایجاد الگوی smear در حرکت الکتروفورزی DNA ژنومیک می‌شود. در حالی که در DNA استخراجی از سلول‌های کنترل (تیمار نشده) چنین الگویی مشاهده نشد. همچنین تیمار سلول‌های SW-۴۸۰ با غلظت‌های ۵، ۷، ۸، ۱۰ و ۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره موجب تشکیل میکرونوکلئوس در سلول‌ها شد. نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌کند که گیاه مریم نخودی شیرازی می‌تواند به عنوان یک گیاه دارویی، کاندید مناسبی برای مطالعات ضد سرطان در آینده مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: Teucrium persicum ، سرطان ، کشندگی سلولی، اثرات ژنوتوکسیک

۱.مقدمه

سرطان یکی از دلایل اصلی مرگ و میر در دنیا می‌باشد که بعد از حوادث ترافیکی و بیماری‌های قلبی-عروقی به عنوان سومین علت مرگ در بین مردم ایران شناخته شده است (Roshandel et al., 2019). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان میدهد که در سال ۲۰۳۰ احتمالا بیش از ۲۷ میلیون نفر به سرطان مبتلا خواهند شد (Bray et al., 2018). استفاده از گیاهان یا ترکیبات مشتق شده از آنها به عنوان عوامل درمانی سابقه طولانی دارد (Petrovska, 2012). در حال حاضر، حدود نیمی از داروهایی که در پزشکی استفاده می‌شوند منشا طبیعی دارند (Maridass and DeBritto, 2008; Licciardi and Underwood, 2010). با توجه به عوارض جانبی داروهای شیمیایی ، در کشورهای در حال توسعه علاقه زیادی به استفاده از داروهای گیاهی وجود دارد (Calixto, 2019). جنس *Teucrium* متعلق به خانواده Lamiaceae بیش از ۳۰۰ گونه را شامل می‌شود که به طور گسترده در جهان پخش می‌شوند (Stankovic et al., 2011). در میان آنها ، ۱۲ گونه در ایران شناسایی شده و سه گونه از آنها به عنوان گونه‌های بومی ایرانی شناخته می‌شوند (Masoudi et al., 2009). گزارش شده است که گونه‌های *Teucrium* دارای فعالیت‌های زیستی مختلفی از جمله فعالیت‌های ضدمیکروبی، ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی، کاهش قند خون، کاهش چربی خون، ضد تب، ضدعفونی‌کننده، ضدحساسیت، ضدزخم و ضدسرطان هستند (Rajabalian, ۲۰۰۸; Rizvi et al., ۲۰۱۹). *T.persicum* یک گونه بومی ایرانی است که در استان فارس رشد می‌کند. بومیان آن را مروه تلخ می‌نامند و از آن برای درمان سردرد، دردهای شکمی، دیابت، چربی خون، التهاب و غیره استفاده می‌کنند (Henchiri et al., 2009; Tafrihi et al., 2014; Al-Hamwi et al., 2021). مطالعات نشان داده که بین رژیم غذایی و سرطان رابطه وجود دارد(Anand et al., 2008; Langner and Rzeski, 2012). بطوریکه گزارش شده است حدود یک سوم سرطان‌ها با الگوی زندگی مناسب قابل پیشگیری است (Surh, 2003). از آنجایی‌که تاکنون مطالعه‌ای درباره اثرات کشندگی سلولی گیاه *T. persicum* و نیز اثرات ژنوتوکسیک آن بر سلول‌های سرطانی دستگاه گوارش صورت نگرفته است. بنابراین، در این مطالعه سلول‌های SW-480 سرطان روده بزرگ به عنوان مدلی برای مطالعه سمیت سلولی و اثرات مهاری عصاره‌ی متانولی *T. persicum* مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

۲.مواد و روش ها

۲-۱-تهیه عصاره متانولی

۲۵ گرم از قسمت‌های هوایی گیاه *T. persicum* پودر شده و سپس در ۵۰ میلی‌لیتر متانول خیس شده و به مدت ۴۸ ساعت توسط دستگاه شیکر، هم زده شد. مایع رویی تغلیظ شد و سپس توسط دستگاه .Freeze-dryer خشک شد.

۲-۲-کشت سلولی

رده سلولی SW-۴۸۰ (آدنوکارسینوم کولورکتال انسانی) مورد استفاده در این مطالعه از بانک سلولی ایران (موسسه پاستور، تهران ، ایران) خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ غنی شده با ۱۰٪ سرم جنین گاو (FBS) (سیگما) و ۱٪ پنی سیلین / استرپتومایسین (سیگما) کشت داده شدند و در انکوباتور مرطوب ۵٪ CO_2 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

۳-۲-بررسی میزان کشندگی عصاره با روش MTT

در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه، ۸×۱۰^۳ سلول SW-۴۸۰ کشت داده شد. پس از اینکه سلول‌ها به تراکم ۷۰٪ رسیدند با غلظتهای ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ میکروگرم برمیلی_لیتر عصاره‌ی *T. persicum* به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. محیط سلول‌ها برداشته شد و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول PBS حاوی ۵ گرم پودر MTT به هر چاهک اضافه شد. ۳ ساعت بعد، محلول MTT با ۱۰۰ میکرولیتر DMSO جایگزین شد و میزان جذب آن در ۵۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA reader اندازه‌گیری شد. این آزمایش سه بار تکرار شد و مقدار $IC_{۵۰}$ با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism ver.۸.۴.۳ محاسبه شد.

۴-۲-آزمایش DNA Laddering

در هر چاهک از پلیت ۶ خانه، $۱۰^۴$ سلول SW-۴۸۰ کاشته شد. پس از اینکه سلول‌ها به تراکم ۷۰٪ رسیدند با غلظت‌های ۲ ، ۵ ، ۷ ، ۸ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ی متانولی *T. persicum* به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. سپس سلول‌ها جمع‌آوری شده و ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیز سلولی (0.01 M Tris-HCl ، pH = 8.0 ، 0.1 M NaCl ، 0.025 M EDTA ، pH = 8 ، ۱٪(SDS (w/v و ۰.۳ میلی‌گرم/میلی‌لیتر آنزیم پروتئیناز K به رسوب سلولی اضافه شده و سپس ۲۴ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در مرحله بعد، ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر RNase به هر یک از ویال‌ها اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس استخراج DNA با استفاده از فنل/کلروفرم/ایزوآمیل الکل (۲۵: ۲۴: ۱) انجام شد. الکتروفورز DNA استخراج شده در ژل آگارز ۱٪ انجام شد. پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، با استفاده از سیستم Red-Type (Proteinsimple, USA) AlphaImager مشاهده شد.

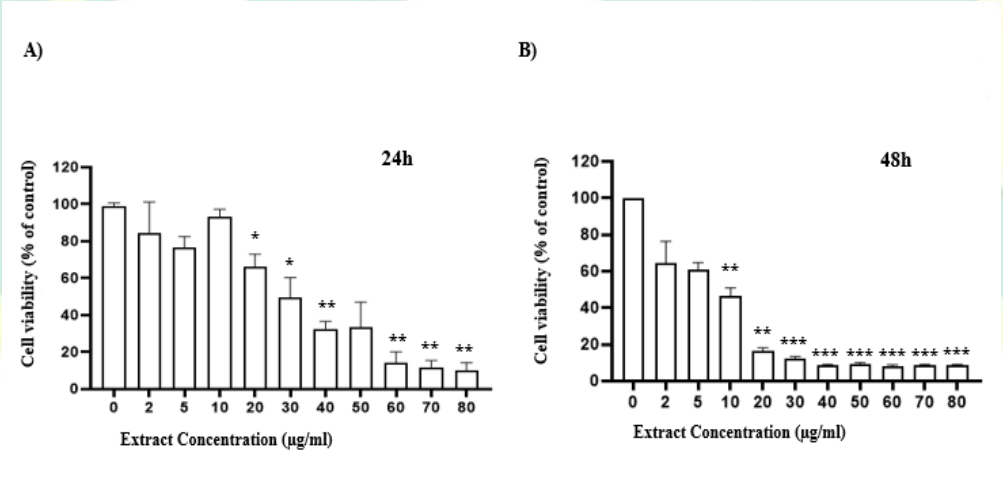
۵-۲-آزمایش سنجش میکرونوکلئوس

در هر چاهک از پلیت ۲۴ خانه، 10^4 سلول SW-480 کاشته شد. پس از رسیدن سلول ها به تراکم ۷۰% با غلظت های ۵، ۷، ۸، ۱۰، ۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر تیمار شدند .بعد از گذشت 15 ساعت سلول ها با یک میکرولیتر سیتوکالازین B به مدت 27 ساعت تیمار شدند تا سیتوکینز متوقف شود.پس از برداشت سلول‌ها با استفاده از محلول EDTA-Trypsin و سانتریفیوژ 10 دقیقه با دور rpm 1000 ، به رسوب سلولی 5 میلی لیتر محلول سرد هیپوتونیک حاوی57% پتاسیم کلرید افزوده شد. پس از گذشت 10 دقیقه،

سانتریفیوژ با دور 3000 rpm به مدت 3 دقیقه انجام شد. سپس 4 میلی لیتر محلول فیکساتور متانول: استیک اسید (6:1) قطره قطره به رسوب سلولی اضافه شد. سپس مجددا سانتریفیوژ با دور ۹۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه 3 بار متوالی انجام شد .سپس بخشی از محلول رویی برداشته شده و روی لام‌های سرد ریخته شده و لام‌ها در دمای اتاق کاملا خشک شدند. ۴۸ ساعت بعد رنگ‌آمیزی سلول‌ها با محلول ۱۵% گیمسا انجام شد. سپس لامل‌ها به وسیله nail polish روی لام فیکس شده و بررسی میکرونوکلئوس با میکروسکوپ نوری انجام گرفت.

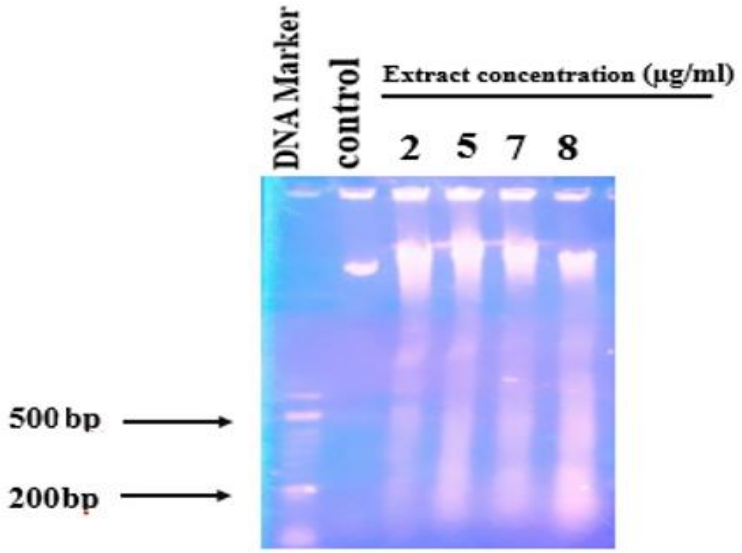
۳.نتایج و بحث

برای تشخیص اثر مهاری عصاره‌ی متانولی T. persicum بر قابلیت زنده ماندن سلول‌های SW-۴۸۰ با روش MTT، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. مقادیر IC_{50} عصاره‌ی T. persicum برای سلول‌های SW-۴۸۰، برای ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب برابر با ۲۸ µg/ml و ۷ µg/ml محاسبه شد. نتایج MTT نشان داد که عصاره‌ی متانولی T. persicum به طور قابل توجهی حیات سلول‌های SW-۴۸۰ را کاهش می‌دهد (شکل ۱).



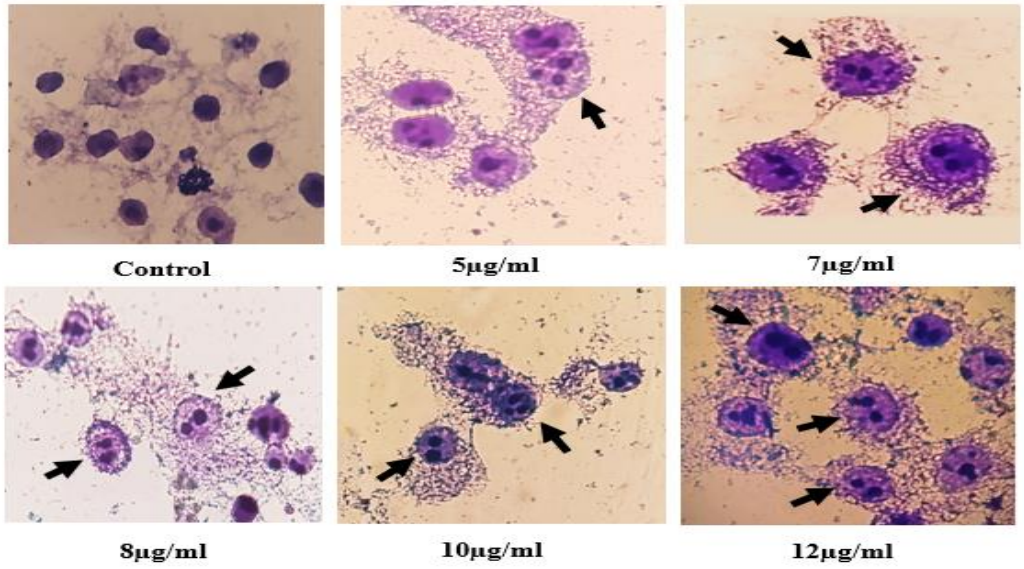
شکل۱:تاثیر عصاره متانولی گیاه T. persicum بر زنده-مانی سلول‌هایSW-480 در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت. داده ها، میانگین سه تکرار مستقل می باشند.

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود الگوی حرکت الکتروفورزی DNA ژنومیک سلول‌های SW-480 تیمار شده با غلظت‌های ۲، ۵، ۷ و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ی گیاه *T.* persicum بصورت smear می‌باشد اما در سلول‌های کنترل (تیمار نشده) این وضعیت دیده نمی‌شود (شکل۲).



شکل۲: تصویر ژل آگارز یک درصد که نمونه‌های DNA استخراج شده از سلول‌های SW-480 تیمار شده با غلظت‌های ۲، ۵، ۷ و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره و سلول‌های کنترل روی آن سوار شده‌اند را نشان می‌دهد. این الگو برای سلول‌های تیمار شده با غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره متفاوت بود و حالت گسترده را نداشت، اما در غلظت‌های نزدیک به IC_{50} و بالاتر، DNA ژنومیک استخراج شده به صورت Smear دیده می‌شود.

نتایج آزمایش micronucleus نشان داد تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۵، ۷، ۸، ۱۰ و ۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی گیاه *T. persicum* موجب تشکیل micronucleus بصورت افزایشی وابسته به دوز شد (شکل ۳). مقایسه سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره و سلول‌های کنترل نشان داد که با افزایش غلظت عصاره سلول‌های دو یا چند هسته‌ای نسبت به کنترل افزایش یافتند.



شکل۳: بررسی اثر ژنوتوکسیک عصاره متانولی گیاه T. persicum بر سلول‌های SW-480. همانطور که شکل نشان می‌دهد با افزایش غلظت عصاره، میزان سلول‌های دو یا سه هسته‌ای بصورت وابسته به دوز، افزایش می‌یابد.

سرطان همچنان به عنوان یک علت اصلی مرگ و میر در سراسر جهان شناخته می‌شود (Masoudi et al. ۲۰۰۹). روش‌های درمانی مختلفی جهت مهار و یا درمان سرطان استفاده شده است که هر کدام عوارض جانبی متعددی برای بیمار دارند. با این حال روش‌های رایج در درمان سرطان سبب دست‌یابی به پیشرفت‌هایی در این زمینه شده است و استراتژی درمان‌های اخیر نیاز به تحقیقات بیشتر در محصولات طبیعی داشته که سبب تولید داروهای مؤثری در درمان سرطان گردیده است (Hasmah et al., ۲۰۱۰). سابقه طولانی استفاده از گیاهان در درمان بیماری‌ها و مطالعات آزمایشگاهی و بالینی نشان داده که گیاهان (شامل میوه‌ها و سبزیجات) پتانسیل خوبی در درمان بسیاری از بیماری‌ها دارند. گیاه T. persicum یک گیاه بومی ایرانی است و در استان فارس رشد می‌کند (Javidnia et al.,۲۰۰۷). مطالعات متعددی در مورد ترکیب شیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی روغن‌های جدا شده از T. persicum انجام شده است (Monsef-Esfahani et al.,۲۰۱۰). در این مطالعه از سلول‌های سرطانی SW-۴۸۰ برای مطالعه خواص کشندگی سلولی و اثرات مهاری گیاه T. persicum استفاده شد. نتایج آزمایش MTT نشان داد که عصاره T. persicum سمیت سلولی قوی را در برابر رده سلولی SW-۴۸۰ نشان می‌دهد. یکی از مکانیسم‌های مهم و مطلوب در شیمی‌درمانی که سلول‌های تومور را از بین می‌برد، القای آپوپتوز است. چندین مطالعه نشان داده است که عصاره‌های گیاهی یا ترکیبات مشتق شده از گیاه دارای پتانسیل القای آپوپتوز هستند. مشخص شده است در سلول‌هایی که وارد آپوپتوز شده‌اند، هسته سلولی متراکم و فشرده شده و اندونوکلئازهای سلولی فعال شده و DNA ژنومیک را در نواحی بین نوکلئوزومی به قطعات ۱۸۰ جفت بازی یا مضربی از آن برش می‌دهند. نتایج آزمایش DNA ladder نشان می‌دهد که کاهش قابلیت زنده ماندن سلول‌های SW-۴۸۰ شاید به دلیل القای آپوپتوز است. همچنین این مطالعه نشان

داد عصاره متانولی گیاه مریم نخودی شیرازی با ایجاد اختلال در تقسیم سلولی و سیتوکینز، موجب تشکیل میکرونوکلئوس و یا تشکیل دو یا چند هسته در سلول‌ها می‌شود.

۴.نتیجه گیری

مطالعه حاضر شواهدی را ارائه می‌دهد که عصاره‌ی متانولی گیاه Teucrium persicum از تکثیر سلولی جلوگیری می‌کند و دارای فعالیت سیتوتوکسیک وابسته به دوز و زمان است و احتمالا آپوپتوز را در رده سلولی SW-۴۸۰ القا می‌کند. در مجموع نتایج این مقاله نشان می‌دهد که گیاه T. persicum احتمالا می‌تواند به عنوان یک کاندید مناسب برای مطالعات بعدی جهت مهار سلول‌های سرطانی دستگاه گوارش مورد توجه قرار گیرد. به طور قطع آزمایش‌های بیشتری برای یافتن مکانیسم‌های مولکولی این تاثیرات گیاه T. persicum مورد نیاز است.

منابع

1. Al-Hamwi M., Aboul-Ela M., El-Lakany A. and Nasreddine S. 2021. Anticancer Activity of Micromeria fruticosa and Teucrium polium Growing in Lebanon. Pharmacognosy Journal, 13(1).
2. Anand P., Kunnumakara A. B., Sundaram C., Harikumar K. B., Tharakan S. T., Lai O. S. and Aggarwal B. B. 2008. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. Pharmaceutical research, 25(9), 2097-2116.
3. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R. L., Torre L. A. and Jemal A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians, 68(6), 394-424.
4. Calixto J. B. 2019. The role of natural products in modern drug discovery. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 91.
5. Henchiri H., Bodo B., Deville A., Dubost L., Zourgui L., Raies A. and Mambu L. 2009. Sesquiterpenoids from Teucrium ramosissimum. Phytochemistry, 70(11-12), 1435-1441.
6. Hasmah A., Nurazila Z., Chow C. Y., Rina R. and Rafiquzzaman M. 2010. Cytotoxic effects of Quercus infectoria extracts towards cervical (Hela) and Ovarian (Caov-3) cancer cell lines. Health and the Environment Journal, 1(2), 17-23.
7. Javidnia K., Miri R. and Khosravi A. R. 2007. Composition of the essential oil of Teucrium persicum Boiss. from Iran. Journal of Essential Oil Research, 19(5), 430-432..
8. Langner, E., & Rzeski, W. (2012). Dietary derived compounds in cancer chemoprevention. Contemporary Oncology, 16(5), 394.
9. Licciardi P. V. and Underwood J. R. 2010. Identification of a novel vaccine adjuvant that stimulates and maintains diphtheria toxoid immunity. Vaccine, 28(22), 3865-3873.
10. Maridass M. and De Britto A. J. 2008. Origins of plant derived medicines. Ethnobotanical Leaflets, 2008(1), 44.
11. Masoudi S., Aghajani Z., Rustaiyan A., Feizbakhsh A. and Kakhky A. M. 2009. Volatile constituents of Teucrium persicum Boiss., Thymus caucasicus Willd. ex Ronniger subsp. grossheimii (Ronniger) Jalas. and Marrubium crassidens Boiss. Three Labiatae herbs growing wild in Iran. Journal of Essential Oil Research, 21(1), 5-7.
12. Menichini F., Conforti F., Rigano D., Formisano C., Piozzi F. and Senatore F. 2009. Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four Teucrium essential oils from Greece. Food Chemistry, 115(2), 679-686.

13. Monsef-Esfahani H. R., Miri A., Amini M., Amanzadeh Y., Hadjiakhoondi A., Hajiaghaee R. and Ajani Y. 2010. Seasonal variation in the chemical composition, antioxidant activity and total phenolic content of Teucrium persicum Boiss. essential oils. Research Journal of Biological Sciences, 5(7), 492-498.
14. Petrovska B. B. 2012. Historical review of medicinal plants' usage. Pharmacognosy reviews, 6(11), 1.
15. Rajabalian S. 2008. Methanolic extract of Teucrium polium L potentiates the cytotoxic and apoptotic effects of anticancer drugs of vincristine, vinblastine and doxorubicin against a panel of cancerous cell lines. Experimental Oncology.
16. Roshandel G., Ghanbari-Motlagh A., Partovipour E., Salavati F., Hasanpour-Heidari S., Mohammadi G. and Malekzadeh R. 2019. Cancer incidence in Iran in 2014: results of the Iranian National Population-based Cancer Registry. Cancer epidemiology, 61, 50-58.
17. Rizvi T. S., Hussain I., Ali L., Mabood F., Khan A. L., Shujah S. and Halim S. A. 2019. New gorgonane sesquiterpenoid from Teucrium mascatense Boiss, as α-glucosidase inhibitor. South African Journal of Botany, 124, 218-222.
18. Stankovic M. S., Curcic M. G., Zizic J. B., Topuzovic M. D., Solujic S. R. and Markovic S. D. 2011. Teucrium plant species as natural sources of novel anticancer compounds: antiproliferative, proapoptotic and antioxidant properties. International journal of molecular sciences, 12(7), 4190-4205.
19. Surh Y. J. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nature Reviews Cancer, 3(10), 768-780.
20. Tafrihi M., Toosi S., Minaei T., Gohari A. R., Niknam V. and Arab Najafi S. M. 2014. Anticancer properties of Teucrium persicum in PC-3 prostate cancer cells. Asia Pac J Cancer Prevent, 15(2), 785-791.

Determination of biochemical parameters of L-asparaginase enzyme from bovine liver in the presence of lemongrass extract of *Melissa officinalis L*

Mahin Sheikhniazi[1]; Maryam Mohadjerani[2*];

1- Master student, Department of molecular and cell biology, University of Mazandaran
2- Associate Professor, Department of molecular and cell biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran

* (m.mohajerani@umz.ac.ir)

Abstract

The enzyme L-asparaginase hydrolyzes the amino acid asparagine to aspartic acid and ammonia. L-asparaginase has antitumor activity and has been accepted as a chemotherapeutic agent. This enzyme is used to treat acute lymphoblastic leukemia. In addition to its therapeutic application, it plays an important role in the food industry and as a food processing agent in reducing the formation of acrylamide, a carcinogen, during the production of starchy food products. In order to evaluate the activity and kinetic parameters of asparaginase enzyme, fresh bovine liver was prepared from an animal source in the presence of Melissa officinalis L extract. 10 g of bovine liver was homogenized with Tris-HCl buffer using a homogenizer and partially purified by precipitation with 60% acetone. Melissa officinalis L is a perennial and aromatic plant belonging to the mint family (lamiacea). This plant is used in Iran to treat nausea, anemia, depression, asthma, etc. Enzyme activity was studied by generation method by calculating the ammonia released during the reaction. In this study, the protein concentration for the purified enzyme was 5 mg/ml. Activity and specific activity values for the purified enzyme were 55.39 U/ml and 11 U/mg, respectively. In order to extract the alkaloid extract from Lemongrass, suitable solvents including: ethyl acetate, petroleum ether and chloroform were used. The resulting extract was concentrated using a rotary apparatus. Enzyme activity at different concentrations of asparagine solution was measured at 1, 3, 5 and 7 minute of incubation time in the presence of extracts at concentrations of 0.3, 0.75 and 1.5 µg/µl and without plant extract. Finally, the diagrams of Mikaelis-Menten and Linweurberg were drawn. K_m and V_{max} values were calculated for it. The value of K_m was equal to 0.38 mM and the value of V_{max} was equal to 0.0264 mM/min. After examining the K_m and V_{max} parameters of L-asparaginase enzyme in the presence of Melissa officinalis L extract, it was observed that in different concentrations of the extract, the amount of V_{max} decreased and the amount of K_m increased. Therefore, the alkaloids in lemongrass have inhibitory effects on the enzyme L-asparaginase.

Keywords: L-asparagine, Nesslerization, Alkaloid, Extraction

تعیین پارامترهای بیوشمیایی آنزیم ال-آسپاراژیناز از کبد گاو در حضور عصاره گیاه بادرنجبویه

مهین شیخ نیازی[۱]؛ مریم مهاجرانی[۲*]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران

۱-دانشیار گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران

(*m.mohajerani@umz.ac.ir)

چکیده

آنزیم ال-آسپاراژیناز اسیدآمینه‌ی آسپاراژین را به آسپارتیک اسید و آمونیاک هیدرولیز می‌کند. ال-آسپاراژیناز دارای فعالیت ضدتوموری است و به عنوان عوامل شیمی درمانی پذیرفته شده است. این آنزیم برای درمان سرطان خون لنفوبلاستیک حاد کاربرد دارد. علاوه‌بر کاربرد درمانی نقش مهمی نیز در صنایع غذایی دارد و به عنوان عامل پردازنده‌ی غذا در کاهش سطح شکل گیری اکریل‌آمید، یک عامل سرطان‌زا، در طول تولید محصولات غذایی نشاسته‌ای می‌باشد. به منظور بررسی فعالیت و پارامترهای سینتیکی آنزیم آسپاراژیناز از منبع حیوانی و در حضور عصاره‌ی گیاه بادرنجبویه، کبد تازه‌ی گاو تهیه شد. ۱۰ گرم کبد گاو با بافر تریس-HCl با استفاده از دستگاه هموژنایزر هموژن شد و از طریق رسوب‌دهی با استون ۶۰ درصد، به طور جزئی خالص شد. گیاه بادرنجبویه (Melissa officinalis L) گیاهی چند ساله و معطر متعلق به خانواده نعناعیان (lamiacea) می‌باشد. این گیاه در ایران برای درمان تهوع، کم خونی، افسردگی، آسم و... کاربرد دارد. فعالیت آنزیم با استفاده از روش نسلریزاسیون، از طریق محاسبه‌ی آمونیاک آزاد شده در طول واکنش، مورد مطالعه قرار گرفت. در این مطالعه، غلظت پروتئین برای آنزیم خالص شده ۵ mg/ml به دست آمد. مقادیر فعالیت و فعالیت ویژه نیز برای آنزیم خالص شده به ترتیب برابر با ۵۵/۳۹ U/ml و ۱۱ U/mg به دست آمد. به منظور استخراج عصاره آلکالوئیدی از گیاه دارویی بادرنجبویه، از حلال های مناسب شامل: اتیل استات، پترلیوم‌اتر و کلروفرم استفاده شد. عصاره‌ی حاصل با استفاده از دستگاه روتاری تغلیظ شد. فعالیت آنزیم در غلظت های مختلف محلول آسپاراژین، در زمان های ۱ و ۳ و ۵ و ۷ دقیقه زمان انکوباسیون، در حضور عصاره با غلظت های ۰/۳، ۰/۷۵ و ۱/۵ میکروگرم بر میکرولیتر و بدون عصاره گیاهی مورد سنجش قرار گرفت. در نهایت نمودارهای میکائیلیس منتن و لاینویوربرگ آن ها رسم گردید. مقادیر K_m و V_{max} برای آن محاسبه شد. مقدار K_m برابر با ۰/۳۸ میلی‌مولار و مقدار V_{max} برابر با ۰/۰۲۶۴ میلی‌مولار بر دقیقه به دست آمد. پس از بررسی پارامترهای K_m و V_{max} آنزیم ال-آسپاراژیناز در حضور عصاره‌ی گیاه بادرنجبویه، مشاهده شد که در غلظت های مختلف عصاره، مقدار V_{max} کاهش و مقدار K_m افزایش یافته است. بنابراین آلکالوییدهای موجود در گیاه بادرنجبویه دارای اثرات مهاری بر بروی آنزیم ال-آسپاراژیناز می‌باشند.

واژگان کلیدی: ال-آسپاراژین، نسلریزاسیون، آلکالوئیدها، استخراج

۱.مقدمه

آنزیم ال-آسپاراژیناز، اسیدآمینه‌ی ال-آسپاراژین را به ال-آسپارتات و آمونیاک هیدرولیز می‌کند (Michalska et al., 2008). ال-آسپاراژیناز یکی از آنزیم‌های مهم درمانی است و به عنوان یک درمان موثر برای سرطان خون لنفوبلاستیک حاد و سایر مواردی که مرتبط با تومور درمانی هستند در ترکیب با شیمی درمانی استفاده می‌شود (Jimat et al., 2017). در سال ۱۹۵۳، کید مشاهده کرد که سرم خوکچه هندی از رشد تومور در موش ها جلوگیری می‌کند (Kidd, 1953). پس از آن بروم نشان داد که خاصیت ضدتوموری سرم خوکچه هندی به دلیل وجود آنزیم آسپاراژیناز است (Broome. and J D 1961). سپس در سال ۱۹۶۴ ماش بورن و ریستون مشاهده کردند که آسپاراژیناز خالص شده از عصاره سلولی باکتری *ایشریشیا کلای* مشابه با سرم خوکچه هندی، فعالیت ضدتوموری دارد (Mashburn, 1964). درمان های بالینی مدرن لوسمی لنفوبلاستیک حاد دوران کودکی (ALL)، از روش های مبتنی بر آنزیم برای تخلیه‌ی آسپاراژین خون استفاده می‌کنند (Khalaf, 2012). منطق درمان با آسپاراژیناز این است که با رساندن این آنزیم به جریان خون، آسپاراژین ها به سرعت از جریان خون تخلیه می‌شوند و از بین می‌روند. آسپاراژین یک نیاز تغذیه‌ای برای هر دو سلول های طبیعی و سلول های سرطانی است. سلول های طبیعی آنزیم آسپاراژین سنتتاز را تولید می‌کنند که قادر به سنتز آسپاراژین از آسپارتیک اسید است. در حالی که در سلول های سرطانی آنزیم آسپاراژین سنتتاز در سطوح پایین وجود دارد (et al., 2009 Theantana). ال-آسپاراژیناز با کاهش غلظت آسپاراژین های گردش خون، رشد سلول های سرطانی را به تاخیر می‌اندازد (Jimat et al., 2017). هم چنین ال-آسپاراژیناز در صنایع غذایی برای جلوگیری از شکل گیری ماده‌ی سرطان زای اکریل‌آمید در محصولات غذایی تولید شده در دمای بیش از ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد کاربرد دارد (Abdelrazek et al., 2020). آنزیم ال-آسپاراژیناز به طور وسیع در طبیعت وجود دارد و نه تنها در اندام های حیوانی بلکه در میکروارگانیسم هایی مانند باکتری *E.coli* و هم چنین در گیاهان توزیع شده است (El-Sayed et al., 2011). منابع دیگر ال-آسپاراژیناز شامل قارچ ها، مخمر ها، اکتینومایست ها و جلبک ها می‌باشد (Nguyen et al., 2016). ال-آسپاراژیناز های به دست آمده از باکتری های *E.coli* و *Erwinia chrysanthemi* در طی ۴۰ سال اخیر به عنوان عوامل شیمی درمانی استفاده شده اند. اما همراه با عوارض جانبی متعددی بوده اند (Kumar et al., 2016). عوارض جانبی ناشی از پاسخ های آلرژیک در نظر گرفته می‌شود و استفاده از ال-آسپاراژیناز ها از ارگانیسم های مختلف ممکن است مشکل را کاهش دهد. از این رو تلاش هایی برای یافتن راه های جدید برای افزایش اثر شیمی درمانی این آنزیم برای درمان لوسمی در حال انجام است (Huang et al., 2014). استفاده از گیاهان دارویی به منظور درمان بیماری ها با تاریخ زندگی بشر همزمان بوده است. امروزه به علت استفاده های بی رویه از داروهای شیمیایی و سنتزی که غالباً اثرات سوء جانبی نیز بر رو ی سلامت انسان دارند، به داروهای گیاهی که طبیعی بوده و دارای همان خواص دارویی ولی با اثرات مضر جانبی کمتر هستند، روی آورده شده است (مرادی و همکاران، ۱۳۹۷). متابولیت های ثانویه‌ی مشتق از گیاهان دارای پتانسیل قوی برای پاک سازی رادیکال های آزاد می‌باشند که در تمام قسمت های مختلف گیاهی مانند برگ، میوه، دانه، ریشه و پوست وجود دارند. تحقیقات و مطالعه های انجام شده نشان می‌دهند که عصاره های به دست آمده از منابع طبیعی دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قوی می‌باشند (شاطرآبادی و همکاران، ۱۳۹۶). گیاهان خانواده‌ی نعناع از زمان های گذشته در طب سنتی مورد استفاده بوده است. از مهم‌ترین محصولاتی که از نعناعیان به دست می‌آید می‌توان به عصاره‌ی آن‌ها اشاره نمود که مصرف زیادی در طب سنتی، صنایع غذایی، عطرسازی و داروسازی دارد (طباطبایی یزدی و همکاران، ۱۳۹۵). گیاه بادرنجبویه با نام علمی *Melissa Officinalis L* یک گیاه چند ساله‌ی معطر متعلق به خانواده‌ی نعنائیان، بومی مدیترانه می‌باشد و به طور گسترده‌ای در مناطق اروپای مرکزی و جنوبی و آسیا رشد می‌کند. در ایران برای درمان سردرد، سوءهاضمه، تهوع، کم‌خونی، سرگیجه، ضعف، آسم، بی‌خوابی، صرع، افسردگی و زخم استفاده می‌شود. بادرنجبویه به دلیل اهمیت

بسیاری که در مصارف پزشکی، صنایع آرایشی و نیز صنایع غذایی دارد، بسیار مورد توجه است (شاه ولی بر و اسمعیل زاده بهابادی، ۱۳۹۸).

۲.مواد و روش‌ها

۲-۱-استخراج آنزیم آسپارازیناز از کبد گاو

۱۰ گرم کبد تازه‌ی گاو در بشر حاوی مقداری بافر تریس-HCl با pH:۸/۶ با استفاده از دستگاه هموژنایزر، هموژن شد. هموژنات حاصل به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۳ درجه‌ی سانتی‌گراد سانترفیوژ شد. سپس از محلول رویی فرکشن استون ۶۰ درصد تهیه شد. برای این منظور ۱۸ میلی‌لیتر استون با ۱۲ میلی‌لیتر محلول رویی به مدت ۱ ساعت و در دمای ۱۸ درجه‌ی سانتی‌گراد هم زده شد. محلول آنزیمی حاصل به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۳ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. بعد از اتمام زمان سانترفیوژ، رسوب حاصل با مقدار کمی بافر تریس-HCl با pH:۷/۹ حل شد. نمونه‌ی آنزیمی حاصل تا زمان انجام مراحل بعدی آزمایش در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه داشته شد.

۲-۲-سنجش فعالیت آنزیم

فعالیت آنزیم بر اساس روش ریستون (Wriston and John, 1970) و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. روش ریستون بر اساس مقدار آمونیاک آزاد شده از ال-آسپاراژین به هنگام فعالیت آنزیم است. برای این منظور، مخلوط واکنش با حجم نهایی ۲/۵ میلی‌لیتر شامل: ۱۰۰ میکرولیتر نمونه‌ی آنزیمی، ۹۰۰ میکرولیتر سوبسترا (آسپاراژین ۰/۰۱ مولار) و ۱ میلی‌لیتر بافر تریس-HCl با pH:۸/۶ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از آن، واکنش از طریق افزودن ۱۰۰ میکرولیتر TCA ۱/۵ مولار متوقف شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد سانترفیوژ شد. به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۲۵۰ میکرولیتر معرف نسلر و ۱/۷۵ میلی‌لیتر آب مقطر درون لوله های آزمایش (با سه تکرار) حل شد. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه، مقادیر جذب آن ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۰ نانومتر خوانده شد. مخلوط شاهد نیز که در آن حجم نمونه‌ی آنزیمی با بافر جایگزین شده بود مورد استفاده قرار گرفت. هر واحد فعالیت آنزیم آسپاراژیناز به عنوان مقدار آنزیمی در نظر گرفته شد که یک میکرومول آمونیاک را در مدت یک دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد آزاد کند.

۲-۳-نمودار استاندارد آمونیوم سولفات

محلول استاندارد آمونیوم سولفات ۶ میلی‌مولار تهیه شد. حجم های مشخصی از آن به لوله های آزمایش اضافه شد و به هریک از آن ها ۰/۲۵ میلی‌لیتر معرف نسلر اضافه شد. در نهایت حجم هریک با استفاده از آب مقطر به ۲/۵ میلی‌لیتر رسانده شد. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه جذب آن ها در طول موج ۴۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت با استفاده از نرم‌فزار اکسل، نمودار استاندارد آن رسم گردید و معادله‌ی خط به دست آمد. مقدار جذب آنزیم در معادله‌ی خط قرار داده شده و میکرومول آمونیاک آزاد شده محاسبه گردید. در نهایت برای تعیین فعالیت آنزیم از معادله‌ی (۱) استفاده شد. در این معادله، ۲/۱، حجم مورد استفاده در مرحله اول (میلی لیتر)، ۰/۵ حجمی از مرحله اول است که در مرحله دوم استفاده شد، ۳۰ زمان واکنش و ۰/۱ مقدار آنزیم مورد استفاده است.

معادله (۱) تعیین فعالیت آنزیم:

$$\text{فعالیت آنزیم} = \frac{(NH3 \text{میکرومول})(2/1)}{(0/5)(30)(0/1)}$$

۲-۴-تعیین غلظت پروتئین

به منظور تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد. (Bradford and Marion, 1976) محلول استاندارد سرم آلبومین گاوی (BSA) با غلظت۱۰ mg/100ml تهیه شد. حجم های مشخص از محلول BSA همراه با نمونه‌ی آنزیمی به لوله های آزمایش منتقل شد. سپس به هر یک از لوله ها ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه شد. در نهایت حجم آن ها با آب مقطر به ۵/۱ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از اندازه‌گیری اعداد جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر، با استفاده از نرم‌افزار اکسل نمودار استاندارد برای مقادیر BSA رسم گردید.

۲-۵-بررسی پارامترهای سینتیکی آنزیم

برای تعیین K_m و V_{max}، محلول سوبسترا (آسپاراژین) در غلظت های ۰/۰۰۱۶، ۰/۰۰۳، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۲ مولار تهیه شد. مخلوط های واکنش حاوی ۹۰۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت های سوبسترا و ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم و ۱ میلی‌لیتر بافر تریس-HCl ۰/۰۵ مولار با pH:۸/۶ به مدت زمان های ۱ و ۳ و ۵ و ۷ دقیقه انکوبه شد، سپس به منظور توقف واکنش به همه‌ی مخلوط های واکنش ۱۰۰ میکرولیتر TCA ۱/۵ مولار افزوده شد و پس از آن ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. در ادامه ۰/۵ میلی‌لیتر از هر محلول رویی جدا و به آن ۰/۷۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف نسلر اضافه شد. عمل ورتکس انجام شد و بعد از ۱۰ دقیقه تغییرات جذب آن ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت با رسم نمودارهای میکائیلیس منتن و لاینویوربرگ، مقادیر K_m و V_{max} به دست آمد.

۲-۶-استخراج عصاره‌ی آلکالوئیدی گیاه بادرنجبویه

۱۰ گرم از پودر گیاه بادرنجبویه با ۱۰۰ میلی‌لیتر($\frac{m}{m}$ %25) NH_4OH حل شد و به مدت ۴ ساعت بر روی شیکر قرار گرفت. پس از اضافه کردن ۳۰۰ میلی‌لیتر اتیل استات به مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر قرار گرفت. سپس از کاغذ صافی عبور داده شده و به منظور تغلیظ روتاری شد. عصاره ی حاصل با مقداری آب مقطر حل شد و با استفاده از H_2SO_4 ۲درصد، pH آن به ۳ الی ۴ رسانده شد. عصاره در قیف دکانتور ریخته شد و پترلیوم اتر به آن اضافه شد، سپس به فاز آبی آن دی‌اتیل‌اتر اضافه شد. سپس pH فاز آبی با استفاده از NH_4OH به ۹ الی ۱۰ رسانده شد. سپس فاز آبی داخل قیف دکانتور ریخته شد و به آن کلروفرم افزوده شد. فاز کلروفرمی چند بار با آب مقطر شسته شد تا به pH خنثی برسد. عصاره حاصل با استفاده از نمک سدیم‌سولفات آب‌گیری شد و از کاغذ صافی عبور داده شد. عصاره بعد از روتاری با ۱ سی سی حلال DMSO حل شد و تا زمان انجام مراحل آزمایش در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه داشته شد.

۲-۷-بررسی پارامترهای سینتیکی آسپاراژیناز در حضور عصاره‌ی گیاهی

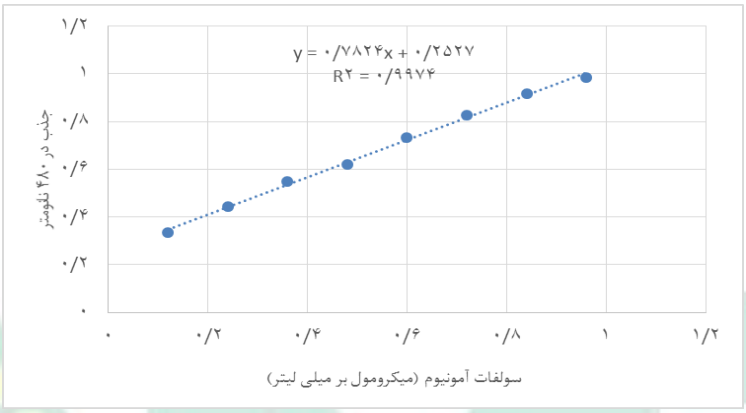
ابتدا ۱۰۰میکرولیتر نمونه آنزیمی با عصاره‌ی گیاه بادرنجبویه با غلظت های ۰/۳ و ۰/۷۵ و ۱/۵ میکروگرم بر میکرولیتر به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. سپس فعالیت هر یک با سوبسترا در غلظت های ۰/۰۰۱۶، ۰/۰۰۳، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۲و زمان های ۱ و ۳ و ۵ و

۷ دقیقه انکوباسیون سنجیده شد. در نهایت نمودار میکائیلیس منتن و سپس نمودار لاینویوربرک برای آنزیم آسپاراژیناز در حضور هر یک از غلظت های عصاره‌ی گیاهی رسم گردید.

۳. نتایج و بحث

۳-۱-نمودار استاندارد آمونیوم سولفات

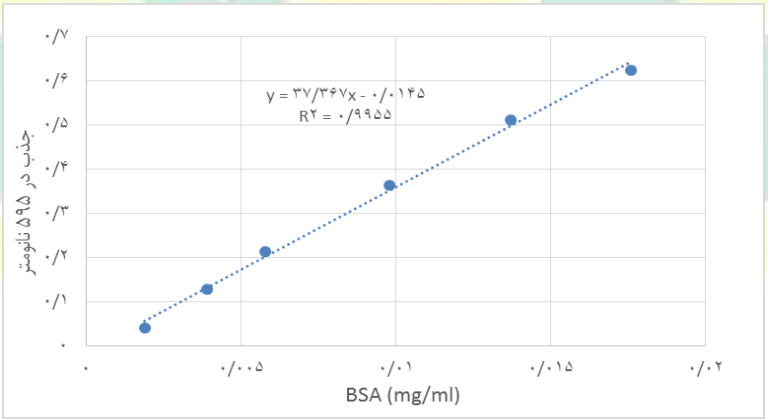
نمودار استاندارد آمونیوم سولفات بر اساس داده های به دست آمده در نرم افزار اکسل رسم شد (شکل ۱).



شکل ۱: نمودار استاندارد آمونیوم سولفات

۳-۲-نتایج تعیین غلظت پروتئین

پس از رسم نمودار استاندارد BSA به روش برادفورد، معادله ی خط به دست آمد (شکل ۲). غلظت پروتئین بر اساس معادله ی خط حاصل محاسبه شد و مقدار ۵ mg/ml به دست آمد.



شکل ۲: نمودار استاندارد BSA

۳-۳-نتایج سنجش فعالیت آنزیم

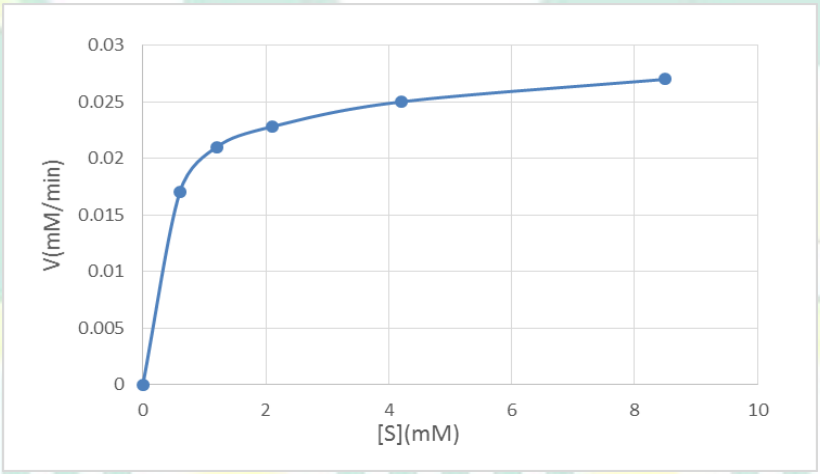
بر اساس داده های به دست آمده از سنجش فعالیت آنزیم، مقادیر فعالیت و فعالیت ویژه عصاره خام آنزیم و نمونه استخراج شده آنزیمی در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: نتایج مرتبط با سنجش فعالیت آنزیم آسپاراژیناز

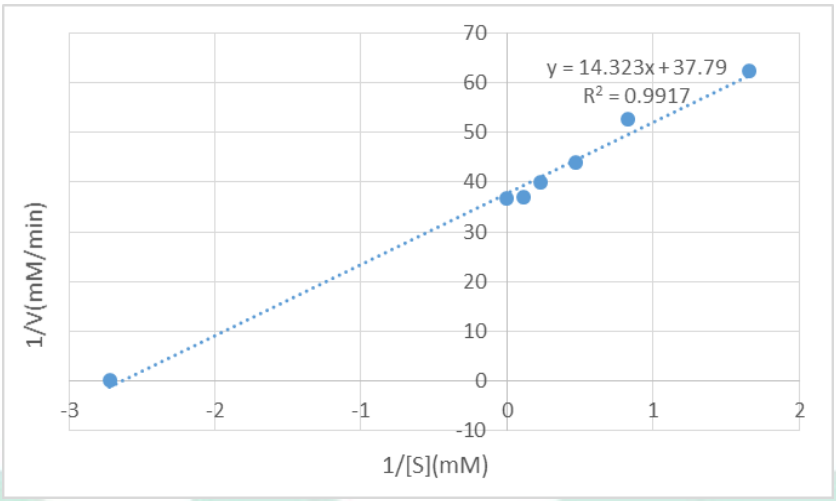
	فعالیت(U/ml)	فعالیت ویژه(U/mg)	غلظت پروتئین(mg/ml)
عصاره خام	۲۳/۱۷	۱/۹	۱۲
خالص سازی نسبی	۵۵/۳۹	۱۱	۵

۴-۳-نتایج تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم ال-آسپاراژیناز

سرعت واکنش آنزیمی در غلظت های مختلف سوبسترا (ال-آسپاراژین) سنجیده شد و نمودار میکائیلیس منتن در نرم افزار اکسل رسم گردید (شکل ۳). سپس با معکوس نمودن داده ها، نمودار لاینویوربرک نیز رسم گردید (شکل ۴).



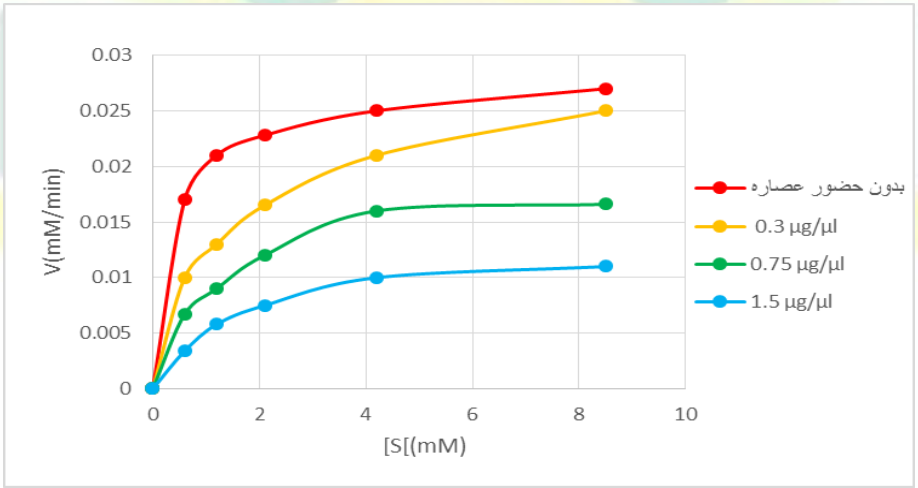
شکل ۳: نمودار میکائیلیس منتن آنزیم ال-آسپاراژیناز



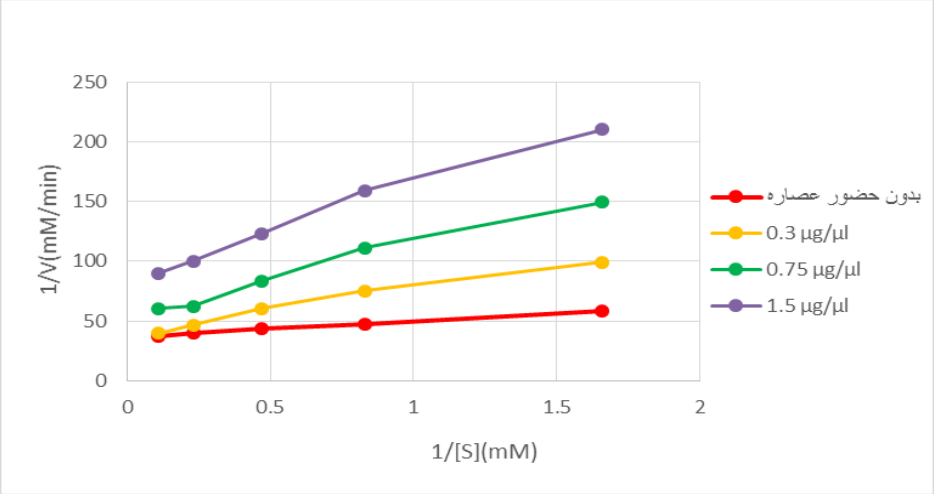
شکل۴: نمودار لاینویوربرک آنزیم ال آسپاراژیناز

۵-۳-نتایج تاثیر عصاره ی گیاهی بر پارامترهای سینتیکی ال-آسپاراژیناز

برای بررسی پارامترهای سینتیکی آنزیم ال-آسپاراژیناز در حضور عصاره گیاه بادرنجبویه، سرعت واکنش آنزیمی در غلظت های مختلف سوبسترا، سنجیده شد. سپس بر اساس داده های به دست آمده، نمودارهای میکائیلیس منتن و لاینویوربرک در نرم افزار اکسل رسم گردید (شکل ۵ و ۶). تغییرات مقادیر K_m و V_{max} در حضور عصاره ی گیاهی در جدول ۲ آورده شده است.



شکل ۵: نمودار میکائیلیس منتن آنزیم در حضور غلظت های مختلف عصاره گیاهی



شکل ۶: نمودار لاینویوربرک آنزیم در حضور غلظت های مختلف عصاره گیاهی

جدول ۲: مقادیر Km و Vmax در حضور غلظت های مختلف عصاره ی گیاهی

	غلظت عصاره ی گیاهی (میکروگرم بر میکرولیتر)	K_m (میلی مولار)	V_{max} (میلی مولار بر دقیقه)	نوع تاثیر	نوع مهار
آنزیم ال-آسپاراژیناز	-	۰/۳۸	۰/۰۲۶۴	-	-
در حضور عصاره	۰/۳	۰/۹۶	۰/۰۲۵	مهار کننده	مختلط
در حضور عصاره	۰/۷۵	۱/۱۱	۰/۰۱۸	مهارکننده	مختلط
در حضور عصاره	۱/۵	۰/۹۲	۰/۰۱۱۷	مهارکننده	مختلط

4. نتیجه‌گیری

موارد سرطان به تدریج در حال افزایش است و عامل مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه است. پیشرفت های مهمی در شیمی درمانی سرطان شامل داروهای مشتق شده از گیاه انجام شده است (Sorial, 2010). امروزه تولید آنزیم ها برای استفاده درمانی، جنبه‌ی مهمی از صنعت داروسازی است (Joshi and Kulkarni, 2014). استفاده‌ی بالینی از آسپاراژیناز باکتریایی برای درمان سرطان خون حاد لنفوبلاستیک، با ایجاد عوارض جانبی همراه است (Mezentsev et al., 2007). در سال ۲۰۱۶ کومار وهمکاران، قارچ های مولد ال-آسپاراژیناز را از گیاهان دارویی جداسازی و شناسایی کردند. در مجموع ۱۰ سویه قارچی از ۳ نمونه برگ گیاه به دست آمد که از بین آن ها دو سویه فعالیتی برابر با ۸۷/۶ U/ml و ۱۱۱/۷ U/ml را نشان دادند. سایر سویه های قارچی

فعالیت آنزیمی کمتری نشـــان دادند (Kumar et al., 2016). در ســـال ۲۰۱۱، السـید و همکاران ال-آســپاراژیناز را از کبد مرغ جداسازی کردند و مراحل مختلف خالص سازیی (شامل جداسازی با سولفات آمونیوم و سپس خالص سازی از طریق ژل فیلتراسیون سـفادکس G-100 و سـفادکس G-200) برای به دسـت آوردن آنزیم خالص انجام شـد. فعالیت ویژه‌ی نهایی برای آن، U/mg /۱۱ ۱۵۸به دست آمد (El-Sayed et al., 2011). در مطالعه‌ی الزبیدی و همکاران، آنزیم ال-آسپاراژیناز از نمونه های گیاهی *P.vulgaris* پس از چندین مرحله خالص ســـازی، پارامترهای ســـینتیکی آن بررســـی شـــد و مقادیر K_m برابر با ۰/۲۹۴ mM و V_{max} برابر با ۱/۰۹ mM/min به دسـت آمد (Al Zobaidy et al., 2016). در مطالعه حاضـر، آنزیم ال-آسـپاراژیناز از کبد گاو اسـتخراج شـد و از طریق رسوب‌دهی با اسـتون ۶۰ درصـد خالص شـد. سـپس فعالیت آنزیم خالص شـده سـنجیده شـد. پس از بررسـی غلظت پروتئین، مشاهده شد که غلظت پروتئین از mg/ml ۱۲ در عصاره خام آنزیمی به۵ mg/ml در آنزیم خالص شده کاهش یافت. مقادیر فعالیت و فعالیت ویژه نیز به ترتیب برابر با U/ml ۵۵/۳۹ و U/mg ۱۱ به دســـت آمد. پس از بررســـی فعالیت آنزیم در غلظت های مختلف سوبسترا در زمان های ۱ و ۳ و ۵ و ۷ دقیقه انکوباسیون، مقادیر K_m و V_{max} نیز به ترتیب برابر با ۰/۳۸ میلی مولار و ۰/۰۲۶۴ میلی مولار بر دقیقه به دسـت آمد. هم چنین پس از این که پارامترهای K_m و V_{max} آنزیم در حضـور عصـاره آلکالوئیدی گیاه بادرنجبویه بررسی شد، مشاهده شد که مقدار V_{max} کاهش یافته است، بنابراین آلکالوییدهای موجود در گیاه بادرنجبویه دارای اثرات مهاری بر بروی آنزیم ال-آسپاراژیناز می‌باشند. مقدار K_m در حضور عصاره افزایش نشان داد، بنابراین بر طبق نتایج این مطالعه آلکالوئیدهای گیاه بادرنجبویه می‌توانند به عنوان مهارکننده برای آنزیم ال-آسپاراژیناز جهت مطالعات in-vitro و in-vivo پیشنهاد گردند.

سپاسگزاری

از آنجایی که بودجه بندی این پژوهش از طرف معاونت محترم پژوهشی دانشگاه مازندران تامین شده است، بدین وسیله از ایشان تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. شاطر آبادی د.، ابونجمی م. قربانی جاوید م. و عرب حسینی ا. ۱۳۹۶. مقایسه روش فراصوت با دیگر روش‌های نوین در استخراج عصاره گیاهان دارویی. نشریه علمی ترویجی صوت و ارتعاش، دوره ششم، شماره۱۲.

۲. شاه ولی بر آ.، و اسمعیل زاده بهابادی ص. ۱۳۹۸. تأثیر نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی بر رشد، شاخصهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه بادرنجبویه. فرایمد و کارکرد گیاهی، جلد ۸، شماره ۳۲.

۳. طباطبایی یزدی ف.، علیزاده بهبهانی ب. و مرتضوی س. ۱۳۹۵. بررسی‌اثر عصاره گیاهان تیره نعناع (آویشن، نعناع و کاکوتی) در جلوگیری از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *ژئوتریکوم کاندیدوم* در نمونه های دوغ صنعتی استان خراسان رضوی با استفاده از روش پاسخ سطح. فصل نامه علوم و صنایع غذایی، دوره۱۳، شماره۵۱.

۴. مرادی ا.، امان زاده ب. املشی م. پورنصرالله م. و عصری ی. ۱۳۹۷. گیاهان دارویی منطقه کلیشم. مجله ترویجی چای و دمنوش های گیاهی، شماره اول.

5. Al Zobaidy H.N., Shakir K.A. and Strasburg G.M. 2016. Characterization of l-asparaginase purified from pole beans. Iraqi Journal of Agricultural Science, 47(7-special issue).

6. Abdelrazek N.A., Elkhatib W.F., Raafat M.M. and Aboulwafa M.M. 2020. Production, characterization and bioinformatics analysis of L-asparaginase from a new *Stenotrophomonas maltophilia* EMCC2297 soil isolate. AMB Express, 10(1), 1-16.

7. Bradford. and Marion M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical biochemistry, 72(1-2): 248-254.
8. Broome. and J D. 1961. Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. Nature, 191(4793), 1114-1115.
9. EL-Sayed., El-Sayed M., El-Sayed S.T., Wafaa., Shousha G., Abeer., Shehata N., Shimaa. and Hanafy S. 2011. Purification, Characterization and Antitumor Activity of L-asparaginase from Chicken liver. Journal of American Science, 7(1).
10. Huang L., Liu Y., Sun Y., Yan Q. and Jiang Z. 2014. Biochemical characterization of a novel L-Asparaginase with low glutaminase activity from Rhizomucor miehei and its application in food safety and leukemia treatment. Applied and environmental microbiology, 80(5), 1561-1569.
11. Jimat D.N., Mohamed I.B.F., Azmi A.S. and Jamal P. 2017. purification and partial characterization of l-asparaginase enzyme produced by newly isolate *bacillus sp*. iium engineering journal, 18(2), 1-10.
12. Joshi R.D. and Kulkarni N.S. 2014. Isolation of L-asparaginase producing endophytic bacteria from plants recommended for cancer therapy. El cáncer, *3*(11), 2012-5.
13. Khalaf A.Z. 2012. Extraction and Purification of Asparaginase enzyme from *Pisum sativum* plant and studying their cytotoxicity against L20B tumor cell line. Msc. Theises. Al-Nahrain University.
14. Kidd J.G., 1953. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. Journal of Experimental Medicine, 98(6), 565-582.
15. Kumar R., Sedolkar V.K., Triveni A.G., Kumar M.S., Shivannavar C.T. and Gaddad S.M. 2016. Isolation, screening and characterization of L-asparaginase producing fungi from medicinal plants. Int J Pharm Pharm Sci, 8(1), 281-283.
16. Mashburn L.T. 1964. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. Arch. Biochem. Biophys., 105, 450-452.
17. Mezentsev Y.V., Molnar A.A., Gnedenko O.V., Krasotkina Y.V., Sokolov N.N. and Ivanov A.S. 2007. Oligomerization of L-Asparaginase from *Erwinia carotovora*. Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry, 1(1), 58-67.
18. Michalska K., Borek D., Hernández-Santoyo A. and Jaskolski M. 2008. Crystal packing of plant-type L-asparaginase from *Escherichia coli*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 64(3), 309-320.
19. Moharib S.A. 2018. Anticancer activity of L-asparaginase produced from Vigna unguiculata. World Sci. Res, 5(1), 1-12.
20. Nguyen T.T.H., Nguyen C.T., Le Nguyen T.S. and Do T.T. 2016. Optimization, purification and characterization of recombinant L-asparaginase II in *Escherichia coli*. African Journal of Biotechnology, 15(31), 1681-1691.
21. Theantana T., Hyde K.D. and Lumyong S. 2009. Asparaginase production by endophytic fungi from Thai medicinal plants: cytotoxicity properties. International Journal of Integrative Biology, 7(1), 1-8.
22. Wriston J R. and John C. 1970. Asparaginase. Methods in enzymology, 17: 733-742.

Extraction of L-asparaginase from bovine liver and the effect of mint essential oil (Mentha spicata) on its kinetic parameters

Zahra Ghorbani[1]; Maryam Mohadjerani[2*]

1- Master student, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran

2- Associate Professor, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran

**Corresponding Author Email address (m.mohajerani@umz.ac.ir)*

Abstract

L-asparaginase amidohydrolase (EC3.5.1.1) is one of the most important anti-cancer drugs in the world due to its catalytic properties of hydrolyzing the amide bond of the L-asparagine side chain and converting it to L-aspartate and ammonia. Other applications of this enzyme include antiviral effect, reduction of acrylamide levels in food industry and anti-inflammatory effect in the treatment of autoimmune diseases. The aim of this study was to measure the activity and kinetic parameters of L-asparaginase enzyme and their changes in the presence of essential oil of mint (*Mentha spicata*). Mint is a herbaceous plant with aerial roots, perennial and fragrant. Mint is used to treat digestive problems. The most common constituent of mint essential oil is menthol. In this study, 10 g of enzyme sample was extracted from fresh bovine liver and homogenized with 0.05 M Tris-HCl buffer. After centrifugation, it was partially purified with 60% acetone. Enzyme activity was measured by Nesslerization method at 480 nm by spectrophotometer. The Bradford method was used to determine the protein concentration. Protein concentration of 5 mg/ml was calculated. Enzyme activity and specific activity were 55.39 U/ml and 11 U/mg, respectively. Then the enzyme activity was measured at different concentrations of L-asparagine substrate and Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk diagrams were drawn. K_m and V_{max} for the enzyme were determined 0.437 mM and 0.028 mM/min, respectively. Essential oil extraction was performed by distillation with distilled water using a Clevenger apparatus. In order to investigate the changes in kinetic parameters, mint essential oil was used in three concentrations of 20, 50 and 100

microliters. Kinetic results showed that with increasing the amount of essential oil, the amount of K_m decreases and the maximum speed increases. With the addition of mint essential oil, the maximum speed was almost doubled, but the V_{max} did not change much for 20, 50 and 100 microliters of essential oil. Based on the results of this study, it was concluded that mint essential oil can act as an activator of the L-asparaginase as a need to increase the activity of the enzyme, for pharmaceutical and industrial purposes.

Keywords: Nesslerization, Amidohydrolases, Clevenger, Lamiaceae, L-asparagine

استخراج آنزیم ال-آسپاراژیناز از کبد گاو و تاثیر اسانس گیاه نعنا (Mentha spicata) بر پارامترهای سینتیکی آن

زهرا قربانی[۱]؛ مریم مهاجرانی[۲*]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران

۲-دانشیار گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: (m.mohajerani@umz.ac.ir)

چکیده

ال-آسپارژیناز آمیدوهیدرولاز به دلیل دارا بودن خاصیت کاتالیزوری هیدرولیز پیوند آمیدی زنجیره جانبی ال-آسپاراژین و تبدیل آن به ال-آسپارتات و آمونیاک یکی از مهم‌ترین داروهای ضدسرطان در سراسر جهان شناخته می شود. ال-آسپاراژیناز یک آنزیم با اهمیت درمانی است که عمدتا برای درمان لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) استفاده می شود. از دیگر کاربردهای این آنزیم میتوان به اثر ضدویروسی، کاهش سطح آکریل آمید در صنایع غذایی و اثر ضدالتهابی در درمان بیماری های خود ایمنی اشاره کرد. این پژوهش با هدف اندازه گیری فعالیت و پارامترهای سینتیکی آنزیم ال-آسپاراژیناز و تغییرات آنها در مجاورت اسانس گیاه نعنا (Mentha spicata) انجام شد. نعنا متعلق به خانواده بزرگ نعناییان (Lamiacea) می‌باشد. نعنا گیاهی علفی با ریشه های هوایی، چند ساله و معطر است. بیشترین ترکیب تشکیل دهنده اسانس نعنا منتول گزارش شده است. در این مطالعه ۱۰ گرم نمونه آنزیمی از کبد تازه گاو استخراج شد و با بافر تریس-HCl ۰/۰۵ مولار هموژن شد. پس از سانتریفیوژ به طور جزیی با استون ۶۰ درصد خالص شد. فعالیت آنزیم با روش نسلریزاسیون و در طول موج ۴۸۰ نانومتر سنجیده شد. برای تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد. میزان غلظت پروتئین ۵ mg/ml محاسبه شد. فعالیت و فعالیت ویژه آنزیم به ترتیب ۵۵/۳۹ U/ml و ۱۱ U/mg بدست آمد. سپس فعالیت آنزیم در غلظت های مختلف سوبسترای ال-آسپاراژین اندازه گیری شد و نمودارهای میکائیلیس-منتن و لاینویوربرک رسم گردید. مقدار K_m و V_{max} برای آنزیم به ترتیب با ۰/۴۳۷ میلی مولار و ۰/۰۲۸ میلی مولار بر دقیقه بدست آمد. اسانس گیری به روش تقطیر با آب مقطر با دستگاه کلونجر انجام شد. به منظور بررسی تغییرات پارامترهای سینتیکی از اسانس گیاه نعنا در سه غلظت۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر استفاده شد. نتایج سینتیکی نشان داد با افزایش میزان اسانس، مقدار K_m کاهش و سرعت بیشینه افزایش می یابد. با افزودن اسانس نعنا سرعت بیشینه حدود دوبرابر افزایش یافت اما V_{max} برای مقادیر ۲۰، ۵۰ و

۱۰۰ میکرولیتر اسانس تغییر چندانی نداشت. براساس نتایج بدست آمده از این پژوهش، نتیجه گیری شد که اسانس گیاه نعنا می‌تواند به عنوان یک فعال کننده آنزیم ال-آسپاراژیناز، در صورتی که نیاز به افزایش فعالیت آنزیم باشد، با هدف دارویی و صنعتی عمل کند.

واژگان کلیدی: نسلریزاسیون، آمیدوهیدرولازها، کلونجر، نعناییان، ال-آسپاراژین

۱.مقدمه

ال-آسپارژیناز یک آنزیم آمیدوهیدرولاز (EC3.5.1.1) است که به دلیل دارا بودن خاصیت کاتالیزوری هیدرولیز پیوند آمیدی زنجیره جانبی ال-آسپاراژین و تبدیل آن به ال-آسپارتات و آمونیاک، باعث مهار سنتز پروتئین در سلول‌های T شده و به عنوان یک عامل مهم در شیمی درمانی، یکی از بالقوه ترین داروهای ضد سرطان شناخته می‌شود (Chand et al., 2020). ال-آسپاراژیناز به صورت مستقل یا در ترکیب با داروهایی مانند وین کریستین و یک گلوکوکورتیکوئید (مانند دگزامتازون) برای درمان لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL)استفاده می شود (Vimal and Kumar, 2017). سلولهای سالم آسپاراژین را از اسید آسپارتیک با استفاده از آنزیم آسپاراژین سنتتاز سنتز می کنند. آسپاراژین سنتتاز تنها آنزیمی است که آسپاراژین را سنتز می کند و توسط یک ژن منفرد در کروموزوم 7q21.3 کدگذاری می شود (Chand et al., 2020). سلولهای لوسمی فاقد آنزیم ال آسپاراژین سنتتاز می باشند و بنابراین توانایی سنتز آسپاراژین را ندارند و رشد آنها وابسته با آسپاراژین موجود در سرم می‌باشد (Asselin et al., 1989). سلول های تومور به ال-آسپاراژین برای سنتز پروتئین ضروری برای سنتز پیریمیدین نیاز دارند. همچنین به عنوان یک دهنده نیتروژن برای سنتز پورین با استفاده از آدنیلوسوکسینات سنتتاز ۱ عمل می کند(Martinez et al., 2016). هنگامی که ال-آسپاراژیناز تجویز می شود، غلظت آن در خون کاهش می یابد در نتیجه باعث مهار سنتز پروتئین در سلول های تومور می شود که منجر به توقف چرخه سلولی G1می شود. این امر گرسنگی کشنده سلول های تومور را به دنبال دارد، در صورتی که سلول های طبیعی به دلیل توانایی آنها در سنتز طبیعی ال-آسپاراژین تحت تأثیر قرار نمی گیرند (Shrivastava et al., 2016).

منابع آنزیم به طور گسترده در بین گیاهان، حیوانات و میکروارگانیسم ها توزیع شده است. طیف گسترده ای از میکروارگانیسم ها شامل باکتری ها، مخمرها و قارچ های رشته ای به عنوان منبع ایده آل این آنزیم قوی در نظر گرفته شده اند. با این حال، منابع میکروبی به دلیل تولید اقتصادی، سازگاری، سهولت اصلاح فرآیند، بهینه‌سازی و خالص‌سازی، سهولت در اصلاح ژنتیکی و پایداری نسبت به آنزیم های مشتق شده از منابع گیاهی و حیوانی، ترجیح داده می‌شوند(Lopez et al., 2017). همه داروهای ال-آسپارژیناز

موجود در بازار عمدتا از دو منبع باکتریایی *اشرشیا کلی* و *اروینیا شریسانتمی*[15] مشتق شده اند(Chand et al., 2020). ال-آسپاراژینیاز اولین آنزیم درمانی با خواص ضد نئوپلاستی است که به صورت گسترده توسط محققان و دانشمندان مورد مطالعه قرار گرفته است (Batool et al., 2016). ال-آسپارژیناز یکی از پرکاربردترین آنزیم های پزشکی می‌باشد، به طوری که سازمان های FDA و WHO تایید کرده اند که آسپاراژیناز می تواند به طور موثر در لوسمی لنفوبلاستیک حاد و درمان سارکوم لنفاوی استفاده شود. همچنین برای درمان لوسمی میلوبلاستیک حاد، لوسمی لنفوسیتی مزمن، بیماری هوچکین، ملانوسارکوم، لنفوم غیرهوچکین، کارسینوم پانکراس و لنفوسارکوم گاوی استفاده می‌شود. گزارش شده است که ال-آسپاراژیناز دارای اثرات سرکوب کننده سیستم ایمنی و ضد التهابی در بیماران است که از آن می توان در درمان بیماری های خود ایمنی مرتبط با پاسخ های غیر طبیعی سلول های T استفاده کرد (Vimal and Kumar, 2017). *هلیکوباکتر پیلوری*، عامل ایجاد کننده گاستریت مزمن، زخم معده، سرطان معده و لنفوم بافت لنفوئیدی مرتبط با مخاط معده، از ال-آسپاراژیناز به عنوان یک عامل ضد ویروسی مرتبط استفاده می‌کند (Scotti et al., 2010). ال-آسپاراژیناز به عنوان یک کمک فرآوری در صنایع غذایی برای کاهش محتوای آکریل آمید نیز استفاده می شود. آکریل آمید یک ماده شیمیایی است که در برخی از غذاهای نشاسته ای در هنگام پخت و پز و سرخ کردن در دمای بالای ۱۲۰ درجه سانتی گراد یافت می شود. ال-آسپاراژیناز به طور موثر سطح آکریل آمید را تا ۹۰٪ در انواع غذاهای نشاسته ای کاهش می دهد و باعث تغییر در طعم و ظاهر نهایی غذا نمی‌شود (Batool et al., 2016).

در کنار تمام فواید و مزیت های دارویی که برای آنزیم آسپاراژیناز مطرح می شود، تعدادی عوارض جانبی هم گزارش شده است. از اثرات نامطلوب این آنزیم میتوان اختلال در عملکرد صحیح کبد، مشکلات پانکراس، دیابت، وجود ترکیبات نیتروژنه[16]در خون، عملکرد نادرست سیستم عصبی مرکزی، هیجان، افسردگی، اختلال و مهار سیستم ایمنی را عنوان کرد (Nagarethinam et al., 2012). تظاهرات بالینی واکنش های ازدیاد حساسیت شامل واکنش های آلرژیک، آنافیلاکسی، بیماری سرم[17]، خارش و تورم شدید، کهیر، التهاب موضعی و یا کلی و همچنین، مسمومیت های ارگان ها، کتواسیدوز، گلوکوزوریا[18]، کاهش سنتز پروتئین، هیپوفیبرینونمی[19]و هیپوآلبومینمی[20] میتواند از دیگر عوارض جانبی درمان با این آنزیم باشد (Avramis and Tiwari, 2006). به علاوه آنزیم طبیعی به دلیل عملکرد پروتئازهای سرمی و واکنش با آنتی بادی های تولید شده دارای پایداری پایینی در سرم است (Soares et al., 2002). در سال های گذشته روش های متعددی مانند مهندسی ژنتیک، الحاق پلیمرهای سنتزی و استفاده از گیاهان دارویی به منظور افزایش پایداری، بهینه سازی ویژگی های فیزیکوشیمیایی و کاهش ایمنی زایی آنزیم انجام شده است.

گیاهان دارویی بخش قابل توجهی از فلور ایران را تشکیل می‌دهند و نقش بسیار مهمی را در ترکیب جوامع گیاهی ایفاء می‌نمایند.این گیاهان از خانواده‌های مختلفی هستند که یکی از این خانواده ها نعناعیان می‌باشد(اکبرزاده، ۱۳۸۲). خانواده نعناییان (*Lamiaceae*)

[15] Erwinia chrysanthemi
[16] Neurotoxic compound
[17] serum sickness
[18] glucosuria
[19] hypofibrinonemia
[20] hypoalbuminemia

یکی از خانواده های گیاهی بزرگ دنیا است از دیرباز به علت داشتن جنس ها و گونه های دارویی و خوراکی مختلف از اهمیت و جایگاه ویژهای برخوردار بوده است (اسماعیلی، ۱۳۹۸). نعنا (*Mentha*) گیاهی علفی با ریشه های هوایی، چند ساله و معطر است. این گیاه در درمان مشکلات گوارشی مورد استفاده قرار میگیرد. بیشترین ترکیب تشکیل دهنده اسانس آن منتول گزارش شده است، اما موارد دیگری همچون منتون، پیپریتون، پولگون، پنین، سابینین و متیل استات در اسانس آن نیز وجود دارد (نوربخش و همکاران، ۱۳۸۹).

۲.مواد و روش‌ها

۲-۱-استخراج و خالص سازی آنزیم ال-آسپاراژیناز

مقدار ۱۰ گرم از کبد تازه گاو با چاقو ریز خرد شد و سپس با ۱۰۰ میلی لیتر بافر Tris- HCl، ۰/۰۵ مولار با pH برابر با ۸/۶ با دستگاه هموژنایزر با دور ۴۰۰۰ بر دقیقه هموژن شد. سپس محلول در دمای ۳ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد.

جهت خالص سازی، فرکشن های ۳۰ درصد، ۵۰ درصد، ۶۰ درصد و ۸۰ درصد با استون خالص تهیه شد. فرکشن ها به مدت ۱ ساعت در حمام یخ همزده شدند و بعد در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب بدست آمده، با بافر تریس ۰/۰۵ مولار با pH برابر با ۷/۸ حل شد. (به دلیل اینکه میزان فعالیت آنزیم خالص شده با استون ۶۰ درصد بیشتر از سایرفرکشن ها بود، در بقیه موارد از همان استفاده شد.)

۲-۲-سنجش فعالیت آنزیم

فعالیت آنزیم طبق روش ریستون سنجیده شد (Wriston and John, 1970). بدین ترتیب ۱ میلی لیتر از نمونه موردنظر برداشته شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی به ۰/۹ میلی لیتر ال-آسپاراژین ۰/۰۱ مولار و ۱ میلی لیتر بافر Tris-HCl ۰/۰۵ مولار pH برابر با ۸/۶ اضافه شد. این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. به منظور توقف واکنش تری کلرواستیک اسید (TCA) ۱/۵ مولار اضافه شد. سپس محلول ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شده و سوپرناتانت برای مرحله بعد استفاده شد. ۰/۲۵ میلی لیتر معرف نسلر با سوپرناتانت و آب مقطر مخلوط شد. لوله ها پس از ورتکس در دمای اتاق گرماگذاری شدند و جذب نمونه ها در ۴۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد.

۲-۳-منحنی استاندارد آمونیوم سولفات

محلول ۶ میلی مولار آمونیوم سولفات تهیه شد و حجم های مشخص از این محلول به لوله های آزمایش اضافه شد. پس از اضافه کردن ۰/۵ میلی لیتر بافر Tris-HCl، ۰/۵ مولار با pH برابر با ۸/۶ و مقادیر مشخص آب مقطر، مراحل سنجش مطابق با آن چه که در بخش سنجش فعالیت آنزیم اشاره شد، انجام شد. در نهایت نمودار جذب نمونه های استاندارد برحسب غلظت میکرومولار آمونیوم سولفات با نرم افزار Excel رسم شد و معادله خط بدست آمد. سپس جذب نوری بدست آمده از مراحل سنجش آنزیم در معادله خط

قرار داده شد و میزان آمونیاک تولید شده توسط آنزیم بر حسب میکرومول محاسبه شد. در آخر برای تعیین فعالیت آنزیم از معادله (۱) استفاده شد. در این فرمول ۲/۱ حجم مورد استفاده از مرحله اول بر حسب میلی لیتر، ۰/۵ حجم مایع رویی مرحله اول است که در مرحله دوم استفاده شد و ۳۰ زمان انجام آزمایش برحسب دقیقه و ۰/۱ مقدار آنزیم مورد استفاده بر حسب میلی لیتر است.

معادله (۱) تعیین فعالیت آنزیم:

$$\text{فعالیت آنزیم} = \frac{(\mu m\ NH3)(2.1)}{(0.5)(30)(0.1)}$$

۲-۴-تعیین غلظت پروتئین

برای تعیین غلظت آنزیم استخراج شده از روش برادفورد استفاده شد(Bradford, 1976). در این روش از سرم آلبومین گاوی(BSA) با غلظت ۰/۰۱ g/۱۰۰ml به عنوان محلول استاندارد استفاده شد. ۹ لوله آزمایش برداشته شد. به ترتیب مقادیر ۱۰ تا ۹۰ میکرولیتر محلول BSA در لوله های ۱ تا ۶ ریخته شد. به لوله های آزمایش ۷، ۸ و ۹ میزان ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکرولیتر نمونه آنزیمی افزوده شد. سپس ۵ میلی لیتر معرف برادفورد و آب مقطر برای رسیدن به حجم ۵/۱ میلی لیتر، به لوله آزمایش اضافه و همزده شد. بعد از مدت زمان ۲۰-۵ دقیقه انکوبه شدن در دمای اتاق، میزان جذب محلول ها در ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد.

۲-۵-اسانس گیری

۳۰ گرم از گیاه نعنا خشک شده را داخل بالن دستگاه کلونجر ریخته و به آن آب مقطر اضافه شده و به مدت ۴ ساعت حرارت داده شد. آب و روغن اسانسی در قسمت سردکننده، سرد شده و در لوله انتهایی جمع آوری شد. عمل تقطیر ادامه داده شد تا زمانی که حجم روغن اسانسی ثابت بماند. در پایان این مدت برای جداسازی و استخراج اسانس، حلال هگزان اضافه شد و برای آب گیری از سولفات سدیم استفاده شد.

۲-۶-تعیین پارامترهای سینتیکی ال-آسپاراژیناز

محلول سوبسترا ال-آسپاراژین در غلظت های ۱/۶، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی مولار تهیه شد. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر نمونه آنزیمی به همراه ۹۰۰ میکرولیتر ال-آسپاراژین با غلظت مشخص و بافر تریس با pH برابر با ۸/۶ برای رسیدن به حجم ۲ میلی لیتر اضافه

شده و مخلوط در زمان های ۱، ۳، ۵ و ۷ دقیقه انکوبه شد. واکنش با اضافه کردن TCA ۱/۵ مولار متوقف شد و محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس ۲۵۰ میکرولیتر معرف نسلر به ۵۰۰ میکرولیتر از مایع رویی و آب مقطر اضافه شده و لوله ها پس از ورتکس در دمای اتاق گرماگذاری شدند. سپس تغییرات جذب در طول موج ۴۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. بر همین اساس نمودار های میکائیلیس-منتن و لاینویوربرک جهت بدست آوردن K_m و V_{max} در نرم افزار اکسل رسم شد.

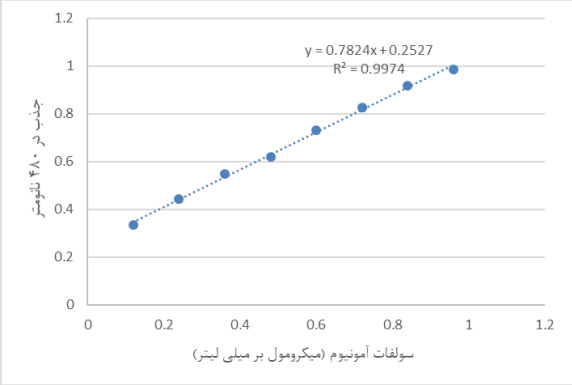
۲-۷-سنجش اثر اسانس بر پارامترهای سینتیکی آنزیم

محلول سوبسترا ال-آسپاراژین در پنج غلظت تهیه شد. در سه لوله ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از اسانس گیاه به همراه ۱۰۰ میکرولیتر نمونه آنزیمی انکوبه شد. بقیه مراحل سنجش مطابق با بخش ۲-۶- انجام شد. بر همین اساس نمودارهای میکائیلیس-منتن و لاینویوربرگ جهت تعیین K_m و V_{max} رسم شد.

۳. نتایج و بحث

۳-۱-نمودار استاندارد آمونیوم سولفات

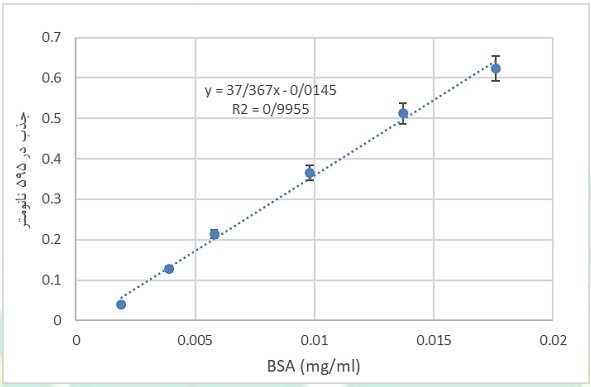
نمودار استاندارد آمونیوم سولفات مطابق داده های بدست آمده رسم شد (شکل ۱).



شکل ۱: نمودار استاندارد آمونیوم سولفات

۳-۲-نتایج تعیین غلظت پروتئین

برای تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد، از معادله خط نمودار استاندارد BSA استفاده شد (شکل ۲). غلظت پروتئین مقدار ۵mg/ml بدست آورده شد.



شکل۲: نمودار استاندارد BSA

۳-۳-نتایج تعیین فعالیت آنزیم

بر اساس نتایج بدست آمده از سنجش فعالیت آنزیم و معادله ی (۱)، مقدار فعالیت و فعالیت ویژه عصاره خام و نمونه استخراج محاسبه شد (جدول ۱).

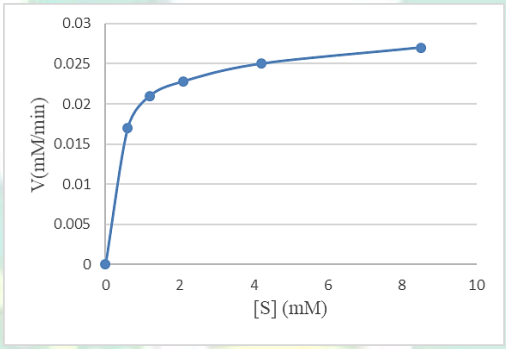
جدول ۱: مقدار فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز

	فعالیت (U/ml)	غلظت پروتئین (mg/ml)	فعالیت ویژه(U/mg)
عصاره خام	۲۳/۱۷	۱۲	۱/۹
خالص سازی نسبی	۵۵/۳۹	۵	۱۱

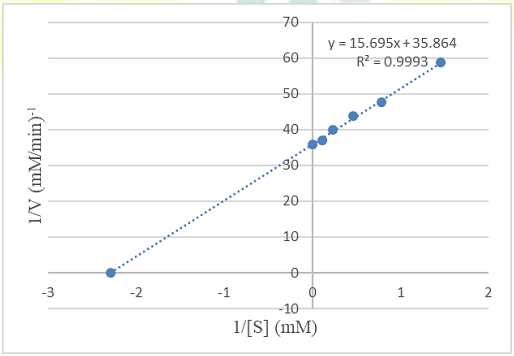
۳-۴-نتایج تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم ال-آسپاراژیناز

براساس معادله میکائیلیس-منتن در واکنش آنزیمی ال-آسپاراژیناز، با افزایش غلظت سوبسترای ال-آسپاراژین، جذب نوری تا زمانی که آنزیم از سوبسترا اشباع شود افزایش می یابد. پس از اشباع شدن آنزیم از سوبسترا، جذب نوری مخلوط واکنش دیگر تغییری نمیکند (شکل ۳).

پس از معکوس کردن تغییرات سرعت نسبت به معکوس غلظت ال-آسپاراژین، نمودار لاینویوربرک رسم شد (شکل ۴). بر این اساس، مقدار K_m و V_{max} آنزیم ال-آسپاراژیناز به ترتیب برابر با ۰/۴۳۷ میلی مولار و ۰/۰۲۸ میلی مولار بر دقیقه بدست آمد.



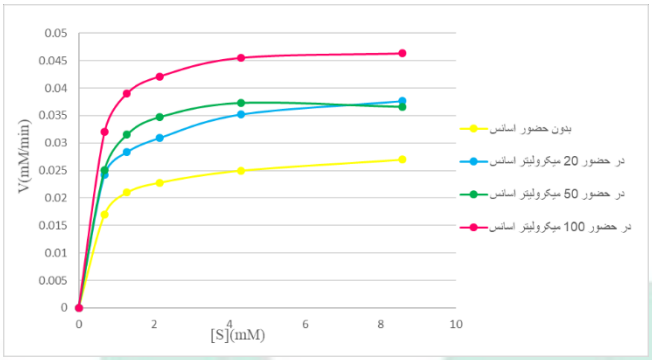
شکل۳:نمودار میکائیلیس-منتن آنزیم ال-آسپاراژیناز(همه اندازه گیری ها سه بار تکرار شدند)



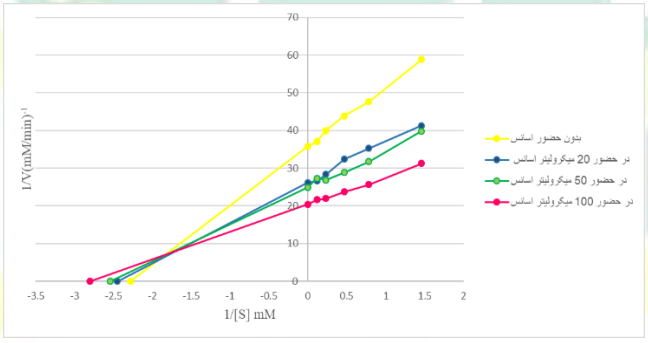
شکل۴: نمودار لاینویوربرک آنزیم ال-آسپاراژیناز(همه اندازه گیری ها سه بار تکرار شدند)

۳-۵-نتایج سنجش اثر اسانس بر آنزیم آسپاراژیناز

برای مطالعه اثر اسانس گیاه نعنا در غلظت های مختلف بر پارامتر های سینتیکی آنزیم ال-آسپاراژیناز، بر طبق روش ذکر شده در بخش مواد و روش ها، سرعت واکنش آنزیمی در مجاورت اسانس گیاه نعنا (۲۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر) اندازه گیری شده و نمودارهای میکائیلیس-منتن و لاینویوربرک برای آنها رسم شد(شکل ۵ و ۶). تغییرات مقادیر K_m و V_{max} آنزیم در جدول ۲ آورده شد.



شکل۵: نمودار میکائیلیس-منتن آنزیم ال-آسپاراژیناز در حضور مقادیر مختلف اسانس گیاه نعنا(همه اندازه گیری ها سه بار تکرار شدند)



شکل۶: نمودار لاینویوربرک آنزیم ال-آسپاراژیناز در حضور مقادیر مختلف اسانس گیاه نعنا(همه اندازه گیری ها سه بار تکرار شدند)

جدول۲: مقدار پارامترهای سینتیکی آنزیم ال-آسپاراژیناز تحت تاثیر اسانس نعنا

	مقدار اسانس(µl)	K_m(mM)	V_{max}(mM/min)	نوع تاثیر
آنزیم ال-آسپاراژیناز	-	۰/۴۳۷	۰/۰۲۷۸	-
در حضور اسانس	۲۰	۰/۴۰۸	۰/۰۳۸	فعال کننده
در حضور اسانس	۵۰	۰/۳۹	۰/۰۴	فعال کننده
در حضور اسانس	۱۰۰	۰/۳۵	۰/۰۴۹	فعال کننده

۴. نتیجه‌گیری

امروزه با وجود پیشرفت های قابل توجهی که در توسعه ال-آسپاراژیناز بدست آمده، فرمولاسیون های فعلی دارای محدودیت می‌باشند. بیشترین عوارض جانبی، مربوط به واکنش های ایمنی بدن به پروتئین آسپاراژیناز ذکر شده است. همچنین، کاهش آسپاراژین و مهار سنتز پروتئین بعدی آن نیز در محدود کردن استفاده از آسپاراژیناز تاثیرگذار می‌باشد (Avramis et al., 2002). ال-آسپاراژیناز به‌دست‌آمده از *E. coli* یکی از آنزیم‌های مهم در درمان سرطان خون است. با این حال، منشا پروتئینی نامتجانس آنزیم باعث تحریک ایمنی میزبان، تولید IgE و بروز واکنشهای آلرژیک در بیماران تحت درمان می‌شود (Boos, 1997). تکنیک‌های متعددی مانند مهندسی پروتئین، تغییرات شیمیایی با استفاده از افزودنی‌ها و ایموبیلیزاسیون، روش‌هایی هستند که در سال‌های گذشته به منظور بهبود نیمه عمر، پایداری سرمی و حذف ایمنی زایی آنزیم آسپاراژیناز مورد استفاده قرار گرفته اند(Brumano et al., 2019). یکی از روش‌هایی که در سال‌های اخیر در زمینه بهبود عملکرد آنزیم آسپاراژیناز به طور وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته است، استفاده از گیاهان دارویی می‌باشد. با وجود اثرات جانبی استفاده از ال-آسپاراژیناز‌های باکتریایی و هزینه های بالای تولید و بهینه سازی آن، در این پروژه آنزیم مشتق شده از منبع حیوانی مورد مطالعه قرار گرفت. از طرفی استفاده از گیاهان دارویی یک روش اقتصادی برای بررسی تغییرات ویژگی های بیوشیمیایی آنزیم می‌باشد.

در رابطه با اندازه گیری فعالیت و بررسی مشخصات سینتیکی آنزیم ال-آسپاراژیناز تحقیقات مختلفی انجام شده است. کوشواها و همکاران در سال ۲۰۱۲ میزان فعالیت ویژه آنزیم ال-آسپاراژیناز از سویه *Bacillus subtilis* را در pH ۷ ، ۰/۴۳۶ U/mg گزارش کردند (Kushwaha et al., 2012). همچنین السید و همکاران در سال ۲۰۱۱ آنزیم ال-آسپاراژیناز را با روش رسوب دهی با آمونیوم سولفات و ژل فیلتراسیون از کبد مرغ استخراج کردند و فعالیت ویژه را ۱۵۸/۱۱ U/mg بدست آوردند. علاوه بر این میزان K_m و V_{max} را به ترتیب، ۱/۶۶ mM و ۳۴/۴۷ U گزارش کردند (El-Sayed et al., 2011). شانموگاپراکاش و همکاران در سال ۲۰۱۵ میزان فعالیت

ویژه و غلظت آنزیم ال-آسپاراژیناز گیاهی مستخرج از *Capsicum annuum* را به ترتیب U/mg ۳۰۰۹/۲۶ و ۹/۱۴ میلی گرم گزارش کردند که در مقایسه با مطالعه حاضر مقدار بیشتری است(Shanmugaprakash et al., 2015). کامبل و همکاران در سال ۲۰۰۶ اثر یک مشتق دی هیدروپیریمیدین را بر پارامترهای سینتیکی آنزیم ال-آسپاراژیناز مشتق شده از *Erwinia carotovora* بررسی کردند. مقدار K_m را در غیاب و حضور مشتق دی هیدروپیریمیدین (۱ تا ۳ میلی گرم بر میلی لیتر) به ترتیب ۷/۱۴، ۵/۲۶، ۴ و ۳/ ۲۲ مولار و میزان V_{max} را به ترتیب ۰/۰۵، ۰/۰۳۵، ۰/۰۲۷ و ۰/۰۲۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر دقیقه محاسبه کردند. کاهش مقادیر K_m نشان می‌دهد، مشتق دی هیدروپیریمیدین باعث افزایش میل ترکیبی آنزیم نسبت به سوبسترای ال-آسپاراژین شده است. از طرفی با افزایش میزان مشتق دی هیدروپیریمیدین، سرعت بیشینه کاهش یافته است (Kamble et al., 2006).

در مطالعه حاضر، مشخصات سینتیکی، تعیین غلظت و سنجش فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز انجام شد. با توجه به این که خالص سازی آنزیم ال-آسپاراژیناز به طور جزیی با استون انجام شده، میزان فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز استخراج شده از کبد گاو ، ۵۵/۳۹U و فعالیت ویژه U/mg ۱۱ بدست آورده شده است. احتمالا با خالص سازی بیشتر و استفاده از گروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، عدد مطلوبی بدست خواهد آمد. پارامترهای سینتکی آنزیم در حضور سوبسترای ال-آسپاراژین تعیین شد. مقدار K_m و V_{max} به ترتیب ۰/۴۳۷ میلی مولار و ۰/۰۲۸ میلی مولار بر دقیقه بدست آمد. پس افزودن مقادیر ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر اسانس گیاه نعنا به آنزیم سرعت واکنش آنزیمی مجددا محاسبه شد و میزان K_m و V_{max} با استفاده از معادله خط نمودار لاینویوربرک بدست آمد. با افزودن اسانس نعنا سرعت بیشینه حدود دوبرابر افزایش یافت. اما V_{max} برای مقادیر ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر اسانس تغییر چندانی نداشت و به ترتیب، ۰/۰۴۸، ۰/۰۴ و ۰/۰۴۹ بدست آمد. با افزودن اسانس میل ترکیبی آنزیم نسبت به سوبسترا افزایش یافت. به طوری میزانK_m برای مقادیر ذکر شده اسانس به ترتیب، ۰/۴۰۸، ۰/۳۹ و ۰/۳۵ تعیین شد. از آنجایی که بیشترین ترکیب تشکیل دهنده اسانس نعنا منتول می‌باشد، ممکن است بیشترین اثر را در تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم داشته باشد. براساس نتایج بدست آمده از این پژوهش، نتیجه گیری می‌شود که اسانس گیاه نعنا می‌تواند به عنوان یک فعال کننده آنزیم ال-آسپاراژیناز، در صورتی که نیاز به افزایش فعالیت آنزیم باشد، با هدف دارویی و صنعتی عمل کند.

سپاسگزاری

از آنجایی که بودجه بندی این تحقیق از سوی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه مازندران تامین اعتبار شده است باین وسیله از ایشان تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

۱- اسماعیلی س.، ایرانی م.، موذنی ح. و مصدق م. ۱۳۹۸. مهار پلیمریزاسیون ماده هم، مکانیسم اثر ضدمالاریایی اختصاصی phlomis caucasica Rech.f. .گیاهان دارویی، جلدهجدهم.

۲- اکبر زاده ل. ۱۳۸۲. گیاهان دارویی از خانواده نعناییان (Lamiacea) در منطقه "واز" مازندران. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، جلدنوزدهم، شماره اول، ص: ۴۶-۳۷.

۳- نوربخش ف.، رضایی س. و عرب م. ۱۳۸۹. شناسایی ترکیبات شیمیایی و اثر اسانس گیاهان نعنا، ریحان، شوید و جعفری بر قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس. دنیای میکروب ها، جلدسوم، شماره دوم، ص:۱۳۶-۱۲۹.

4- Asselin., Ryan B.L., Frantz D., Bernal C.N., Leavitt S.D., Sallan P., Cohen S.E. and Harvey J. 1989. *In vitro* and *in vivo* killing of acute lymphoblastic leukemia cells by L-asparaginase. Cancer research, 49(15): 4363-4368.

5- Avramis V.I., Sencer S., Periclou A.P., Sather H., Bostrom B.C., Cohen L.J., Ettinger A.G., Ettinger L.J., Franklin J., Gaynon P.S., Hilden J.M., Lange B., Majlessipour F., Mathew P., Needle M., Neglia J., Reaman G. and Holcenberg J.S. 2002. A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood*, *99*(6): 1986-1994.

6- Avramis V.I. and Tiwari P.N. 2006. Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. Int J Nanomedicine, 1(3): 241-254.

7- Batool T., Makky E.A., Jalal M. and Yusoff M.M. 2016. A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications. Applied biochemistry and biotechnology, 178(5): 900-923.

8- Boos J. 1997. Pharmacokinetics and drug monitoring of L-asparaginase treatment. International journal of clinical pharmacology and therapeutics, *35*(3): 96-98.

9- Bradford. and Marion M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical biochemistry, 72(1-2): 248-254.

10- Brumano L.P., da Silva F.V.S., Costa-Silva T.A., Apolinario A.C., Santos J.H.P.M., Kleingesinds E.K., Monteiro G., Rangel-Yagui C.d.O., Benyahia B. and Junior A.P. 2019. Development of L-asparaginase biobetters: current research status and review of the desirable quality profiles. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 6: 212.

11- Chand S., Mahajan R.V., Prasad J.P., Sahoo D.K., Mihooliya K.N., Dhar M.S. and Sharma G. 2020. A comprehensive review on microbial L-asparaginase: Bioprocessing, characterization, and industrial applications. Biotechnology and applied biochemistry, 67(4): 619-647.

12- EL-Sayed., El-Sayed M., El-Sayed S.T., Wafaa., Shousha G., Abeer., Shehata N., Shimaa. and Hanafy S. 2011. Purification, Characterization and Antitumor Activity of L-asparaginase from Chicken liver. Journal of American Science, 7(1).

13- Kamble V.P., Rao R.S., and Borkar P.S. 2006. Purification of L-asparaginase from a bacteria *Erwinia carotovora* and effect of a dihydropyrimidine derivative on some of its kinetic parameters. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, 43: 391-394.

14- Kushwaha A., Ahmed F. and Singh P. 2012. Production and Purification of L-Asparaginase from bacterial sources. International Journal of Universal Pharmacy and Life Sciences, 132(12): 34- 82.

15- Lopes A.M., Oliveira-Nascimento L.d.O., Ribeiro A., Tairum Jr C.A., Breyer C.A., Oliveira M.A.d., Monteiro G., Souza-Motta C.M.d., Magalhaes P.d.O., Avendano J.G.F., Cavaco-Paulo A.M., Mazzola P.G., Rangel-Yagui C.d.O., Sette L.D., Converti A., and Pessoa A. 2017. Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. Critical reviews in biotechnology, 37(1): 82-99.

16- Nagarethinam., Sivagurunathan., Naik., Nagappa A., Udupa., N., Rao., J V., Vanathi. And B M. 2012. Microbial L-Asparaginase and its future prospects. Asian Journal of Medical Research, 1(4):159-160.

17- Scotti C., Sommi P., Pasquetto M.V., Cappelletti D., Stivala S., Mignosi P., Savio M., Chiarelli L.R., Valentini G., Bolanos-Garcia V.M., Merrell D.S., Franchini S., Verona M.L., Bolis C., Solcia E., Manca R., Franciotta D., Andrea Casasco., Filipazzi P., Zardini E. and Vannini V. 2010. Cell-Cycle Inhibition by *Helicobacter pylori* L-Asparaginase. PloS one, 7(2): 10.1371.

18- Shanmugaprakash M., Jayashree C., Vinothkumar V., Senthilkumar S.N.S., Sahabjada S., Rawat V. and Arshad M. 2015. Biochemical characterization and antitumor activity of three phase partitioned L-asparaginase from *Capsicum annuum L.* Separation and Purification Technology, 142: 258-267.

19- Shrivastava A., Khan A.A., Khurshid M., Kalam M.d.A., Jain S.K. and Singhal P.K. 2015. Recent Developments in L-asparaginase Discovery and Its Potential as Anticancer Agent. Critical Reviews in Oncology and Hematology, 100: 1-10.

20- Soares A.L., Guimaraes G.M., Polakiewicz B., Pitombo R.N.d.M. and Abrahao-Neto J. 2002. Effects of polyethylene glycol attachment on physicochemical and biological stability of E. Coli L-asparaginase. International journal of pharmaceutics, 237(1-2): 163-170.

21- U E., Martinez-Outschoorn., Peiris-Pages M., Pestell R.G., Sotgia F. and Lisanti M.P. 2017. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. Nat Rev Clin Oncol, 14: 11–31.
22- Vimal A. and Kumar A. 2017. Biotechnological production and practical application of L-asparaginase enzyme. Biotechnology and genetic engineering, 33(1): 40-61.
23- Wriston J.R. and John C. 1970. Asparaginase. Methods in enzymology, 17: 733-742.

Interaction of human serum albumin with single-walled and double-walled carbon nanotubes: A molecular dynamics simulation study

* Leila Karami

Faculty of Biological Science, Kharazmi University, Tehran, Iran

*l_karami@khu.ac.ir

Abstract

The study of the interaction between nanoparticles and biomolecules is important to understand the biological activity of the nanoparticles and their applications in medicine and biotechnology. A way to reduce the toxic effects of carbon nanotubes (CNTs) is to coat their surface with proteins or other designed molecules. Thus, it is significant to investigate the interaction of CNTs with biomolecules such as proteins. For this purpose, we performed a 40-ns molecular dynamics simulations to investigate the adsorption of a model protein of HSA onto the surfaces of single-walled and double-walled carbon nanotubes. Human serum albumin (HSA) is the major plasma protein and the most abundant protein in the circulatory system. Albumin is a water-soluble monomeric protein that is synthesized in the liver and its most important role is to carry compounds such as hormones, fatty acids and some drugs. Parameters such as interaction energy, secondary structure of protein and interface area were examined. Studies showed that over time, the interaction of carbon nanotubes with the model protein increases. Studies on the interaction energy between carbon nanotubes and amino acid residues of the HSA protein model indicated that aromatic amino acids play an effective role in protein adsorption on the surface of carbon nanotubes. Also, the aromatic amino acid, Tyr, has π-π stacking interaction with CNTs. It has led to effective interaction with nanotubes, which is more in double-walled carbon nanotubes than single-walled carbon nanotubes. Hydrophobic amino acids such as Leu also play an important role in the interaction energy by participating in hydrophobic interactions. Calculations of the second structure of protein show that with the formation of complexes, the second structure is reduced in the form of an alpha helix compared to the free state of HSA. The reason is the participation of some residues in absorbing the level of CNTs.

Keywords: Human serum albumin (HSA), Carbon nanotubes, Conformational changes, Protein adsorption, Molecular dynamics simulations.

ارزیابی برهمکنش آلبومین سرم انسانی با نانولوله های کربنی تک جداره و دو جداره با استفاده از شبیه سازی دینامیک مولکولی

لیلا کرمی*

استادیار گروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

*l_karami@khu.ac.ir**

چکیده

مطالعه برهمکنش بین نانوذرات و زیست مولکول ها برای درک فعالیت بیولوژیکی نانوذرات و کاربردهای آنها در پزشکی و بیوتکنولوژی اهمیت زیادی دارد. یک راه برای کاهش اثرات سمی نانولوله های کربنی (CNTs) پوشاندن سطح آنها با پروتئین ها یا سایر مولکول های طراحی شده است. بنا بر این، بررسی برهمکنش CNT ها با زیست مولکول هایی مانند پروتئین ها حائز اهمیت است. برای این منظور، یک شبیه‌سازی دینامیک مولکولی ۴۰ نانوثانیه ای برای بررسی جذب سطحی یک پروتئین مدل HSA بر روی سطوح نانولوله‌های کربنی تک جداره و دو جداره انجام شد. آلبومین سرم انسانی (HSA) پروتئین اصلی پلاسما و فراوان ترین پروتئین در سیستم گردش خون است. آلبومین یک پروتئین مونومری محلول در آب است که در کبد سنتز می شود و مهمترین نقش آن حمل ترکیباتی مانند هورمونها، اسیدهای چرب و برخی دارو ها می باشد. در این مطالعه، پارامترهایی مانند انرژی برهمکنش، ساختار ثانویه پروتئین و سطح حد فاصل مورد بررسی قرار گرفتند. مطالعات نشان داد که با گذشت زمان، برهمکنش نانولوله های کربنی با پروتئین مدل افزایش می یابد. بررسی انرژی برهمکنش بین نانولوله‌های کربنی و رزیدوهای اسید آمینه مدل پروتئین HSA مشخص کرد که اسید آمینه های آروماتیک نقش موثری در جذب پروتئین روی سطح نانولوله‌های کربنی دارند. همچنین اسید آمینه آروماتیک تیروزین با CNT ها برهمکنش انباشتگی π-π دارد. این شرایط منجر به برهمکنش موثر با نانولوله‌ها شده است که در نانولوله‌های کربنی دو جداره بیشتر از نانولوله‌های کربنی تک جداره می باشد. اسید آمینه های هیدروفوبی مانند لوسین نیز با مشارکت در برهمکنش های هیدروفوب در انرژی برهمکنش نقش مهمی ایفا می کنند. بررسی تغییرات ساختار دوم پروتئین نشان می دهد که با تشکیل کمپلکس ها، میزان ساختار دوم از نوع مارپیچ آلفا در مقایسه با حالت آزاد HSA، به دلیل مشارکت برخی از رزیدوها در جذب شدن به سطح CNT ها، کاهش می یابد.

واژگان کلیدی: آلبومین سرم انسانی (HSA)، نانولوله های کربنی، تغییرات ساختاری، جذب سطحی پروتئین، شبیه سازی دینامیک مولکولی

۱.مقدمه

نانولوله‌های کربنی (CNTs) اســـتوانه‌های بلندی از کربن‌های sp^2 در مقیاس نانو هســـتند. نانولوله‌های کربنی می‌توانند دو شـــکل داشـته باشـند: نانولوله‌های کربنی تک جداره (SWCNT) و نانولوله‌های کربنی چند جداره (MWCNT). در سـال های اخیر، CNT ها به دلیل خواص ساختاری، حرارتی، مکانیکی و الکتریکی خاصشان، توجه زیادی را به خود جلب کرده اند (Zhang et al., 1999). CNT ها با مقاومت مکانیکی قابل توجه، سطح در دسـترس زیاد و پایداری شـیمیایی مطلوبی که دارند، دارای کاربرد های بسـیاری مانند حسگر های زیستی، سیستم های دارو رسانی (Bhirde et al., 2009)، طراحی دارو و درمان تومور (Thakare et al., 2010) و مهندسی بافت می باشند. با این حال، نگرانی های زیادی در مورد ایمنی این نانومواد وجود دارد. بنابراین، درک برهمکنش ذرات در مقیاس نانو با واحدهای تشـکیل‌دهنده اسـاسـی مولکول‌های زیسـتی مانند پپتیدها، پروتئین‌ها و اسـیدهای نوکلئیک بسـیار مهم است.مطالعات بر روی برهمکنش CNT ها و پروتئین ها منجر به درک بهتر مفاهیم اساسی در نانوتوکسیکولوژی و نانوفارماکولوژی می شـود. در واقع، یکی از راه های کاهش اثرات سـمی نانولوله‌های کربنی، پوشـاندن سـطح آن‌ها با پروتئین یا سـایر مولکول‌های طراحی‌شـده است (Yan et al., 2011). CNT ها بسـیار آبگریز هسـتند و اغلب مجتمع های نامحلول را تشـکیل می دهند. بنابراین، کاربرد آن ها در نانوبیوتکنولوژی و نانوپزشکی به شکل خالصشان محدود شده است. عامل دار کردن مولکول های زیستی یکی از راه های غلبه بر این مشـکل است. جذب برخی از عوامل انحلال‌سـاز مانند پروتئین‌ها، پپتیدها و DNA بر روی CNT به عنوان یک تکنیک امیدوارکننده برای پراکنده کردن CNT ها در نظر گرفته می‌شود. تا کنون چندین روش تجربی از طریق اتصال کووالانسی یا غیرکووالانسی مواد زیستی با هدف حل شدن CNT ها انجام شده است (Georagakilas et al., 2002).

مدل سـازی محاسـباتی به طور گسـترده برای مطالعه خواص دینامیکی، ترمودینامیکی و مکانیکی سـیسـتم های بیولوژیکی مورد اسـتفاده قرار گرفته اسـت. بررسـی‌های اخیر، کاربرد شـبیه‌سـازی‌های کامپیوتری را برای مطالعه مواد بیولوژیکی در حضـور نانومواد، به‌ویژه حالت‌های متداول که توسـط آن نانومواد با پروتئین‌ها، DNA و غشـاهای لیپیدی برهم‌کنش می‌کنند، خلاصـه می‌کند. در اینجا، از روش محاسـباتی شـبیه‌سـازی دینامیک مولکولی برای مدل‌سـازی کمپلکس‌های بین نانولوله‌های کربنی و پروتئین آلبومین سرم انسانی (HSA) استفاده شد. شایان ذکر است که آلبومین فراوان ترین پروتئین در پلاسمای انسان است (~600 mM) (Peters, 1995). آلبومین می تواند به لیگاندهای مختلفی مانند اسـیدهای چرب غیر اسـتری شـده، بیلی روبین، همین و تیروکسـین متصـل شـود. در این مطالعه، شـبیه‌سـازی‌های دینامیک مولکولی برای بررسـی جذب پروتئین مدل HSA بر روی سـطوح SWCNT و DWCNT انجام شـد. از آنجایی که HSA یک پروتئین بزرگ اسـت؛ یک پروتئین مدل از HSA برای درک برهمکنش بین CNT و پروتئین اسـتفاده شـده اسـت. سـه شـبیه‌سـازی دینامیک مولکولی ۴۰ نانوثانیه ای برای حالت آزاد HSA و کمپلکس های HSA-SWCNT و HSA-DWCNT اجرا شـد. خواص سـاختاری مانند RMSD و سـاختار دوم پروتئین مدل و انرژی برهمکنش از ترجکتوری های (فایل های مسیر) آن ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲.مواد و روش‌ها

ساختار اشعه ایکس HSA از بانک داده پروتئین(کد 2BXI) به دست آمد. HSA شامل سه دامنه ی مارپیچ همولوگ (I-III) می باشد که هر کدام به زیر دامنه‌های A و B تقسیم می‌شوند. در این مطالعه، پروتئین مدل از دامنه IIIA انتخاب شده و دارای توالی AEDYLSVVLNQLCVL است (رزیدوهای ۴۴۹-۴۶۳). پروتئین توسط میدان نیروی CHARMM27 مدل سازی شد

(MacKerell et al., 1998). ابعاد جعبه به صورت $Å^3$ ۳۰.۶۱×۳۳.۶۷×۳۸.۲۳ تنظیم شد. مدل آب TIP3P برای حلال‌سازی مورد استفاده قرار گرفت و دو یون Na^+ برای خنثی کردن این سیستم به جعبه شبیه سازی اضافه شد.

نانو لوله های کربنی استفاده شده در این کار، از نوع Aarmchair هستند. یک SWCNT از نوع (۷،۷) با قطر Å ۹.۴۲۵ و طول Å ۳۴.۴۶۸ استفاده شد. DWCNT (۱۶،۱۶) دارای طول Å ۳۴.۴۶۸ و قطر Å ۲۱.۵۴۳ می باشد. پارامترهای میدان نیرو نانولوله های کربنی در آب از منبع (Walter et al., 2001) گرفته شده است. اتم‌های کربن روی SWCNT و DWCNT به‌عنوان ذرات بدون بار با پارامترهای واندروالس با $\sigma cc = ۳.۸۵۱ Å$ و $\varepsilon_{cc} = ۰.۴۳۹۶ kJ\ mol^{-1}$ مدل‌سازی شدند. فاصله ی تقریبی بین مرکز جرم پروتئین و نانولوله های کربنی Å ۲۰ تعیین شد.کمپلکس های پروتئین مدل با SWCNT (HSA-SWCNT) و DWCNT (HSA-DWSNT) به ترتیب در جعبه هایی با ابعاد $Å^3$ ۵۵×۳۵×۳۴.۴۷ و $Å^3$ ۳۴.۴۷×۷۰×۹۰ قرار گرفتند. محور CNT ها موازی با محور Z تنظیم شد. دو سیستم ایجاد شده با مدل آب TIP3P آبپوشی شدند. تعداد مولکول های آب TIP3P برای کمپلکس های دارای SWCNT و DWCNT به ترتیب ۱۹۲۷ و ۶۵۳۱ بود. دو یون Na^+ برای خنثی کردن سیستم ها اضافه شد. تعداد کل اتم ها برای کمپلکس های دارای SWCNT و DWCNT به ترتیب ۲۵۵۹ و ۸۰۰۳ بود.

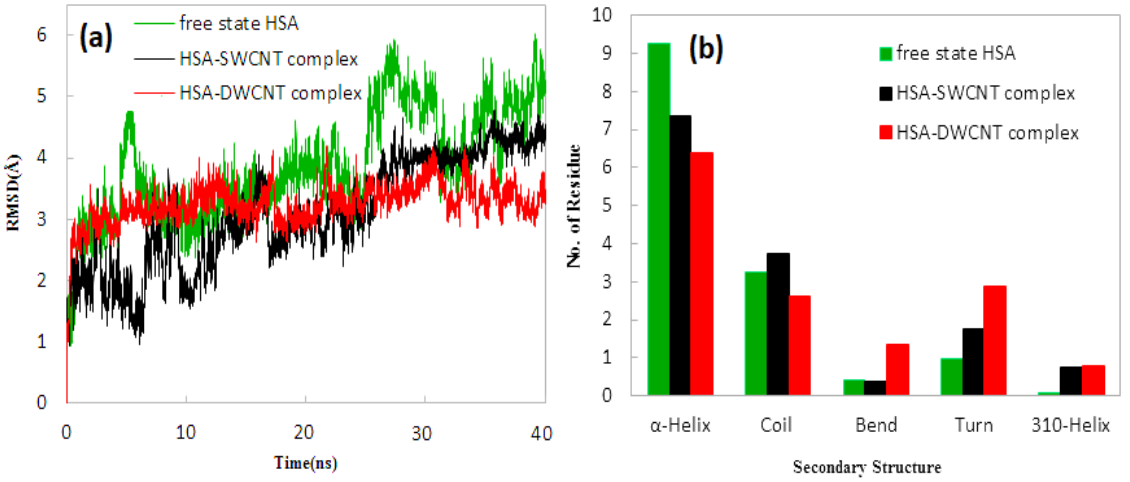
تمام شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی توسط نرم افزار Gromacs نسخه ۴.۵.۳ (Van der Spoel et al., 2005) با استفاده از میدان نیروی CHARMM27 انجام شد. حداقل رسانی انرژی با استفاده از الگوریتم تند ترین کاهش طی ۱۰۰۰۰ مرحله انجام شد. شرایط مرزی متناوب برای همه سیستم ها اعمال شد. سپس، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در حجم و دمای ثابت (هنگرد NVT) به مدت 5ns در ۳۱۰K اجرا شد. متعاقباً، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی ۴۰ نانوثانیه ای در ۳۱۰K انجام شد. سرعت‌های اتمی اولیه با استفاده از توزیع Maxwell-Boltzmann در نظر گرفته شد. برهمکنش های الکترواستاتیک دوربرد با روش particle-mesh Ewald (PME) محاسبه شدند (Essman et al., 1995). شعاع قطع برای برهمکنش های واندروالس و کولمبی ۱۲Å تنظیم شد. ثابت زمانی برای اتصال به ترموستات در ۳۱۰K، ۰.۱ ps بود. گام زمانی شبیه سازی روی ۲fs تنظیم و مختصات ساختارها هر ۱۰ps ثانیه ذخیره شد. تمام اتم های کربن CNT ها ثابت در نظر گرفته شدند.

۳. نتایج و بحث

برای بررسی پایداری شبیه‌سازی‌های پروتئین مدل، انحراف جذر میانگین مربع (RMSD) اتم‌های Cα نسبت به ساختار اولیه ی آن‌ها به عنوان تابعی از زمان شبیه‌سازی محاسبه شد. شکل ۱a نشان می دهد که RMSD پروتئین مدل در دو کمپلکس (HSA-SWCNT و HSA-DWCNT) کم تر از حالت آزاد (بدون هیچ CNT) است. همچنین RMSD آلبومین سرم انسانی در حالت آزاد دارای نوسانات بیشتری است. از داده های RMSD می توان نتیجه گرفت که در حضور CNT ها، پروتئین پایدار شده و DWCNT پایداری بیشتری دارد. پایداری بیشتر را می توان به برهمکنش موثر بین پروتئین و CNT نسبت داد.

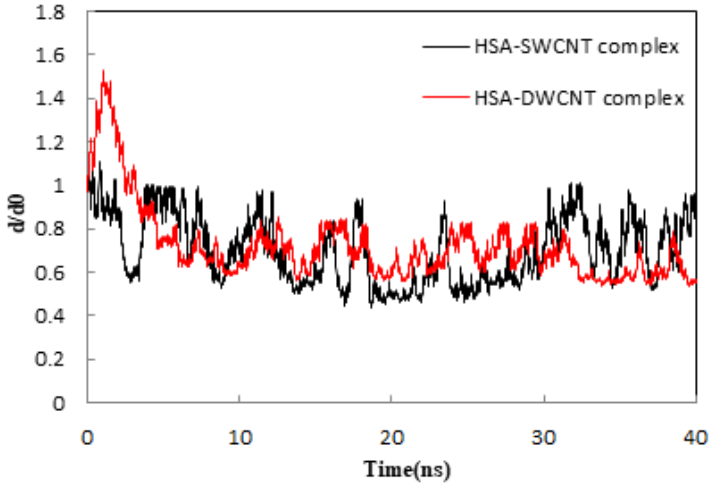
تجزیه و تحلیل ساختار دوم پروتئین با استفاده از برنامه DSSP انجام شد (Kabsch and Sander, 1983). به این منظور، میانگین تعداد رزیدوهایی که عنصر ساختاری دوم مارپیچ α ، 3_{10}-Helix ، Bend، Turn و Coil را دارند، برای هر یک از سه شبیه‌سازی در بازه ی زمانی شبیه سازی ۴۰ns محاسبه و در شکل 1b ترسیم شد. در هر دو حالت آزاد و کمپلکس ها (HSA-SWCNT و HSA-DWCNT)، بیشتر رزیدو ها در ساختار مارپیچ α شرکت می‌کنند و تعداد رزیدوها با ساختار مارپیچ α برای حالت آزاد و کمپلکس ها یکسان نیست. هنگامی که کمپلکس تشکیل می شود، تعداد رزیدو ها با ساختار مارپیچ α کاهش می یابد و این کاهش برای کمپلکس HSA-SWCNT کمتر است. دلیلکاهش مارپیچ α را می توان حضور CNT ها و فرآیند اتصال آن ها به پروتئین مدل بیان کرد.

تغییرات ساختاری و جهت گیری پروتئین مدل برای فرآیند اتصال پروتئین به نانولوله ها ضروری است. در پروتئین در کمپلکس با DWCNT تغییرات ساختاری بیشتری دیده می شود تا برهمکنش های قویتری بین DWCNT و پروتئین مدل برقرار شود. ساختارهای coil و turn که غالبا دو مارپیچ α را به هم متصل می‌کنند، دومین عنصر ساختاری ثانویه هستند که اغلب مشاهده می‌شوند، در حالی که تعداد بسیار کمی از رزیدوها در ساختارهای 3_{10}-Helix و Bend دخیل هستند.



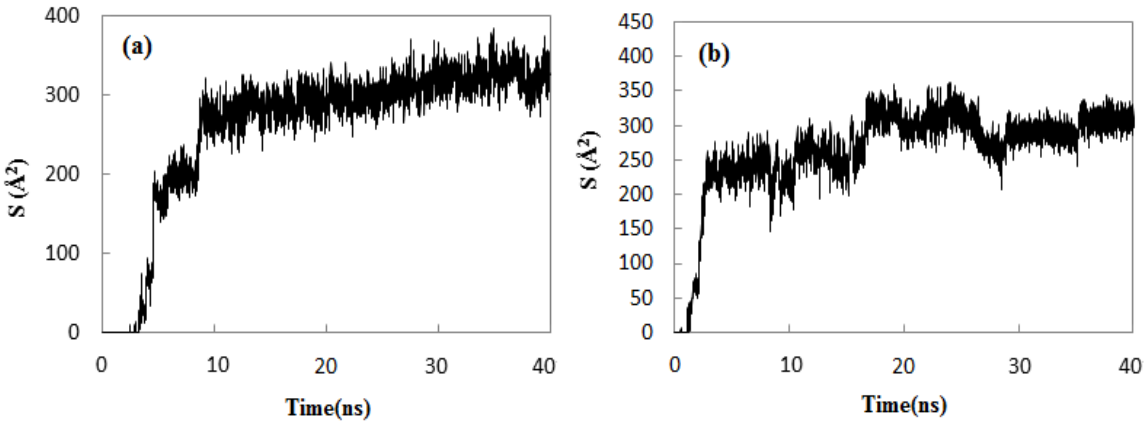
شکل ۱: (a) تغییرات زمانی انحراف جذر میانگین مربع (RMSD) اتم های Cα در پروتئین مدل HSA. (b) ساختار دوم پروتئین مدل HSA در طی شبیه سازی ۴۰ نانوثانیه.

برای مطالعه پدیده جذب ، فاصله نرمال شده مرکز جرم (COM) بین پروتئین مدل HSA و CNTs (d/d_0)، در کمپلکس‌های HSA-SWCNT و HSA-DWCNT مورد بررسی قرار گرفت و در شکل ۲ نشان داده شده است. متغیر d فاصله مرکز جرم را برای پروتئین مدل HSA و CNT ها نشان می دهد و d_0 مقدار اولیه ی d قبل از شروع اجرای شبیه سازی دینامیک مولکولی است. فاصله COM نرمال شده بین پروتئین مدل و DWCNT از ۰ تا ۰.۵~ نانوثانیه به ۱.۵ افزایش، سپس فاصله به تدریج کاهش می یابد. در طول فرآیند جذب ، نوساناتی برای d/d_0 وجود دارد. این نوسانات به دلیل تغییر ساختاری پروتئین یا بازآرایی رزیدو ها در نزدیکی سطح CNT است. مقدار نهایی برای d/d_0 برابر با ۰.۵۹۳ است. کاهش فاصله COM در کمپلکس HSA-DWCNT نشان می دهد که جذب پروتئین در سطح SWCNT رخ داده است. فاصله ی نرمال شده HSA-SWCNT به شدت در نوسان است و در نهایت به ۰.۹۷۰می رسد.



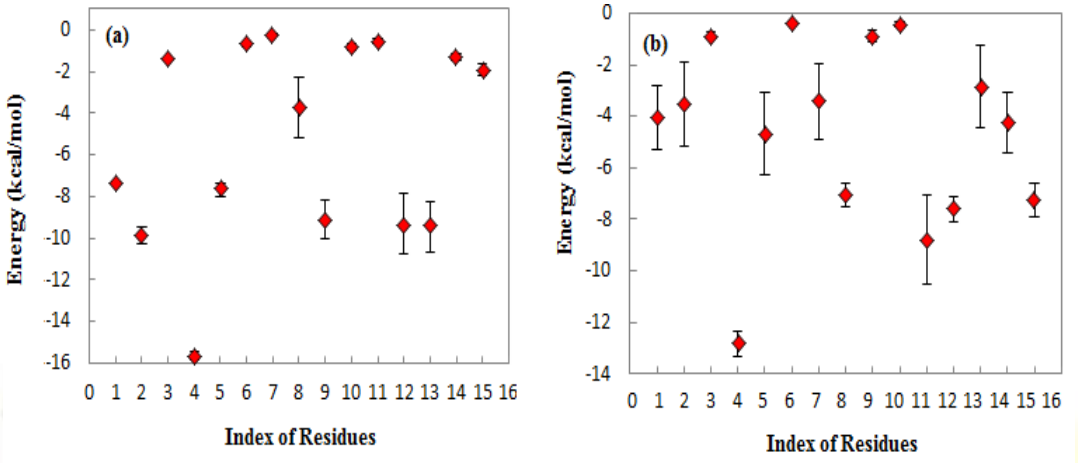
شکل ۲: فاصله ی نرمال شده مرکز جرم برای پروتئین و CNT ها در کمپلکس ها.

سطح حد فاصل بین پروتئین مدل HSA و CNT ها برای نشان دادن فرآیند اتصال CNT ها استفاده می شود. سطح حد فاصل برای هر دو کمپلکس محاسبه و در شکل ۳ نشان داده شده است. سطح حد فاصل (که با S مشخص می شود) به عنوان نیمی از اختلاف بین سطح در دسترس حلال (SASA) کمپلکس و مجموع سطوح در دسترس حلال پروتئین و CNT تعریف می شود. ابتدا، S برای HSA-DWCNT کوچک است زیرا پروتئین مدل HSA و DWCNT از هم جدا شده اند. پس از ۸ns، S به حدود $۱۷۶Å^2$ می رسد. این افزایش S در کمپلکس HSA-DWCNT نشان می دهد که پروتئین مدل و DWCNT خیلی سریع به یکدیگر نزدیک شدند. همین روند بطور مشابهی برای کمپلکس HSA-SWCNT نیز مشاهده می شود.



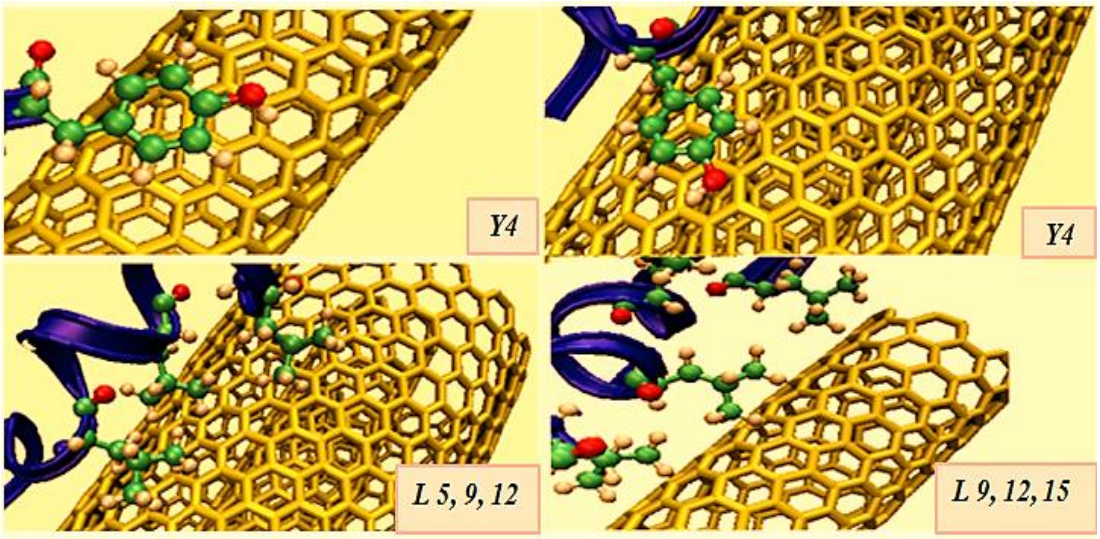
شکل ۳: سطح حد فاصل پروتئین مدل و CNT ها: HSA-DWCNT (a)؛ HSA-SWCNT (b).

انرژی برهمکنش بین CNT ها و رزیدو ها در هر دو کمپلکس محاسبه و در شکل ۴ نشان داده شده است. انرژی برهمکنش بین رزیدوی تیروزین (Y4) به صورت قابل توجهی بزرگ تر از باقی رزیدو ها است. مقادیر انرژی برهمکنش برای رزیدوی تیروزین در کمپلکس های HSA-DWCNT و HSA-SWCNT به ترتیب -15.6 kcal mol^{-1} و -12.8 kcal mol^{-1} می باشد.



شکل ۴: انرژی برهمکنش بین CNT ها و رزیدو ها در پروتئین مدل HSA: HSA-DWCNT (a)؛ HSA-SWCNT (b)

شکل ۵ نشان می دهد که حلقه ی فنیل رزیدوی تیروزین (Y4) در هر دو سیستم موازی با سطح CNT ها است. ناحیه ی تماس حلقه ی فنیل با سطوح حداکثر است. حلقه فنیل برهمکنش انباشتگی π-π با CNT ها تشکیل می دهد، که نیروی محرکه اصلی برای برهمکنش پروتئین-CNT ها است. این نشان می دهد که برهمکنش بین CNT ها و رزیدو های آبگریز، به ویژه رزیدو های آروماتیک (برهمکنش های انباشتگی π-π)، نقش مهمی در تشکیل کمپلکس پروتئین-CNT دارند. رزیدوی دیگری که انرژی برهمکنش قابل توجهی دارد لوسین است (L5، L9 و L12 در کمپلکس HSA-DWCNT و L9، L12 و L15 در کمپلکس HSA-SWCNT). زنجیره جانبی در رزیدوی لوسین ایزوپروپیل می باشد که یک گروه غیر قطبی است. بنابراین، لوسین به سبب برهمکنش های واندروالس و هم چنین برهمکنش های هیدروفوب، به راحتی می تواند به سطوح جذب شود.



شکل ۵: برهمکنش بین CNT ها و رزیدو های کلیدی در دو کمپلکس (HSA-DWCNT و HSA-SWCNT).

۴. نتیجه‌گیری

در این مطالعه، فرایند جذب، برهمکنش های موثر بین پروتئین مدل HSA و CNT ها و تغییرات ساختاری پروتئین مدل در حضور نانو لوله های کربنی تک جداره و دو جداره مورد بررسی قرار گرفت. سه شبیه سازی دینامیک مولکولی ۴۰ns ای برای حالت آزاد HSA و کمپلکس های HSA-SWCNT و HSA-DWCNT انجام شد. ویژگی های ساختاری مانند RMSD و ساختار ثانویه پروتئین مدل از این ترجکتوری ها مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل ترجکتوری های دینامیک مولکولی نشان داد که مقادیر RMSD برای HSA در هر دو کمپلکس کاهش یافته است که نشان دهنده ی پایداری بیشتر کمپلکس ها به ویژه در کمپلکس HSA-DWCNT می باشد. در این کمپلکس ها، تغییرات ساختاری در سطوح ساختار های ثانویه مشاهده شد. کاهش فاصله ی مرکز جرم نرمال شده بین پروتئین مدل و CNT ها در هر دو کمپلکس نشان داد که جذب پروتئین به سطح CNT ها اتفاق افتاده است. تجزیه و تحلیل انرژی برهمکنش بین CNT ها و رزیدو ها در پروتئین مدل نشان می دهد که رزیدو های آروماتیک (تیروزین) و لوسین، رزیدوهای کلیدی برای اتصال پروتئین-CNT ها می باشند. مقادیر انرژی برهمکنش برای رزیدوهای آروماتیک با DWCNT بزرگ تر از SWCNT است.

منابع

1. Bhirde A.A., Patel V. and Gavard J. 2009. Targeted killing of cancer cells in vivo and in vitro with EGF-directed carbon nanotube-based drug delivery. ACS Nano, 3(2), 307.
2. Essman U., Perela L., Berkowitz M.L., Darden T., Lee H. and Pedersen L.G. 1995. A smooth particle mesh Ewald method. Journal of physical chemistry, 103, 8577.
3. Georagakilas V., Kordatos K., Prato M., Guldi D.M., Holzinger M. and Hirsch A.J. 2002. An Organic functionalization of carbon carbon nanotubes. Journal of american chemical society, 124, 760.

4. Kabsch W. and Sander C. 1983. Dictionary of protein secondary structure: pattern-recognition of hydrogen-bonded and geometrical feature. Biopolymers, 22, 2577.
5. MacKerell A.D., Bashford D., Bellott M., Dunbrack R.L., Evanseck J.D., Field M.J. and Karplus M. 1998. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. Journal of physical chemistry B, 102, 3586.
6. Peters T. 1995. All about Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications ,Academic Press.
7. Thakare V.S., Das M. and Jain A.K. 2010. Carbon nanotubes in cancer theragnosis. Nanomedicine, 5(8), 1277.
8. Van der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A.E. and Berendsen H.J.C. 2005. GROMACS: fast, flexible and free. Journal of computational chemistry, 26, 1701.
9. Walther J.H., Jaffe R., Halicioglu T. and Koumoutsakos P. 2001. Carbon nanotubes in water: structural characteristics and energetics ,Journal of physical chemistry B, 105, 9980.
10. Yan L.A., Zhao F., Li S.J., Hu Z.B. and Zhao Y.L. 2011. Low-toxic and safe nanomaterials by surface-chemical design, carbon nanotubes, fullerenes, metallofullerenes, and graphene. Nanoscale, 3, 362.
11. Zhang Y., Ichihashi T., Landree E., Nihey F. and Iijima S. 1999. Heterostructures of single-walled carbon nanotubes and carbide nanorod. Science, 285, 1719.

An Overview on Clinical Applications of Exosomes

Parham Soufizadeh[1*]; Mohammad Mehdi Dehghan[2,5]; Gholamreza Nikbakht Brujeni[3,5]; Massoumeh Jabbari Fakhr[4,5]

1. Student of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2. Professor, Department of Surgery and Radiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
3. Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
4. Department of Tissue Engineering, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran
5. Biomedical Research Institute, University of Tehran, Tehran, Iran

Soufizadehparham@ut.ac.ir

Abstract

Exosomes are extracellular vesicles that range in size from 30 to 150 nanometers and contain biologically active molecules such as nucleic acids, lipids, and proteins. The target cells of these vesicles are usually adjacent cells and even cells farther away, and these exosomes can be extracted from all body fluids. In recent years, the therapeutic and diagnostic potential of exosomes has been considered and many clinical studies have been performed on them. The most important function of exosomes is in cellular communication. In fact, these vesicles, with their biologically active molecules, exchange messages between different cells that can exert various effects on the target cell. These effects can be considered positive or negative, depending on the target cell secreted. If you use exosomes secreted by beneficial cells such as stem cells, you can see the positive effects of them in various conditions. Among these effects are the ability to modulate and regulate immunity and to improve and repair different tissues. These effects can manifest themselves with different clinical manifestations in different diseases; Including in skin, autoimmunity, liver, nerve, cardiovascular, respiratory, gastrointestinal, urinary and genital, skeletal and joint, muscular and etc. lesions and diseases. In addition, by identifying exosomes secreted by cells involved in various diseases, they can be diagnosed and treated in a timely manner. The contents of the exosomes can also be modified to the desired contents, such as drugs, and injected specifically into the patient's body to treat specific cells. Another application of exosomes is in vaccine development, as these vesicles are secreted from all living cells, including microorganisms, and can be used in the production of emerging vaccines due to their specific cell-specific receptors. These vaccines are not only for microorganisms, but can also be used to treat and prevent a variety of cancers. In this study, by searching in valid databases, the types of clinical trials of exosomes have been reviewed and the results have been mentioned as a guide for the clinical approach to the use of exosomes.

Keywords: Extracellular vesicles, Exosomes, Immune Modulation, Repair

مروری بر کاربردهای بالینی اگزوزوم‌ها

پرهام صوفی‌زاده[۱*]؛ محمدمهدی دهقان[۵،۲]؛ غلامرضا نیکبخت بروجنی [۵،۳]؛ معصومه جباری‌فخر[۵،۴]

۱- دانشجوی دکترای عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲- استاد، گروه جراحی و رادیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳- استاد، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۴- گروه مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران
۵- پژوهشکده تحقیقات زیست پزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

Soufizadehparham@ut.ac.ir

چکیده

اگزوزوم‌ها از جمله وزیکول‌های خارج سلولی‌ای هستند که سایزی بین ۳۰ تا ۱۵۰ نانومتر دارند و محتویات آن‌ها مولکول‌های فعال زیستی مانند نوکلئیک اسیدها، لیپیدها و پروتئین‌ها است. سلول‌های هدف این وزیکول‌ها، معمولا سلول‌های مجاور و حتی سلول‌های دورتر از آن‌ها است و این اگزوزوم‌ها را می‌توان از تمامی مایعات بدن استخراج کرد. در سال‌های اخیر، پتانسیل درمانی و تشخیصی اگزوزوم‌ها مورد توجه قرار گرفته است و پژوهش‌های بالینی بسیاری بر روی آن‌ها انجام شده است. مهمترین عملکرد اگزوزوم‌ها در برقراری ارتباطات سلولی است. در واقع این وزیکول‌ها با دارا بودن مولکول‌های فعال زیستی پیام‌هایی را بین سلول‌های مختلف تبادل می‌کنند که می‌توانند اثرات گوناگونی بر سلول هدف اعمال نمایند. این اثرات می‌تواند مثبت و یا منفی تلقی شود که وابسته به سلول مترشحه‌ی آن است. در صورت استفاده از اگزوزوم‌های مترشحه از سلول‌های مفیدی مانند سلول‌های بنیادی، می‌توان شاهد آثار مثبتی از آن‌ها در شرایط گوناگون بود. از جمله‌ی این آثار خاصیت تعدیل و تنظیم ایمنی و بهبود و ترمیم بافت‌های متفاوت است. این آثار می‌تواند با نمودهای بالینی متفاوتی در بیماری‌های گوناگون آشکار شود؛ از جمله در ضایعات و بیماری‌های پوستی، خود ایمنی، کبدی، عصبی، قلبی و عروقی، تنفسی، گوارشی، ادراری و تناسلی، استخوانی و مفصلی، عضلانی و... . علاوه بر این می‌توان با شناسایی اگزوزوم‌های مترشحه از سلول‌های درگیر در بیماری‌های گوناگون، اقدام به تشخیص و درمان به موقع آن‌ها نمود. همچنین می‌توان محتویات اگزوزوم‌ها را با استفاده از تکنیک‌های موجود به محتویات دلخواه نظیر مواد دارویی تغییر داد و به طور اختصاصی برای درمان سلول‌های خاصی به بدن بیمار تزریق کرد. یکی دیگر از کاربردهای اگزوزوم‌ها در ساخت واکسن است، چرا که این وزیکول‌ها از تمام سلول‌های زنده از جمله میکروارگانیسم‌ها نیز ترشح می‌شوند و به واسطه‌ی دارا بودن گیرنده‌های اختصاصی سلول مترشحه، می‌توانند در تولید واکسن‌های نوظهور کاربرد داشته باشند. این واکسن‌ها تنها برای میکروارگانیسم‌ها نیستند، بلکه می‌توانند جهت پیشگیری و درمان انواع سرطان‌ها نیز به کار برده شوند. در این مطالعه، با جستجو در پایگاه‌های اطلاعاتی معتبر، به بررسی و مرور انواع کارآزمایی‌های بالینی اگزوزوم‌ها پرداخته شده است و نتایج آن به عنوان راهنما برای رویکرد بالینی استفاده از اگزوزوم‌ها ذکر شده است.

واژگان کلیدی: وزیکول‌های خارجی سلولی، اگزوزوم، تعدیل ایمنی، ترمیم

۱- مقدمه

اکثر سلول‌های زنده بدن، وزیکول‌های خارج سلولی‌ای (EVs) آزاد می‌کنند که سایزی ما بین ۳۰ تا ۵۰۰۰ نانومتر دارند. این وزیکول‌ها بسته به اندازه، عملکرد و سلول ترشح‌کننده‌ی آن‌ها، به انواع گوناگونی تقسیم می‌شوند که نام‌های متفاوتی دارند؛ از جمله میکرووزیکول‌ها (یا اکتوزوم‌ها)، میکروپارتیکل‌ها، پروستازوم‌ها (مترشحه از غده‌ی پروستات)، تولروزوم‌ها (مترشحه از اپیتلیوم روده)، اجسام آپوپتوتیک، نانووزیکول‌ها و اگزوزوم‌ها. بحث اصلی این مقاله، کاربردهای بالینی اگزوزوم‌ها هست. محتویات این اگزوزوم‌ها وابسته به سلولی است که آن‌ها را آزاد می‌کند. اما می‌توان گفت که محتویات غالب این وزیکول‌ها، مولکول‌های فعال زیستی مانند نوکلئیک اسیدها، miRNAها، لیپیدها و پروتئین‌ها است. سلول‌های هدف این مولکول‌ها، سلول‌های مجاور و حتی سلول‌های دورتر از سلول ترشح‌کننده‌ی آن‌ها است. همچنین اثر این محتویات به گونه‌ای است که بر سرنوشت و عملکرد سلول‌های هدف اثر می‌گذارد. علاوه بر این، بر ریزمحیط (Microenviroment) احاطه‌کننده‌ی سلول نیز موثر است. اگزوزوم‌ها از مشتقات سیستم اندوزومی هستند که ظاهری فنجانی شکل دارند و اندازه‌ی آن‌ها بین ۳۰ تا ۱۵۰ نانومتر است. این اگزوزوم‌ها از طریق فیوژن و اتصال وزیکول‌های مختلف به غشای سلولی به ماتریکس خارج سلولی ترشح می‌شوند. یکی از مزیت‌هایی که موجب شده است تا کار با اگزوزوم‌ها راحت‌تر و پربازده‌تر باشد، توانایی استخراج آن‌ها از مایعات بدن از جمله خون، مایع مغزی-نخاعی، ادرار، بزاق، شیر و... است (Rahmati et al., 2020). در سال‌های اخیر پتانسیل اگزوزوم‌ها در درمان و تشخیص بیماری‌های گوناگونی مورد توجه دانشمندان بسیاری قرار گرفته است. به گونه‌ای که کمتر عارضه‌ای می‌توان یافت که اگزوزوم‌ها در روند تشکیل آن، یا در درمان آن و یا در پیشگیری در آن بی‌اثر باشند. در ادامه به برخی از آثار درمانی و تشخیصی اگزوزوم‌ها در عارضه‌های گوناگون اشاره خواهد شد.

۲- مواد و روش‌ها

این مطالعه مروری از مقالاتی است که در شش سال اخیر در پایگاه اطلاعاتی Science Direct در رابطه با پژوهش‌های بالینی اگزوزوم منتشر شده است. به همین جهت، برای پیدا کردن این مقالات از جستجوی پیشرفته این پایگاه استفاده شده است و مقالاتی با کلیدواژه‌های Exosome، Mesenchymal Stem Cell، Immunomodulatory و Regeneration که در سال‌های ۲۰۱۵ تا ۲۰۲۱ منتشر گردیده است، استخراج شد. نتایج حاصله از جستجو، ۵۰۶ مقاله، خلاصه مقاله، کتاب، بخش‌هایی از کتاب و... بود. همچنین با برداشتن محدودیت زمانی، تعداد ۶۰ مقاله به نتایج جستجو اضافه گردید. در نهایت با بررسی عنوان، خلاصه مقالات و واژگان کلیدی، ۱۰۲ مقاله انتخاب شد و مورد بررسی قرار گرفت که از این ۱۰۲ مقاله، ۶۴ عدد آن در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است.

۳. نتایج و بحث

۳ – ۱ – عملکرد اگزوزوم‌ها: عملکرد اصلی اگزوزوم‌ها، در ارتباطات بین سلولی است. در واقع این ارتباطات بین سلولی از چند طریق انجام می‌شود: ۱) اگزوزوم‌ها به عنوان سیستم‌های انتقال‌دهنده‌ی نانو عمل می‌کنند و موجب انتقال اطلاعات بیولوژیکی خاصی به سلول‌های پیشساز (پروژنیتورها) و تغییر در اختصاصیت آن‌ها می‌شوند. ۲) مارکرهای سطحی اگزوزوم‌ها و همچنین محتویات داخلی آن‌ها، باعث شده است تا بیومارکرهای ایده‌آلی باشند. ۳) اگزوزوم‌های مترشحه از سلول‌های بنیادی مزانشیمال، نقش مهمی در ترمیم در اندام‌های مختلف ایفا می‌کنند که موجب شده است تا در اهداف درمانی، از آن‌ها استفاده شود. ۴) علاوه بر خواص ترمیمی اگزوزوم‌ها، در درمان بیماری‌های گوناگون و همین طور ترمیم و اصلاح زخم‌ها نیز موثرند. ۵) اگزوزوم‌هادر بیان پپتیدهای MHC نقش دارند. این توانایی، موجب تحریک سیستم ایمنی می‌شود. بنابراین می‌توان از آن‌ها در تولید واکسن‌ها استفاده کرد. بررسی و آنالیز پروتئین‌های موجود در اگزوزوم‌ها، نشان داده است که بر اساس سلول مترشحه، نقش‌های مختلفی برای اگزوزوم‌ها

وجود دارد. از جمله‌ی عملکردهای اگزوزوم‌ها: دفع پروتئین‌های زائد از رتیکولوسیت‌ها – دفع مولکول‌های مضر از سلول‌ها – انتقال و تبادل مواد میان سلول‌ها – ارتباطات بین‌سلولی – انتشار عوامل بیماری‌زا – مشارکت در فعالیت‌های سیستم ایمنی مانند ارائه آنتی‌ژن‌ها و... (Rahmati et al., 2020). ارتباطات سلولی، شامل ارتباطات بین‌سلولی و داخل‌سلولی می‌شود که این ارتباط به وسیله‌ی انتقال مولکول‌های ترشحی به درون سلول و یا به بیرون سلول انجام می‌شود. وزیکول‌های خارج سلولی، جدیدا به عنوان عاملی در این ارتباطات شناخته شده‌اند. چرا که می‌توانند مولکول‌های عملکردی را به سلول‌های مجاور منتقل کنند. این حالت در مقایسه با سیگنال‌هایی که توسط لیگاند و گیرنده منتقل می‌شود، می‌تواند سبب بروز اتفاقات پیچیده‌تر و بیشتری شود. اگزوزوم‌ها می‌توانند به غشای سلول‌های هدف خود باند شوند و متعاقب آن موجب ایجاد سطوح جدیدی شوند. این سطوح جدید ایجاد شده توسط اگزوزوم‌ها، می‌تواند منجر به ایجاد گیرنده‌ها و اتصلات جدیدتری شوند. همچنین با اتصال اگزوزوم‌ها به سلول هدف، پروتئین‌های غشایی و سیتوپلاسمی میان دو سلول تبادل می‌شود (Showalter et al., 2019) (Qu, G et al., 2018).

یکی از نقش‌های اصلی اگزوزوم‌ها، تعدیل دستگاه ایمنی (چه ذاتی و چه اکتسابی) است. در واقع این اگزوزوم‌ها، از روش های مختلفی این کار را انجام می‌دهند که در اینجا، مختصری از این روش‌ها ذکر شده است:

۱. در بیان و معرفی آنتی ژن‌های مختلف شرکت می‌کنند؛
۲. در دریافت آنتی ژن‌های مختلف توسط MHCهای کلاس یک و دو نقش دارند؛
۳. می‌توانند عملکرد سلول‌های T تنظیم‌کننده را بهبود ببخشند؛
۴. در سرکوب و کاهش ایمنی نیز موثرند. آن‌ها این کار را از طریق سرکوب سلول‌های کشنده ی طبیعی و سلول‌های +CD8 انجام می‌دهند؛
۵. هم می‌توانند محرک ایمنی باشند و هم تضعیف‌کننده‌ی ایمنی. به طوری که با فعال کردن سلول‌های کشنده طبیعی و سلول‌های B و همین طور افزایش بقای سلول‌های هماتوپوئتیک، موجب تحریک ایمنی می‌شوند. عملکرد تضعیف‌کنندگی آن‌ها نیز با مهار تمایز مونوسیت‌ها در مقابل سلول‌های دندریتیک صورت می‌گیرد؛
۶. علاوه بر موارد فوق، موجب ازدیاد پاسخ‌های اختصاصی MHC کلاس یک و دو در سلول‌های دندریتیک می‌شوند.

در یکی از پژوهش‌ها محتویات اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، به صورت مجزا خالص‌سازی و مورد بررسی قرار گرفته است که نتیجه‌ی آن نشان داد که اگزوزوم‌ها، حاوی متابولیت‌هایی هستند که دارای اثر مستقیم بر سیستم ایمنی است (Qu, G et al., 2018) (Showalter et al., 2019). در پژوهش چو و همکاران، آثار تعدیل‌کنندگی ایمنی اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی چربی (ADCs) مورد بررسی قرار گرفته است. اثر این اگزوزوم‌ها بر روی سلول‌های TH2 که با آنتی‌ژن پروتئاز آسپرژیلوس در سلول‌های پوششی ریه تحریک شده بودند مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که این اگزوزوم‌ها در تحریک و تمایز ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک در مغز استخوان موثر بودند. همچنین میزان بیان eotoxin و IL-25 کاهش یافت و میزان بیان TGF-B و IL-10 در سلول‌های پوششی ریه افزایش پیدا کرد. علاوه بر آن موجب افزایش بیان مولکول‌هایی مانند CD40، CD80 و CD86 در سلول‌های نابالغ دندریتیک شد. متعاقب تمام این تغییرات بیان ژن‌های M2 ماکروفاژها نیز افزایش پیدا کرد (Cho,K et al., 2019). همچنین در مطالعه‌ی ژانگ و همکاران، نقش اگزوزوم‌ها در افزایش و تنظیم سلول‌های T تنظیم‌کننده و مسیر APC در موش‌های آزمایشگاهی نشان داده شده است (Zhang et al., 2018). در پژوهش رانگانات و همکاران، با استفاده از مهندسی بافت و طراحی میکروپارتیکل‌هایی در محیط اطرافی سلول‌های بنیادی مزانشیمال، اگزوزوم‌هایی با خواص تعدیل‌کنندگی

ایمنی استخراج شده است؛ که این اگزوزوم‌ها علاوه بر نقش تعدیل‌کنندگی ایمنی، از تمایز فیبروبلاست‌های انسانی به میوفیبروبلاست جلوگیری کرده‌اند (Ranganath et al., 2016).

آثار تعدیل‌کنندگی ایمنی اگزوزوم‌ها را می‌توان در درمان برخی از بیماری‌های خودایمن نیز یافت. در مطالعه‌ی شیگموتو-کورادو و همکاران، اگزوزوم‌ها جهت درمان بیماری‌های خود ایمن از جمله دیابت تیپ ۱ و یووئورتینیت خود ایمن استفاده شده است و اگزوزوم‌ها، پانکراس و چشم موش‌های بیمار را تحت تأثیر قرار داده‌اند. همچنین بر اساس مطالعات موجود در این مقاله، اگزوزوم‌ها در پیشگیری از وقوع چنین بیماری هایی نیز موثر بودند و موجب سرکوب سلول های TH1 و TH17 شدند (Shigemoto-Kuroda et al., 2017). این مطالعه می‌تواند پتانسیل بالقوه‌ی اگزوزوم‌ها را در پیشگیری و درمان بیماری‌های خودایمن نشان دهد. همچنین در مطالعه‌ی لی و همکاران، اگزوزوم‌ها موجب درمان آترواسکلروزیس در موش‌ها شدند. این موش‌ها طی دوازده روز اگزوزوم‌ها را به صورت تزریقی دریافت کردند که نتیجه‌ی آن کاهش بیماری و ریسک ابتلا به سایر بیماری‌های خطرناک مانند گرفتگی عروق کرونر بود. عملکرد اگزوزوم‌ها در درمان این بیماری تا حدی نامشخص است ولی می‌توان آن را به کاهش پاسخ‌های التهابی و ماکروفاژهای M2نسبت داد (Li, j. et al., 2019). همچنین در سایر پژوهش‌ها نیز آثار اگزوزوم‌ها بر دیگر بیماری‌های خود ایمن مانند مالتیپل اسکلروزیس، لوپوس اریتروماتوز، آرتریت روماتوئید و سندروم Sjogren's مورد بررسی قرار گرفته است (Bruno et al., 2015) (Wang et al., 2020).

علاوه بر این‌ها، اگزوزوم‌ها با آثار تعدیل‌کنندگی ایمنی خود می‌توانند در ترمیم بافت‌های مختلف نیز نقش داشته باشند. در مطالعه‌ی سئونگ‌تو و همکاران، ذکر شده است که یکی از مهمترین روندها در ترمیم، فعالیت به موقع و به جای سلول‌های ایمنی است. چرا که با فعالیت این سلول‌ها، بافت‌های نکروزه و تخریب‌شده از موضع پاک می‌شوند. در این مقاله ذکر شده است که اگزوزوم‌ها، موجب تعدیل و تنظیم پاسخ‌های التهابی در موضع می‌شوند، پاسخ‌هایی که موجب بهبود روند ترمیم و نوزایش سلول‌ها می‌گردد (Toh et al., 2017).

مطالعات گوناگونی، وزیکول‌های مترشحه از سلول‌های سرطانی را مورد بررسی قرار داده است. این مطالعات نشان داده‌اند که این وزیکول‌ها، نقش مهمی در بیان مارکرهای سطحی غشای سلول‌های توموری دارند. علاوه بر این، پژوهش دیگری در این زمینه نشان داده است که این وزیکول‌ها در تومورزایی نقش دارند. در واقع سلول‌های سرطانی، ۱۰ برابر بیشتر از سلول‌های عادی اگزوزوم ترشح می‌کنند. بنابراین می‌توان پی برد که یکی از نقش‌های مهم این اگزوزوم‌ها در انتقال پیام‌های مرتبط با سیگنالینگ متاستاز است. در واقع این اگزوزوم‌ها موجب فعال شدن فنوتیپ‌های متاستاتیک در سلول‌های عادی می‌شوند و آن‌ها را به سمت سرطانی شدن پیش می‌برند. پس می‌توان بحث را اینگونه خلاصه کرد که اگزوزوم‌ها در روندهای سرطان نقش مهمی دارند، از جمله: متاستاز، مهاجرت، تکثیر، رگ‌زایی (آنژیوژنز)، مقاومت دارویی و سرکوب ایمنی (Lee et al., 2020) (Xu et al., 2019) (Rahmati et al., 2020).

۳ – ۲ – واکسن: یکی از کاربردهای بالینی اگزوزوم‌ها، تولید واکسن‌های ضد تومور است. این ایده حدود دو دهه پیش ارائه داده شد. در واقع به دلیل توانایی اگزوزوم‌ها در تولید و ارائه‌ی MHC ها، این وزیکول‌ها می‌توانند مولکول‌های CD4+ و CD8+ را تحریک کنند. در یک مطالعه از این خاصیت جهت واکسیناسیون علیه سلول‌های سرطانی ریه و ملانوما استفاده شد. در فاز دو کلینیکال ترایال در این مطالعات، از اگزوزوم‌های مترشحه از سلول‌های دندریتیک استفاده شده است. مطالعات مختلف دیگری نیز با این ایده برای سرطان های مختلف انجام شده است. در این مطالعات منشأ وزیکول‌ها متفاوت بودند. به عنوان مثال، از اگزوزوم‌های مترشحه از مایعات محوطه‌ی شکمی، به همراه GM-CSF جهت واکسیناسیون علیه سرطان کولورکتال انجام شده است. هر دوی این مطالعات، علاوه بر اثربخشی، کاملا ایمن و بی‌خطر بودند. اما تومورها، تنها کاربرد واکسن اگزوزومی نیستند. مطالعات گوناگونی نشان داده است که میکروارگانیسم‌ها نیز اگزوزوم‌هایی ترشح می‌کنند. لذا می‌توان از این خاصیت نیز جهت تولید واکسن‌های پیشرفته علیه

میکروارگانیسم‌های متفاوت استفاده کرد. از جمله تولید واکسن علیه ویروس کرونا که بحث داغ پژوهش‌های امروز است (Rahmati et al., 2020) (Greening et al., 2015) (Peak et al., 2018).

۳ – ۳ – ترمیم و نوزایش: یکی دیگر از کاربردهای بالینی اگزوزوم‌ها، بحث ترمیم زخم و بافت‌های آسیب‌دیده است که در بخش تعدیل ایمنی توسط اگزوزوم‌ها مختصرا شرح داده شد. امروزه پژوهش‌های متفاوتی در این زمنیه انجام شده است و حتی برخی از این پژوهش‌ها، منجر به تولید محصولات تجاری شده است. اما در ادامه، بخشی از روند ترمیمی اگزوزوم‌ها و کاربردهای بالینی آن ذکر خواهد شد. اولین نقش اگزوزوم‌ها در روند ترمیم و نوزایش بافتی، افزایش تولید مواد (سایتوکاین‌های) موثر در ترمیم است. از جمله‌ی این مواد IGF1، NGF، HGF و SDF1 است. علاوه بر افزایش تولید این مواد، اگزوزوم‌ها قادر هستند تا مسیرهای ارتباطی مهم و موثر در روند ترمیم را فعال کنند. همچنین سرعت رشد فیبروبلاست‌ها را نیز افزایش می‌دهند. تمامی این موارد موجب می‌شود تا اگزوزوم‌ها یک انتخاب مناسب جهت بهبود روند ترمیم باشند. همان طور هم که پیش از این و در بحث ایمنی نیز ذکر شد، اگزوزوم‌ها با کنترل پاسخ‌های التهابی موضع زخم، روند ترمیم را بهبود می‌بخشند؛ این کنترل التهاب به گونه‌ای است که موجب می‌شود تا پاسخ‌های عفونی، بافت‌های نکروزه را از موضع پاک کنند و در عین حال، هیچ گونه پاسخ اضافه بر سازمان و آسیب‌زننده‌ای هم ایجاد نشود. برای این روند هنوز علت مشخصی وجود ندارد. در مورد خاصیت ایمونومودولیتوری اگزوزوم‌ها توضیح داده شد و همچنین مثالی از آن نیز در بهبود روند ترمیم آورده شد. در سایر مطالعات نیز مشخص شده است که، اگزوزوم‌های حاوی miR-21، miR-146a و miR-181 موجب تنظیم پاسخ‌های ایمنی در موضع زخم شدند. همچنین، نشان داده شده است که اگزوزوم‌ها می‌توانند انباشتگی و تجمع میوفیبروبلاست‌ها را کاهش داده و تولید بافت اسکار را به حداقل برسانند. این کار به miRNAهای موجود در اگزوزوم‌ها ربط داده شده است، چرا که این مولکول‌ها می‌توانند موجب مهار مسیر transforming growth factor-b2/SMAD2 شوند. در یک مطالعه‌ی دیگر نیز، اثر اگزوزوم‌ها بر روی سوختگی نشان داده شده است. در این پژوهش، اگزوزوم‌ها به همراه سایتوکاین۱۹، PCNA و کلاژن نوع I روند تولید سلول‌های اپیتلیال را افزایش دادند (Rahmati et al., 2020). در مطالعه‌ی ونگ و همکاران، اثر اگزوزوم‌ها در آسیب‌های استرس اکسیداتیو بررسی شده است. در واقع با ایجاد استرس اکسیداتیو در پوست حیوانات آزمایشگاهی، مثل تابش اشعه فرابنفش و یا استفاده از هیدوژن پراکسید و القای اگزوزوم‌ها به موضع، نشان داده شد که اگزوزوم‌ها موجب کاهش و افت پاسخ‌های اکسیداتیو شده و فعالیت آنزیم‌هایی مثل گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز را کاهش می‌دهند. همچنین با افزایش یون فریک، موجب بروز پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی می‌گردند. در این مطالعه به اثر ایمونومودولیتوری اگزوزوم‌ها نیز اشاره شده است (Wang et al., 2020). در پژوهش بای و همکاران نیز، اثر اگزوزوم‌ها در ترمیم فلپ‌های پوستی مورد مطالعه قرار گرفته است. این مطالعه نشان داد که اگزوزوم‌ها موجب تسریع بهبود فلپ‌های پوستی می‌شوند و واکنش‌های التهابی موضع را تنظیم می‌کنند (Bai et al., 2018). همچنین کینک و همکاران نیز به بررسی اثر اگزوزوم‌ها در پاسخ‌های متعاقب تشعشعات پرداخته‌اند؛ با این تفاوت که در این مطالعه، ماکروفاژها به وسیله‌ی اگزوزوم‌های مزانشیمال، تعلیم داده شد (در محیط کشت) و سپس این ماکروفاژها به داخل بدن القا گردید. نتیجه‌ی آن نشان داد که ماکروفاژهای تعلیم داده شده به وسیله‌ی اگزوزوم‌ها، عملکرد مناسب‌تری در از بین بردن عوارض ناشی از تشعشع در بدن نسبت به ماکروفاژهای معمولی داشتند (Kink et al., 2019). وو و همکاران نیز به بررسی تمام روش‌های ممکن در روند ترمیم زخم با اگزوزوم‌ها پرداخته‌اند و اگزوزوم‌ها را به واسطه‌ی قابلیت انتقال و ذخیره، روش درمانی راحت‌تری نسبت به سلول‌های مزانشیمال می‌دانند. همچنین بیان می‌کنند که کار با اگزوزوم‌ها، راحت و ایمن است (Wu et al., 2018). این آثار در سایر گونه‌های حیوانی نیز مورد بررسی قرار گرفته است. به طوری که در مطالعه‌ی ویلاتورو و همکاران، با بررسی اگزوزوم‌های مزانشیمال در گونه‌های سگ‌سانان، روند ترمیمی و تعدیل‌کنندگی ایمنی آن‌ها نشان داده شده است (Villatoro et al., 2019) .

۳ – ۳ – بیماری‌های کبدی: کاربرد بالینی دیگر اگزوزوم‌ها، توانایی آن در روند درمان بیماری‌های کبدی است. در ادامه به هر یک از این بیماری‌های کبدی و نقش اگزوزوم‌ها در درمان آن‌ها پرداخته خواهد شد. اولین بیماری مورد بحث، فیبروز کبدی است. مطالعات نشان داده‌اند که اگزوزوم‌ها در روند بهبود این بیماری بسیار موثر هستند. چرا که آن‌ها موجب مهار تولید کلاژن شده و همچنین تولید سلول‌های پوششی را از هپاتوسیت‌ها افزایش می‌دهند. علاوه بر این خود این اگزوزوم‌ها، آثار مثبتی را نیز بر روی کبد دارند، از جمله:

۱- فیبروز سطحی را کاهش می‌دهند؛
۲- بافت کبد را نرم می‌کنند؛
۳- التهاب‌های کبدی را کاهش می‌دهند؛
٤- جایگزینی کلاژن‌ها را در بافت کبد، تعدیل می‌کنند؛
٥- فعالیت آنزیم AST را به حالت طبیعی در می‌آورند و
٦- میزان کلاژن نوع ۱ و ۲، انتقال TGF-β1 و بیان ژن و فسفریلاسیون Smad2 را نیز کاهش می‌دهند.

همچنین آثار مثبت miR-125bهای موجود در اگزوزوم‌ها در بهبود فیبروز مطرح است. این مولکول‌ها با اثر بازدارندگی خود بر Hedgehog signaling موجب کاهش پاسخ‌های فیبروتیک می‌شوند. بحث درمان فیبروز تنها محدود به کبد نمی‌شود؛ بلکه در درمان فیبروز ارگان‌هایی مانند قلب و ریه نیز کاربرد دارد. بیماری کبدی بعدی که در مورد آن بحث خواهد شد، آسیب‌های حادی است که به کبد وارد می‌شود. مطالعات اندکی در این زمینه وجود دارد. در ادامه دستاوردهای برخی از این مطالعات ذکر خواهد شد. در یکی از این مطالعات، نشان داده شد که اگزوزوم‌ها موجب تقویت پاسخ‌های محافظتی از کبد متعاقب آسیب‌های ناشی از استامینوفن و هیدروژن پراکسید می‌شوند. همچنین اگزوزوم‌ها در موش‌هایی که در آن‌ها آسیب حاد کبدی متعاقب مصرف تتراکلریدکربن ایجاد شده بود، موجب افزایش پرولیفراسیون هپاتوسیت‌ها، افزایش PCNA و ماندگاری بیشتر سلول‌ها شده‌اند. در مطالعات دیگر نیز، اگزوزوم‌ها موجب کاهش مقادیر سرمی آنزیم‌های AST و ALT شدند، همچنین التهاب و نکروز کبدی را کاهش دادند و سایتوکاین‌های پیش التهابی را نیز به حداقل رساندند. بیماری کبدی بعدی، کارسینومای هپاتوسلولار است. اگزوزوم‌ها موجب کاهش رشد سلول‌های سرطانی کبد شده و موجب کاهش حجم و اندازه‌ی تومورها می‌گردند (Rahmati et al., 2020). در رابطه با اثر اگزوزوم‌ها بر روی پاسخ‌های اکسیداتیو صحبت شد. اما این اثر تنها محدود به پوست نمی‌شود. در مطالعه‌ی یان و همکاران بر اثر اگزوزوم‌ها روی استرس اکسیداتیو کبد بحث شده است (با همان مکانیسم مشابه). همچنین در این مقاله گریزی بر اثر اگزوزوم‌ها در واکنش‌های توکسیک کبدی نیز زده شده است (Yan et al., 2017). در مطالعه‌ی جیانگ و همکاران نیز نشان داده شده است که اگزوزوم‌ها حتی در بهبود failure کبدی موثر هستند. در واقع اگزوزوم‌ها موجب کاهش بیان مولکول‌های NLRP3 می‌شوند که به دنبال آن واکنش‌های ماکروفاژی تخریب‌کننده کبد کاهش می‌یابد. همچنین موجب بهبود بخش‌های از بین رفته‌ی آن می‌شوند. بنابراین اگزوزوم‌ها می‌توانند یک رویکرد درمانی مناسب برای این بیماری تلقی شوند (Jiang et al., 2019).

۳ – ۴ – بیماری‌های قلبی: اما نقش درمانی دیگر اگزوزوم‌ها در درمان بیماری‌های قلبی است. در واقع اگزوزوم‌ها موجب بهبود انتقال اطلاعات زیستی بین سلول‌های مختلف قلب از جمله فیبروبلاست‌ها، کاردیومیوسایت‌ها و سلول‌های اپیتلیال می‌شوند. همچنین سایر مطالعات نشان داده است که miRNAهای موجود در اگزوزوم‌های کاردیومیوسایت‌ها، موجب تغییر بیان ژن‌ها در فیبروبلاست‌ها می‌شود. علاوه بر این، اگزوزوم‌های مترشحه از فیبروبلاست‌ها، به عنوان مولکول‌های پاراکراینی عمل می‌کنند که موجب مهار برخی از ژن‌های خاص می‌شوند. مثلا miR-21-3p با مهار سوربین، موجب القای هایپرتروفی کاردیومیوسایت‌ها می‌شود. در ادامه در رابطه با برخی از این بیماری‌ها و اثر اگزوزوم‌ها روی آن‌ها بحث خواهد شد. بیماری اولی که در بحث قلب به آن پرداخته می‌شود، نارسایی

قلبی است. در نارسایی‌های مزمن قلبی، یکی از سیستم‌های جبران‌کننده، سیستم رنین-آنژیوتانسین است. در مطالعات گوناگون نشان داده شده است که آنژیوتانسین ۲، به طور بالقوه موجب افزایش تولید اگزوزوم‌ها از فیبروبلاست‌های قلبی می‌شود. این اگزوزوم‌ها نیز می‌توانند سبب افزایش تولید آنژیوتانسین، رنین و گیرنده‌های تیپ ۱ و ۲ آنژیوتانسین ۲ شوند. همچنین موجب کاهش آنزیم‌های تبدیل‌کننده‌ی آنژیوتانسین می‌شوند. در نهایت نیز می‌توانند رنین-آنژیوتانسین را در کاردیومیوسایت‌ها افزایش دهند. تمامی این اتفاقات موجب تشدید اثرات آنژیوتانسیون در سلول‌های قلبی می‌شود. علاوه بر این اثرات، اگزوزوم‌های مترشحه از سلول‌های اندوتلیال نیز، می‌توانند روند آنژوژنز را با تحریک شکل‌گیری عروق و مهار پیر شدن و افت سلول‌های اندوتلیال سرعت ببخشند. miRNAهای مختلفی در روند رگ‌زایی استفاده شده‌اند که همگی موجب افزایش آن می‌شوند. بیماری دومی که در بحث بیماری‌های قلبی، ذکر خواهد شد، آسیب‌هایی است که متعاقب ایسکمی به میوکارد وارد می‌شود. در مطالعات گوناگون مقادیر زیادی از miRNAها در پاسخ‌های ایسکمیک قلب یافت شدند. به نظر می‌رسد که این مولکول‌ها در ایجاد پاسخ‌های بقا نقش دارند. در یکی از مطالعات نشان داده شده است که این مولکول‌ها موجب فعال شدن گیرنده‌های TLR و کینازهای مختلفی در کاردیومیوسایت‌ها می‌شوند. به دنبال فعال شدن این مولکول‌ها، سیستم محافظتی قلب یعنی HSP27 فعال می‌شود که به دنبال آن نیز سلسله اتفاقات دیگری رخ خواهد داد. پژوهش‌های دیگری نیز به بررسی اثر اگزوزوم‌ها در دستگاه قلبی عروقی پرداخته‌اند که مشابه تمامی آن‌ها تا به اینجا بارها و بارها ذکر شده است؛ مانند خاصیت ترمیمی و التیامی اگزوزوم‌ها در بهبود روند آنژیوژنز و خاصیت ایمونومودولیتوری و ترمیمی اگزوزوم‌ها در قلب (Vadivel et al., 2020) (Sahoo et al., 2015) (Sajeesh et al., 2020) (Rahmati et al., 2020).

۳ – ۵ – بیماری‌های عصبی: بعد از بحث بیماری‌های قلبی-عروقی، نوبت به اثر اگزوزوم‌ها بر روی دستگاه عصبی می‌رسد. در واقع بهتر است تا ابتدا به نقش اگزوزوم‌ها در ایجاد بیماری‌های عصبی اشاره شود. بر اساس مطالعات انجام شده، اگزوزوم‌ها با ترشح α-synuclein در ایجاد بیماری پارکینسون دخالت دارند. همچنین می‌توانند حاوی پروتئین‌هایی باشند که در برخی از بیماری نورودژنراتیو دخیل هستند. بنابراین اگزوزوم‌ها می‌توانند به عنوان بیومارکرهای مناسبی جهت تشخیص و پیش آگهی از چنین بیماری‌هایی استفاده شوند. علاوه بر این، پژوهش‌های بیشتر نشان داده‌اند که اگزوزوم‌های مترشحه از سلول‌های نابالغ دندریتیک، حاوی پروتئین‌های سطحی خاص به همراه siRNAهایی هستند که در بروز بیماری آلزایمر دخالت دارند. البته هدف اصلی این مطالعه، نشان دادن اختصاصیت اگزوزوم‌ها برای گیرنده‌های هدف بوده است. در واقع در این مطالعه با تزریق این اگزوزوم‌ها به موش‌ها، سلول‌های میکروگلیا، نورون‌ها و اولیگودندروسیت‌ها تحت تأثیر قرار گرفتند (Rahmati et al., 2020). در مطالعه‌ی درمل اشمید و همکاران، با استفاده از تزریق اگزوزوم‌ها، روند درمان و بهبود بیماری‌های مغزی مورد مطالعه قرار گرفته است. در واقع اگزوزوم‌ها موجب کاهش التهاب و دژنراسیون نورون‌ها، میکروگلیاها و آستروگلیاها شدند. میلین‌سازی‌های ناقص و در زمان کوتاه نیز کم شد و ناهنجاری‌های بخش سفید مغز نیز برطرف گردید. همچنین عملکردهای اصلاحی مغز نیز بهبود پیدا کرد (Drommelschmidt et al., 2017). اما برخلاف آنچه که در پاتوفیزیولوژی بیماری آلزایمر و نقش اگزوزوم‌ها ذکر شد، اگزوزوم‌های سلول‌های مزانشیمی، توانایی تعدیل و تنظیم پاسخ ایمنی را در نواحی مورد تهاجم بیماری آلزایمر دارند. به طوری که در مطالعه‌ی ژانگ و همکاران نشان داده شد که این اگزوزوم‌ها می‌توانند موجب بهبود و اصلاح نورون‌های آسیب دیده شوند. در این مطالعه، اگزوزوم‌ها به عنوان یک پتانسیل درمانی طولانی اثر جهت آلزایمر معرفی شده است (Zhang et al., 2020). سان و همکاران نیز به اثرات تعدیل‌کنندگی ایمنی و ترمیمی اگزوزوم‌ها پرداخته‌اند و آن را جهت درمان و ترمیم آسیب‌های نخاعی معرفی کرده است (Sun et al., 2018). اثر مثبت اگزوزوم‌ها در درمان سایر بیماری‌های عصبی مانند سکته مغزی، میلوانسفالوپاتی خودایمنی و... نیز مورد بررسی قرار گرفته است (Yousefi et al., 2016) (Rahmani et al., 2020).

۳ – ۶ – سایر کاربردهای درمانی: علاوه بر اندام‌ها و دستگاه‌های گفته شده، مطالعات گوناگون ولی پراکنده‌ای بر روی سایر اندام‌های بدن، مانند دستگاه تنفسی، گوارشی، حرکتی و... نیز انجام شده است که در ادامه به این مطالعات اشاره خواهد شد. البته اساس و پایه‌ی روش درمانی اگزوزوم‌ها هر آنچه که تا اینجا به آن اشاره شده است می‌باشد و سایر مطالب، صرفا مثال‌هایی از کاربرد اگزوزوم‌ها در دیگر ارگان‌های بدن هستند.

آسیب‌های حاد ریوی و نارسایی‌های ریوی، می‌توانند به دلایل گوناگونی بروز پیدا کنند که اگزوزوم‌ها می‌توانند یکی از انتخاب‌های درمانی برای این گونه ضایعات باشند. چرا که علاوه بر اثرات ترمیمی و ایمنی اگزوزوم‌ها، می‌توانند جلوی فیبروز ریوی را نیز بگیرند. یکی از بحث‌های داغ امروز در زمینه‌ی ریوی و پنومونی‌ها، بیماری کووید-۱۹ است (Muraca et al., 2020) (Taghavi-Farahabadi et al., 2020) (Xu, B. et al., 2020) (Xu, N et al., 2020) (Yi et al., 2019).

آسیب‌های دیگری که اگزوزوم‌ها می‌توانند موجب بهبود و ترمیم آن‌ها شوند، ضایعاتی است که به دستگاه گوارش وارد می‌شود. در واقع اگزوزوم‌ها در بهبود زخم‌های گوارشی، کاهش و تعدیل التهاب دیواره‌ی دستگاه گوارش و همچنین التیام و ترمیم پولیپ‌های دندانی نیز می‌توانند استفاده شوند. همچنین در مطالعات دیگری نیز این روند ترمیمی در رحم مورد بررسی قرار گرفته است (Giri et al., 2020) (Hussey et al., 2018) (Huang et al., 2016) (Xin et al., 2020).

اما یکی دیگر از کاربردهای مهم اگزوزوم‌ها، در بیماری‌های اندام حرکتی است، از جمله مفاصل، استخوان‌ها، عضلات، رباط و لیگامان‌ها و... . در مطالعه‌ی توفینو-ویان و همکاران، بیشتر به جنبه‌ی درمانی اگزوزوم‌ها و بیماری‌های خودایمن درگیرکننده‌ی مفاصل اشاره شده است که پیش از این نیز مورد بحث و بررسی قرار گرفت. همچنین در مطالعه‌ی هه و همکاران نیز، مشاهده شده است که اگزوزوم‌ها توانایی افزایش تفکیک و تمایز کندروسیت‌ها را دارند. علاوه بر این به آثار ضدالتهابی اگزوزوم‌ها و اثراتی که بر روی سایتوکاین ها می‌گذارد نیز اشاره شده است. در پژوهش بیر و همکاران، اثر اگزوزوم‌ها بر روی عضلات در سندروم عضلانی دوشن مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که اگزوزوم‌ها می‌توانند میزان تمایز میلوبلاست را افزایش دهند و میزان بیان ژن‌های فیبروژنیک را کم کنند. سطوح سرمی کراتین‌کیناز نیز پس از درمان با اگزوزوم‌ها کاهش یافت و واکنش‌های التهابی عضلات تعدیل گردید. علاوه بر این میزان فیبروز دیافراگم و عضلات قلب به حداقل رسید و میزان بیان آتروفین افزایش پیدا کرد. علاوه بر بررسی موارد فوق در این مطالعه، روند درمانی با استفاده از تصویربرداری مانیتور شد که نشان داد علائم بهبود بافت عضلانی در طی سه هفته آشکار می‌شوند. در سایر مطالعات نیز، آثار ترمیمی و ایمونومودولیتوری اگزوزوم‌ها در بیماری‌های استخوانی و مفصلی در نواحی مختلف بدن مثل استخوان ران، مفصل تمپورومندیبولار متعاقب عوامل گوناگون نظیر افزایش سن و... مورد بررسی قرار گرفته است که ذکر جزئیات آن‌ها تکرار مطالب قبلی خواهد بود. یکی دیگر از ارگان‌های مورد هدف اگزوزوم‌ها، می‌تواند کلیه‌ها باشد. در مطالعه‌ی ایرین و همکاران اثر اگزوزوم‌ها در ضایعات کلیوی خوک‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. در این بررسی در طی ۶ هفته، آثار بهبودی در کلیه‌ها ظاهر شدند و عملکرد طبیعی آن‌ها تا حد زیادی بازگشته است. علاوه بر این به آثار تعدیل‌کنندگی ایمنی در کلیه نیز اشاره شده است (Eirin et al., 2017). در سایر مطالعات نیز آثار ترمیمی اگزوزوم‌ها بر روی بافت شبکیه چشم مورد بررسی قرار گرفته است.

۳ – ۷ – انتقال مواد و تشخیص: تا به اینجای بحث، اثرات بالقوه‌ی اگزوزوم‌ها در درمان و بهبودی ضایعات مختلف شرح داده شد. اما یکی از کاربردهای دیگر اگزوزوم‌ها در حمل و انتقال مواد دارویی و مولکول‌های زیستی است. در ابتدا توضیحی در رابطه با توانایی اگزوزوم‌ها در انتقال miRNA داده خواهد شد. در واقع miRNAها می‌توانند به عنوان یک کاندید مناسب در درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار بگیرند. اما یکی از چالش‌های این روش، عدم وجود محملی مناسب جهت انتقال آن‌ها به موضع است. این در حالی است که اگزوزوم‌ها یکی از مناسب‌ترین کاندیدهای انتقال آن‌ها به حساب می‌آیند. چرا که: اولا اگزوزوم‌ها می‌توانند با انتقال

این مولکول‌های زیستی، بر عملکرد کلی سلول‌ها و به دنبال آن اندام‌ها اثرگذار باشند. ثانیا می‌توانند به طور اختصاصی مولکول مورد نظر را به سلول هدف خود برسانند. به همین دلیل آثار دیگری را به دنبال نخواهند داشت. مثال‌های متعددی از عملکرد miRNA بر اندام‌های گوناگون تا به اینجا مورد بحث قرار گرفته است. کاربرد دیگر miRNAهایی که در درون اگزوزوم‌ها هستند، پتانسیل تشخیصی آن‌ها است. همان طور هم که تا اینجا ذکر گردید، اگزوزوم‌ها به واسطه‌ی مولکول‌های سطحی خود، می‌توانند بیومارکرهای خوبی جهت تشخیص باشند. یکی از این بیومارکرها که در بیماری‌های مختلف انواع مختلفی از آن‌ها تولید می‌شود و توسط اگزوزوم‌ها منتقل می‌گردد، miRNA است. به عنوان مثال وجود miR-185 می‌تواند نشان‌دهنده‌ی اختلالات بدخیم دهان باشد. چرا که این مولکول موجب بروز پاسخ‌های التهابی، مهار پرولیفراسیون و آنژیوژنز و القای آپوپتوز می‌شود. در نهایت نیز، آخرین کاربرد اگزوزوم‌ها، در حمل و نقل مواد دارویی است. چرا که اگزوزوم‌ها، می‌توانند به عنوان محملی برای داروهای مختلف بدن عمل کنند و این داروها را به اندام هدف خود به طور کاملا اختصاصی برسانند. به عنوان مثال، جهت انتقال داروهای سیستم اعصاب مرکزی، می‌توان از اگزوزوم‌هایی استفاده کرد که از سد خونی-مغزی عبور می‌کنند (Rahmati et al., 2020).

۴- نتیجه‌گیری:

با توجه به موارد ذکر شده، می‌توان نتیجه گرفت که اگزوزوم‌ها یکی از پتانسیل‌های درمانی آینده در طیف وسیعی از ضایعات هستند. این وزیکول‌ها با دارا بودن خواص مثبت فراوانی، می‌توانند در پاتوفیزیولوژی بیماری‌های گوناگون در امر تشخیص، درمان و پیشگیری آن‌ها مشارکت کنند. شناخت کامل محتویات و بررسی عملکرد دقیق آن‌ها در این امر بی‌اثر نخواهد بود. در مقاله‌ی پیش‌رو سعی شد تا با تمرکز بر مهمترین عملکرد اگزوزوم‌ها که همان تعدیل و تنظیم ایمنی است، به کاربردهای بالینی آن اشاره شود. این کاربردها می‌توانند رهنمودی برای ارتقاء طرح‌های پژوهشی و حتی تولید محصولات تجاری باشند. در نهایت، جهت استفاده از یک روش جدید، همیشه باید نقاط قوت و ضعف آن مورد بررسی و ارزیابی قرار گیرد. در این مقاله، تمامی موارد ذکر شده به نوعی جز نقاط قوت اگزوزوم‌ها تلقی می‌شوند. اما مشکلاتی نیز در این روش وجود دارد. از جمله اینکه هنوز یک راهکار قطعی و مناسب جهت خالص‌سازی و همچنین شناسایی اگزوزوم‌ها وجود ندارد. علاوه بر این اگر بخواهیم اگزوزوم‌ها را در سطح وسیع و کلان تولید نمائیم، نیاز به تکنولوژی های پیشرفته‌ای وجود دارد و از همه مهم‌تر اینکه سلول‌های مزانشیمی (که منشأ اگزوزوم‌ها در اکثر مطالعات ذکر شده، این سلول‌ها بودند)، سلول‌های هتروژنی هستند که موجب می‌شود اگزوزوم‌های مترشحه از آن‌ها نیز همین خاصیت را داشته باشند. لذا با توجه به این خاصیت، ممکن است آثار متفاوتی را در شرایط گوناگون و سلول‌های هدف گوناگون ایجاد کنند. این بحث بسیار گسترده است و چالش‌های پیش رو در کاربرد بالینی اگزوزوم‌ها باید به طور جداگانه مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

Bai, Y. *et al.* (2018) 'Adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulated by hydrogen peroxide enhanced skin flap recovery in ischemia-reperfusion injury', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 500(2), pp. 310–317. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.065.

Bier, A. *et al.* (2018) 'Placenta-derived mesenchymal stromal cells and their exosomes exert therapeutic effects in Duchenne muscular dystrophy', *Biomaterials*, 174, pp. 67–78. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.04.055.

Bruno, S., Deregibus, M. C. and Camussi, G. (2015) 'The secretome of mesenchymal stromal cells: Role of extracellular vesicles in immunomodulation', *Immunology Letters*, 168(2), pp. 154–158. doi: 10.1016/j.imlet.2015.06.007.

Cabeza, L. *et al.* (2020) 'Cancer therapy based on extracellular vesicles as drug delivery vehicles', *Journal of Controlled Release*, 327, pp. 296–315. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.08.018.

Chen, C. Y. *et al.* (2020) 'Extracellular vesicles from human urine-derived stem cells inhibit glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head by transporting and releasing pro-angiogenic DMBT1 and anti-apoptotic TIMP1', *Acta Biomaterialia*, 111, pp. 208–220. doi: 10.1016/j.actbio.2020.05.020.

Cho, K. S. *et al.* (2019) 'Dendritic cells and M2 macrophage play an important role in suppression of Th2-mediated inflammation by adipose stem cells-derived extracellular vesicles', *Stem Cell Research*, 39(May), p. 101500. doi: 10.1016/j.scr.2019.101500.

Ciccocioppo, R. and Corazza, G. R. (2018) 'Mesenchymal stromal cells: an opportunity to treat chronic inflammatory intestinal conditions', *Cytotherapy*, 20(10), pp. 1223–1226. doi: 10.1016/j.jcyt.2018.08.004.

Lo Cicero, A., Stahl, P. D. and Raposo, G. (2015) 'Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: For good or for bad', *Current Opinion in Cell Biology*, 35, pp. 69–77. doi: 10.1016/j.ceb.2015.04.013.

Crivelli, B. *et al.* (2017) 'Mesenchymal stem/stromal cell extracellular vesicles: From active principle to next generation drug delivery system', *Journal of Controlled Release*, 262, pp. 104–117. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.07.023.

Drommelschmidt, K. *et al.* (2017) 'Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles ameliorate inflammation-induced preterm brain injury', *Brain, Behavior, and Immunity*, 60, pp. 220–232. doi: 10.1016/j.bbi.2016.11.011.

Eirin, A. *et al.* (2017) 'Mesenchymal stem cell–derived extracellular vesicles attenuate kidney inflammation', *Kidney International*, 92(1), pp. 114–124. doi: 10.1016/j.kint.2016.12.023.

Giri, J. *et al.* (2020) 'CCL2 and CXCL12 Derived from Mesenchymal Stromal Cells Cooperatively Polarize IL-10+ Tissue Macrophages to Mitigate Gut Injury', *Cell Reports*, 30(6), pp. 1923-1934.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2020.01.047.

Greening, D. W. *et al.* (2015) 'Emerging roles of exosomes during epithelial-mesenchymal transition and cancer progression', *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 40, pp. 60–71. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.02.008.

He, L. *et al.* (2020) 'Exosomes derived from miRNA-210 overexpressing bone marrow mesenchymal stem cells protect lipopolysaccharide induced chondrocytes injury via the NF-κB pathway', *Gene*, 751(April), p. 144764. doi: 10.1016/j.gene.2020.144764.

Huang, C. C. *et al.* (2016) 'Exosomes as biomimetic tools for stem cell differentiation: Applications in dental pulp tissue regeneration', *Biomaterials*, 111, pp. 103–115. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.09.029.

Huang, C. C. *et al.* (2020) 'Functionally engineered extracellular vesicles improve bone regeneration', *Acta Biomaterialia*, 109, pp. 182–194. doi: 10.1016/j.actbio.2020.04.017.

Hussey, G. S., Cramer, M. C. and Badylak, S. F. (2018) 'Extracellular Matrix Bioscaffolds for Building Gastrointestinal Tissue', *Cmgh*, 5(1), pp. 1–13. doi: 10.1016/j.jcmgh.2017.09.004.

Jiang, L. *et al.* (2019) 'Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate acute liver failure by reducing the activity of the NLRP3 inflammasome in macrophages', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 508(3), pp. 735–741. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.11.189.

Kadota, T. *et al.* (2020) *Extracellular vesicles in fibrotic diseases: New applications for fibrosis diagnosis and treatment*, *Exosomes*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/b978-0-12-816053-4.00013-4.

Kink, J. A. *et al.* (2019) 'Macrophages Educated with Exosomes from Primed Mesenchymal Stem Cells Treat Acute Radiation Syndrome by Promoting Hematopoietic Recovery', *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 25(11), pp. 2124–2133. doi: 10.1016/j.bbmt.2019.07.026.

Klingeborn, M. *et al.* (2017) 'Roles of exosomes in the normal and diseased eye', *Progress in Retinal and Eye Research*, 59, pp. 158–177. doi: 10.1016/j.preteyeres.2017.04.004.

Lee, S. *et al.* (2020) 'Mesenchymal stem cell-derived exosomes suppress proliferation of T cells by inducing cell cycle arrest through p27kip1/Cdk2 signaling', *Immunology Letters*, 225(May), pp. 16–22. doi: 10.1016/j.imlet.2020.06.006.

Li, J. *et al.* (2019) 'Exosomes derived from mesenchymal stem cells attenuate the progression of atherosclerosis in ApoE −/- mice via miR-let7 mediated infiltration and polarization of M2 macrophage', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 510(4), pp. 565–572. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.02.005.

Maffioli, E. *et al.* (2017) 'Proteomic analysis of the secretome of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells primed by pro-inflammatory cytokines', *Journal of Proteomics*, 166, pp. 115–126. doi: 10.1016/j.jprot.2017.07.012.

Mathew, B. *et al.* (2019) 'Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles and retinal ischemia-reperfusion', *Biomaterials*, 197(June 2018), pp. 146–160. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.01.016.

Mead, B. and Tomarev, S. (2020) 'Extracellular vesicle therapy for retinal diseases', *Progress in Retinal and Eye Research*, 79(March), p. 100849. doi: 10.1016/j.preteyeres.2020.100849.

Muraca, M. *et al.* (2020) 'Mesenchymal stromal cells and their secreted extracellular vesicles as therapeutic tools for COVID-19 pneumonia?', *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 325(April), pp. 135–140. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.06.036.

O'Driscoll, L. (2020) 'Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells as a Covid-19 treatment', *Drug Discovery Today*, 25(7), pp. 1124–1125. doi: 10.1016/j.drudis.2020.04.022.

Peak, T. C. *et al.* (2018) 'Exosomes secreted by placental stem cells selectively inhibit growth of aggressive prostate cancer cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 499(4), pp. 1004–1010. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.038.

Piffoux, M. *et al.* (2019) 'Extracellular vesicles for personalized medicine: The input of physically triggered production, loading and theranostic properties', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 138, pp. 247–258. doi: 10.1016/j.addr.2018.12.009.

Pourakbari, R. *et al.* (2019) 'The potential of exosomes in the therapy of the cartilage and bone complications; emphasis on osteoarthritis', *Life Sciences*, 236(September). doi: 10.1016/j.lfs.2019.116861.

Qu, G. *et al.* (2018) 'Immunomodulatory function of mesenchymal stem cells: regulation and application', *Journal of Cellular Immunotherapy*, 4(1), pp. 1–3. doi: 10.1016/j.jocit.2018.09.001.

Rahmani, A. *et al.* (2020) 'Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicle-based therapies protect against coupled degeneration of the central nervous and vascular systems in stroke', *Ageing Research Reviews*, 62, p. 101106. doi: 10.1016/j.arr.2020.101106.

Rahmati, S. *et al.* (2020) 'An overview of current knowledge in biological functions and potential theragnostic applications of exosomes', *Chemistry and Physics of Lipids*, 226(August 2019), p. 104836. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2019.104836.

Ranganath, S. H. *et al.* (2016) 'Controlled inhibition of the mesenchymal stromal cell pro-inflammatory secretome via microparticle engineering', *Stem Cell Reports*, 6(6), pp. 926–939. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.05.003.

Ren, L. *et al.* (2019) 'Adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate hypoxia/serum deprivation-induced osteocyte apoptosis and osteocyte-mediated osteoclastogenesis in vitro', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 508(1), pp. 138–144. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.11.109.

Sahoo, S. *et al.* (2015) *Effect of Exosomes from Mesenchymal Stem Cells on Angiogenesis*, *Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes: The Potential for Translational Nanomedicine*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-800164-6.00009-5.

Sajeesh, S. *et al.* (2020) 'Stem cell derived extracellular vesicles for vascular elastic matrix regenerative repair', *Acta Biomaterialia*, 113, pp. 267–278. doi: 10.1016/j.actbio.2020.07.002.

Shigemoto-Kuroda, T. *et al.* (2017) 'MSC-derived Extracellular Vesicles Attenuate Immune Responses in Two Autoimmune Murine Models: Type 1 Diabetes and Uveoretinitis', *Stem Cell Reports*, 8(5), pp. 1214–1225. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.04.008.

Showalter, M. R. *et al.* (2019) 'Primed mesenchymal stem cells package exosomes with metabolites associated with immunomodulation', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 512(4), pp. 729–735. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.03.119.

Sun, G. *et al.* (2018) 'hucMSC derived exosomes promote functional recovery in spinal cord injury mice via attenuating inflammation', *Materials Science and Engineering C*, 89(January), pp. 194–204. doi: 10.1016/j.msec.2018.04.006.

Taghavi-Farahabadi, M. *et al.* (2020) 'Hypothesis for the management and treatment of the COVID-19-induced acute respiratory distress syndrome and lung injury using mesenchymal stem cell-derived exosomes', *Medical Hypotheses*, 144(May), p. 109865. doi: 10.1016/j.mehy.2020.109865.

Tan, S. H. S. *et al.* (2020) 'Mesenchymal stem cell exosomes in bone regenerative strategies—a systematic review of preclinical studies', *Materials Today Bio*, 7, p. 100067. doi: 10.1016/j.mtbio.2020.100067.

Tofiño-Vian, M., Guillén, M. I. and Alcaraz, M. J. (2018) 'Extracellular vesicles: A new therapeutic strategy for joint

conditions', *Biochemical Pharmacology*, 153(February), pp. 134–146. doi: 10.1016/j.bcp.2018.02.004.

Toh, W. S. *et al.* (2017) 'MSC exosome as a cell-free MSC therapy for cartilage regeneration: Implications for osteoarthritis treatment', *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 67, pp. 56–64. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.11.008.

TOH, W. S. *et al.* (2018) 'Immune regulatory targets of mesenchymal stromal cell exosomes/small extracellular vesicles in tissue regeneration', *Cytotherapy*, 20(12), pp. 1419–1426. doi: 10.1016/j.jcyt.2018.09.008.

Tran, C. and Damaser, M. S. (2015) 'Stem cells as drug delivery methods: Application of stem cell secretome for regeneration', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 82, pp. 1–11. doi: 10.1016/j.addr.2014.10.007.

Vadivel, S. *et al.* (2020) 'Inflammation in myocardial injury- Stem cells as potential immunomodulators for myocardial regeneration and restoration', *Life Sciences*, 250(March), p. 117582. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117582.

Villatoro, A. J. *et al.* (2019) 'Comparative analysis and characterization of soluble factors and exosomes from cultured adipose tissue and bone marrow mesenchymal stem cells in canine species', *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 208(December 2018), pp. 6–15. doi: 10.1016/j.vetimm.2018.12.003.

Wang, R. *et al.* (2020) 'Role of gingival mesenchymal stem cell exosomes in macrophage polarization under inflammatory conditions', *International Immunopharmacology*, 81(October), p. 106030. doi: 10.1016/j.intimp.2019.106030.

Wang, T. *et al.* (2020) 'MSC-derived exosomes protect against oxidative stress-induced skin injury via adaptive regulation of the NRF2 defense system', *Biomaterials*, 257, p. 120264. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120264.

Wu, P. *et al.* (2018) 'MSC-exosome: A novel cell-free therapy for cutaneous regeneration', *Cytotherapy*, 20(3), pp. 291–301. doi: 10.1016/j.jcyt.2017.11.002.

Xin, L. *et al.* (2020) 'A scaffold laden with mesenchymal stem cell-derived exosomes for promoting endometrium regeneration and fertility restoration through macrophage immunomodulation', *Acta Biomaterialia*, 113, pp. 252–266. doi: 10.1016/j.actbio.2020.06.029.

Xu, B. *et al.* (2020) 'Stem cell derived exosomes-based therapy for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: A novel therapeutic strategy', *Life Sciences*, 254(April), p. 117766. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117766.

Xu, Hui, Jia, S. and Xu, Hanmei (2019) 'Potential therapeutic applications of exosomes in different autoimmune diseases', *Clinical Immunology*, 205(March), pp. 116–124. doi: 10.1016/j.clim.2019.06.006.

Xu, N. *et al.* (2020) 'Lung-derived exosomes in phosgene-induced acute lung injury regulate the functions of mesenchymal stem cells partially via miR-28-5p', *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 121(July 2019), p. 109603. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109603.

Yan, Y. *et al.* (2017) 'hucMSC Exosome-Derived GPX1 Is Required for the Recovery of Hepatic Oxidant Injury', *Molecular Therapy*, 25(2), pp. 465–479. doi: 10.1016/j.ymthe.2016.11.019.

Yao, X. *et al.* (2019) 'Stem cell derived exosomes: microRNA therapy for age-related musculoskeletal disorders', *Biomaterials*, 224. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119492.

Yi, X. *et al.* (2019) 'Exosomes derived from microRNA-30b-3p-overexpressing mesenchymal stem cells protect against lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting SAA3', *Experimental Cell Research*, 383(2), p. 111454. doi: 10.1016/j.yexcr.2019.05.035.

Yousefi, F. *et al.* (2016) 'In vivo immunomodulatory effects of adipose-derived mesenchymal stem cells conditioned medium in experimental autoimmune encephalomyelitis', *Immunology Letters*, 172, pp. 94–105. doi: 10.1016/j.imlet.2016.02.016.

Zhang, B. *et al.* (2018) 'Mesenchymal stromal cell exosome–enhanced regulatory T-cell production through an antigen-presenting cell–mediated pathway', *Cytotherapy*, 20(5), pp. 687–696. doi: 10.1016/j.jcyt.2018.02.372.

Zhang, L., Dong, Z. fang and Zhang, J. yuan (2020) 'Immunomodulatory role of mesenchymal stem cells in Alzheimer's disease', *Life Sciences*, 246(February), p. 117405. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117405.

Zhang, S. *et al.* (2018) 'MSC exosomes mediate cartilage repair by enhancing proliferation, attenuating apoptosis and modulating immune reactivity', *Biomaterials*, 156, pp. 16–27. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.11.028.

Zhang, S. *et al.* (2019) 'MSC exosomes alleviate temporomandibular joint osteoarthritis by attenuating inflammation and restoring matrix homeostasis', *Biomaterials*, 200(January), pp. 35–47. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.02.006.

New Sono-Chemical synthesis and characterization of Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPION) and its biomedical applications

Sahand Fakurpur Shirejini[1]; Seyed Mohsen Dehnavi [2*]; mehdi jahanfar [3]

1- Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
2- Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
3- Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Email: *mo_dehnavi@sbu.ac.ir*[*]

Abstract

For many years, magnetic materials have attracted more attention from scientists as a suitable candidate for use in various applications. [1] On the other hand, with the development of nanotechnology in the last decade, magnetic nanoparticles due to their unique properties, including Biocompatibility, relatively low toxicity in the human body, low sensitivity to oxidation, stability in magnetic response (even up to 50 years), ease of synthesis and surface modification process, were of great importance in advanced research, including biomedical research. Superparamagnetic nanoparticles (SPION) synthesized by the modern Sono-Chemical method have been used in several biomedical fields such as targeted drug delivery, biomolecule separation, and contrast agents in magnetic resonance imaging (MRI). to show suitable efficiency in several biomedical uses as mentioned above, the nanoparticles should be exposed to the maximum value of saturation magnetization (Ms) and minimum value of coercive field (Hc) and remnant magnetization (Mr) and its surface must be composed of functional groups to bind the drug or other coatings. In this study, the composition of SPION was investigated and proved by the X-ray diffraction (XRD) test. The Identity functional groups on the surface of nanoparticles were determined by Fourier to transform infrared (FTIR) spectroscopy. Also, a vibration magnetometer (VSM) test was used to prove the super-magnetic properties of nanoparticles.

Keywords: Drug delivery, Drug release, Hyperthermia, Contrast agent, Bio-isolation

سنتز نوین صوتی_شیمیایی و مشخصه یابی نانو ذرات سوپر پارامغناطیسی اکسید آهن(SPION) وکاربرد آن در زیست پزشکی

سهند فکورپور شیره‌جینی[۱]؛ سید محسن دهنوی[۲]*؛ مهدی جهانفر[۳]

۱- دانشجو گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری های زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

۲- استادیار گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری های زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

۳- استادیار گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری های زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: mo_dehnavi@sbu.ac.ir*

چکیده

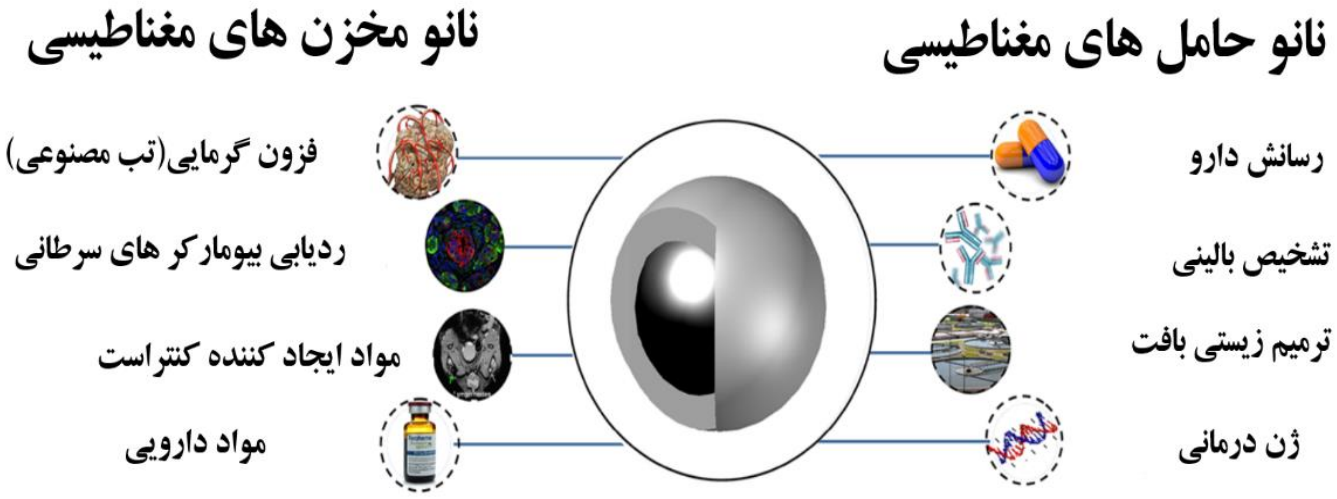
سال‌هاست که مواد مغناطیسی توجه بیشتر دانشمندان را به‌عنوان نامزدی مناسب برای استفاده در موارد مختلف به خود جذب کرده است. از سوی دیگر ، با توسعه فناوری نانو در دهه اخیر،نانو ذرات مغناطیسی به دلیل ویژگی‌های منحصربه‌فرد خود ازجمله زیست سازگاری ، سمیت نسبتاً پایین در بدن انسان،حساسیت پایین به اکسیداسیون ، پایداری در پاسخ مغناطیسی (حتی تا بالای ۵۰ سال) ، سهولت در فرایند سنتز و اصلاح سطح، از اهمیت بالایی در تحقیقات نوین ازجمله تحقیقات زیست پزشکی برخوردار شدند. نانو ذرات مگنتیت(Fe_3O_4) سنتز شده توسط روش نوین صوتی_شیمیایی در چندین زمینه زیست پزشکی مانند رسانش هدفمند دارویی،جداسازی مولکول‌های زیستی و مواد ایجادکننده کنتراست در تصویربرداری رزونانس مغناطیسی (MRI) مورداستفاده قرارگرفته است.نانو ذرات به‌منظور نمایش عملکرد سازگار با کاربردهای ذکرشده،باید دارای حداکثر مقدار مغناطیسی اشباع‌شده (M_S) ، حداقل مقدار میدان وادارندگی(H_C) و مغناطش باقی‌مانده(M_r) و سطحی دارای گروه‌های عاملی فعال برای اتصال دارو یا سایر پوشش‌ها باشند.در این تحقیق با انجام آزمون پراش اشعه ایکس[۲۱](XRD)ماهیت نانو ذرات سوپر پارامغناطیسی اکسید آهن مورد برسی و اثبات قرار گرفت و گروه‌های عاملی کارآمدی بر روی سطح نانوذره به‌وسیله تست طیف‌سنجی مادون‌قرمز با تبدیل فوریه[۲۲] (FTIR) مشخص شد و همچنین برای اثبات خاصیت سوپر پارامغناطیسی نانو ذرات از آزمون مغناطیس‌سنج ارتعاشی[۲۳] (VSM)استفاده شد.

واژگان کلیدی: رسانش دارو،رهایش دارو،فزون گرمایی،مواد ایجادکننده کنتراست،جداسازی زیستی

21 X-ray diffraction
22 Fourier-transform infrared spectroscopy
23 vibrating-sample magnetometer

۱.مقدمه

زمینه‌های کاربردی SPION در سال‌های اخیر به‌شدت افزایش‌یافته است. در حوزه بالینی پزشکی ، این ذرات به‌عنوان سیستم‌های انتقال دارو ، ژن‌ها و رادیونوکلئیدها استفاده می‌شوند.علاوه بر آن سیال‌های مغناطیسی، به‌عنوان عوامل ایجادکننده کنتراست در تصویربرداری رزونانس مغناطیسی[۲۴] (MRI)، به‌طورمعمول در تصویربرداری‌های تشخیصی مورداستفاده قرار می‌گیرند. SPION همچنین برای کاربردهای آزمایشگاهی در تشخیص‌های بالینی، مانند تحقیقات در ژنتیک و فناوری‌های مبتنی بر جداسازی مغناطیسی ایمنی[۲۵] (IMS) سلول‌ها، پروتئین‌ها، DNA/RNA، باکتری‌ها، ویروس‌ها و سایر مولکول‌های زیستی ، جذاب هستند. همچنین، در سال‌های اخیر، پیشرفت‌هایی با استفاده از SPION در مطالعات بالینی درمان سرطان در دامپزشکی و پزشکی انسانی با حمله به تومورهای جامد به‌وسیله نانو ذرات مغناطیسی متصل به ۴-اپیدوکسوروبیسین، یا افزایش تأثیر شیمی‌درمانی داخل شریانی از طریق آزادسازی هدفمند این نانو ذرات انجام‌شده است. محلول مغناطیسی فزون گرمایی[۲۶](MFH) روش دیگری است که در آن SPION برای ایجاد افزایش دما با اعمال یک میدان مغناطیسی نوسانی برای کشتن سلول‌های تومور مورداستفاده قرار می‌گیرند. این نوع درمان در حال حاضر در بیماران انسانی دارای سرطان استفاده می‌شود.



شکل ۱:کاربرد نانو ذرات مغناطیسی

یکی از کاربردهای امیدوارکننده SPION در آینده می‌تواند تمرکز بر روی چالش‌های موجود در سیستم اسکلتی عضلانی در انسان و حیوانات باشد. بسیاری از بیماری‌های سیستم اسکلتی عضلانی با فرآیندهای التهابی موضعی مشخص می‌شوند و در حال حاضر با

24 magnetic resonance imaging
25 immune magnetic separation
26 Magnetic fluid hyperthermia

داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی سیستمیک[۲۷] (NSAIDs) یا کورتیکواستروئیدها درمان می‌شوند. جدا از عوارض جانبی سیستمیک این داروها، مانند زخم معده یا تمایل به خونریزی، دسترسی موضعی یا حفظ غلظت داروی درمانی ممکن است یک مشکل باشد. SPION می‌تواند از طریق تحویل دارو به محل‌های التهابی و درعین‌حال حفظ غلظت‌های مناسب در محل موردنظر، نقش اصلی را در پروسه درمانی ایفا کند که موجب کاهش زمان، هزینه، دوز کلی و عوارض جانبی ناخواسته می‌شود. آهنرباهایی که همراه با SPION به‌عنوان حامل دارو استفاده می‌شوند، امکان روشن و خاموش کردن میدان مغناطیسی را فراهم می‌کنند، بنابراین نانو ذرات در مدت‌زمان و دوز مناسب در محل موردنظر رها می‌شوند و سپس جمع می‌شوندسایر کاربردهای زیست پزشکی SPION در شکل ۱ به نمایش گذاشته‌شده است.

روش‌های زیادی برای تهیه نانو ذرات آهن سوپر پارامغناطیسی ایجادشده است. نانو ذرات آهن تهیه‌شده توسط تجزیه حرارتی[۲۸] در حلال‌های آلی بسیار آب‌گریز هستند که کاربرد زیست پزشکی آن‌ها را مختل می‌کند. یک روش متداول برای سنتز نانوذره‌های آهن آب‌دوست،هم رسوبی شیمیایی محلول‌های آبی نمک‌های فرو(Fe^{2+}) و فریک(Fe^{3+}) در یک محلول آبی اساسی است. این روش ساده است و بازدهی فوق‌العاده بالایی دارد. بااین‌حال، این روش کنترل خوبی بر توزیع اندازه SPION ها ندارد و نانو ذرات تولیدشده اندازه‌های مختلف و میزان پخش‌شدگی پایینی دارند که برای کاربردهای پزشکی مناسب نیست. روش سونو-شیمیایی ابزار مهمی در تهیه اکسیدهای فلزی است. که علاوه برداشتن تمامی ویژگی‌های روش هم رسوبی شیمیایی معایب این روش را نیز از بین می‌برد.در این تحقیق تلاش بر تولید نانوذره‌های سوپر پارامغناطیسی اکسید آهن متناسب با کاربردهای زیست پزشکی شد.

۲.مواد و روش‌ها

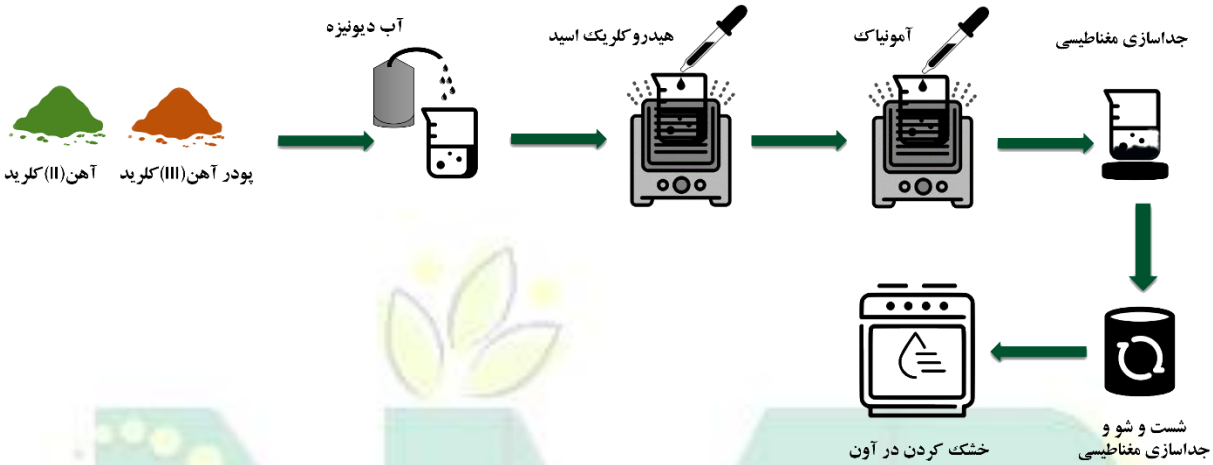
۲-۱.مواد شیمیایی و استانداردها: مواد مورداستفاده برای سنتز عبارت‌اند از پودر آهن(II)کلرید و آهن(III)کلرید تهیه‌شده از شرکت مرک آلمان،آمونیاک(NH_3) ٪۲۵ شرکت مرک آلمان، هیدروکلریک اسید ٪۲۵ شرکت مرک آلمان و آب دیونیزه تهیه‌شده از شرکت مرک آلمان.

۲-۲.تجهیزات موردنیاز:تجهیزات مورداستفاده برای سنتز عبارت‌اند از بشر ۲۰۰ میلی‌لیتر،ترازو AND GR-202 ژاپن، سمپلر ۱۰۰۰ماکرو لیتر ، حمام التراسونیک بکر مدلvCLEAN1-L4 و آهن‌ربا نئودیمیوم باقدرت ۱/۴ تسلا.

۲-۳.روش سنتز:ابتدا ۴/۴۳ گرم از پودر آهن(III)کلرید و ۱/۶۳ گرم از پودر آهن(II)کلرید برداشته و به داخل بشر ریخته شد، سپس۲۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه به بشر اضافه شد و بشر در حمام اولتراسونیک باقدرت 1141kHz با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در همان حال ۵۰۰ ماکرو لیتر هیدروکلریک اسید به محلول اضافه شد و محلول به مدت ۵ دقیقه تا رسیدن به حالتی شفاف، اولتراسونیک شد.در همان حال ۱۸ میلی‌لیتر آمونیاک به‌سرعت به بشر اضافه شد تا محلول تیره گردد و سپس ۳۰ دقیقه محلول حاوی رسوب اولتراسونیک گردید.در مرحله بعد محلول بر روی آهنربا قرار گرفت تا در ته ظرف رسوب شکل گیرد و مایع

27 systemic non-steroidal antiinflammatory drugs
28 thermal decomposition

رویی دور ریخته شد.سپس رسوب ۳ بار به‌وسیله آب مقطر شست‌وشو داده شد و توسط آهن‌ربا جداسازی شد.درنهایت رسوب در آون و در دمای ۳۷ درجه‌یک شبانه‌روز خشک شد.



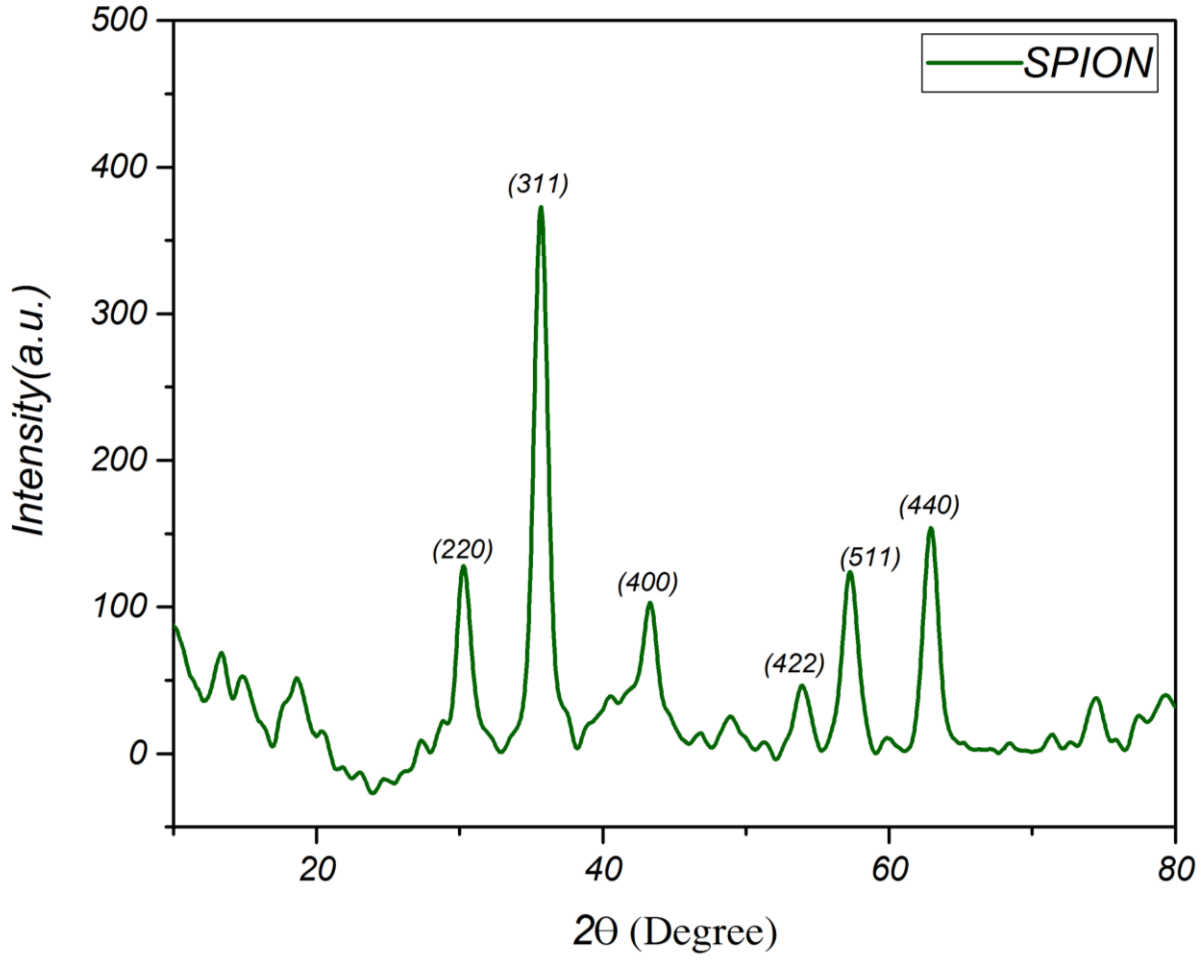
شکل ۲: مراحل سنتز SPION

۳. نتایج و بحث

پس از سنتز نوبت به مشخصه یابی نانو ذرات مغناطیسی رسید تا ویژگی‌های مختلف آن مورد برسی قرار گیرد.

۳-۱. برسی نتایج حاصل از پراش اشعه ایکس

این تست توسط دستگاه (XPert PRo MPD) PANalytical با ولتاژ۴۰kV و جریان ۴۰ mA انجام شد و اطلاعات مفیدی در ارتباط با ماهیت و ساختار بلوری نانو کامپوزیت در اختیار قرار گرفت. شکل ۲ نشان می‌دهد نانو ذرات سنتز شده در فازهای Fe_3O_4 و یا γ-Fe_2O_3 هستند. اگرچه الگوهای فازهای Fe_3O_4 وγ-Fe_2O_3 مشابه هستند اما عدم وجود برخی از قله‌های مربوط به فاز γ-Fe_2O_3 که خاصیت مغناطیسی پایینی دارد،مانند پیک‌های (۱۱۰) ، (۲۱۰) و (۲۱۱) ، تائید می‌کند که نانو ذرات سنتز شده در فاز Fe_3O_4 هستند. پنج قله پراش نسبتاً قابل‌تشخیص Fe_3O_4 در۲θ=۳۰ درجه ، ۳۵ درجه ، ۴۳ درجه ، ۵۳ درجه ، ۵۷ درجه ، ۶۲/۷ درجه به ترتیب با ، (۲۲۰) ، (۳۱۱) ، (۴۰۰) ، (۴۲۲) ، (۵۱۱) و (۴۴۰) مرتبط هستند(JCPDS-No- 19-0629).

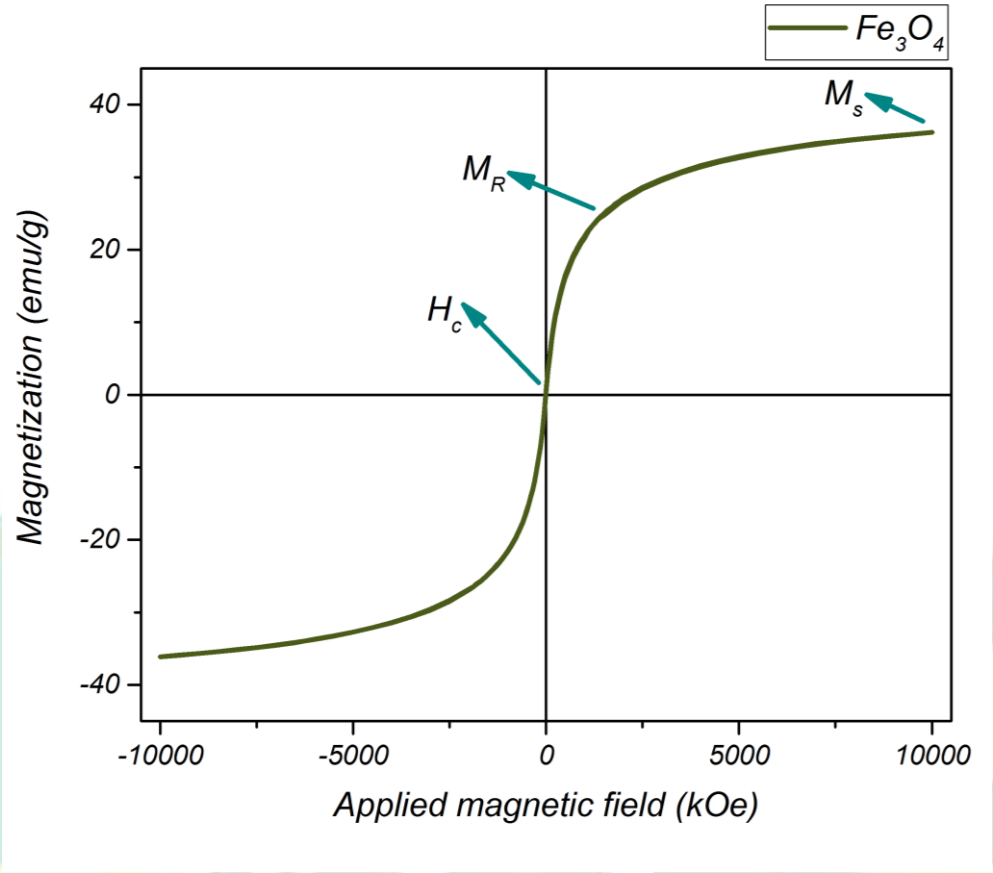


شکل 3: نمودار حاصل از پراش اشعه ایکس(XRD) نانو ذرات سوپر پارامغناطیسی اکسید آهن را نشان می‌دهد.

۳-۲- بررسی نتایج حاصل از مغناطیس‌سنج ارتعاشی (VSM)

این تست توسط دستگاه LBKFB شرکت مغناطیس کویر کاشان باقدرت تفکیک دامنه میدان‌های پایین ۰/۲ اورستد و در میدان‌های بالا ۱ اورستد، برای اثبات و اندازه‌گیری خاصیت مغناطیسی نانو کامپوزیت صورت گرفت.

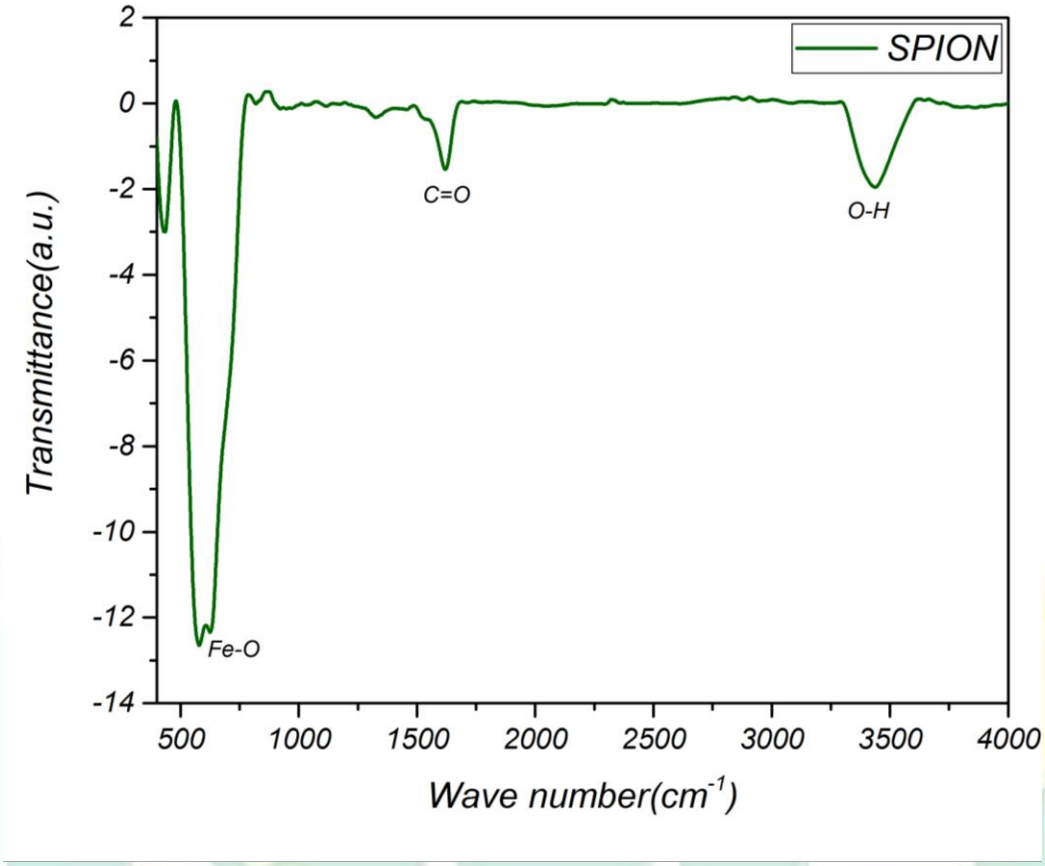
خواص مغناطیسی SPION بامطالعه منحنی‌های مغناطیسی وابسته به میدان در دمای اتاق بررسی شد. شکل ۳ حلقه‌های هیسترزیس مغناطیسی SPION ها را نشان می‌دهد. مغناطش اشباعSPION ، 36 emu/g بود. نتایج، هیچ میدان وادارندگی(H_C) و مغناطش باقی‌مانده(M_r) را نشان نداد و خاصیت سوپر پارامغناطیسی نانوذره را تائید کرد.



شکل ۴: حلقه‌های هیسترزیس مغناطیسی SPION ها را نشان می‌دهد که ماهیت سوپر پارامغناطیسی نانوذره را تائید می‌کند.

۳-۳- برسی نتایج طیف‌سنجی مادون‌قرمز با تبدیل فوریه (FTIR)

این تست توسط دستگاه بروکر (Bruker Tensor۲۷) در گستره ۴۰۰cm^{-1} تا ۴۰۰۰cm^{-1} از نمونه پودری و خشک‌شده به‌منظور مشخصه یابی گروه‌های عاملی موجود در سطح نانو کامپوزیت گرفته شد.که نتایج آن در شکل ۴ به نمایش گذاشته‌شده است. در برسی طیف FT-IR از SPION های سنتز شده ، قله‌های ۴۰۰ cm^{-1}-۶۰۰ مربوط به پیوندهایFe-O (اکسیژن فلز) است ، قله‌های ۱۵۴۷ cm-1 ، ۱۶۵۶ مربوط به گروه C-O (کربوکسیل دوگانه) و جذب گسترده در ۳۳۳۴ cm-1 مربوط به O- H است.



شکل ۵ طیف FTIR گروه‌های عاملی سطح SPION ها را نشان می‌دهد.

۴. نتیجه‌گیری

ما یک مسیر ساده و مستقیم برای تهیه SPION های با کارایی بالا با استفاده از فرکانس فراصوت ایجاد کرده‌ایم که با توجه به سوپر پارامغناطیسی بودن نانو ذرات اکسید آهن تولیدشده و همچنین دارا بودن سطحی غنی از گروه‌های عاملی فعال مانند گروه‌های کربوکسیل و هیدروکسیل، امکان اتصال داروها و طیف وسیعی از پوشش‌ها را دارا می‌باشد، که به‌صورت گسترده‌ای می‌توان از آن در کاربردهای زیست پزشکی گوناگونی ازجمله رسانش و رهایش دارو به منطقه خاصی از بدن،جداسازی بیومولکول ها،فزون گرمایی و مواد کنتراست دهنده در تصویربرداری رزونانس مغناطیسی[۲۹] (MRI) استفاده کرد.

29 magnetic resonance imaging

منابع

1. S. Teja and P.-Y. Koh, 2009 , “Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles,” Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials, vol. 55, no. 1-2, pp.۲۲-۴۵
2. P.Majewski and B. Thierry, 2007, “Functionalizedmagnetite nanoparticles—synthesis, properties, and bio-applications,” Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences, vol. 32, no. 3-4, pp. 203–215.
3. T. Neuberger, B. Sch· ·opf, H. Hofmann, M. Hofmann, and B. von Rechenberg, 2005, “Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: possibilities and limitations of a new drug delivery system,” Journal ofMagnetism andMagneticMaterials, vol. 293, no. 1, pp. 483–496.
4. Tobias Neuberger and et.al,2005, Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system, Journal of Magnetism and Magnetic Materials 293 (2005) 483–496
5. José Raúl Sosa‑Acosta and et.al.,2020, DNA–Iron Oxide Nanoparticles Conjugates: Functional Magnetic Nanoplatforms in Biomedical Applications, Topics in Current Chemistry , 378:13

Screening the bioherbicidal activity of some isolated bacteria from soil against *Lepidium sativum*

Matia Sadat Borhani [1*]; Ebrahim Gholamalipour Alamdari [2]; Mohammad Hadi Masoomi[3]

1- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Gonbad Kavous University
2- Assistant Professor, Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University
3 -Student of Genetics, Department of Biology, Faculty of Sciences, Gonbad Kavous University

*msadat.borhani7@gmail.com; borhani@gonbad.ac.ir

Abstract

Studies on the discovery of environmentally friendly, biodegradable, and highly effective herbicides due to the high financial costs imposed on farmers each year and also due to the adverse environmental and clinical effects of the use of chemical herbicides, are of great importance. In this study, at first, the hypochlorite sodium method (3.25%) for one minute was used for the treatment of susceptible plant seeds, *i.e.*, garden cress (*Lepidium sativum*). Different soil samples around the roots of various plants, including wheat, beans, Urtica (nettle), and the weeds that grew on the farms of Gonbad Kavous University were used to isolate the bacteria with bioherbicidal activity. Soil samples were serially diluted and cultured on the nutrient agar medium. Then the pure culture of isolated bacterial strains was prepared on the same culture medium. The strip culture method was used to screen the first and second stages of screening the isolated microbial strains. In the first screening stage, the bacterial strains that reduced the seed growth by more than 90% compared to the control, were selected for the second screening stage. The second screening stage was repeated with more seeds of *Lepidium sativum* and incubation time up to 7-10 days to confirm the results of the first screening stage. Out of 30 isolated microbial strains, 6 microbial strains had about 90-80% herbicidal activity in the second screening stage compared to the control (seeds without microbial treatment). Therefore, the strip culture method used in this study was a suitable method for screening microbial strains with bioherbicidal activity.

Keywords: Bioherbicide, Weed, Microbial strain, Screening, Sustainable agriculture

غربالگری فعالیت علف کشی زیستی برخی از باکتری های جدا شده از خاک علیه تره تیزک

ماتیا سادات برهانی[1*]؛ ابراهیم غلامعلی پور علمداری[2]، محمدهادی معصومی[3]

۱- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبدکاووس

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

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبدکاووس

msadat.borhani7@gmail.com; borhani@gonbad.ac.ir *

چکیده

مطالعات بر روی یافتن علف کش های زیستی سازگار با محیط زیست، قابل تجزیه و دارای کارایی بالا به دلیل هزینه های مالی بالایی که هر ساله بر کشاورزان تحمیل می شود و هم چنین به دلیل اثرات نامطلوب زیست محیطی و بالینی استفاده از علف کش های شیمیایی، دارای اهمیت بالایی است. در تحقیق حاضر در ابتدا به منظور حذف میکروب های موجود در بذر گیاه تره تیزک از هیپوکلریت سدیم ۳/۲۵ درصد به مدت یک دقیقه استفاده گردید. نمونه‌های مورد استفاده جهت جداسازی باکتری‌های دارای فعالیت علف کشی زیستی از ۱۰ نمونه خاک اطراف ریشه گیاهان مختلف از جمله گندم، باقلا، گزنه و علف های هرز آن‌ها که در مزارع دانشگاه گنبد کاووس روئیده بودند، بوده است. نمونه های خاک تحت رقت سازی متوالی قرار گرفته و بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شدند. سپس کشت خالصی از سویه های میکروبی جداسازی شده بر روی محیط ذکر شده تهیه گردید. سپس از روش کشت نواری به منظور غربالگری مرحله اول و مرحله دوم سویه های میکروبی جداسازی شده استفاده شد. در مرحله اول غربالگری، از بین سویه های باکتری که باعث کاهش بیش از ۹۰ درصد رشد بذرها نسبت به کنترل یا شاهد شدند، برای مرحله غربالگری دوم انتخاب گردیدند. آزمایش غربالگری دوم برای اطمینان از این که سویه باکتریایی نقش در کاهش یا عدم رشد بذرهای گیاه تره تیزک شده است، با تعداد بذرهای بیشتری از گیاه تره تیزک و زمان انکوباسیون طولانی تر تا ۱۰-۷ روز تکرار گردید. از میان ۳۰ سویه میکروبی جداسازی شده، ۶ سویه میکروبی نسبت به شاهد (بذر بدون تیمار میکروبی) در مرحله غربالگری دوم دارای فعالیت علف کشی حدود ۹۰-۸۰ درصد بودند. بنابراین، روش کشت نواری مورد استفاده در این تحقیق روش مناسبی در غربالگری سویه های میکروبی پذیرفته شد.

واژگان کلیدی: علف کش زیستی، علف هرز، سویه میکروبی، غربالگری، کشاورزی پایدار

۱.مقدمه

کنترل علف های هرز یکی از جنبه های مهم تولید در هر نظام کشاورزی است. علف های هرز به دلیل رقابت با گیاهان زراعی، موجب کاهش کیفیت و کمیت محصول و ایجاد پناهگاهی مناسب برای حشرات و عوامل بیماری زا می شوند که می توانند مشکل

ساز باشند [Melander et al., 2005]. کنترل علفهای هرز درگیاهان زراعی، باغبانی و مرتعی، ایجاد محیطی مساعد برای گیاهان موردنظر، و محیطی نامساعد برای گیاهان ناخواسته می باشد. مبالغ هنگفتی که هر ساله کشاورزان صرف کاهش اثرات سوء علف های هرز بر روی محصولات خود می کنند و هم چنین خسارت هایی که آن ها به دلیل نبود کنترل کافی علف های هرز متحمل می شوند، نشانگر اهمیت این موضوع است [Macias et al., 2007].

هرکدام از روشهای کنترل علفهای هرز که امروزه مورد استفاده قرار می گیرند، دارای فواید و محدودیت هایی است و نمی توان یک روش را برای همه شرایط توصیه نمود. روشهای وجین دستی و مکانیکی، نتایج پربازده ای ازنظر افزایش عملکرد زراعی به همراه نداشته اند [Harke, and O'Donovan, 2013]. درحال حاضر علف کش های شیمیایی درایران ساخته نمی شوند و راه اندازی چنین صنعتی نیاز به سرمایه گذاری و هزینه بسیار زیادی دارد. ازطرف دیگر اشکالات زیست محیطی ناشی ازکاربرد نادرست علف کشهای شیمیایی، به عنوان یک خطرجدی مطرح است که می توانند بر سلامتی انسان ها، محیط زیست و کیفیت محصولات کشاورزی تاثیرات منفی بسیاری داشته باشند. از طرفی، بروز مقاومت در برابر علف کش های شیمیایی به کرات گزارش شده است. با توجه به هزینه زیاد مصرف سموم و هم چنین اثرات مخرب زیست محیطی آن، استفاده از علف هرزکش های زیستی می توانند به عنوان روش های مقرون به صرفه و زیست سازگار جایگزین روش های شیمیایی گردند [Weaver et al., 2007].

کنترل بیولوژیک علف‌های هرز به معنای استفاده از دشمنان طبیعی برای جلوگیری و کاهش رشد جمعیت یک گونه علف هرز می‌باشد. میکروارگانیسم ها متابولیت های ثانویه بسیار مفیدی تولید می کنند که معمولا دارای وزن مولکولی پایین (کمتر از ۲۵ کیلودالتون) بوده و در فاز سکون باکتری ها یعنی زمانی که منابع غذایی پیرامون باکتری محدود می شوند، تولید می گردد. این متابولیت ها برای رشد و تکثیر میکروب ضروری نیستند و می توانند از لحاظ شیمیایی و عملکردی بسیار متنوع باشند [Harding and Raizada, 2015; Hoagland et al., 2007]. خواص آنتی باکتریال، تنظیم کننده رشد گیاه، مهار کننده آنزیم های گیاهی و خواص آنتاگونیسم علیه حشرات، علف هرز و انگل ها، از جمله این فعالیت های بیولوژیکی است. به همین دلیل این ترکیبات به شدت در حوزه کشاورزی، پزشکی و علوم دام مورد توجه قرار گرفته اند. باکتری هایی مانند *سودوموناس*، *باسیلوس* و *استرپتومایسز* از جمله باکتری های تولید کننده متابولیت های ثانویه مفید هستند که در مطالعات گذشته گزارش شده اند [Berdy, 2005]. استفاده از علف کش های زیستی برای کنترل علف های هرز، مستلزم وارد کردن مقدار زیادی از یک عامل بیماری زا به صورت یکباره و یا استفاده متعدد و چند مرحله ای دارد. عوامل بیماری زایی که برای علف کش های زیستی انتخاب می شوند عموماً بومی هستند و از لحاظ قیمت ارزانتر می باشد. با وجود پتانسیل زیاد آنها برای استفاده در نظام های مدیریت تلفیقی علف های هرز، فقط چند علف کش تا این زمان ثبت شده است[Duke et al., 2007] . به منظور درک کامل پتانسیل و سازگاری این ابزارهای مدیریتی تحقیقات بیشتری در رابطه با شناسایی علف کش های زیستی برای علف های هرز مهم و بهبود فرمولاسیون آنها، تولید بهینه، فن آوری کاربرد آنها، کارایی و سازگاری با دیگر فعالیت های کشاورزی مورد نیاز است. همچنین عوامل بیماریزای با قدرت بیماریزایی کم اما دارای سایر خصوصیات مطلوب دیگر (همانند اختصاصی عمل کردن، مرغوبیت، همه گیر بودن) را می توان با استفاده از مهندسی ژنتیک قدرت بیماریزایی آنها را زیاد نمود، و بدین وسیله، اجازه ایجاد فرصت و کشف عوامل بیماریزایی را که قبلاً نادیده گرفته شده بودند در آینده به عنوان یک علف کش زیستی مورد استفاده قرار گیرد [Ash, 2010].

انجام مطالعات در این زمینه می تواند در ارتقای کشاورزی ارگانیک تاثیرگذار باشد. توجه لازم و کافی به امرتحقیقات درزمینه های ساخت و کاربرد علف کش‌های زیستی برای کنترل علفهای هرز و تلفیق بهینه باسایر روشها درایران میتواند نتایج سودمندی مانند

کاهش اتکا به واردات ماشـینهای کشاورزی و علف کشـهای شـیمیایی ازخارج و همچنین افزایش عملکرد گیاهان زراعی و باغبانی و مرتعی به همراه داشته باشد. لذا در این راستا، در مطالعه حاضر سعی شده است که باکتری های دارای خاصیت علف کشی از نمونه های خاک مختلف غربالگری شده و علیه تره تیزک مورد ارزیابی قرار بگیرد.

۲.مواد و روش‌ها

۲-۱: جمع آوری نمونه های رایزوسفر خاک

به دلیل ترشحات ریشه گیاهان، خاک اطراف ریشه ها یا رایزوسفر دارای میکروارگانیسم های متنوع تر و بیشتری نسبت به خاک دور از ریشه گیاهان می باشد. در این مطالعه، از ۱۰ نمونه خاک اطراف ریشه گیاهان مختلف از جمله گندم، باقلا، گزنه و علف های هرز آنها که در مزارع دانشگاه گنبد کاووس روئیده بودند، نمونه برداری شد. نمونه های رایزوسفر در کیسه های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل شد. سپس اجازه داده شد تا نمونه های خاک خشک شوند. بعد از جداسازی ریشه گیاهان و بقایای گیاهی و جانوری موجود در نمونه های خاک، همه نمونه ها به میزان یک گرم توزین شدند.

۲-۲: جداسازی میکروارگانیسم

ابتدا نمونه های خاک با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل تحت رقت سازی متوالی قرار گرفتند. به منظور رقت سازی متوالی ۰/۱ گرم نمونه خاک به لوله اول حاوی ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی اضافه و کاملا حل شد. سپس از لوله اول، ۱ میلی لیتر به لوله دوم انتقال و به خوبی هم زده شد. این کار تا لوله ۶ ادامه یافت. از هر لوله به میزان ۵۰۰ میکرولیتر به محیط نوترینت آگار انتقال داده و به صورت چمنی کشت داده شد. تمام محیط های کشت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. بعد از اتمام زمان گرمخانه گذاری، باکتری های رشد یافته بر روی محیط کشت، از نظر اندازه، رنگ کلونی و تعداد مورد بررسی قرار گرفتند. کلونی های متفاوت بر روی هر پلیت نامگذاری شدند.

۲-۳: خالص سازی میکروارگانیسم جداسازی شده روی محیط کشت

در مرحله بعد کلونی های نامگذاری شده به منظور کشت خالص، در پلیت های جداگانه نوترینت آگار به صورت خطی یا چهار منطقه ای کشت داده شدند. سپس تمام پلیت ها درون در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. در صورتی که بر روی یک پلیت باز کلونی های متفاوتی مشاهده می شد، دوباره کشت خالص صورت می پذیرفت.

۲-۴: تیمار بذرها

برای بررسی خاصیت علف کشی باکتری های جداسازی شده، از بذر گیاه تره تیزک (شاهی) استفاده شد. این گیاه به راحتی رشد می کند، شرایط کشت آن در آزمایشگاه آسان است و نسبت به مواد علف کش حساس می باشد. از آن جائی که بر روی بذرها ممکن است باکتری های مختلفی وجود داشته باشد و در بررسی اثر علف کشی باکتری های جداسازی شده از رایزوسفر مداخله کنند، ابتدا باید هر گونه میکروارگانیسم از سطح بذر حذف گردد. برای این کار، ۴ روش زیر مورد استفاده قرار گرفتند:

روش ۱: در این روش، بذرها در میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری تا ۲۵ درصد حجم ریخته شدند. یک میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد و تریتون X ۰/۱ اضافه و به مدت ۸ دقیقه ورتکس شد. سپس محلول تا جای ممکن خالی گردید. یک میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد، اضافه و ۳۰ ثانیه ورتکس شد. این مرحله دوبار تکرار شد. در پایان بذرها درون پلیت استریل کنار شعله قرار داده شدند تا خشک گردند (خیاط ماهر و همکاران، ۱۳۹۱).

روش ۲: در این روش، بذرها تحت تیمار با هیپوکلریت سدیم (NaOCl) ۳/۲۵ درصد به مدت یک دقیقه قرار گرفتند. سپس با اتانول ۷۰ درصد شسته شدند. در پایان ۵ بار با آب تزریقی استریل شسته شدند. در پایان بذرها درون پلیت استریل کنار شعله قرار داده شدند تا خشک گردند (Lawrance et al., 2019).

روش ۳: در این روش بذرها به مدت یک دقیقه تنها با اتانول ۷۰ درصد تیمار و سپس درون پلیت استریل کنار شعله قرار داده شدند تا خشک گردند.

روش ۴: در این روش بذرها به مدت یک دقیقه تنها با هیپوکلریت سدیم ۳/۲۵ درصد تیمار و سپس درون پلیت استریل کنار شعله قرار داده شدند تا خشک گردند.

۲-۵: بررسی اثرات آنتاگونیسمی علیه علف های هرز در مقیاس آزمایشگاهی

از کشت های خالص باکتری ها به صورت نوارهای یک سانتی متری درون محیط نوترینت آگار کشت داده شد. سپس تعدادی بذر تیمار شده و خشک شده، در اطراف این نوار باکتریایی قرار داده شدند. همچنین تعدادی بذر به صورت شاهد در محیط کشت بدون باکتری قرار داده شدند. تمامی محیط های کشت در دمای آزمایشگاه در کنار پنجره و جائی که نور خورشید به آن می رسید، به مدت ۴-۳ روز قرار داده شدند. از بین سویه های باکتری آنهایی که باعث کاهش بیش از ۹۰ درصد رشد بذرها نسبت به کنترل یا شاهد شدند، برای مرحله غربالگری دوم انتخاب گردیدند. آزمایش غربالگری دوم برای اطمینان از این که سویه باکتریایی نقش در کاهش یا عدم رشد بذرهای گیاه تره تیزک شده است، با تعداد بذرهای بیشتری از گیاه تره تیزک و زمان انکوباسیون طولانی تر تا ۱۰-۷ روز تکرار گردید. به منظور محاسبه میزان مهار رشد بذرهای تره تیزک در کنار سویه های میکروبی نسبت به شاهد از رابطه زیر استفاده شد:

$$\text{درصد مهار رشد بذرها} = ۱۰۰ - (\frac{\text{میانگین رشد بذر ها مجاورت در سویه ها میکروبی}}{\text{میانگین رشد بذر ها در کنترل}} \times ۱۰۰)$$

۲-۶: نگهداری کشت های سویه های میکروبی درکوتاه مدت و درازمدت

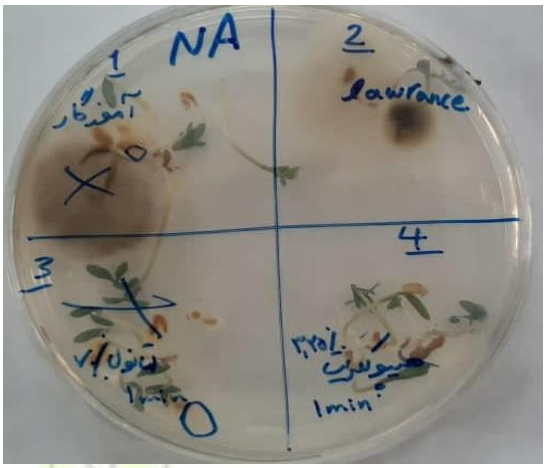
به منظور نگه داری سویه های میکروبی جداسازی و خالص سازی شده در کوتاه مدت، از روش کشت در محیط شیبدار و برای نگه داری طولانی مدت سویه ها از روش گلیسرول ۳۰ درصد در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد استفاده شد.

۲-۷: شناسایی میکروبیولوژیکی سویه های جداسازی شده

به منظور شناسایی سویه های میکروبی جداسازی شده در این تحقیق، از ویژگی های مورفولوژیکی کلونی و تست های رنگ آمیزی گرم، اسپور، کاتالاز و تست تحرک به صورت قطره معلق استفاده شد.

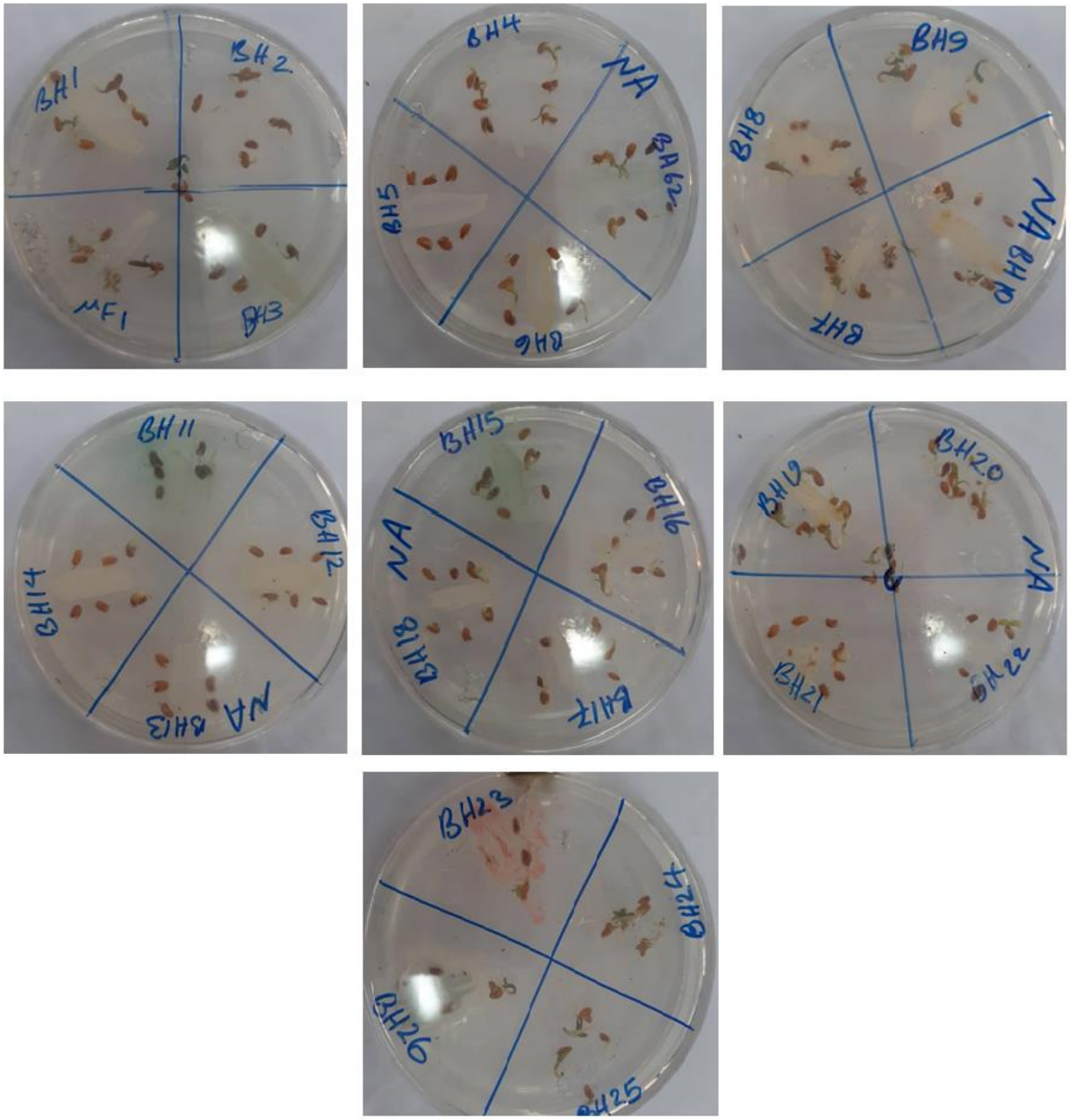
۳. نتایج و بحث

به منظور بررسی اثر میکروب های جداسازی شده بر گیاه تست این تحقیق (گیاه تره تیزک) با توجه به شکل ۱، بهترین روش تیمار بذرها که جوانه زنی بذر را کاهش نداد و آلودگی میکروبی نشان نداد، روش مورد استفاده در این تحقیق یا روش ۴ یعنی استفاده از روش هیپوکلریت سدیم ۳/۲۵ درصد به مدت یک دقیقه می باشد.



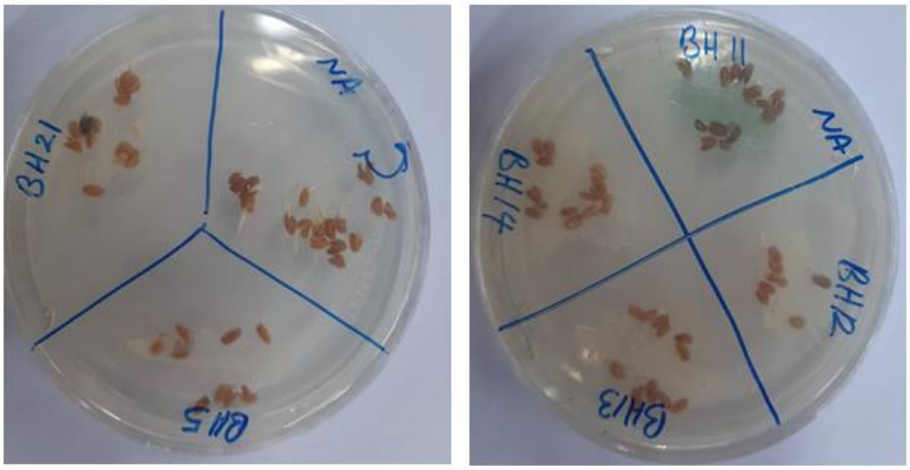
شکل ۱: نتایج تیمار بذرها. پلیت حاوی نوترینت آگار به ۴ بخش تقسیم شده است و هر بخش یک روش مورد استفاده در تیمار بذر را نشان می دهد. در این شکل، روش ۱ همان روش مورد استفاده در مقاله خیاط ماهر و همکاران (۱۳۹۱) می باشد.

در مطالعه حاضر از میان ۱۰ نمونه رایزوسفر مختلف، تعداد ۳۰ سویه میکروبی متفاوت جداسازی و خالص سازی شد. نتایج غربالگری سویه های میکروبی جداسازی شده از ناحیه رایزوسفر در محیط نوترینت آگار در مجاور بذرهای استریل شده گیاه تره تیزک در شکل ۲ نشان داده شده است. در مجموع از میان تمامی سویه های میکروبی جداسازی شده، ۶ سویه عملکرد علف کشی مطلوبی از خود نشان دادند. منظور از عملکرد علف کشی مطلوب این است که کاهش نرخ جوانه زنی بذرهای گیاه تره تیزک نسبت به بذرهای مجاور باکتری قرار نگرفته یا گروه شاهد برای بار اول به مدت ۴-۳ روز مورد بررسی قرار گرفته است و سپس نتایج در آزمایشات سری دوم با تعداد بذرهای استریل شده بیشتر و برای مدت یک هفته تا ۱۰ روز دیگر مورد تایید قرار گرفت.



شکل ۲: نتایج غربالگری اول سویه های میکروبی دارای فعالیت علف کشی بعد از ۳ روز انکوباسیون

نتایج تکرار آزمایشات در مورد سویه های میکروبی که در سری اول جواب مثبت نشان دادند در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۳: تایید نتایج غربالگری دوم فعالیت علف کشی سویه های میکروبی بعد از ۳ روز انکوباسیون. حرف C در شکل زیر بیانگر کنترل یا شاهد می باشد.

۶ سویه میکروبی به دست آمده با نام های BH5, BH 11, BH12, BH13, BH14, BH21 نسبت به شاهد بعد از ۱۰ روز انکوباسیون دارای فعالیت علف کشی حدود ۹۰-۸۰ درصد بودند.

از آن جائی که هدف از این مطالعه صرفا غربالگری سویه های میکروبی دارای خاصیت علف کشی بوده است بنابراین، آزمایشات انجام شده توانسته است که سویه های میکروبی مطلوب را غربالگری کند. مطالعات مختلفی در زمینه غربالگری سویه های میکروبی دارای خاصیت علف کشی صورت گرفته است که در اینجا به منظور مقایسه با نتایج به دست آمده مطرح می گردند. در مطالعه خیاط ماهر و همکاران (۱۳۹۱) از روش کشت نواری و محیط کشت گلوکز-آسپاراژین- دی پتاسیم فسفات آگار و ۴۰ نمونه رایزوسفر از مناطق مختلف ایران به منظور غربالگری سویه های دارای فعالیت علف کشی استفاده شد. از میان ۴۵۷ سویه میکروبی جدا شده، ۱۱ سویه میکروبی دارای فعالیت علف کشی بودند. علت تعداد کمتر سویه های میکروبی جداسازی شده در مطالعه حاضر، می تواند به دلیل تعداد کمتر نمونه های رایزوسفر و از طرفی استفاده از سموم کشاورزی مختلف در خاک های مورد استفاده باشد. با این وجود از بین ۳۰ سویه میکروبی جداسازی شده از ۱۰ نمونه رایزوسفری مورد استفاده، ۶ سویه میکروبی دارای فعالیت علف کشی به دست آمد. بنابراین نسبت به تعداد نمونه های رایزوسفری و تعداد سویه های میکروبی جداسازی شده، تعداد سویه های میکروبی بالاتری دارای خاصیت علف کشی بودند. همچنین در مقایسه با مطالعه خیاط ماهر و همکاران (۱۳۹۱) روش آسان تری برای استریل کردن نمونه های بذر گیاه تره تیزک (شاهی) در مطالعه حاضر به دست آمد. در مطالعه آنها از اتانول ۷۰ درصد، تریتون X ۰/۱ و اتانول ۹۵ درصد برای تیمار بذرها استفاده گردید. در حالی که تیمار بذرها در مطالعه حاضر تنها با استفاده از هیپوکلریت سدیم و با صرف زمان کمتر انجام شد [خیاط ماهر و همکاران، ۱۳۹۱].

همچنین Juan و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه دیگری به بررسی خاصیت علف کشی در سویه های میکروبی پرداختند. در مطالعه آن ها از میان ۴۷۹ سویه میکروبی جداسازی شده تنها ۴ سویه در مرحله غربالگری از نظر فعالیت علف کشی مثبت گزارش شدند

[Juan et al., 2015]. به علاوه Aung و همکاران (۲۰۱۹) از بین ۱۳۰۰سویه میکروبی جداسازی شده توانستند ۴ سویه میکروبی را معرفی کنند [Aung et al., 2019].

با توجه به این که سویه های میکروبی جداسازی شده در مطالعه حاضر، در مرحله دوم آزمایشات (غربالگری دوم) با تعداد بذر بیشتر و زمان انکوباسیون بیشتر تا ۷ روز، (نتایج آزمایشات سری اول (غربالگری اول) با تعداد بذر کمتر و طی زمان ۴-۳ روز به دست آمد)، نتایج مشابهی تولید کردند، بنابراین می توان گفت روش کشت نواری در محیط پلیت آگار دار یک روش کارآمد و تکرار پذیر برای غربالگری سویه های میکروبی دارای فعالیت علف کشی است. این نتیجه همچنین توسط مطالعه خیاط ماهر و همکاران (۱۳۹۱) و Mallik (۲۰۰۱) نیز مطرح شده است. در حالی که خیاط ماهر و همکاران گزارش کرده اند که روش دیگر غربالگری مورد استفاده توسط آنها یعنی استفاده از محیط آگار حاوی سوپرناتانت سویه های میکروبی جداسازی شده، دارای نتایج تکرار پذیر نبوده است [خیاط ماهر و همکاران ۱۳۹۱؛ Mallik, 2001].

همچنین ۶ سویه میکروبی به دست آمده در مرحله غربالگری اول با نام های BH5, BH 11, BH12, BH13, BH14, BH21 نسبت به شاهد بعد از ۱۰ روز انکوباسیون در مرحله غربالگری دوم دارای فعالیت علف کشی حدود ۹۰-۸۰ درصد بودند. این میزان بالای مهار بذرهای تره تیزک توسط سویه های میکروبی می تواند با کارایی بالای سویه های جداسازی شده اشاره داشته باشد. تمامی سویه های میکروبی به دست آمده ویژگی های موفولوژیکی کلونی مربوط به *باسیلوس* ها را دارا بودند. نتایج رنگ آمیزی گرم (باسیل های گرم مثبت)، رنگ آمیزی اسپور (وجود اسپور)، تست کاتالاز (کاتالاز مثبت)، تست تحرک (متحرک) حدس اولیه را تایید می کرد.

۴. نتیجه‌گیری

با توجه به این که سویه های میکروبی غربالگری شده در این تحقیق از تنها ۱۰ نمونه رایزوسفر از تنها یک ناحیه کشاورزی در داخل مزارع دانشگاه گنبدکاووس جداسازی شدند و از میان ۳۰ سویه میکروبی جداسازی شده، ۶ سویه میکروبی بعد از مرحله غربالگری دوم فعالیت علف کشی بالای ۸۰ درصد نسبت به گروه کنترل نشان دادند، می توان نتایج مطالعه حاضر را در غربالگری سویه های میکروبی با فعالیت علف کشی را مطلوب توصیف کرد. در این مطالعه روش به صرفه، سریع و با کارایی بالاتر نسبت به مطالعات گذشته برای تیمار بذرهای گیاهی پیشنهاد شده است. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که روش کشت نواری، روش مقرون به صرفه، سریع و تکرارپذیری در غربالگری سویه های میکروبی دارای خاصیت علف کشی است. با این وجود این مطالعه می تواند با استفاده از نمونه های خاک بیشتر، از مناطق مختلف صورت پذیرد. هرچند که نتایج مطالعات گذشته بیان می کنند که تعداد بیشتر نمونه های رایزوسفری و تعداد بیشتر سویه های میکروبی جداسازی شده الزاما با به دست آرودن سویه های میکروبی بیشتر دارای فعالیت علف کشی همراه نیست.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از آقای سید اصغر حسینی (کارشناس آزمایشگاه شیمی و مرکزی دانشگاه گنبدکاووس) به دلیل همکاری های بی دریغ شان در طول این تحقیق کمال تشکر را دارند.

منابع

۱. ریحان خیاط ماهر، محمد علی آموزگار، شیما سادات سید مهدی، جواد حامدی، محمدرضا نقوی، فرانک فروزان فر و علی محمد لطیفی. ۱۳۹۱. جداسازی و غربالگری اکتینومیست های مولد فیتوتوکسین و بررسی اثر فیتوتوکسین سویه های منتخب. فصلنامه علمی پژوهشی زیست شناسی میکروارگانیسم ها. سال اول، شماره ۲، صفحه ۲۲-۱.

2. Ash, G. J. 2010. The science, art and business of successful bioherbicides. Biological Control, 52(3): 230-240.

3. Aung, B. B., Hwang, K. S., Khaitov, B., and Park, K. W. 2019. Herbicidal Activity of Metabolite from Streptomyces formicae. 한국잡초학회 별책 (학술대회 초록집), 39(1): 56-56.

4. Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics*, *58*(1): 1.

5. Duke, S. O., Wedge, D. E., Cerdeira, A. L., and Matallo, M. B. 2007. Interactions of synthetic herbicides with plant disease and microbial herbicides. In Novel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management. Springer, Dordrecht. pp. 277-296.

6. Harding, D. P., and Raizada, M. N. 2015. Controlling weeds with fungi, bacteria and viruses: a review. Frontiers in plant science, 6: 659.

7. Harker, K. N., and O'Donovan, J. T. 2013. Recent weed control, weed management, and integrated weed management. Weed Technology, 27(1): 1-11.

8. Hoagland, R. E., Boyette, C. D., Weaver, M. A., and Abbas, H. K. 2007. Bioherbicides: research and risks. Toxin Reviews, 26(4): 313-342.

9. Juan, Y., Wei, W., Peng, Y., Bu, T. A. O., Zheng, Y. A. N. G., Zhang, L. H., and Dong, J. G. 2015. Isolation and identification of Serratia marcescens Ha1 and herbicidal activity of Ha1 'pesta'granular formulation. Journal of Integrative Agriculture, 14(7): 1348-1355.

10. Macias, F. A., Molinillo, J. M., Varela, R. M., and Galindo, J. C. 2007. Allelopathy—a natural alternative for weed control. Pest Management Science: formerly Pesticide Science, 63(4): 327-348.

11. Mallik, M. A. B. 2001. Selective isolation and screening of soil microorganisms for metabolites with herbicidal potential. Journal of crop production, 4(2): 219-236.

12. Melander, B., Rasmussen, I. A., and Bàrberi, P. 2005. Integrating physical and cultural methods of weed control—examples from European research. Weed Science, 53(3): 369-381.

13.Weaver, M. A., Lyn, M. E., and Boyette, C. D., & Hoagland, R. E. 2007. Bioherbicides for weed control. Non-chemical weed management, 93-110.

Effect of emulsion of Ficus carica latex and olive oil on the survival of MKN-45 cells

Sara bakhshnia[1*]; Pooyan mehrabanjoubani[2]; poorya biparva[3]

1- Master student of Cellular and Molecular Biology, Department of Basic Sciences, Sari, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Mazandaran,

2-Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Mazandaran

3- Associate Professor, Department of Basic Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Mazandaran

**Corresponding author: sara.bakhshnia23@gmail.com*

Abstract

Subject: Cancer is a groupe of cells that is affected of various factors, lose their natural control over growth and differentiation and proliferate continuously. Gastric cancer has the first and highest prevalence of malignant tumors in East Asian countries. With changing conditions and declining quality of life, the number of cancer patients in the world is increasing every day to the point that today this disease is the second leading cause of death in the world in both men and women. Some plants contain the metabolites active compounds that have antioxidant and anti-cancer properties. The fig, known by the scientific name *Ficus carica*, is belongs to the family Moraceae. The fig fruits, seeds, bark, tender shoots and leaves are traditionally used in the treatment of many diseases such as jaundice and nutritional anemia and also used as a potent anti-inflammatory agent. Olives known as *Olea europaea* L., is an evergreen tree and belongs to the oleaceae family. Olive has antioxidant properties due to its phenolic compounds and can prevent cardiovascular diseases and various cancers, and also has an anti-inflammatory role. Olive oil is one of the healthy oils that nutritional and medicinal value has been proven to humans. The presence of bioactive compounds and monounsaturated fatty acids in olive oil is an important factor in reducing the risk of various cancers.
Objectives: this study was to evaluate the effects of different ratios of *Ficus carica* latex and olive oil on the survival of the human gastric cancer cell line MKN-45.
Material and methods: *Ficus carica* latex and olive oil were mixed in ratios of 100 and 0, 50 and 50, 0 and 100, respectively and then were treated at the concentrations of 0.25, 0.5 and 1 mg/ml from each on the gastric cancer cell line for 24 and 72 hours. At the end of the treatment, cell viability was assessed by MTT assay.
Results: The experiments showed that the reduction of cell survival was dependent on the concentration of the mixture of *Ficus carica* latex and olive oil. Increase the concentrations to 1 mg/ml induced cell apoptosis and had a more lethal effect on cells.

Keywords: Gastric cancer, MKN-45, MTT, Fig latex, Olives

بررسی اثر امولوسیون شیرابه انجیر و روغن زیتون بر زنده‌مانی سلول‌های MKN-45 معده

سارا بخش‌نیا[۳۰*]، پویان مهربان[۲]، پوریا بی پروا[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران

۲- استادیار گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران

۳- دانشیار گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران

*ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: sara.bakhshnia23@gmail.com

چکیده

موضوع: سرطان به جمعیتی از سلول‌ها گفته می‌شود که تحت تاثیر عوامل متعدد کنترل طبیعی خود را در رشد و تمایز از دست داده و بدون کنترل تکثیر می‌شوند. سرطان معده اولین و بیشترین فراوانی تومورهای بدخیم را در کشورهای آسیای شرقی دارد. با تغییر شرایط و کاهش کیفیت زندگی، تعداد بیماران سرطانی در دنیا هر روز در حال افزایش است تا جایی که امروزه این بیماری علت دوم مرگ و میر در جهان در هر دو جنس مردان و زنان محسوب می‌شود. گیاهان حاوی ترکیبات فعالی هستند که این ترکیبات دارای خواص آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی می‌باشند. Ficus carica L. یا انجیر گونه‌ای از خانواده moraceae است. میوه‌ها، دانه‌ها، پوست، شاخه‌های جوان و برگ‌های درخت انجیر در طب سنتی در درمان بسیاری از بیماری ها مانند یرقان و کم‌خونی استفاده و همچنین به عنوان یک عامل ضد التهابی قوی شناخته می‌شود. زیتون با نام علمی Olea europaea L.، درختی همیشه سبز و متعلق به خانواده oleaceae می‌باشد. زیتون به علت داشتن ترکیبات فنلی دارای خاصیت ضداکسیدانی است و می‌تواند از ایجاد بیماری‌های قلبی-عروقی و انواع سرطان‌ها جلوگیری‌کند و همچنین دارای نقش ضدالتهابی هم باشد. روغن زیتون از سالم‌ترین روغن‌های مایع است که ارزش غذایی و دارویی آن تا به امروز به بشر اثبات شده است. وجود ترکیبات فعال زیستی و اسیدهای چرب غیر اشباع تک زنجیره‌ای موجود در روغن زیتون از عوامل مهم کاهش خطرات ابتلا به انواع سرطان‌ها است.

اهداف مطالعه: این مطالعه با هدف بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره انجیر و زیتون بر زنده‌مانی سلول‌های MKN-45 به عنوان لاین سرطانی معده انجام شد.

روش تحقیق: شیرابه انجیر و روغن زیتون با نسبت‌های مختلف به ترتیب ۱۰۰ و ۰، ۵۰ و ۵۰ و ۰ و ۱۰۰ به صورت امولیسیون تهیه و سپس با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به مدت ۲۴ و ۷۲ ساعت بر روی سلول‌های MKN-45 اثر داده

30

شد و پس از اتمام مدت تیمار، میزان زنده‌مانی سلول‌ها با روش سنجش MTT مورد بررسی قرار گرفت. **نتایج:** آزمایشات انجام شده نشان داد که کاهش بقای سلولی، به غلظت عصاره وابسته است. به این صورت که عصاره‌ها با افزایش غلظت تا ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، سبب القای آپاپتوز سلولی شده و اثر کشندگی بیشتری بر سلول‌ها داشتند.

واژه‌های کلیدی: سرطان معده، MKN-45، MTT ، شیرابه انجیر، زیتون

۱. مقدمه

سرطان نوعی بیماری است که اغلب با برهم خوردن چرخه سلولی و از کنترل خارج شدن روند تکثیر سلول‌ها شروع شده و به تدریج با پیشرفت آن، متاستاز رخ می‌دهد و بافت‌های دیگر بدن هم درگیر می‌شوند که در این صورت احتمال مرگ‌ومیر ناشی از آن بسیار بالا خواهد بود. سرطان پس از بیماری‌های قلبی-عروقی، دومین عامل مهم مرگ‌ومیر در سراسر جهان است (Sudhakar, 2009). طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۱۸ حدود ۵/۹ ملیون مرگ یا یک در هر ۶ مورد مرگ در جهان مرتبط با سرطان بوده است (Ferlay et al., 2019). ایجاد سرطان در انسان روندی چند مرحله‌ای است که طی آن تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی در یک سلول رخ می‌دهدکه منجر به تغییر آن از حالت طبیعی به حالت جهش یافته می‌شود (Merlo, Pepper, Reid, & Maley, 2006). سرطان معده پنجمین سرطان رایج و سومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان است (Rawla and Barsouk 2019). برخی از اتفاقات درون سلولی از جمله فعال شدن چندین انکوژن یا غیرفعال شدن چندین ژن مهارکننده‌ی تومور و یا بیان نابه‌جای فاکتورهای رشد و گیرنده‌هایشان، منجر به حالت بدخیمی یا تهاجمی سرطان معده می‌شود (González et al., 2019). علاوه بر عامل ژنتیک، عوامل محیطی مختلف نظیر عفونت هلیکوباکترپیلوری و مصرف نمک و سیگار، از مهمترین دلایل ابتلا به سرطان معده هستند. امروزه شیمی درمانی به همراه جراحی از مهم‌ترین سازوکارهای درمان برای این نوع سرطان است (Sugano, 2019). از گذشته تاکنون، گیاهان دارویی، پایه و اساس اولیه سلامت را برای ۷۰ تا ۹۵ درصد جمعیت جهان در حال توسعه، تشکیل داده است. از این رو، گیاهان شفابخش دارویی باعث کاهش رنج انسان شده و به طور گسترده برای درمان‌های سنتی، مواد دارویی و تجارت مورد استفاده قرار گرفته‌اند. مطالعات نشان می‌دهد که استفاده از رژیم غذایی که در آن از گیاهان استفاده شده باشد، می‌تواند از ایجاد انواع سرطان جلوگیری کند (Pei et al.,2015). *Ficus carica* L. یک گونه‌ی آسیایی از گیاهان گلدار، از تیره‌ی Moraceae است که با نام انجیر شناخته می‌شود. انجیر به عنوان یک داروی بسیار مفید در درمان بیماری‌های قلبی‌وعروقی، تنفسی و به‌عنوان یک ماده‌ی ضداسپاسم و ضدالتهاب مورد استفاده قرار می‌گیرد (Patel et al., 2014). همچنین این گیاه دارای ترکیبات فلانوئیدی به نام لوتئولین[31] می‌باشد که دارای اثرات ضدسرطانی و ضدمتاستازی است (Lopez-Lazaro, 2009). *Olea europaea* L. از تیره‌ی Oleaceae و شامل بیست گونه در مناطق گرمسیری است. این گیاه با داشتن ترکیبات فنلی خاص، در جلوگیری و یا کاهش اثرات

[31] Luteolin

مضر فرآیندهای اکسیداتیو در بدن نقش دارد. یکی از ترکیبات فنلی موجود در زیتون که اثر ضداکسیدانی دارد هیدروکسی تیروزول[۳۲] است (Markovic et al., 2019). کافئیک اسید[۳۳] و اولئوروپین[۳۴] نیز از دیگر ترکیبات فنلی زیتون هستند که باعث کاهش تنش اکسیداتیو می‌شوند (Foscolou et al., 2018). روغن زیتون با داشتن آنتی اکسیدان‌های قوی نظیر پلی فنول‌ها و فلاونوئیدها[۳۵] (Pouliot and Kusuma 2013)، میوه‌ی آن با داشتن آنتوسیانین و برگ آن نیز با ترکیبات فنلی از بروز سرطان پیشگیری می‌کنند (Gonzalez et al., 2019).

۲. مواد و روش‌ها

برای جمع آوری شیرابه انجیر، ابتدا با شکستن ساقه درخت انجیر در فصل بهار شیرابه این گیاه به صورت قطره قطره جمع‌آوری و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. روغن زیتون استفاده شده در آزمایش به صورت تازه از مرکز تحقیقات زیتون رودبار تهیه شد. جهت مطالعه اثرات شیرابه انجیر و روغن زیتون، یکبار شیره انجیر بدون روغن زیتون، یکبار روغن زیتون بدون شیره انجیر و یکبار نیز ترکیب ۵۰٪ شیره انجیر و ۵۰٪ روغن زیتون به صورت امولیسیون تهیه و سپس با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به مدت ۲۴ و ۷۲ ساعت بر روی سلول‌های MKN-45 اثر داده شد. سلول‌های سرطانی معده از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری و با محیط RPMI 1640 در داخل چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. کیت MTT از شرکت بیوایده خریداری شد. جهت ارزیابی زنده مانی سلول‌ها با عصاره انجیر و روغن زیتون، مقدار ۹۰ میکرولیتر محیط کشت به همراه ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT به هر چاهک اضافه و جهت تبدیل MTT به فورمازان به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد. پس از ۴ ساعت مایع رویی به آرامی خارج و ۵۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه و جهت حل‌شدن کریستال‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت و سپس با استفاده از دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۶۳۰ نانومتر بررسی شد (Mosmann, 1983). به منظور رسم نمودارها و تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار Excel و SAS استفاده شد.

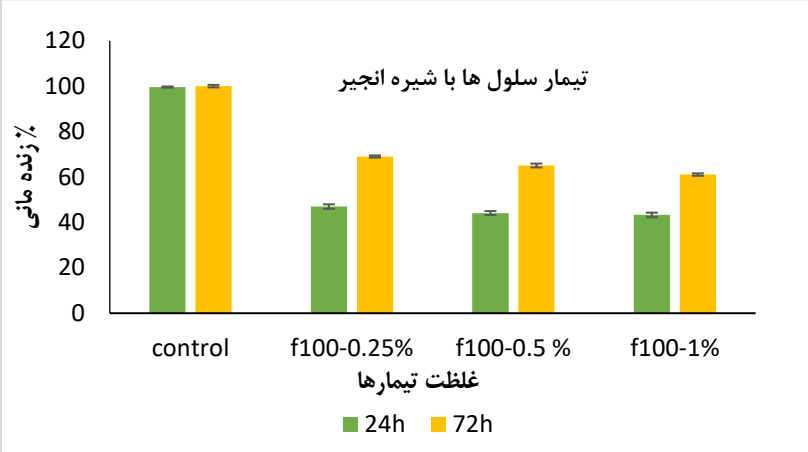
۳. نتایج و بحث

۳-۱-اثر کشندگی عصاره شیرابه انجیر و روغن زیتون بر سلول‌های MKN-45 به روش رنگ سنجی MTT

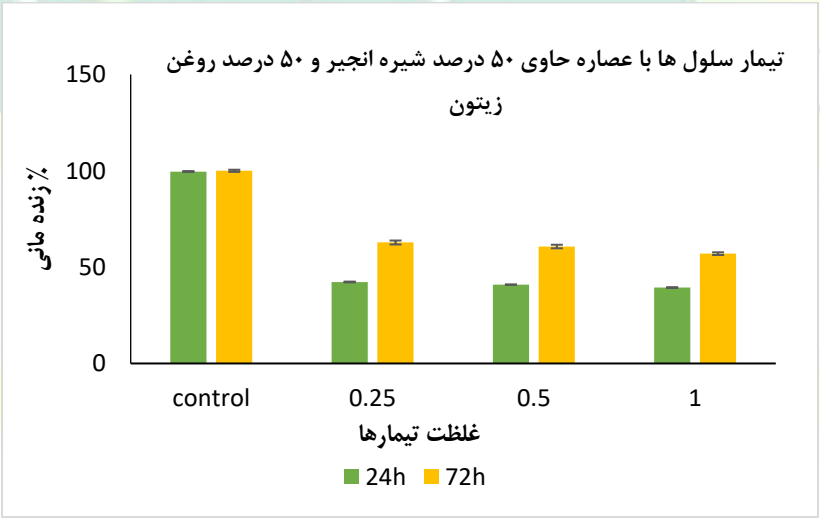
سلول‌ها در غیاب و با حضور غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از روغن زیتون، شیره انجیر و ترکیب این دو ماده به نسبت مساوی (۵۰٪ شیره انجیر و ۵۰٪ روغن زیتون) برای ۲۴ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. نتایج حاصل نشان داد که تیمار سلول-های mkn-45 درهر دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت در غلظت ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هر سه نسبت از عصاره‌ها شامل: شیره انجیر بدون روغن زیتون شکل (۱)، ترکیب مساوی از دو ماده شکل (۲) و تیمار روغن زیتون بدون شیره انجیر شکل (۳) زنده‌مانی بیشتری نسبت به غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر داشت. اما هر سه غلظت نسبت به تیمار شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بودند. طبق

[32] Hydroxytyrosol
[33] Caffeic acid
[34] Oleuropein
[35] Flavonoid

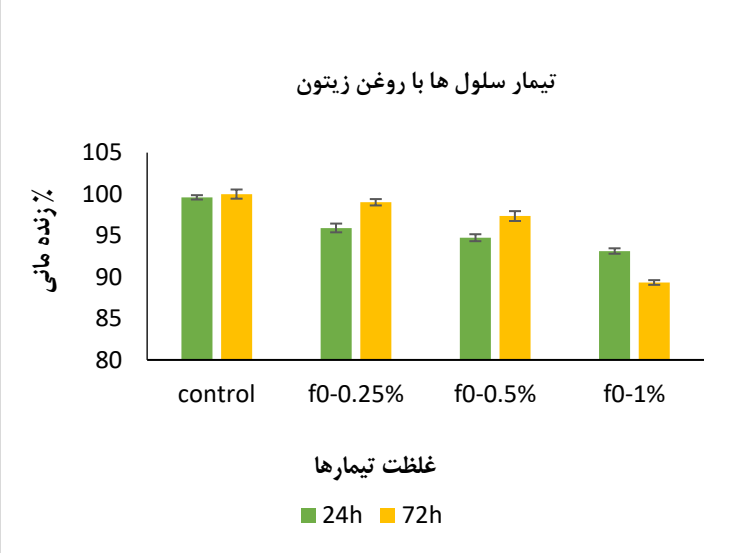
نتایج حاصل، تیمار ۲۴ ساعت اثر کشندگی بیشتری نسبت به تیمار ۷۲ ساعت داشت و نشان داد که عصاره پس از گذشت زمان مشخص اثر کشندگی خود را بر این سلول از دست داده است.



شکل ۱: اثرکشندگی عصاره ۱۰۰٪ شیره انجیر بر سلول‌های MKN-45 به روش رنگ سنجی MTT در مدت زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تیمار. میله‌های روی هریک از ستون‌ها نشان دهنده‌ی خطای استاندارد می‌باشند.



شکل ۳: اثرکشندگی عصاره ترکیب ۵۰٪ از شیره انجیر و ۵۰٪ روغن زیتون بر سلول‌های MKN-45 به روش رنگ سنجی MTT در مدت‌زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تیمار. میله‌های روی هریک از ستون‌ها نشان دهنده‌ی خطای استاندارد می‌باشند.



شکل ۳: اثرکشندگی عصاره ۱۰۰٪ روغن زیتون بر سلول‌های MKN-45 به روش رنگ سنجی MTT در مدت‌زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تیمار. میله‌های روی هریک از ستون‌ها نشان دهنده‌ی خطای استاندارد می‌باشند.

سرطان معده پنجمین سرطان شایع و سومین علت شایع مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان است. عوامل خطر این بیماری شامل عفونت هلیکوباکتر پیلوری، افزایش سن، مصرف زیاد نمک و رژیم غذایی نامناسب می‌باشد (Smyth, Nilsson, Grabsch, van Grieken, & Lordick, 2020). استفاده از گیاهان دارویی مختلف به جهت بهبود بیماری و کاهش عوارض ناشی از شیمی درمانی در بیماران مبتلا به سرطان معده مفید است (D. Zhang et al., 2017). هاشمی و همکاران با تیمار ۷۲ ساعته سلول‌های سرطانی معده با غلظت‌های مختلف از شیرایه انجیر، نشان دادند که شیرایه این گیاه بدون هیچ‌گونه تاثیر سایتوتوکسیک بر سلول‌های طبیعی بدن، می‌تواند تکثیر سلول‌های سرطانی را متوقف کند (S. Hashemi et al., 2011). شیرایه درخت انجیر در مقدارهای معین موجب مهار رشد سلول‌های سرطان مری می‌شود (S. A. Hashemi & Abediankenari, 2013). اولئوروپئین موجود در روغن زیتون از طریق القای آپاپتوز، بر سلول‌های رده‌MCF-7 سرطان سینه اثر کشندگی اعمال می‌کند. همچنین این ماده با به تاخیر انداختن چرخه سلولی در فاز S، مانع از تکثیر سلول‌ها می‌شود (Elamin et al., 2013). دوزهای معین از اولئوکانتال موجود در روغن زیتون رشد رده‌های MDA-MB-231 و MCF-7 سرطان سینه را مهار می‌کند در حالی که هیچ اثری بر سلول‌های نرمال رده MCF-10A بدن ندارد. این عملکرد با مهار مهاجرت و تهاجم سلول‌ها از طریق محاصره غشای سلولی و کاهش تحرک سلول‌ها رخ می‌دهد (Akl et al., 2014). در این پژوهش با توجه به مطالعات پیشین و با استفاده از روش MTT زنده ماندن سلول‌ها را به طورکمی تخمین زده شد. نتایج حاصل از میزان کشندگی عصاره شیرایه انجیر و روغن زیتون در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روی سلول‌های سرطان معده (MKN-45) نشان داد این عصاره میزان بقای سلول‌های سرطانی را کاهش داد.

۴. نتیجه گیری

با توجه به اینکه امروزه تحقیقات بر روی عملکرد اختصاصی داروها بر سلول‌های سرطانی بدون داشتن اثرات کشندگی بر سایر سلول‌ها متمرکز شده است بنابراین اثر گزاری شیرابه انجیر و روغن زیتون بر کشندگی سلول‌های سرطانی این امید را ایجاد می‌کند که در آینده این گیاهان می‌توانند به منظور از بین بردن مستقیم سلول‌های توموری مورد استفاده قرار گیرند.

منابع

1. Badgujar, S. B., Patel, V. V., Bandivdekar, A. H., & Mahajan, R. T. (2014). Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of Ficus carica: A review. Pharmaceutical biology, 52(11), 1487-1503.
2. Bonam, S. R., Wu, Y. S., Tunki, L., Chellian, R., Halmuthur, M. S. K., Muller, S., & Pandy, V. (2018). What has come out from phytomedicines and herbal edibles for the treatment of cancer? ChemMedChem, 13(18), 1854-1872.
3. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D., Piñeros, M., . . . Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. International journal of cancer, 144(8), 1941-1953.
4. Foscolou, A., Critselis, E., & Panagiotakos, D. (2018). Olive oil consumption and human health: A narrative review. Maturitas, 118, 60-66.
5. González, E., Gómez-Caravaca, A. M., Giménez, B., Cebrián, R., Maqueda, M., Martínez-Férez, A., . . . Robert, P. (2019). Evolution of the phenolic compounds profile of olive leaf extract encapsulated by spray-drying during in vitro gastrointestinal digestion. Food chemistry, 279, 40-48.
6. Karković Markovic, A., Torić, J., Barbarić, M., & Jakobušić Brala, C. (2019). Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health. Molecules, 24(10), 2001.
7. López-Lázaro, M. (2009). Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. Mini reviews in medicinal chemistry, 9(1), 31-59.
8. Merlo, L. M., Pepper, J. W., Reid, B. J., & Maley, C. C. (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. Nature reviews cancer, 6(12), 924-935.
9. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, 65(1-2), 55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
10. Pei, S., Yang, X., Wang, H., Zhang, H., Zhou, B., Zhang, D., & Lin, D. (2015). Plantamajoside, a potential anti-tumor herbal medicine inhibits breast cancer growth and pulmonary metastasis by decreasing the activity of matrix metalloproteinase-9 and-2. BMC cancer, 15(1), 1-12.
11. Pouliot, N., & Kusuma, N. (2013). Laminin-511: a multi-functional adhesion protein regulating cell migration, tumor invasion and metastasis. Cell adhesion & migration, 7(1), 142-149.
12. Rawla, P., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. Przeglad gastroenterologiczny, 14(1), 26.
13. Sudhakar, A. (2009). History of cancer, ancient and modern treatment methods. Journal of cancer science & therapy, 1(2), 1.
14. Sugano, K. (2019). Effect of Helicobacter pylori eradication on the incidence of gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. Gastric cancer, 22(3), 435-445.

In vitro study of the interaction of Aripiprazole drug with bovine serum albumin

Saba Hadidi*

Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Chemistry, Razi University, Kermanshah, Iran

s.hadidi@razi.ac.ir

Abstract

The aim of this study was to evaluate the interaction of Aripiprazole (Arp) with bovine serum albumin (BSA) under physiological conditions (pH 7.4, ionic strength 0.1 M). Binding of drugs to plasma proteins, including albumin, is a critical factor that affects the distribution, metabolism, and biological activity of drugs in the body. A combination of spectroscopy and molecular docking simulation techniques was used to understand the molecular mechanism of drug-protein interaction. The results of UV-Vis spectroscopy showed that Arp interacts with BSA to form a new drug-protein complex in the ground state. The binding constant value of 2.06×10^{7} M^{-1} indicates the high affinity of Arp for interaction with BSA. Analysis of fluorescence spectra showed that with increasing drug concentration, the fluorescence emission intensity of BSA at $\lambda = 346$ nm decreases and fluorescence quenching occurs through a static mechanism. The results of molecular docking simulation confirmed binding of Aripiprazole to the site II of BSA by hydrophobic interaction.

Keywords: Drug-protein interaction, Steady state complex, Hydrophobic forces

مطالعه برون‌تنی برهمکنش داروی Aripiprazole با آلبومین سرم گاوی

صبا حدیدی*

استادیار گروه شیمی معدنی، دانشکده شیمی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

s.hadidi@razi.ac.ir

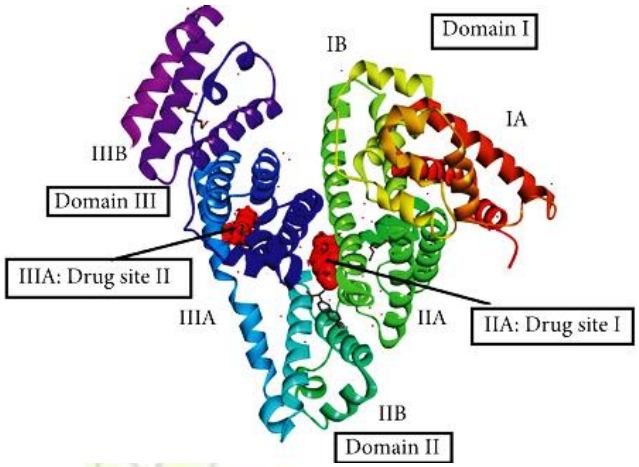
چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی تعامل داروی Aripiprazole (Arp) با آلبومین سرم گاوی (BSA) تحت شرایط فیزیولوژیک (pH 7.4, ionic strength 0.1 M) طراحی شده است. اتصال داروها به پروتئین‌های پلاسما از جمله آلبومین عاملی حیاتی است که بر توزیع، متابولیسم و فعالیت زیستی داروها در بدن تأثیر می‌گذارد. برای درک مکانیسم مولکولی برهمکنش دارو با پروتئین مجموعه‌ای از تکنیک‌های طیف‌سنجی و شبیه‌سازی داکینگ مولکولی به کار برده شد. نتایج طیف‌سنجی UV-Vis ثابت کرد Arp با BSA برای تشکیل یک کمپلکس جدید دارو-پروتئین در حالت پایه برهمکنش دارد. مقدار ثابت اتصال 2.06×10^{7} M^{-1} نشان‌دهنده میل ترکیبی بالای داروی Arp برای برهمکنش با BSA است. تجزیه و تحلیل طیف فلورسانس نشان داد با افزایش غلظت دارو از شدت بند نشری BSA در $\lambda=346$ نانومتر کاسته شده و خاموشی فلورسانس از طریق یک مکانیسم استاتیک رخ می‌دهد. نتایج شبیه‌سازی داکینگ مولکولی قراگیری دارو در سایت II سرم آلبومین به وسیله نیروهای هیدروفوبیک را تایید کرد.

واژگان کلیدی: برهمکنش دارو-پروتئین، کمپلکس حالت پایه، نیروهای هیدروفوبیک

۱. مقدمه

آلبومین سرم یکی از فراوان‌ترین و مهم‌ترین پروتئین‌های پلاسمای خون است که نقش مهمی در حفظ pH پلاسما، تنظیم فشار اسمزی و همچنین انتقال متابولیت‌ها، اسیدهای چرب، هورمون‌ها و داروها در سیستم گردش خون دارد(Makarska-Bialokoz and Lipke, 2019) . آلبومین سرم گاوی (BSA) پروتئینی کروی و تک رشته‌ای است که از ۵۸۲ آمینواسید با ۱۷ پیوند دی‌سولفید تشکیل شده است. تجزیه و تحلیل ساختار کریستالی نشان می‌دهد که این پروتئین دارای ۳ دومین (I، II، III) که هریک به ۲ زیردومین A و B تقسیم می‌شود، می‌باشد. این پروتئین دارای دو اسید آمینه تریپتوفان است که در دو دومین مختلف جاسازی شده‌اند: Trp-134، در سطح دومین I و Trp-213، واقع در پاکت آبگریز دومین II (شکل ۱) (Shahabadi and Hadidi, 2014) . BSA به دلیل پایداری، هزینه کم، ویژگی‌های منحصر به فرد تعامل با لیگاند و به ویژه همسانی ساختاری با آلبومین سرم انسانی (HSA) در بررسی برهمکنش با لیگاندها به عنوان یک پروتئین مدل به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است (Khatun and Riyazuddeen, 2018; Wani, et al., 2018; Yousuf, et al., 2019). شناخت جایگاه‌های اتصال لیگاند به پروتئین کمک مهمی به مطالعه برهمکنش سرم آلبومین با ترکیباتی که به وسیله این بیومولکول در خون جابه‌جا می‌شوند، می‌کند.

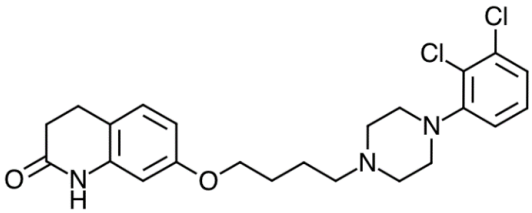


شکل ۱: ساختار سه بعدی آلبومین سرم گاوی

Sudlow و همکارانش که در دهه ۷۰ میلادی به مطالعات آزمایشگاهی برهمکنش داروها با سرم آلبومین می‌پرداختند، دو جایگاه مهم اتصال به نام‌های Sudlow-site I و II را کشف کردند (Sudlow, et al.1975, 1976) . جایگاه اتصال I مخصوص اتصال به آنیون‌های دارای ساختار حلقه‌ای ناهمگن با بار خنثی و جایگاه II مخصوص اتصال به کربوکسیلات‌های دارای حلقه آروماتیکی است. همچنین بر پایه اتصال داروهای وارفارین و ایبوپروفن این جایگاه‌ها به ترتیب جایگاه اتصال وارفارین (Warfarin site) و جایگاه اتصال ایبوپروفن (Ibuprofen site) نیز شناخته می‌شوند.

میزان تمایل اتصال یک دارو به پروتئین‌های پلاسما به دلیل تاثیر بر فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک دارو بسیار حائز اهمیت می‌باشد. میزان و نحوه اتصال یک دارو به آلبومین می‌تواند منجر به تداخل دارو با ترکیبات اندوژن، اگزوژن و یا سایر داروها و در نتیجه بروز تغییرات در طول مدت اثر، متابولیسم و غلظت آزاد دارو در پلاسما گردد. اتصال ضعیف یک دارو به پروتئین باعث می‌شود تا مقدار بیشتری از دارو به صورت آزاد وجود داشته باشد، در حالی که اتصال محکم دارو منجر به کاهش غلظت آزاد دارو در خون و در نتیجه کم شدن دوز مؤثر تجویز شده آن خواهد شد. به همین دلیل، بررسی مکانیسم برهمکنش لیگاندهای دارویی مختلف با آلبومین سرم خون به عنوان یک زمینه تحقیقاتی مهم و کاربردی در علوم زیستی و دارویی مطرح بوده و پژوهش‌های قابل توجهی را به خود اختصاص داده است (Sedyakina, et al., 2020; Shamsi et al., 2020; B.-L. Wang, et al., (2020.

Aripiprazole (شکل ۲) یک داروی ضد روان پریشی است که عملکرد مواد شیمیایی مغز را تغییر داده و به ایجاد تعادل روانی فرد کمک می‌کند. این دارو برای درمان اسکیزوفرنی و حملات حاد پانیک همراه با اختلال دو قطبی تجویز می‌شود (Coustals et al.,2021).



شکل ۲: ساختار شیمیایی داروی Aripiprazole

از آنجایی‌که مطالعه عملکرد داروها در سطح مولکولی، نیازمند تفسیر مکانیسم برهمکنش دارو با پروتئین است و آلبومین همواره یک پروتئین الگو برای روشن‌سازی این نوع از برهمکنش‌ها بوده است و علی‌رغم اینکه اطلاعات فارمالوژیکی بسیاری برای Aripiprazole وجود دارد هنوز مکانیسم برهمکنش آن با آلبومین سرم مورد بررسی قرار نگرفته است. بنابراین انجام این کار می‌تواند در بررسی توزیع دارویی و برهمکنش‌های Aripiprazole بسیار مهم باشد.

برهمکنش‌های مربوط به مولکول‌های بیولوژیک اگر در شرایط فیزیولوژیک توصیف شوند، به بهترین وجه قابل درک هستند. در حال حاضر تکنیک‌های مختلفی برای به دست آوردن این اطلاعات موجود است. فلورسانس و طیف‌سنجی جذبی به دلیل حساسیت، تکرارپذیری و راحتی، تکنیک‌های موثری برای مطالعه برهم‌کنش‌های لیگاند با پروتئین هستند. این تکنیک‌ها می‌توانند میل پیوند مولکول‌های کوچک به پروتئین‌ها را آشکار کنند و به درک مکانیسم‌های اتصال آنها کمک کنند. به دلیل اینکه هیچ گزارش طیف‌سنجی در مورد برهمکنش داروی Aripiprazole با BSA وجود ندارد. بنابراین، ما در این مقاله به بررسی برون‌تنی برهمکنش این دارو با BSA به کمک روش‌های طیف‌سنجی و شبیه‌سازی مولکولی پرداختیم.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

مواد مورد استفاده در برهمکنش داروی Aripiprazole با BSA، از جمله دارو، بافر، پروتئین و سایر مواد شیمیایی، به صورت تجاری در دسترس بودند و بدون خالص‌سازی استفاده شدند. بافر فسفات و سایر محلول‌های آبی با استفاده از آب دوبار تقطیر تهیه شدند. محلول BSA با غلظت ۱×۱۰^{-۴} مولار در بافر فسفات ۰.۱ مولار (pH 7.4) تهیه و در تاریکی در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. محلول استوک دارو با غلظت ۱×۱۰^{-۲} مولار از حل کردن پودر آن در بافر فسفات تهیه شد.

۲-۲-طیف‌سنجی UV-Visible

طیف جذبی با استفاده از اسپکتروفتومتر Nordantec T80 با استفاده از سل کوارتز ۱.۰ سانتی‌متری در محدوده ۳۵۰-۲۰۰ نانومتر ثبت شد. آزمایش جذب با ثابت نگه‌داشتن غلظت BSA (۱×۱۰^{-۶} مولار) و تغییر غلظت دارو انجام شد. مقادیر جذب پس از افزودن دارو و به تعادل رسیدن سیستم ثبت شد. به منظور حذف اثر جذب دارو مقادیر یکسانی از محلول استوک Arp به هر دو سل نمونه و شاهد اضافه گردید.

۳-۲- طیف‌سنجی فلورسانس

طیف فلورسانس با اسپکتروفلوریمتر JASCO FP 6200 مجهز به لامپ زنون uxl-159 و سل کوارتز (۱.۰ سانتی‌متر) ثبت شد.. اندازه‌گیری فلورسانس در غلظت ثابتی از پروتئین (۴.۹×۱۰^{-۷} مولار) و غلظت‌های متفاوتی از دارو (۰ تا ۲.۶×۱۰^{-۷} مولار) در دمای محیط در گستره طول موجی ۳۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر با طول موج برانگیختگی ۲۹۵ نانومتر انجام شد.

۴-۲- شبیه‌سازی داکینگ مولکولی

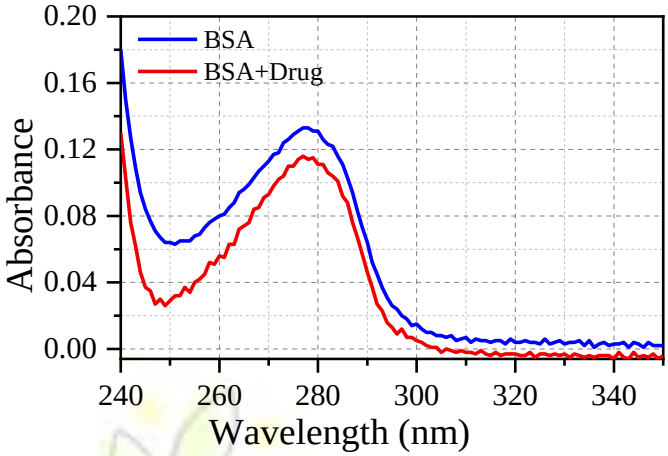
ساختار سه بعدی دارو (ChemSpider ID: 54790) از پایگاه داده ChemSpider (http://www.chemspider.com) به دست آمد. ساختار سه بعدی BSA با شناسه 3V03 از بانک اطلاعات پروتئین (Protein data bank) دانلود شد. قبل از شبیه‌سازی مولکول‌های آب، یون‌ها و لیگاند با استفاده از نرم‌افزار BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2021 از ساختار مولکول مدل حذف شد. سایت اتصال دارو بر روی پروتئین با استفاده AutoDock Vina نسخه ۱.۱.۲ محاسبه شد. BSA در جعبه‌ای با تعدد نقاط x، y و z به ابعاد ۹۴، ۵۸ و ۷۲ و جعبه شبکه مرکزی ۴۰.۱۶۸، ۲۴.۵۵ و ۳۴.۹۳۳ با فاصله شبکه 1.0 انگستروم محصور شد. بهترین کنفورمور از لحاظ انرژی از میان ۵۰۰ کنفورمور استخراج شد. BIOVIA Discovery Studio Visualizer برای تجزیه و تحلیل خروجی شبیه‌سازی داکینگ مولکولی مورد استفاده قرار گرفت.

۳. نتایج و بحث

۱-۳- طیف‌سنجی UV-Vis

طیف‌سنجی جذبی یک روش ساده اما مؤثر در تشخیص تغییرات ساختاری پروتئین‌ها و تشکیل کمپلکس دارو-پروتئین است. BSA دو پیک جذبی در طول موج‌های ۲۱۰ و ۲۸۰ نانومتر دارد. جذب قوی BSA در ۲۱۰ نانومتر ناشی از انتقالات $\pi\rightarrow\pi^*$ گروه کربوکسیل زنجیره پلی‌پپتیدی است و به تغییرات ساختاری (مارپیچ-کویل) این زنجیره مرتبط می‌شود. و بند جذبی در ۲۸۰ نانومتر مربوط به قطبیت محیط اطراف باقیمانده‌های تیروزین و تریپتوفان است (Shahabadi and Hadidi, 2015).

به منظور کسب اطلاعات در مورد برهمکنش داروی Aripiprazole با BSA، طیف جذبی BSA در غیاب و حضور دارو ثبت و در شکل ۳ ارائه شده است. واضح است که با افزایش مقدار دارو به محلول BSA، شدت پیک جذبی BSA در ۲۸۰ نانومتر کاهش یافته است. این مشاهدات نشان می‌دهد که برهمکنش دارو با BSA ممکن است باعث تغییرات ساختاری در پروتئین و تغییر قطبیت محیط اطراف باقیمانده‌های تیروزین و تریپتوفان شود. همچنین، این نتایج تأیید می‌کند که دارو با BSA برای تشکیل یک کمپلکس در حالت پایه تعامل داشته است (Liu et al., 2010).

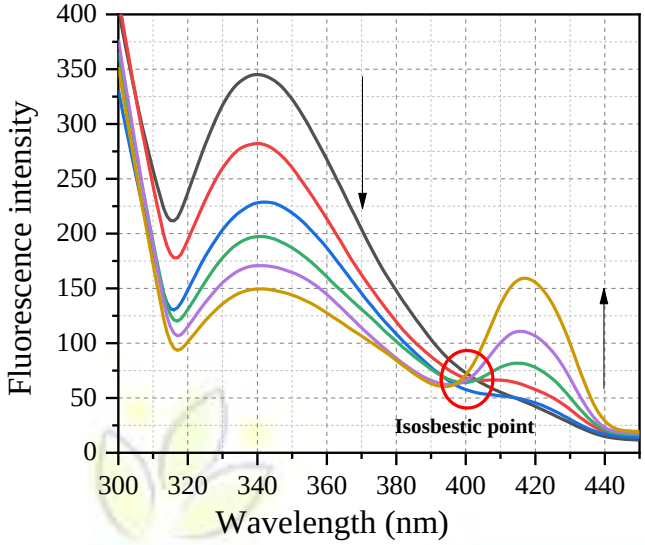


شکل ۳: طیف جذبی BSA (۱×۱۰^{-۶} مولار) در غیاب و حضور دارو (۵.۲×۱۰^{-۸} مولار) در بافر فسفات ۰.۱ مولار (pH 7.4) و دمای محیط

۳-۲- طیف‌سنجی فلورسانس

BSA دارای سه فلوروفور ذاتی است: تریپتوفان، تیروزین و فنیل آلانین. از آنجاییکه فنیل آلانین بازده کوانتومی بسیار پایینی دارد و فلورسانس تیروزین اگر یونیزه شود، یا در نزدیکی یک گروه آمین، یک گروه کربوکسیل، یا یک تریپتوفان قرار داشته باشد تقریباً به طور کامل خاموش می‌شود، در نتیجه فلورسانس ذاتی BSA به دو تریپتوفان 213 و 134 نسبت داده می‌شود (Starosta et al., 2020). یکی از ویژگی‌های مفید فلورسانس ذاتی پروتئین‌ها، حساسیت بالای تریپتوفان و محیط اطراف آن است. برخی از مولکول‌های کوچک می‌توانند محیط باقی‌مانده‌های تریپتوفان را تغییر دهند، که در پی آن تغییراتی در شدت فلورسانس پروتئین ایجاد می‌شود. تغییرات در طیف نشری تریپتوفان در پاسخ به انتقال ساختاری پروتئین، تجمع زیردومین‌ها، اتصال لیگاند یا دناتوره شدن پروتئین رایج است (Sharma et al., 2021).

طیف نشری BSA در غیاب و حضور دارو در شکل ۴ نشان داده شده است. همانطور که در شکل دیده می‌شود، شدت فلورسانس BSA با افزایش غلظت دارو به طور قابل توجهی کاهش یافت. این تغییرات طیفی تایید می‌کند که دارو با BSA تعامل دارد و شدت فلورسانس آن را خاموش می‌کند. همچنین مشاهده یک نقطه ایزوبستیک در طیف BSA را می‌توان نشانه‌ای از حضور دو گونه در حالت تعادل در محلول در نظر گرفت.



شکل ۴: طیف نشری BSA (۱۰-۷×۴.۹ مولار) در غیاب و حضور دارو (۰ تا ۱۰-۷×۲.۶ مولار) در بافر فسفات ۰.۱ مولار (pH 7.4) و دمای محیط

۳-۳- بررسی مکانیسم خاموشی فلورسانس

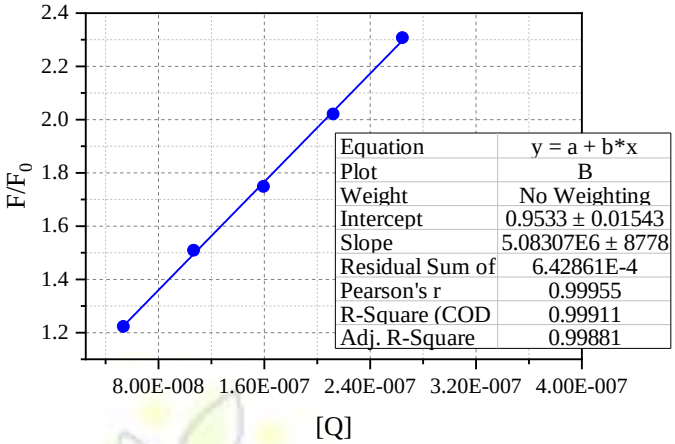
هر فرآیندی که شدت بند نشری یک ماده را کاهش دهد، خاموشی فلورسانس نامیده می‌شود. خاموشی فلورسانس با مکانیسم‌های مختلف رخ می‌دهد که به طور کلی به دو دسته خاموشی دینامیک و خاموشی استاتیک تقسیم می‌شود. تشکیل یک کمپلکس در حالت پایه بین نشردهنده و خاموش‌کننده باعث خاموشی استاتیک می‌شود، در حالی که خاموشی دینامیک توسط فرآیندی ایجاد می‌شود که در آن نشردهنده و خاموش‌کننده در حالت برانگیخته با هم تماس پیدا کردند (Grigoryan et al., 2020).

معادله استرن-ولمر (معادله ۱) برای بررسی مکانیسم خاموشی BSA در حضور مقادیر افزاینده دارو استفاده شد (Lakowicz, 1999):

$$F_0/F = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_{sv}[Q] \qquad (1)$$

که در آن F_0 شدت فلورسانس در غیاب خاموش‌کننده، F شدت فلورسانس در حضور خاموش‌کننده، Kq ثابت سرعت خاموشی، K_{SV} ثابت استرن-ولمر، τ_0 طول عمر حالت برانگیخته و [Q] غلظت خاموش‌کننده می‌باشد.

نمودار معادله استرن-ولمر در دمای اتاق در شکل ۵ نشان داده شده است. برای خاموشی دینامیک، حداکثر ثابت سرعت خاموشی در خاموش کننده‌های مختلف 2×10^{10} L mol^{-1}s^{-1} است. Kq بسیار بزرگتر (5.08×10^{14} L mol^{-1}s^{-1}) در فرایند برهمکنش داروی Aripiprazole با BSA نشان می‌دهد خاموشی فلورسانس پروتئین از طریق یک مکانیسم استاتیک (تشکیل کمپلکس دارو-پروتئین در حالت پایه) رخ می‌دهد.



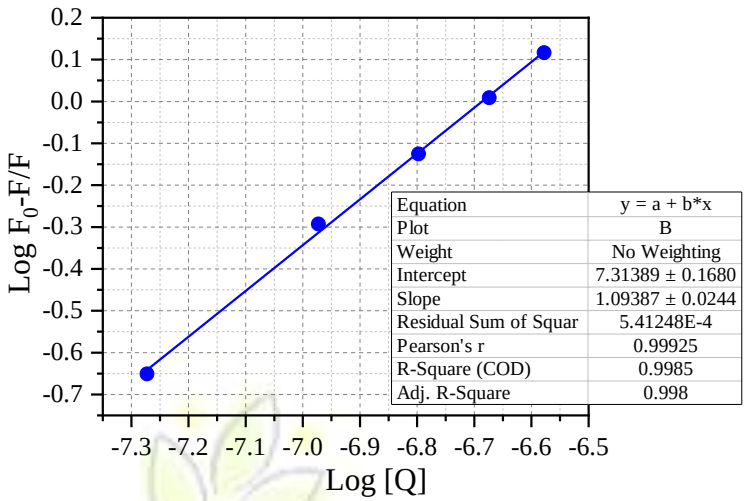
شکل ۵: نمودار استرن-ولمر برهمکنش دارو با BSA

۳.۴. تعیین پارامترهای تمایل اتصال دارو به پروتئین

معادله لگاریتمی Hill (معادله ۲) به منظور تعیین کمی ثابت اتصال (K_b) و ضریب Hill (n) برای برهمکنش دارو با BSA مورد استفاده قرار گرفت و نتایج در شکل ۶ نشان داده شد (Wang et al., 2008):

$$Log\frac{(F_0 - F)}{F} = LogK_b + nLog[Q] \qquad (2)$$

در اینجا F_0 و F شدت فلورسانس BSA در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف دارو [Q] است، K_b (ثابت اتصال) بیانگر میل اتصال دارو به پروتئین و n ضریب همکاری Hill برای توصیف همکاری سایت‌های اتصال BSA برای قرارگیری دارو در این جایگاه‌ها است. مقدار عددی ثابت اتصال (2.06×10^7 M^{-1}) نشان‌دهنده میل بالای دارو برای اتصال به BSA است. همچنین، مقدار n تقریباً برابر با ۱ است، که نشان می‌دهد که یک کمپلکس جدید دارو-پروتئین به نسبت مولی ۱:۱ بین این دو گونه تشکیل شده است.



شکل ۶: نمودار معادله Hill برهمکنش دارو با BSA

۳.۵.. شبیه‌سازی داکینگ مولکولی

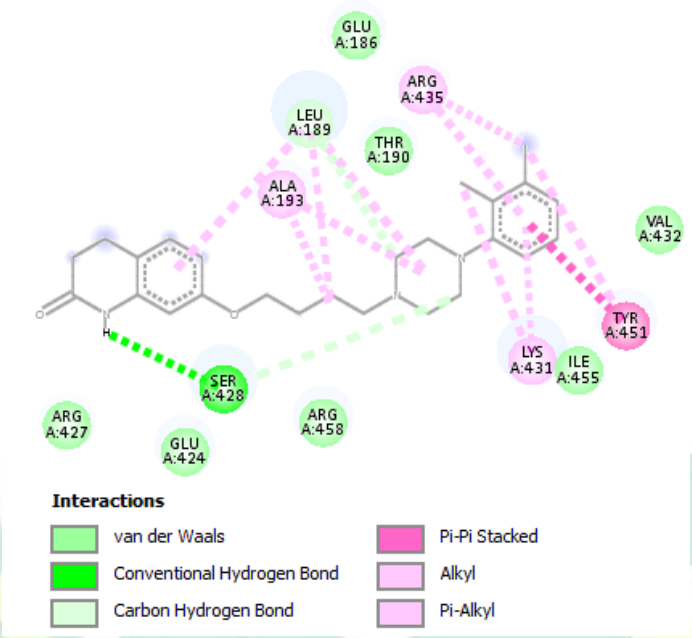
به منظور تعیین جایگاه اتصال دارو به BSA شبیه‌سازی داکینگ مولکولی انجام شد و کنفورمری با کمترین RMSD و بهترین انرژی (۷.۶- کیلوکالری بر مول) از بین ۲۰ ساختار از تعداد کل ۵۰۰ شبیه‌سازی انتخاب شد (جدول ۱). همانطور که در شکل ۷ قابل مشاهده است، دارو به سایت II پروتئین متصل شده است.



شکل ۷: شبیه سازی داکینگ مولکولی برهمکنش داروی Aripiprazole با BSA

در شکل ۸ آمینواسیدها و نیروهای اصلی در برهمکنش دارو با BSA قابل مشاهده است. برهمکنش های Alkyl، Pi-Alkyl و Pi-Pi stacking با باقی‌مانده‌های Leu189، Ala193، Arg435، Lys431 و Tyr451 نقش اصلی را در اتصال دارو به پروتئین بر عهده داشته‌اند. همچنین تشکیل یک پیوند هیدروژنی بین گروه NH– دارو با اسید آمینه Ser428 باعث پایداری کمپلکس دارو-پروتئین

شده است. دارو از طریق برهمکنش‌های واندوالس با اسید آمینه‌های Glu186، Thr190، Glu424، Arg427، Val432، Ile455 و Arg458 در ارتباط است.



شکل ۷: اسید آمینه‌ها و نیروهای اصلی در برهمکنش داروی Aripiprazole با BSA

جدول ۱: انرژی‌های اتصال کنفورمرهای مختلف دارو به BSA به دست آمده با شبیه‌سازی داکینگ مولکولی با استفاده از Lamarkian Genetic Algorithm

Mode	Affinity (Kcal/mol)	Dist. from rmsd 1.b.	Best mode rmsd u.b.
1	-7.6	0.000	0.000
2	-7.5	4.562	8.989
3	-7.4	4.360	8.039
4	-7.3	4.297	8.052
5	-7.3	3.587	5.167
6	-7.1	1.510	2.370
7	-6.9	5.197	9.820
8	-6.8	5.110	8.112
9	-6.7	2.337	3.104
10	-6.6	5.274	8.538
11	-6.5	7.113	10.420
12	-6.5	17.428	21.198
13	-6.3	7.294	10.867
14	-6.3	15.303	16.670

15	-6.2	14.569	18.271
16	-6.1	16.428	17.682
17	-6.1	9.277	11.284
18	-6.0	14.922	18.627
19	-5.9	16.042	18.206
20	-5.8	4.117	5.686

۴. نتیجه‌گیری

در این مطالعه، برهمکنش داروی Aripiprazole با BSA در محیط آزمایشگاهی تحت شرایط فیزیولوژیکی شبیه‌سازی شده (pH 7.4، قدرت یونی ۰.۱ مولار) با استفاده از تکنیک‌های طیف‌سنجی و شبیه‌سازی داکینگ مولکولی بررسی شد. نتایج طیف‌سنجی جذبی نشان داد که دارو برای تشکیل یک کمپلکس حالت پایه با BSA برهمکنش دارد و احتمالا این برهمکنش باعث تغییر در قطبیت محیط اطراف اسیدآمینه‌های تریپتوفان نیز خواهد شد. داده‌های طیف‌سنجی فلورسانس نشان داد که مکانیسم احتمالی برهمکنش دارو با BSA یک فرآیند خاموشی استاتیک است. همچنین، توانایی اتصال قابل توجه به BSA (K_b: 2.06×10^7 M^{-1}) برای دارو در یک کمپلکس ۱:۱ از تجزیه و تحلیل داده‌های فلورسانس به دست آمد. نتایج شبیه‌سازی داکینگ مولکولی ثابت کرد دارو به سایت II پروتئین متصل می‌شود و نیروهای هیدروفوبیک نقش اصلی را در فرایند برهمکنش ایفا می‌کنند. از آنجایی که درک اساس مولکولی برهمکنش دارو و پروتئین در طراحی عوامل درمانی جدید برای بهبود فعالیت دارویی مهم است، ما امیدواریم که نتایج حاصل از این مطالعه اطلاعات مفیدی برای درک رابطه ساختار و فعالیت در فرایند برهکنش این دارو با BSA به منظور طراحی داروهای بهبود یافته جدید ارائه کرده باشد.

منابع

۱-Coustals N., Ménard M.-L. and Cohen D. 2021. Aripiprazole in children and adolescents. Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology, 31(1): 4-32.

2- Grigoryan K., Shilajyan H. and Hovhannisyan V. 2020. Bovine Serum Albumin Fluorescence Quenching by Tannic Acid in Dimethylsulfoxide Containing Solutions. Proceedings of the YSU B: Chemical and Biological Sciences, 54(2 (252)): 99-104.

3- Khatun S. and Riyazuddeen. 2018. Interaction of colchicine with BSA: spectroscopic, calorimetric and molecular modeling approaches. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 36(12): 3122-3129.

4- Lakowicz J. 1999. Kluwer, Principles of Fluorescence Spectroscopy. Academic Plenum Publishers.

5- Liu B., Xue C., Wang J., Yan, C., Zhao F. and Lv Y. 2010. Study on the competitive reaction between bovine serum albumin and neomycin with ponceau S as fluorescence probe. Journal of Luminescence, 130(11): 1999-2003.

6- Makarska-Bialokoz M. and Lipke A. 2019. Study of the binding interactions between uric acid and bovine serum albumin using multiple spectroscopic techniques. Journal of Molecular Liquids, 276: 595-604.

7- Sedyakina N., Kuskov A., Velonia K., Feldman N., Lutsenko S. and Avramenko G. 2020. Modulation of Entrapment Efficiency and In Vitro Release Properties of BSA-Loaded Chitosan Microparticles Cross-Linked with Citric Acid as a Potential Protein–Drug Delivery System. Materials, 13(8): 1989.

8- Shahabadi N. and Hadidi S. 2014. Molecular modeling and spectroscopic studies on the interaction of the chiral drug venlafaxine hydrochloride with bovine serum albumin. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 122: 100-106.

9- Shahabadi N. and Hadidi S. 2015. Mechanistic and conformational studies on the interaction of a platinum(II) complex containing an antiepileptic drug, levetiracetam, with bovine serum albumin by optical spectroscopic techniques in aqueous solution. Applied biochemistry and biotechnology, 175(4): 1843-1857.
10- Shamsi A., Mohammad T., Anwar S., Alajmi M.F., Hussain A., Hassan M.I. and Islam A. 2020. Probing the interaction of Rivastigmine Tartrate, an important Alzheimer's drug, with serum albumin: Attempting treatment of Alzheimer's disease. International journal of biological macromolecules, 148: 533-542.
11- Sharma A.D., Kaur I. and Singh N. 2021. Tryptophan fluorescence spectroscopy: key tool to study protein denaturation/anti-inflammatory assay. Research and Reviews in Biotechnology and Biosciences, 8: 90-94.
12- Starosta R., Santos F.C. and de Almeida R.F. 2020. Human and bovine serum albumin time-resolved fluorescence: Tryptophan and tyrosine contributions, effect of DMSO and rotational diffusion. Journal of Molecular Structure, 1221: 128805.
13- Sudlow G., Birkett D. and Wade D. 1975. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. Molecular pharmacology, 11(6): 824-832.
14- Sudlow G., Birkett D. and Wade D. 1976. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. Molecular pharmacology, 12(6): 1052-1061.
15- Wang B.L., Kou S.B., Lin Z.Y. and Shi J.H. 2020. Investigation on the binding behavior between BSA and lenvatinib with the help of various spectroscopic and in silico methods. Journal of Molecular Structure, 1204: 127521.
16- Wang Y.Q., Zhang H.M., Zhang G.C., Zhou Q.H., Fei Z.H., Liu Z.T. and Li Z.X. 2008. Fluorescence spectroscopic investigation of the interaction between benzidine and bovine hemoglobin. Journal of Molecular Structure, 886(1-3): 77-84.
17- Wani T.A., Bakheit A.H., Abounassif M. and Zargar S. 2018. Study of interactions of an anticancer drug neratinib with bovine serum albumin: spectroscopic and molecular docking approach. Frontiers in chemistry, 6: 47.
18- Yousuf I., Bashir M., Arjmand F. and Tabassum S. 2019. Multispectroscopic insight, morphological analysis and molecular docking studies of CuII-based chemotherapeutic drug entity with human serum albumin (HSA) and bovine serum albumin (BSA). Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 37(12): 3290-3304.

Investigation the effect Fe^{3+} ion on the interaction of codeine phosphate drug with calf thymus DNA

Saba Hadidi*

Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Chemistry, Razi University, Kermanshah, Iran

s.hadidi@razi.ac.ir

Abstract

In this paper, the effect of Fe^{3+} metal ion on the interaction of codeine phosphate drug with calf thymus DNA in aqueous medium and physiological pH was investigated using spectroscopic and molecular docking simulation methods. With increasing DNA concentration, a decrease in the drug absorption band was observed in the region 240 and 280 nm, which indicates the interaction of the drug with DNA. Fluorescence data analysis confirms the formation of a new drug-DNA complex during a static quenching process. Calculation of the binding constant using the Hill equation showed that the DNA binding affinity of drug increased about 4-fold in the presence of Fe^{3+} ions. Molecular docking simulations confirmed the drug was located in DNA minor groove in the vicinity of DG4, DA5, DA6, DT20 and DC21 nucleotides by hydrogen bonds and hydrophobic forces.

Keywords: Spectroscopic methods, Groove bonding, hydrogen bonding, Increasing binding affinity

بررسی تاثیر یون Fe^{3+}بر برهمکنش داروی کدئین فسفات با DNA تیموس گوساله

صبا حدیدی*

استادیار گروه شیمی معدنی، دانشکده شیمی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

s.hadidi@razi.ac.ir

چکیده

در این مقاله تاثیر یون فلزی Fe^{3+} بر برهمکنش داروی کدئین فسفات با DNA تیموس گوساله در محیط آبی و pH فیزیولوژیک با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی و شبیه‌سازی داکینگ مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. با افزایش غلظت DNA کاهشی در بند جذبی دارو در نواحی ۲۴۰ و ۲۸۰ نانومتر مشاهده شد که نشان‌دهنده برهمکنش دارو با DNA است. تجزیه و تحلیل داده‌های فلورسانس تاییدکننده تشکیل یک کمپلکس جدید دارو-DNA در طی یک فرایند خاموشی استاتیک است. محاسبه ثابت اتصال با استفاده از معادله Hill نشان داد که تمایل اتصال دارو به DNA در حضور یون‌های Fe^{3+} حدود ۴ برابر افزایش یافته است. شبیه‌سازی داکینگ مولکولی قرارگیری دارو در شیار کوچک DNA و در مجاورت نوکلئوتیدهای DG4، DA5، DA6، DT20 و DC21 توسط پیوندهای هیدروژنی و نیروهای هیدروفوبیک را تایید کرد.

واژگان کلیدی: روش‌های طیف سنجی، اتصال شیاری، پیوند هیدروژنی، افزایش ثابت اتصال

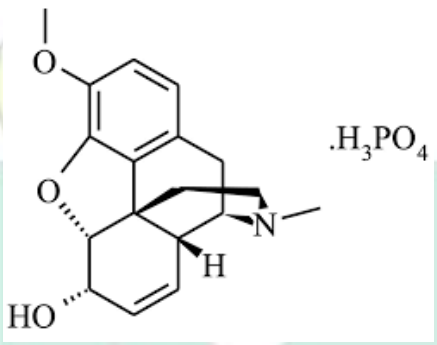
۱. مقدمه

DNA مولکولی است که دستورالعمل‌های ژنتیکی را در انسان و تقریبا همه موجودات زنده حمل می‌کند. بسیاری از فرآیندهای درون سلولی به برهمکنش لیگاندها با DNA بستگی دارد، چرا که این برهمکنش‌ها می‌تواند پایه بسیاری از فرآیندهای داخل سلولی بوده و باعث شود که تغییرات در رونویسی و همانندسازی DNA را پیش‌بینی نماییم. از این پیش‌بینی‌ها می‌توان در بررسی مرگ سلولی، تکثیر سلولی، ایجاد سرطان، جهش‌های ژنی و در درمان سرطان استفاده نمود. ترکیبات متصل‌شونده به DNA می‌توانند دارای طیف وسیعی از اثرات بالقوه ضدسرطان، ضدویروس یا سرطان‌زا باشند. از بررسی انواع برهمکنش‌های ترکیبات با DNA می‌توان در طراحی داروهایی با کارایی بیشتر، مطالعه‌ی تغییرات ساختار DNA در اثر واکنش با ترکیبات مختلف و حتی در مطالعه ساختمان‌های پروتئین-نوکلئیک اسید استفاده نمود (Aggarwal et al., 2020; Teng et al., 2021).

DNA به عنوان یکی از مهمترین مولکول‌های بیولوژیکی بدن می‌تواند توسط مولکول‌های کوچک از طریق برهمکنش‌های کووالانسی و یا غیرکوالانسی مورد هدف قرار گرفته شود. در مولکول‌های DNA چندین سایت وجود دارد که ممکن است اتصال در آنها رخ دهد: ۱) بین جفت بازها در داخل رشته مارپیچ، ۲) برهمکنش با بازها در شیارهای کوچک و بزرگ و ۳) برهمکنش‌های الکترواستاتیک با گروه‌های فسفات (Nelson et al., 2007; Sharma et al., 2021).

تکنیک‌های بسیاری برای بررسی برهمکنش مولکول‌ها با DNA به کار گرفته شده است. از این میان روش‌های طیف‌سنجی به این دلیل که برهمکنش لیگاند-DNA بطور مستقیم با تغییرات در شدت و موقعیت طیف‌ها قابل رویت است، ارجح‌تر بر سایر روش‌ها می‌باشد (Dougherty and Pigram, 1982).

کدئین فسفات (شکل ۱) یک داروی مخدر است که برای کنترل دردهای خفیف تا متوسط و درمان سرفه به کار می‌رود. متاسفانه با وجود کاربردهای پزشکی گسترده، کدئین یکی از ۱۰ دارویی است که جهت تسکین درد در فرایند ترک اعتیاد مورد سوء استفاده قرار گرفته است. از آنجایی‌که مصرف کدئین در دوز بالا بسیار مضر است، در اکثر کشورها کدئین جزء داروهای کنترل شده طبقه‌بندی می‌شود (Williams et al., 2002).



شکل ۱: ساختار شیمیایی داروی کدئین فسفات

Shafer و همکارانش نشان دادند که آسیب‌های کروموزومی و بروز سرطان در افرادی از که مواد مخدر مصرف می‌کنند بالاتر است، همچنین از طرفی آنها بیان کردند که مواد مخدر ظرفیت ترمیم DNA را نیز کاهش می‌دهد (Shafer et al., 1990).

انصافی و همکاران برهمکنش بین کدئین و DNA را با استفاده از تکنیک Differential pulse voltammetry (DPV) ارزیابی کردند. در شرایط آزمایشی و بر اساس مشاهدات انجام شده به نظر می‌رسد که کاهش جریان پیک کدئین پس از افزودن DNA، ناشی از اتصال کدئین به مولکول حجیم DNA است که در نتیجه منجر به کاهش قابل توجهی در ضریب انتشار می‌شود. شیفت پتانسیل به مقادیر منفی می‌تواند نشانه‌ای از دخالت نیروهای الکترواستاتیک در برهمکنش دارو به DNA باشد (Ensafi et al., 2013).

Lin و همکارانش به بررسی تبدیل اکسیداتیو چهار داروی کنترل‌شده از جمله کدئین توسط MnO_2 سنتز شده (δ-MnO_2) در محیط‌های آبی پرداختند. نتایج نشان داد که کدئین می‌تواند توسط MnO_2 اکسید شود و احتمالاً به‌طور طبیعی در محیط‌های آبی ضعیف می‌شود. همچنین افزودن یون Fe^{3+} و اسید فولویک میزان اکسیداسیون کدئین را افزایش داد (Lai et al., 2015).

از آنجایی که اطلاعات در مورد برهمکنش داروی کدئین با بیومولکول‌های زیستی ناکامل و محدود است و از طرفی مکانیسم اتصال کدئین به DNA در حضور یون Fe^{3+} تاکنون گزارش نشده است. بنابراین، ما در این مقاله با استفاده از ترکیب روش‌های تئوری و

تجربی به بررسی جزئیات تعاملی پیوند کدئین با DNA می‌پردازیم. ما معتقدیم که دانش به‌دست‌آمده از این مطالعه برای درک بیشتر مکانیسم کدئین در بدن مفید خواهد بود و در بهبود طراحی دارویی جدید ارزشمند است.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

مواد مورد استفاده در برهمکنش با DNA، از جمله یون فلزی، بافر، اسید نوکلئیک و سایر مواد شیمیایی، به صورت تجاری در دسترس بودند و بدون خالص‌سازی استفاده شدند. بافر Tris-HCl و سایر محلول‌های آبی با استفاده از آب دوبار تقطیر تهیه شدند. خلوص DNA از پروتئین با اندازه‌گیری نسبت جذبی در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر $A_{260}/A_{280}>1.8$ بررسی شد (Shiri et al., 2019). محلول 2.4×10^{-3} مولار DNA تیموس گوساله در بافر Tris-HCl (pH 7.4) به عنوان محلول استوک DNA استفاده شد. محلول 1×10^{-2} مولار از دارو در بافر Tris-HCl (pH 7.4) به عنوان محلول استوک استفاده شد. تمامی آزمایش‌ها در بافر ۵۰ میلی مولار Tris-HCl در pH 7.4 انجام شد.

۲-۲- طیف‌سنجی UV-Visible

طیف جذبی دارو با غلظت 2.5×10^{-5} مولار در محلول بافر تریس با افزایش غلظت DNA تا 3.6×10^{-5} مولار در گستره طول موجی ۳۵۰-۲۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر Nordantec T80 و سل کوارتز ۱.۰ سانتی‌متری اندازه‌گیری شد. به منظور حذف اثر جذب DNA مقادیر یکسانی از محلول استوک DNA به هر دو سل نمونه و شاهد اضافه گردید.

۲-۳- طیف‌سنجی فلورسانس

طیف فلورسانس با اسپکتروفلوریمتر JASCO FP 6200 مجهز به لامپ زنون uxl-159 و سل کوارتز (۱.۰ سانتی‌متر) ثبت شد.. اندازه‌گیری فلورسانس در غلظت ثابتی از دارو (4.9×10^{-5} مولار) و غلظت‌های متفاوتی از DNA (۰ تا 4.8×10^{-4} مولار) در دمای محیط در گستره طول موجی ۳۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر با طول موج برانگیختگی 280 نانومتر انجام شد. برای بررسی اثر یون Fe^{3+} بر تمایل اتصال دارو به DNA آزمایش مشابهی در حضور Fe^{3+} با غلظت 9.8×10^{-5} مولار انجام شد.

۲-۴- شبیه‌سازی داکینگ مولکولی

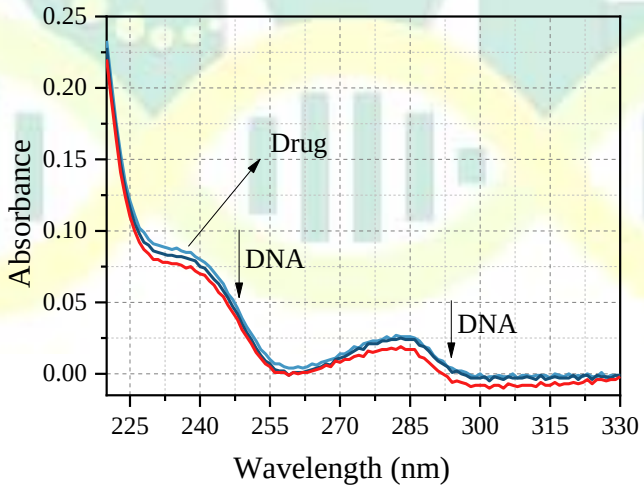
ساختار سه بعدی دارو به عنوان لیگاند (ChemSpider ID: 4447447) در فرمت mol. از پایگاه داده ChemSpider (http://www.chemspider.com) به دست آمد و با استفاده از BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2016 به فرمت pdb. تبدیل شد. ساختار کریستالی DNA با شناسه 1BNA از پایگاه داده (http://www.rcsb.org/pdb) PDB RCSB دانلود شد. مولکول‌های حلال، یون‌ها و مولکول‌های لیگاند قبل از انجام محاسبات از ساختار DNA حذف شدند. اتم های هیدروژن قطبی و بارهای Gasteiger در ساختار گیرنده گنجانده شدند و سپس DNA در قالب PDBQT به عنوان ورودی برای برنامه AutoDock Vina ذخیره شد. سایر پارامترها به صورت پیش فرض باقی ماندند. مدل DNA در جعبه ای با تعدد نقاط x، y و z به ابعاد ۲۶، ۲۶ و ۴۲ و جعبه شبکه

مرکزی ۱۷.۳۷۴، ۲۱.۳۴۶ و ۸.۴۱۴ با فاصله شبکه 1.00 انگستروم محصور شد. بهترین کنفورمور از لحاظ انرژی از میان ۲۰ ساختار با حداقل انرژی از بین ۵۰۰ کنفورمور استخراج شد. BIOVIA Discovery Studio Visualizer برای تجزیه و تحلیل خروجی شبیه سازی داکینگ مولکولی مورد استفاده قرار گرفت.

۳. نتایج و بحث

۳-۱- طیف‌سنجی UV-Vis

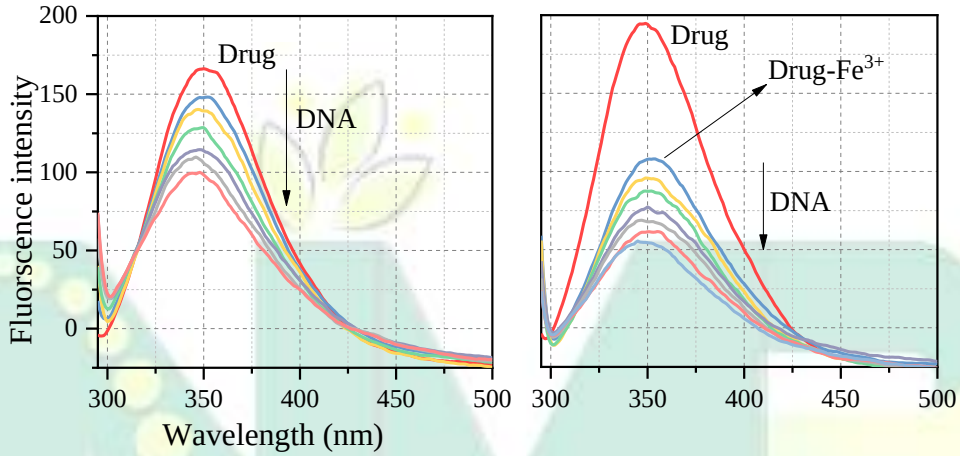
به طور کلی اتصال مولکول‌های کوچک به عنوان لیگاند به مارپیچ DNA از طریق تیتراسیون اسپکتروفتومتری، با پیروی از تغییرات در شدت و یا موقعیت بند جذبی مورد بررسی قرار می‌گیرد. اگر مد اتصال اینترکلیت باشد اوربیتال π* لیگاند می‌تواند با اوربیتال π مولکول DNA کوپل شود و در نتیجه انرژی انتقال π*←π کاهش یافته و رد شیفتی در بند جذبی مشاهده می‌شود. از طرفی با کوپل شدن اوربیتال π تقریبا از الکترون می‌شود در نتیجه احتمال انتقال کم شده و شدت بند جذبی کاهش می‌یابد. هایپرکرومیسم و هیپوکرومیسم ویژگی‌های طیفی DNA در رابطه با ساختار مارپیچ دوگانه آن هستند (Shahabadi and Hadidi, 2012). هایپرکرومیسم به معنای شکستن ساختار ثانویه DNA است. در مطالعه حاضر، تیتراسیون اسپکتروفتومتری برای پایش برهمکنش داروی کدئین در محلول آبی با DNA تیموس گوساله استفاده شده است. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می شود در حضور DNA، بند جذبی دارو یک هیپوکرومیسم بدون هیچ گونه تغییری در موقعیت پیک را نشان داد، که تایید می‌کند مولکول‌های دارو با DNA برهمکنش دارند (Ensafi et al., 2016).



شکل ۲: طیف جذبی دارو (2.5×10^{-5} مولار) در غیاب و حضور DNA (3.6×10^{-5} مولار) در بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار (pH 7.4) و دمای محیط

۳.۲. طیف‌سنجی فلورسانس

طیف‌سنجی فلورسانس معمولا در مطالعه برهم‌کنش‌های مولکولی بین لیگاندها و بیومولکول‌ها استفاده می‌شود، که عمدتا به دلیل حساسیت بالای این تکنیک و تنوع پارامترهای مرتبط با برهمکنش مولکولی است که می‌توان محاسبه کرد. برای به دست آوردن اطلاعات بیشتر در مورد برهمکنش داروی کدئین با DNA، اسپکتروفلوریمتری انجام شد. طیف فلورسانس دارو با غلظت های مختلف DNA در غیاب و حضور یون Fe^{3+} در شکل ۳ نشان داده شده است. همانطور که در شکل دیده می‌شود در هر دو مورد فلورسانس دارو به طور منظم با افزایش غلظت DNA کاهش می‌یابد، اما هیچ تغییر قابل توجهی در طول موج بند نشری مشاهده نشد، که نشان می‌دهد DNA با دارو تعامل داشته و فلورسانس ذاتی آن را خاموش می‌کند.

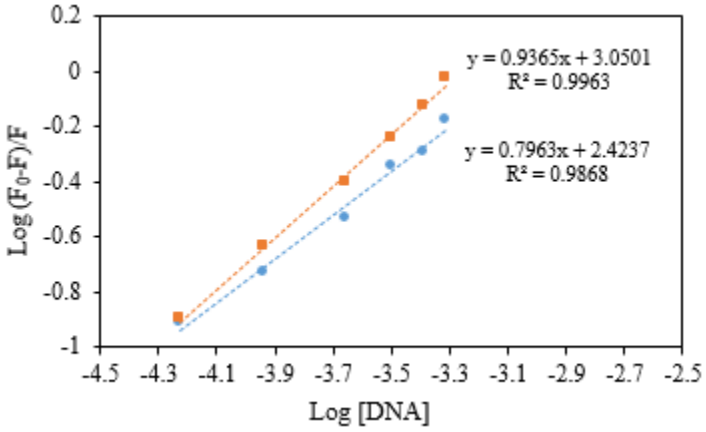


شکل ۳: طیف فلورسانس دارو (4.9×10^{-5} مولار) در غیاب (سمت چپ) و حضور (سمت راست) یون Fe^{3+} با افزایش غلظت DNA تا 4.8×10^{-4} مولار در بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار (pH 7.4) و دمای محیط

به منظور تعیین کمی ثابت اتصال (K_b) و تاثیر حضور یون Fe^{3+} بر تمایل اتصال دارو به DNA، معادله لگاریتمی Hill (معادله ۱) مورد استفاده قرار گرفت (Wang et al., 2008) و نتایج در شکل ۴ نشان داده شد:

$$Log\frac{(F_0 - F)}{F} = LogK_b + nLog[Q] \qquad (1)$$

در اینجا F_0 و F شدت فلورسانس دارو در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف DNA [Q] است، K_b (ثابت اتصال) بیانگر میل اتصال دارو به DNA و n ضریب همکاری Hill برای توصیف همکاری سایت‌های اتصال DNA برای قرارگیری دارو در این جایگاه‌ها است. مقدار عددی ثابت اتصال در غیاب و حضور یون Fe^{3+} به ترتیب $2.65\times10^{2}\ M^{-1}$ و $1.12\times10^{3}\ M^{-1}$ به دست آمد که نشان می‌دهد یون Fe^{3+} تاثیر مثبتی بر تمایل اتصال دارو به DNA داشته و این مقدار را به حدود ۴ برابر افزایش داده است.



شکل ۴: نمودار معادله Hill برهمکنش دارو با DNA در غیاب (خط آبی) و حضور (خط نارنجی) یون Fe^{3+}

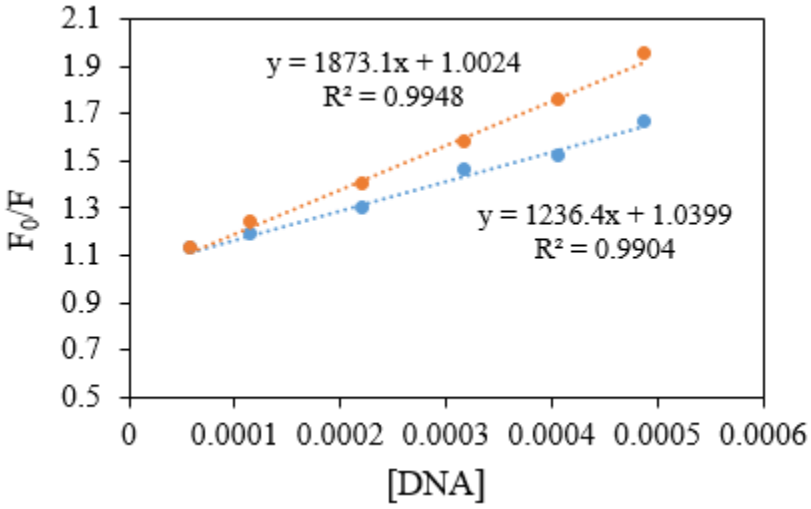
خاموشی فلورسانس به هر فرآیندی اطلاق می‌شود که شدت فلورسانس یک فلوروفور را کاهش دهد. مکانیسم خاموشی را می‌توان به عنوان خاموشی استاتیک (تشکیل یک کمپلکس در حالت پایه بین نشردهنده و خاموش‌کننده) و خاموشی دینامیک (برخورد بین نشردهنده و خاموش‌کننده در حالت برانگیخته) طبقه‌بندی کرد.

معادله استرن-ولمر (معادله ۲) برای بررسی مکانیسم خاموشی دارو در حضور مقادیر افزاینده DNA در غیاب و حضور یون Fe3+ استفاده شد (Shahabadi et al., 2015)

$$F_0/_F = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_{sv}[Q] \qquad (2)$$

که در آن F_0 شدت فلورسانس در غیاب خاموش‌کننده، F شدت فلورسانس در حضور خاموش‌کننده، Kq ثابت سرعت خاموشی، K_{SV} ثابت استرن-ولمر، τ_0 طول عمر حالت برانگیخته و [Q] غلظت خاموش‌کننده می‌باشد.

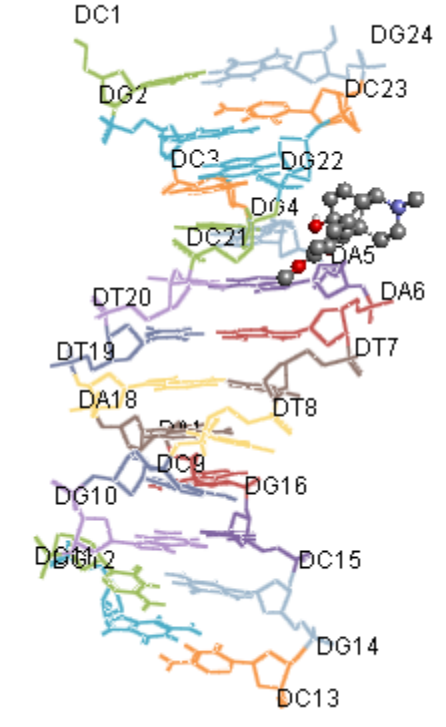
نمودار معادله استرن-ولمر در دمای اتاق در شکل ۵ نشان داده شده است. برای خاموشی دینامیک، حداکثر ثابت سرعت خاموشی در خاموش کننده‌های مختلف ۲×۱۰^{۱۰} L $mol^{-1}s^{-1}$ است. Kq بزرگتر در غیاب (1.2×10^{11} L mol^{-1} s^{-1}) و حضور یون Fe^{3+} (1.8×10^{11} L mol^{-1} s^{-1}) در فرایند برهمکنش داروی نشان می‌دهد خاموشی فلورسانس دارو از طریق یک مکانیسم استاتیک (تشکیل کمپلکس دارو-DNA در حالت پایه) رخ می‌دهد. علاوه بر این حضور یون Fe^{3+} باعث افزایش ثابت استرن-ولمر به اندازه حدود ۱.۵ برابر شده است.



شکل ۵: نمودار استرن-ولمر برهمکنش دارو با DNA در غیاب (خط آبی) و حضور (خط نارنجی) یون Fe^{3+}

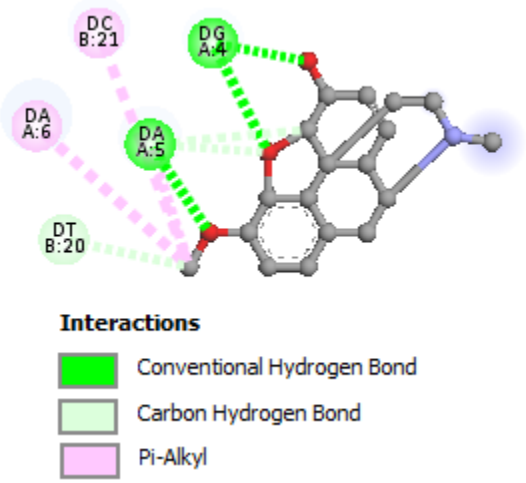
۳-۵- شبیه‌سازی داکینگ مولکولی

به منظور تعیین جایگاه اتصال دارو به DNA شبیه‌سازی داکینگ مولکولی انجام شد و کنفورمری با کمترین RMSD و بهترین انرژی (7.4- کیلوکالری بر مول) از بین ۲۰ ساختار از تعداد کل ۵۰۰ شبیه‌سازی انتخاب شد (جدول ۱). همانطور که در شکل ۶ قابل مشاهده است، دارو به شیار کوچک DNA متصل شده است.



شکل ۶: شبیه سازی داکینگ مولکولی برهمکنش داروی کدئین با DNA

در شکل ۷ نوکلئوتیدها و نیروهای اصلی در برهمکنش دارو با DNA قابل مشاهده است. همانطور که از شکل پیداست پیوندهای هیدروژنی با بازهای گوانین ۴، آدنین ۵ و تیمن ۲۰ و برهمکنش های Pi-Alkyl اب بازهای سیتوزین ۲۱ و آدنین ۶ نقش اصلی را در برهمکنش دارو با DNA و پایداری کمپلکس تشکیل شده ایفا کردند.



شکل ۷: نوکلئوتیدها و نیروهای اصلی در برهمکنش داروی کدئین با DNA

جدول ۱: انرژی‌های اتصال کنفورمرهای مختلف دارو به DNA به دست آمده با شبیه‌سازی داکینگ مولکولی با استفاده از Lamarkian Genetic Algorithm

Mode	Affinity (Kcal/mol)	Dist. from rmsd 1.b.	Best mode rmsd u.b.
1	-7.4	0.000	0.000
2	-7.4	3.087	4.560
3	-7.0	4.462	6.578
4	-6.9	2.704	5.305
5	-6.9	1.889	2.506
6	-6.6	24.927	26.980
7	-6.5	5.226	8.038
8	-6.5	24.009	26.116
9	-6.5	3.838	6.737
10	-6.5	7.020	9.277
11	-6.4	24.575	27.314
12	-6.4	2.214	4.541
13	-6.3	12.926	14.647
14	-6.3	5.616	8.376
15	-6.2	13.070	14.874
16	-6.2	24.715	26.554
17	-6.2	3.389	6.175
18	-6.2	1.770	2.270
19	-6.1	13.782	16.546
20	-6.0	12.098	14.308

۴. نتیجه‌گیری

در این مقاله، برهمکنش داروی کدئین فسفات با DNA در غیاب و حضور یون Fe^{3+} در محیط آزمایشگاهی با استفاده از تکنیک‌های طیف‌سنجی و شبیه‌سازی داکینگ مولکولی بررسی شد. نتایج طیف‌سنجی جذبی نشان داد که دارو برای تشکیل یک کمپلکس حالت پایه با DNA برهمکنش دارد. داده‌های طیف‌سنجی فلورسانس نشان داد که DNA با دارو وارد برهمکنش شده و شدت بند نشری دارو را در یک فرایند خاموشی استاتیک کاهش می‌دهد. آنالیز داده‌های نشری با استفاده از معادله استرن-ولمر و معادله Hill نشان داد یون Fe^{3+} تاثیر مثبتی بر برهمکنش دارو داشته است و ثابت استرن-ولمر و ثابت اتصال دارو را به ترتیب حدود ۱.۵ و ۴ برابر افزایش داده است. نتایج شبیه‌سازی داکینگ مولکولی ثابت کرد دارو به شیار کوچک DNA متصل می‌شود و پیوندهای هیدروژنی و نیروهای هیدروفوبیک نقش اصلی را در فرایند برهمکنش ایفا می‌کنند. از آنجایی که درک اساس مولکولی برهمکنش دارو و DNA

در طراحی عوامل درمانی جدید برای بهبود فعالیت دارویی مهم است، ما امیدواریم که نتایج حاصل از این مطالعه اطلاعات مفیدی برای درک مکانیسم داروهای مسکن در بدن به منظور طراحی داروهای بهبود یافته جدید ارائه کرده باشد.

منابع

1. **Aggarwal A., Naskar S., Sahoo A.K., Mogurampelly S., Garai A. and Maiti P.K. 2020.** What do we know about DNA mechanics so far? Current opinion in structural biology, 64: 42-50.
2. **Dougherty G. and Pigram W.J. 1982.** Spectroscopic analysis of drug-nucleic acid interaction. Critical Reviews in Biochemistry, 12(2): 103-132.
3. **Ensafi A.A., Amini M., and Heydari-Bafrooei E. 2016.** Interaction of Codeine with DNA. In Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse (pp. 490-496): Elsevier.
4. **Ensafi A.A., Heydari-Bafrooei E. and Rezaei B. 2013.** Different interaction of codeine and morphine with DNA: a concept for simultaneous determination. Biosensors and Bioelectronics, 41: 627-633.
5. **Lai W.W.P., Lin A.Y.C., Yang S.Y. and Huang C.H. 2015.** Oxidative transformation of controlled substances by manganese dioxide. The Scientific World Journal, 2015.
6. **Nelson S.M., Ferguson L.R. and Denny W.A. 2007.** Non-covalent ligand/DNA interactions: minor groove binding agents. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 623(1-2): 24-40.
7. **Shafer D.A., Falek A., Donahoe R.M. and Madden J.J. 1990.** Biogenetic effects of opiates. International journal of the addictions, 25(sup1), 1-18.
8. **Shahabadi N. and Hadidi S. 2012.** Spectroscopic studies on the interaction of calf thymus DNA with the drug levetiracetam. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 96: 278-283.
9. **Shahabadi N., Hadidi S., Ghasemian Z. and Taherpour A.A. 2015.** Racemic R, S-venlafaxine hydrochloride–DNA interaction: experimental and computational evidence. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 145: 540-552.
10. **Sharma V., Gupta M., Kumar P. and Sharma A. 2021.** A Comprehensive Review on Fused Heterocyclic as DNA Intercalators: Promising Anticancer Agents. Current pharmaceutical design, 27(1): 15-42.
11. **Shiri F., Hadidi S., Rahimi-Nasrabadi M., Ahmadi F., Ganjali M. R. and Ehrlich H. 2019.** Synthesis, characterization and DNA binding studies of a new ibuprofen–platinum(II) complex. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.
12. **Teng F.Y., Jiang Z.Z., Guo M., Tan X.Z., Chen F., Xi X.G. and Xu Y. 2021.** G-quadruplex DNA: A novel target for drug design. Cellular and Molecular Life Sciences, 78(19): 6557-6583.
13. **Wang Y.Q., Zhang H.M., Zhang G.C., Zhou Q.H., Fei Z.H., Liu Z.T. and Li, Z. X. 2008.** Fluorescence spectroscopic investigation of the interaction between benzidine and bovine hemoglobin. Journal of Molecular Structure, 886(1-3): 77-84.
14. **Williams D., Patel A. and Howard R. 2002.** Pharmacogenetics of codeine metabolism in an urban population of children and its implications for analgesic reliability. British Journal of Anaesthesia, 89(6): 839-845.

Biosensors and Their Applications in The Food Industry: A Review

Maryam Ghorbani Tajar[1]; Hossein Zare[2*]

1- Department of Chemical and Materials Engineering, Imam Khomeini International University - Buin Zahra Higher Education Center of Engineering and Technology, Buein Zahra, Qazvin, Iran
2- Assistant Professor, Department of Chemical and Materials Engineering, Imam Khomeini International University - Buin Zahra Higher Education Center of Engineering and Technology, Buein Zahra, Qazvin, Iran

**Corresponding Author Email address: hv.zare@bzeng.ikiu.ac.ir*

Abstract

Food industry experts and manufacturers are looking for flawless quality control methods to ensure the production of quality products in a short time and at a lower cost. Accurate and rapid analysis in food processing is essential for quality assurance as well as control of health hazards such as harmful bacteria, toxins, etc. Biosensors provide fast, non-destructive and inexpensive methods for controlling food quality Biosensors are a type of sensor based on a bioreceptor and its interaction with a specific substrate. The main component in the bioreceptor is a biological element that produces a biochemical signal due to its interaction with the analyte, which is converted into a measurable electrical response by the converter. A biological element is a biological molecular species such as an enzyme, microorganism, antibody, protein, or nucleic acid, or a living biological system such as a cell, tissue, or whole organism that uses a biochemical mechanism for detection. Biosensors have improved a wide range of biological and food applications with high speed and ease of use compared to other traditional methods. In this review study, the application of biosensors in food quality and safety has been investigated. A complete study has been done on biosensors and their components and how they work. Aspects of application of biosensors in food industry and research in this field are also presented.

Keywords: Biosensor, Food industry, Biochemical, Enzyme

مروری بر حس‌گرهای زیستی و کاربرد آن‌ها در صنایع غذایی

مریم قربانی طجر[۱]؛ حسین زارع ولوکلائی[۲*]

۱- دانش آموخته رشته مهندسی شیمی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) - مرکز آموزش عالی فنی و مهندسی بوئین زهرا، بوئین زهرا، قزوین، ایران

۲- استادیار گروه مهندسی شیمی و مواد، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) - مرکز آموزش عالی فنی و مهندسی بوئین زهرا، بوئین زهرا، قزوین، ایران

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: hv.zare@bzeng.ikiu.ac.ir

چکیده

متخصصان و تولیدکنندگان صنایع غذایی به دنبال روش‌های کنترل کیفیت بی عیب و نقصی هستند تا از تولید محصولات با کیفیت در مدت زمان کوتاه و هزینه کمتر اطمینان حاصل نمایند. آنالیز دقیق و سریع در فراوری مواد غذایی برای تأیید کیفیت و همچنین کنترل خطرات سلامتی مانند باکتری‌های مضر، سموم و غیره، ضروری است. حس‌گرهای زیستی روش‌های سریع، غیر مخرب و ارزان را در کنترل کیفیت غذا ارائه می‌دهند. حس‌گرهای زیستی نوعی از سنسور هستند که بر مبنای یک گیرنده زیستی و تعامل آن با سوبسترای اختصاصی عمل می‌کنند. جزء اصلی در گیرنده زیستی یک عنصربیولوژیکی است که به علت برهمکنش با آنالیت مورد نظر یک سیگنال بیوشیمیایی تولید می‌کند که توسط مبدل به یک پاسخ الکتریکی قابل اندازه‌گیری تبدیل می‌شود. عنصر بیولوژیکی یک گونه مولکولی بیولوژیکی مانند آنزیم، میکروارگانیسم، آنتی بادی، پروتئین یا اسید نوکلئیک، و یا یک سیستم بیولوژیکی زنده مانند سلول، بافت یا ارگانیسم کامل است که از مکانیسم بیوشیمیایی برای تشخیص استفاده می‌کند. حس‌گرهای زیستی طیف وسیعی از کاربردهای بیولوژیکی و غذایی را همراه با سرعت بالا و سهولت استفاده در مقایسه با سایر روش‌های سنتی بهبود بخشیده‌اند. در این تحقیق مروری، نقش حس‌گرهای زیستی در کیفیت و ایمنی مواد غذایی بررسی شده است. مطالعه کاملی بر حس‌گرهای زیستی و اجزا و نحوه عملکرد آن صورت گرفته است. همچنین جنبه‌های کاربرد حس‌گرهای زیستی در صنایع غذایی و تحقیقات صورت گرفته در این زمینه ارائه شده است.

واژگان کلیدی: حس‌گر زیستی، صنایع غذایی، بیوشیمیایی، آنزیم

۱.مقدمه

سلامت و ایمنی غذا یکی از نگرانی‌های اصلی زندگی بشر است که به طور مستقیم بر سلامتی و زندگی مردم تأثیر می‌گذارد. صنایع غذایی در حال حاضر شامل فرآیندهای فرآوری، حمل و نقل و نگهداری است که اغلب این فرآیندها قبل از رسیدن مواد غذایی به

دست مصرف کننده بر روی مواد غذایی که قابلیت فسادپذیری بالایی دارند صورت می‌گیرد. آلاینده‌های غذایی از منابع مختلف بیولوژیکی و شیمیایی سرچشمه می‌گیرند. آلودگیهای بیولوژیکی توسط عوامل بیماری‌زای مختلف مانند باکتری‌ها، قارچها و انگلها ایجاد می‌شود. ایی. کولای، سالمونلا، لیستریا، استافیلوکوکوس، کلستریدیوم از شایع‌ترین عوامل بیماری‌زا در غذاها هستند. آلاینده های شیمیایی منابع مختلفی مانند آفت کش‌ها، بقایای داروها و افزودنی‌های غذایی دارند. آلودگیهای غذایی باعث بیماری‌های جدی مانند بیماری‌های حاد گوارشی و سرطان می‌شوند. بر اساس گزارش‌های سازمان جهانی بهداشت (WHO)، سالانه تقریباً دو میلیون نفر از مردم جهان به دلیل بیماری‌های اسهالی مرتبط با آلودگی‌های غذایی جان خود را از دست می‌دهند، بر این اساس WHO به وضوح می‌گوید که ایمنی غذا باید غیر سمی و بی ضرر باشد (Bagheryan et al., 2015; Lv et al., 2018; Eyvazi et al., 2021).

طیف وسیعی از روش‌های آنالیز برای تشخیص آلودگی‌های بیولوژیکی و شیمیایی در غذاها در دسترس است. روش‌های مرسوم برای نظارت بر آلاینده‌های بیولوژیکی، روش‌های مبتنی بر کشت در آزمایشگاه‌ها مانند شمارش باکتری‌ها، روش‌های مبتنی بر ایمنی سنجی که از برهمکنش‌های آنتی ژن/آنتی بادی است و روش‌های مبتنی بر DNA که شامل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز است، استفاده می‌کند. از سوی دیگر، از کروماتوگرافی مایع یا گازی و طیف سنجی جرمی، تشخیص با اشعه ماوراءبنفش یا تکنیک‌های فلورسانس به‌صورت جداگانه یا در ترکیب با سایر تکنیک‌های جداسازی برای شناسایی آلاینده‌های شیمیایی انجام می‌شود. اگرچه این روش‌های آنالیز، حساس و قابل اعتماد هستند، با این حال، نیاز آن‌ها به زمان سنجش بیشتر، فراوری نمونه، ابزارهای گران قیمت و پیچیده و یک فرد آموزش دیده، کاربرد وسیع آن‌ها را محدود می‌کند؛ بنابراین، توسعه تکنیک‌های جایگزین با واکنش سریع، ویژگی و حساسیت قابل اعتماد در صنایع غذایی مورد نیاز است. یکی از بهترین تکنیک‌های جایگزین استفاده از حسگرهای زیستی است که ابزارهای سریع، خاص، حساس و موثری برای نظارت بر آلودگی‌های غذایی ارائه می‌دهد (Viswanathan and Radecki, 2008; Mishra et al., 2018; Zhang et al., 2019; Eyvazi et al., 2021).

بیوسنسور یا حسگر زیستی ترکیب یک عنصر بیولوژیکی، یک آشکارساز فیزیکوشیمیایی و یک مبدل می‌باشد. یک مولکول زیستی مانند آنتی بادی، آپتامر، آنزیم، اسید نوکلئیک یا سلول که قادر به تشخیص یا شناسایی آنالیت هدف است، به عنوان گیرنده زیستی استفاده می‌شود. در ابتدا، کلارک و لیونز اولین حسگر زیستی را در سال ۱۹۶۲ معرفی کردند. با استفاده از آنزیم گلوکز اکسیداز (GOx) به عنوان یک عنصر تشخیص، در واقع یک سنسور الکتروشیمیایی اکسیژن آمپرومتریک برای تشخیص گلوکز بود. اصطلاح بیوسنسور به عنوان شکل کوتاه شده اصطلاح بیوسنسور انتخابی توسط رچنیتز و همکاران در سال ۱۹۷۷ پیشنهاد شد که برای الکترود انتخابی آرژینین، از موجودات زنده به عنوان عناصر تشخیص استفاده می‌کرد (Ensafi, 2019; Eyvazi et al., 2021).

کاربرد تجاری بیوسنسورها در تعدادی از زمینه‌ها، به ویژه در زمینه تشخیص پزشکی، تأثیر قابل توجهی داشته است، مانند بیوسنسورهای یکبار مصرف گلوکز که اغلب توسط مبتلایان به دیابت برای نظارت بر سطح قند خون مورد استفاده قرار می‌گیرد. یکی از این صنایع که در آن از فناوری حسگر زیستی استفاده می‌شود، صنایع غذایی است. با این حال، در حال حاضر، آزمایش مواد غذایی درصد بسیار کمی از کل بازار را شامل می‌شود، اما با پیشرفت‌های اخیر در بهبود طول عمر و پایداری سنسور، استفاده از بیوسنسورها برای تشخیص مواد غذایی در حال گسترش است. با توجه به موارد ذکرشده، توجه روزافزون به توسعه روش‌های آنالیزی با حساسیت و گزینش پذیری کافی متمرکز شده است. نمونه‌های برجسته دستگاه‌های آنالیزی که تمام مزایای فوق را باهم تلفیق می‌کنند، بیوسنسورها هستند (Korotkaya, 2014; Mehrotra, 2016).

حس‌گر زیستی

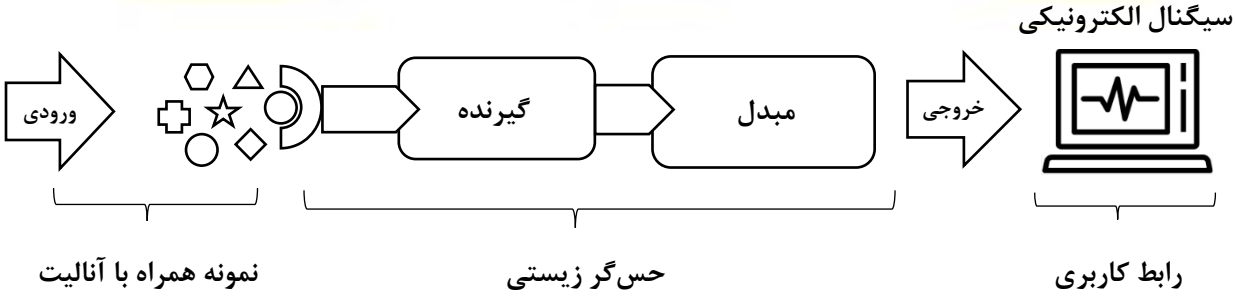
یک سنسور یا حسگر به عنوان وسیله‌ای برای تبدیل یک ورودی با کمیت فیزیکی به یک خروجی مرتبط با عملکرد تعریف شود که معمولاً به شکل یک سیگنال الکتریکی یا نوری است که توسط کاربر انسانی یا توسط ابزارهای الکترونیکی قابل خواندن یا تشخیص است. حسگرها برای تشخیص و اندازه گیری خواص فیزیکی و شیمیایی مختلف ترکیبات از جمله دما، pH، نیرو، بو، فشار، وجود مواد شیمیایی خاص، جریان، موقعیت و شدت نور استفاده می‌شود. حساسیت یک سنسور نشان دهنده میزان تغییرات خروجی نسبت به تغییر در ویژگی شیمیایی یا فیزیکی اندازه گیری شده است. یک سنسور زمانی کارآمد است که (Ensafi, 2019):

۱. در میان انواع پارامترهای موجود فقط به مقدار شیمیایی یا فیزیکی که باید اندازه گیری شود حساس باشد.
۲. در حین کار، بر خواص کمیت‌های فیزیکی یا شیمیایی تاثیر نگذارد.

بیوسنسور ها دستگاه‌های آنالیزی هستند که پاسخ بیولوژیکی را به سیگنال الکتریکی تبدیل می‌کنند. بیوسنسورها باید کاملاً اختصاصی باشند و مستقل از پارامترهای فیزیکی مانند pH و دما قابل استفاده باشند. بیوسنسور شامل یک عنصر زیستی است که بر روی یک پایه تثبیت شده و این پایه در تماس مستقیم با یک مبدل فیزیکی بوده و قادر است آنالیت‌های مورد شناسایی را عموماً به یک سیگنال الکتریکی یا نوری تبدیل کند و این سیگنال بستگی به غلظت ترکیب آنالیت در نمونه دارد (Griffiths, 1993; Mehrotra, 2016).

اصول کار حس‌گر زیستی

همه بیوسنسورها متشکل از سه جزء اصلی عنصر بیولوژیکی، آشکارساز و مبدل می‌باشند. همانطور که در شکل ۱ قابل مشاهده است، عنصر بیولوژیکی با آنالیت مورد آزمایش تعامل دارد و پاسخ بیولوژیکی توسط مبدل به سیگنال الکتریکی تبدیل می‌شود. ماده بیولوژیکی به صورت تثبیت شده و بی‌حرکت بوده و تماسی بین ماده بیولوژیکی و مبدل ایجاد می‌شود. آنالیت به مواد بیولوژیکی متصل می‌شود و یک برهمکنش زیستی ایجاد می‌شود که به‌نوبه خود پاسخ الکتریکی قابل اندازه‌گیری را ایجاد می‌کند. گاهی اوقات آنالیت به محصولی تبدیل می‌شود که می‌تواند با آزادسازی گرما، گاز (اکسیژن)، الکترون‌ها یا یون‌های هیدروژن همراه باشد. سپس مبدل تغییرات مربوط به محصول را به سیگنال‌های الکتریکی تبدیل می‌کند که قابل تقویت و اندازه‌گیری است. اگر عنصر بیولوژیکی و آنالیت باعث ایجاد تغییر شیمیایی شوند که بتوان از آن برای اندازه‌گیری غلظت یک سوبسترا استفاده کرد، سنسور را بیوسنسور متابولیک می‌نامند. اگر عنصر بیولوژیکی با آنالیت ترکیب شود و آن را از نظر شیمیایی تغییر ندهد بلکه آن را به سوبسترای کمکی تبدیل کند، سنسور را بیوسنسور کاتالیزوری می‌نامند (Karunakaran et al., 2015).



شکل ۱:شماتیک نحوه عملکرد حس‌گر زیستی

گیرنده زیستی

این قسمت حساس از نظر زیستی، یک کاوشگر با عنصربیولوژیکی است که قادر به تولید یک سیگنال بیوشیمیایی است که توسط مبدل به پاسخ الکتریکی تبدیل می‌شود. تشخیص مولکولی نمونه خاص یعنی آنالیت توسط گیرنده مربوطه مانند قفل و کلید عمل می‌کند. تعامل آنالیت با گیرنده زیستی به گونه‌ای طراحی شده است که یک پارامتر را برای اندازه گیری توسط مبدل ایجاد کند که اطلاعات را به یک پارامتر قابل اندازه گیری تبدیل می‌کند. آن‌ها اجازه می‌دهند تا آنالیت خاص مورد نظر با حداقل تداخل با سایر اجزا در مخلوط‌های پیچیده، برای اندازه گیری به سنسور متصل شود. گیرنده زیستی یک گونه مولکولی بیولوژیکی (به عنوان مثال، آنتی بادی، آنزیم، پروتئین یا اسید نوکلئیک) یا یک سیستم بیولوژیکی زنده (به عنوان مثال، سلول‌ها، بافت یا ارگانیسم کامل) است که از مکانیسم بیوشیمیایی برای تشخیص استفاده می‌کند (Viswanathan and Radecki, 2008; Kulkarni et al., 2014).

مبدل

مبدل تحلیل‌گر بیوسنسور است که اثرات واکنش بیوکاتالیستی را به سیگنال‌هایی تبدیل می‌کند که می‌توان آن‌ها را به صورت الکترونیکی تقویت، ذخیره و نمایش داد که از یک تغییر فیزیکی همراه با واکنش استفاده می‌کند که ممکن است موارد زیر باشد (Viswanathan and Radecki, 2008; Thakur and Ragavan, 2013):

۱. خروج گرما (یا جذب) توسط واکنش (بیوسنسورهای گرماسنجی)
۲. تغییرات در خروجی الکتریکی (بیوسنسورهای الکتروشیمیایی)
۳. واکنش اکسایش-کاهش (بیوسنسورهای آمپرومتریک)
٤. خروج نور یا اختلاف جذب نور بین واکنش‌دهنده‌ها و محصولات (بیوسنسورهای نوری)
٥. بر اساس جرم واکنش‌دهنده‌ها یا محصولات (بیوسنسورهای گرانشی)

روش‌های تثبیت اجزا حس‌گر زیستی

تثبیت عناصر بیولوژیکی نقش مهمی در عملکرد بیوسنسورها دارد. برای یک اتصال پایدار بین دو عنصر "بیو" و "سنسور" و تثبیت و بی حرکت نگه داشتن عنصر بیولوژیکی از روش‌های فیزیکی مانند جذب، سطحی، به دام اندازی، و محبوس سازی و روش‌های شیمیایی مانند اتصال عرضی و پیوند کووالانسی استفاده کرد (Najafpour and Zare, 2015; Kumar and Neelam, 2016).

جذب سطحی فیزیکی

جذب سطحی عنصر بیولوژیکی بر روی سطح بیوسنسور ساده ترین روش برای تثبیت است. روش جذب سطحی فیزیکی به ترکیبی از نیروهای وندروالس، نیروهای آبگریز، پیوندهای هیدروژنی و نیروهای یونی وابسته است تا مواد زیستی را به سطح حسگر متصل کند. در روش جذب، یا محلول آنزیم روی پایه ریخته می‌شود، یا پایه در محلول آنزیم غوطه ور می‌شود. پس از زمان خاص، اجازه

داده می‌شود تا سطح پایه خشک شود و سپس با محلول بافر یا آب مقطر شسته می‌شود تا آنزیم های تثبیت نشده از سطح جدا شوند. این روش هزینه ی کمی دارد و همچنین هیچ تاثیر نامطلوبی روی فعالیت آنزیم ها ندارد. نشت آنزیم، اشکال اصلی روش جذب است، که به علت نوسان دما، pH و مقاومت یونی آنالیت ها به وجود می‌آید. بیوسنسورهایی که بر اساس روش جذب عمل می‌کنند، تکرار پذیری کافی ولی پایداری کمی دارند و برای کیت های آنزیم تشخیصی یکبار مصرف مفید هستند (Najafpour and Zare, 2015; Kumar and Neelam, 2016).

محبوس سازی

در روش محبوس سازی، یک غشای نیمه تراوا، آنالیت و عنصر زیستی را جدا می‌کند و سنسور به عنصر زیستی متصل می‌شود. کپسوله کردن آنزیم در میان غشا، کاربردی ترین روش مورد استفاده در حسگرهای زیستی است. در این روش ابتدا آنزیم روی سطح پایه قرار می گیرد و سپس لایه ای از غشاء روی سطح آنزیم قرار داده می شود. مهمترین غشاء و مواد پوششی مورد استفاده برای محبوس سازی عبارتند از کاراگینان، کیتوزان، آلژینات سدیم، کربوکسی متیل سلولز، متیل سلولز، استات سلولز، پلی کربنات، پلی سولفون، پلی آکریلات، کلاژن، تفلون و فسفولیپیدها. استفاده از غشاهایی که به طور انتخابی به آنالیت ها و محصولات اجازه نفوذ می دهند، یک تکنیک مفید و دقیق است. با این حال، حسگرهای زیستی مبتنی بر این روش معمولا زمان پاسخ طولانی دارند. اختلال غشایی ناشی از تجمع محصولات جانبی از دیگر معایب این روش است (Najafpour and Zare, 2015; Kumar and Neelam, 2016).

به دام اندازی

روش به دام اندازی بر اساس تشکیل یک ماتریس محصور متخلخل در اطراف مواد بیولوژیکی است که به اتصال آن به سنسور کمک می‌کند. در این روش ابتدا آنزیم به محلول مونومر اضافه می شود و سپس مونومر پلیمریزه می شود. اندازه منافذ ژل یا فیبر به صورتی است که ماتریس از نشت ماکرومولکول های آنزیمی جلوگیری می کند. در حالی که آنالیت یا محصولات واکنش می توانند آزادانه در ماتریس پخش شوند و به جایگاه فعال آنزیم برسند. با این حال، آنالیت های با وزن مولکولی بالا نمی توانند به راحتی به ماتریس نفوذ کنند. شرایط اعمال شده در پلیمریزاسیون شیمیایی و رادیکال های آزاد تولید شده ممکن است اثرات مخربی بر فعالیت آنزیم داشته باشد. بنابراین، شرایط پلیمریزاسیون باید به دقت کنترل شود. پلی پیرول، پلی تیونین، پلی اتیلن دی اکسی تیوفن، پلیمر طبیعی (کیتوسان، آگار) و آلژینات کلسیم برخی از مواد رایجی هستند که به طور گسترده برای به دام اندازی آنزیم استفاده می‌شوند (Najafpour and Zare, 2015; Kumar and Neelam, 2016).

پیوند کووالانسی

در مورد پیوند کووالانسی به سطح سنسور گروه‌های عاملی اضافه می‌شود که مواد بیولوژیکی می‌توانند به آن متصل شوند. روش اتصال کووالانسی مبتنی بر پیوندهای کووالانسی قوی بین زنجیره‌های جانبی اسید آمینه آنزیم و پروتئینی با گروه‌های عاملی موجود بر روی سطح بیوسنسور است. از آنجایی که پیوندهای کووالانسی قوی‌ترین پیوندهای شیمیایی هستند، روش اتصال کووالانسی

پایدارتر از سایر روش‌های تثبیت است. رایج ترین گروه های عاملی مورد استفاده در پیوند کووالانسی گروه هیدروکسیل (OH) سرین، ترئونین و تیروزین، گروه آمینه (NH_2) لیزین، آرژنین و هیستیدین، گروه کربوکسیل (COOH) گلوتامیک اسید و آسپارتیک اسید و گروه تیول (SH) سیستئین هستند. در این تکنیک، ابتدا سطح با معرف‌های خاص برای ایجاد گروه‌های عاملی مورد نیاز عامل‌دار می‌شود. سپس، آنزیم به سطح بیوسنسور اضافه می‌شود تا به گروه های عاملی متصل شود (Najafpour and Zare, 2015; Kumar and Neelam, 2016).

اتصال عرضی

این نوع تثبیت مبتنی بر اتصال عرضی بین مولکولی یک آنزیم با مولکول‌های آنزیم دیگر یا گروه‌های عاملی موجود بر روی سطح بیوسنسور است. تجمع آنزیم ها منجر به توده بزرگی از مولکول های آنزیمی می شود که در الکترولیت پشتیبان نامحلول است. بنابراین، نشت آنزیم ناشی از حلالیت آنزیم به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. رایج ترین معرف های مورد استفاده برای اتصال عرضی گلوتارآلدئید و تولوئن دی ایزوسیانات هستند. ماهیت مختل کننده واکنش های اتصال عرضی و همچنین سمیت اتصال دهنده های عرضی بر روی ترکیب جایگاه‌های فعال آنزیمی تأثیر منفی می گذارد و باعث کاهش فعالیت آنزیم می شود. از این رو، مقدار معرف مورد استفاده در اتصال عرضی و نسبت آنزیم به معرف باید دقیقاً کنترل شود. تکنیک اتصال عرضی معمولاً همراه با روش‌های تثبیت دیگر برای اطمینان از عملکرد بالای تثبیت و در نتیجه افزایش پایداری حسگر زیستی استفاده می شود (Cass, 2004; Najafpour and Zare, 2015).

پارامترهای موثر بر عملکرد یک حس‌گر زیستی

یک بیوسنسور تنها در صورتی قابل استفاده تجاری خواهد بود که خصوصیات عملکردی مناسبی داشته باشد. برای توسعه یک سیستم حسگر زیستی الزامات زیر بسیار ضروری است و برای پروژه‌های موفق و تجاری قابل توجه است.

گزینش پذیری

گزینش پذیری به‌عنوان نسبت سیگنال خروجی مربوط به آنالیت به‌تنهایی به سیگنال ماده مزاحم به‌تنهایی، در همان غلظت آنالیت بیان می‌شود. این امر به محدوده غلظت آنالیت و گزینش پذیری گیرنده و مبدل بیولوژیکی بستگی دارد. بسیاری از عناصر گزینش‌پذیر بیولوژیکی (آنزیم‌ها) اختصاصی هستند، بااین‌حال، برخی غیرانتخابی هستند. اندازه‌گیری آنالیت در محیط‌های بیولوژیکی شامل سوبستراهای مختلفی است که ممکن است با اندازه‌گیری تداخل داشته باشند و با استفاده از غشاهای مناسب می‌توان تأثیر آن‌ها را محدود کرد (Karunakaran et al., 2015).

پایداری و دوام عملیاتی

پایداری عملیاتی سنسور زیستی ممکن است به میزان قابل‌توجهی بسته به هندسه سنسور و روش تهیه متفاوت باشد. این به‌شدت به نفوذ داخلی بستر و شرایط عملیاتی بستگی دارد. این پارامتر با تماس مداوم یا پی‌درپی حسگر زیستی با محلول آنالیت (غلظت‌های مختلف)، دما، ترکیب بافر و pH بررسی می‌شود (Karunakaran et al., 2015).

حساسیت

حساسیت به عنوان پاسخ جریان در واحد غلظت آنالیت و سطح الکترود تعریف می شود. از تعریف مشخص است که برای یک پاسخ جریان خاص، حساسیت بیوسنسور برای الکترودی که سطح کوچک‌تری نسبت به سایرین دارد، بیشتر است (Karunakaran et al., 2015; Najafpour and Zare, 2015).

گستره تشخیص خطی

گستره تشخیص خطی حدی از غلظت آنالیت است که در آن پاسخ بیوسنسور به صورت خطی تغییر می‌کند. منحنی کالیبراسیون خطی برای غلظت‌های معین آنالیت با ترسیم پاسخ‌های به‌دست‌آمده نسبت به غلظت‌های مختلف آنالیت تهیه می‌شود. در حسگرهای زیستی، محدوده خطی وسیع مورد توجه است که باعث می شود حسگر زیستی در محدوده وسیعی از غلظت آنالیت قابل استفاده باشد (Karunakaran et al., 2015; Najafpour and Zare, 2015).

قابلیت تکرارپذیری

برای بررسی تکرارپذیری چندین حسگر زیستی مختلف با استفاده از همان روش ساخته می‌شود و پاسخ‌های آن‌ها نسبت به آنالیت معین اندازه‌گیری و بررسی می‌شود. هر چه پاسخ‌های سنسورهای ساخته شده به هم نزدیک‌تر باشد سنسور تکرارپذیری بالاتری دارد (Karunakaran et al., 2015; Najafpour and Zare, 2015).

زمان پاسخ

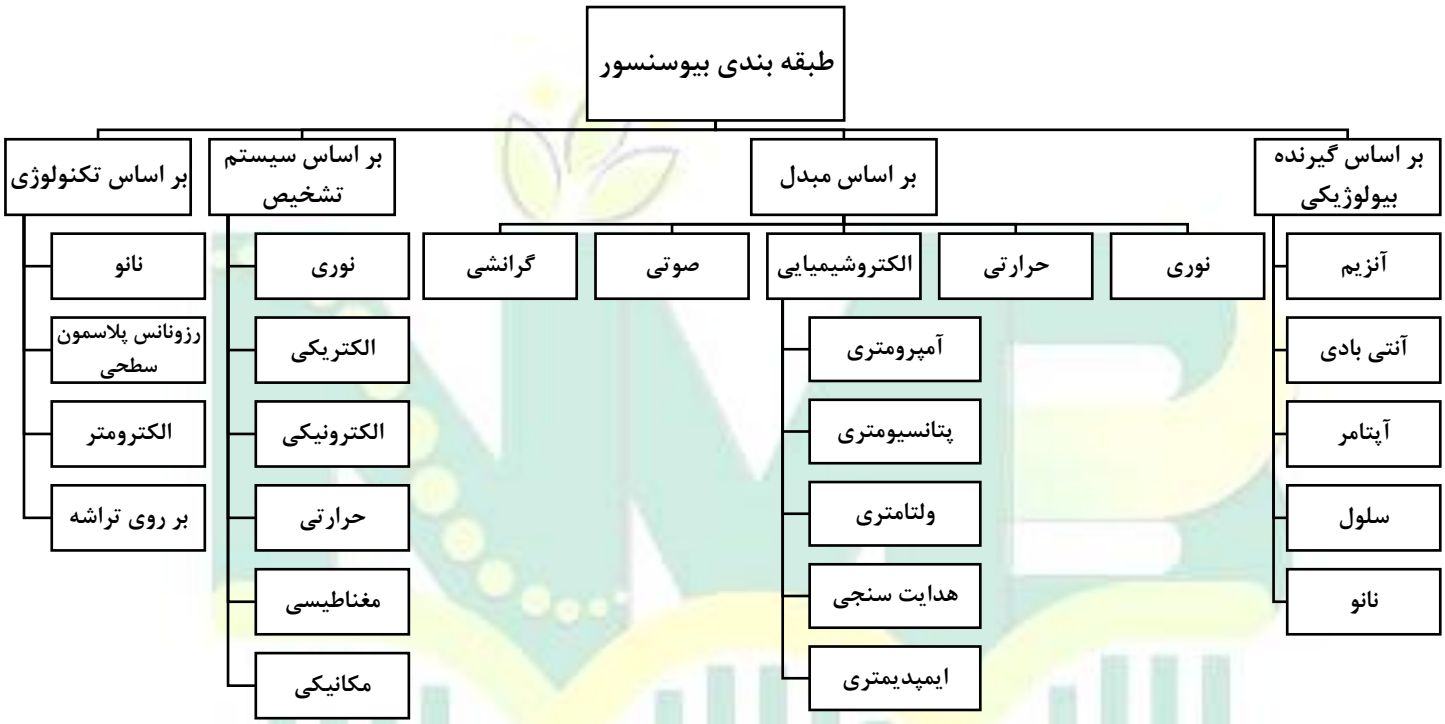
زمان پاسخ یک حسگر زیستی زمان مورد نیاز برای دستیابی به مقدار حالت پایدار است. با این حال، در عمل، زمان لازم برای رسیدن به ۹۵ یا ۹۸ درصد از پاسخ حسگر زیستی به عنوان زمان پاسخ شناخته می شود. زمان پاسخ وابسته به آنالیت و فعالیت سیستم تشخیص مولکولی است، یعنی هر چه فعالیت بالاتر باشد، زمان پاسخ کوتاه‌تر است. زمان پاسخ ۳ ثانیه تا ۲۵ دقیقه در مقالات گزارش شده است. از آنجایی که ماهیت سنسورها مبتنی بر تشخیص سریع است، زمان پاسخ بالای ۵ دقیقه جالب توجه نیست (Karunakaran et al., 2015; Najafpour and Zare, 2015).

حد تشخیص

حد تشخیص (LOD)، کمترین غلظت آنالیت است که توسط بیوسنسور قابل شناسایی است. در عمل حد تشخیص معمولاً با نسبت سیگنال به نویز ۳ تعیین می شود. حد تشخیص توسط معادله LOD=3Sb/m به دست می‌آید که در آن Sb انحراف معیار بافر یا نمونه بدون آنالیت است و m شیب منحنی کالیبراسیون است (Reddaiah and Reddy, 2014).

طبقه بندی بیوسنسورها

بیوسنسورها را می‌توان به بر اساس گیرنده بیولوژیکی، مبدل، سیستم تشخیص و تکنولوژی به کار رفته در آن طبقه بندی کرد که در شکل ۲ قابل مشاهده می‌باشد (Curulli, 2021). مهمترین نوع بیوسنسورها که در صنایع غذایی کاربرد گسترده‌ای دارند بیوسنسورهای الکتروشیمیایی می‌باشند.



شکل ۲: طبقه بندی بیوسنسورها

بیوسنسورهای الکتروشیمیایی

حسگر الکتروشیمیایی که در آن از الکترود به عنوان عامل انتقال استفاده می‌شود، نشان دهنده یک زیر طبقه مهم از حسگرها است. بر اساس گفته IUPAC در سال ۱۹۹۹، یک حسگر الکتروشیمیایی یک دستگاه یکپارچه مستقل است که قادر است اطلاعات تحلیلی کمی یا نیمه کمی خاصی را با استفاده از یک عنصر تشخیص بیولوژیکی ارائه دهد که در تماس مستقیم فضایی با یک عامل انتقال الکتروشیمیایی است. بیوسنسورهای الکتروشیمیایی جریان تولید شده از واکنش‌های اکسیداسیون و احیا را اندازه گیری می‌کنند. جریان تولید شده را می‌توان با غلظت گونه‌های فعال الکتریکی موجود و یا میزان تولید یا مصرف آن مرتبط دانست. سیگنال الکتریکی حاصله به فرایند تشخیص توسط هدف و آنالیت مربوط می‌شود و متناسب با غلظت آنالیت است (Perumal and Hashim, 2014).

در بین انواع مختلف حسگرهای زیستی، بیوسنسورهای الکتروشیمیایی از اهمیت بیشتری برخوردارند، زیرا نه تنها مقرون به صرفه و کاربر پسند هستند، بلکه اجازه می‌دهند دستگاه‌های قوی، قابل حمل و کوچک شده برای کاربردهای خاص ساخته شوند. علاوه بر این، ظرفیت عالی آن‌ها برای تشخیص و نظارت بر هرگونه تغییر در پارامترهای الکتریکی پتانسیل الکترود، جریان و امپدانس یا خازن انتقال بار به عنوان تابعی از غلظت آنالیت، آن‌ها را برای بسیاری از کاربردهای تجاری مناسب کرده است. در بیوسنسورهای الکتروشیمیایی، تغییرات جریان الکترون منجر به تولید یک سیگنال الکتروشیمیایی می‌شود که توسط آشکارساز الکتروشیمیایی اندازه گیری می‌شود. تنوع بیوسنسورهای الکتروشیمیایی در کاربردهای متعدد این سنسورها از نظارت بر میزان میکروارگانیسم‌ها در محیط‌های آلوده گرفته تا تشخیص گلوکز نشان داده شده است. بیوسنسورهای الکتروشیمیایی بسته به ماهیت تغییرات الکتروشیمیایی تشخیص داده شده در طی یک رویداد تشخیص زیستی، به یکی از پنج دسته آمپرومتری، پتانسیومتری، ولتامتری، هدایت سنجی و ایمپدیمتری تقسیم می‌شوند (Perumal and Hashim, 2014; Ensafi, 2019).

آمپرومتری

سنسورهای آمپرومتریک بر اساس اندازه گیری جریان به عنوان تابعی از زمان ناشی از اکسیداسیون و کاهش یک گونه الکترواکتیو در یک واکنش بیوشیمیایی عمل می‌کنند که عمدتا به غلظت یک آنالیت با پتانسیل ثابت بستگی دارد. سه نوع الکترود وجود دارد که معمولاً در سنسور آمپرومتریک استفاده می‌شود. الکترود کاری که معمولاً از طلا (Au)، کربن (C)، یا پلاتین (Pt) ساخته شده است. یک الکترود مرجع معمولاً نقره یا کلرید نقره (Ag/AgCl) که دارای پتانسیل ثابتی است که پتانسیل الکترود را کنترل می‌کند و الکترود سوم که الکترود کمکی نامیده می‌شود که گاهی برای کمک به اندازه گیری جریان مستقیم وجود دارد. از آنجا که مولکول‌های خاصی در الکترودهای فلزی خنثی اکسیده یا کاهش می‌یابند (واکنش‌های اکسایش و کاهش)، الکترون‌ها از آنالیت به الکترود در حال کار از الکترود به آنالیت منتقل می‌شوند. جهت جریان الکترون‌ها بستگی به خواص آنالیت دارد که می‌تواند توسط پتانسیل الکتریکی اعمال شده بر روی الکترود کار، کنترل شود. اگر الکترود کار به سمت پتانسیل مثبت هدایت شود، یک واکنش اکسیداسیون رخ می‌دهد و جریان فعلی بستگی به غلظت گونه‌های فعال (آنالیت) دارد که در سطح الکترود کار، منتشر می‌شود. به طور مشابه، اگر الکترود کار به سمت پتانسیل منفی سوق داده شود، واکنش کاهش رخ می‌دهد. سومین الکترود به نام الکترود کمکی اغلب برای کمک به اندازه گیری جریان مستقیم استفاده می‌شود. روش آمپرومتری را می‌توان با آنزیم‌ها، اسیدهای نوکلئیک و یک عنصر تشخیص بیولوژیکی حسگر ایمنی برای کاربردهای مختلف مانند تشخیص گلوکز، تشخیص بیماری، نظارت بر محیط زیست و غیره ادغام کرد. با این حال، محدودیت‌هایی برای استفاده از این حسگر زیستی وجود دارد که در آن وجود تداخل الکترواکتیو در ماتریس نمونه می‌تواند باعث شود که میزان جریان به دست آمده توسط مبدل صحیح نباشد. روش‌های مختلفی برای غلبه بر این محدودیت وجود دارد مانند رقیق کردن نمونه، پوشش دهی الکترود با پلیمرهای مختلف، تغییر محیط آنالیت، افزودن واسطه و غیره (Perumal and Hashim, 2014; Sezgintürk, 2020).

ولتامتری

ولتامتری تکنیکی موثر برای مطالعه رفتار الکتروشیمیایی بیوسنسورها در مجاورت آنالیت می‌باشد. در ولتامتری، جریان در شرایطی اندازه گیری می‌شود که پتانسیل اعمالی ما بین الکترود مرجع و الکترود کاری تغییر داده می‌شود. ولتامتری روبشی خطی روشی

می‌باشد که در آن پتانسیل اعمالی به صورت خطی تغییر داده می‌شود و جریان پاسخ بر حسب اختلاف پتانسیل در نمودارهای ولتاموگرام نمایش داده می‌شود. ولتامتری چرخه‌ای روش دیگری است که اکسایش و کاهش در واکنش‌های شیمیایی را مورد بررسی قرار می‌دهد. در ولتامتری چرخه‌ای اختلاف پتانسیل با یک سرعت روبش ثابت از مقدار اولیه به مقدار ثانویه تغییر داده می‌شود و سپس مجددا به مقدار ثانویه برگشت داده می‌شود (Zare et al., 2017). در ولتاموگرام، شدت پیک مستقیماً با غلظت آنالیت متناسب است، در حالی که موقعیت حداکثر قله بستگی به گونه‌های شیمیایی درگیر در واکنش‌های اکسیداسیون و کاهش دارد. نوع ولتامتری به کنترل پتانسیل بستگی دارد. این روش بیشترین کاربرد را برای تشخیص باکتری‌های بیماری زا در غذا دارند. در واقع ولتامری همان آمپرومتری است با این تفاوت که در آمپرومتری، جریان در پتانسیل ثابت اندازه گیری می‌شود اما در ولتامتری، جریان در تغییرات کنترل شده پتانسیل اندازه گیری می‌شود (Perumal and Hashim, 2014; Sezgintürk, 2020).

پتانسیومتری

روش پتانسیومتری اولین بار در سال ۱۹۶۹ گزارش شد که در آن از بیوسنسور آنزیمی برای تشخیص اوره استفاده شد. این حسگر شامل دو الکترود نشانگر و مرجع (Ag/AgCl) بود. اصل کار انتقال پتانسیومتری به تفاوت پتانسیل بین الکترود نشانگر و الکترود مرجع بستگی دارد که در حین فرآیند تشخیص در یک سلول الکتروشیمیایی هنگامی که مقدار صفر یا ناچیز جریان از طریق الکترود عبور می‌کند، جمع می‌شوند. تفاوت پتانسیل الکتریکی یا نیروی محرکه الکتریکی بین دو الکترود با استفاده از ولت متر امپدانس بالا اندازه گیری می‌شود. الکترود کار از یک غشاء رسانای یون انتخابی ساخته شده است که گاهی اوقات الکترود انتخاب کننده یون (ISE) نامیده می‌شود. در این بیوسنسور لگاریتم غلظت ماده اندازه گیری شده متناسب با اختلاف پتانسیل است. با توجه به اینکه روش پتانسیومتری به دلیل انتخاب پذیری، سادگی، سرعت بالا، هزینه پایین اندازه گیری، تعمیر و نگهداری، برای عملکرد حسگرهای زیستی بسیار جذاب است، در شیمی بالینی کاربرد زیادی دارد. با این حال، این دستگاه هنوز حساسیت کمتری دارد و اغلب کندتر از دستگاه آمپرومتری است (Perumal and Hashim, 2014; Sezgintürk, 2020).

هدایت سنجی

در این روش اطلاعات تحلیلی با اندازه گیری هدایت الکترولیت به دست می‌آید که با تغییر در غلظت گونه‌های یونی متفاوت است؛ به عبارت دیگر، روش مبتنی بر هدایت سنجی اطلاعاتی در مورد توانایی یک محلول الکترولیت برای هدایت جریان الکتریکی بین الکترودها ارائه می‌دهد. دستگاه هدایت سنجی از دو الکترود ساخته شده است که با فاصله معینی یا با واسطه‌ای مانند نانوسیم و غیره از هم جدا شده‌اند. اکثر کارهایی که درباره سنسور هدایت سنجی گزارش شده است، در رابطه با آنزیم‌هایی است که در آن قدرت یونی و هدایت محلول بین دو الکترود و در نتیجه واکنش آنزیمی تغییر می‌کند. منبع AC برای اعمال بر روی الکترود برای اندازه گیری هدایت استفاده می‌شود؛ بنابراین، ترکیب یونی تغییر کرده و رسانایی را فراهم می‌کند که با استفاده از اهم متر اندازه گیری می‌شود. مزایای اصلی دستگاه هدایت سنجی این است که نیازی به الکترود مرجع نیست، ارزان است و امکان کوچک سازی و پاسخ مستقیم الکتریکی وجود دارد. نشان داده شده که که مبدل‌های هدایت سنجی برای تشخیص عوامل بیماری زای قابل انتقال از غذا استفاده شده‌اند. روش هدایت سنجی در مقایسه با سایر روشهای الکتروشیمیایی حساسیت کمتری دارد و به شدت به پاسخ به ظرفیت بافر وابسته است. با این حال، تحقیقات اخیر نشان داده است که مبدل هدایت سنجی توجه زیادی را به خود جلب کرده و بر مشکل

حساسیت غلبه کرده است. متعاقباً، برخی تحقیقات به منظور بهبود عملکرد و حساسیت انجام شده است (Perumal and Hashim, 2014; Sezgintürk, 2020).

ایمپدیمتری

روش طیف سنجی امپدانس الکتریکی (EIS) یک روش معمول برای تشخیص الکتروشیمیایی نیست. با این حال، این روش اخیراً به یک ابزار محبوب برای انتقال گیرنده‌های زیستی تبدیل شده است. این روش شبیه به سایر دستگاه‌های تشخیص الکتروشیمیایی است. اساساً، طیف سنجی امپدانس مزایای عمده‌ای نسبت به سایر روش‌های تشخیص در غلظت‌های پایین آنالیت دارد. در روش طیف سنجی امپدانس نمونه بر روی دستگاه سنجش قرار می‌گیرد و یک ولتاژ متناوب کنترل شده بر روی الکترود اعمال می‌شود و جریان عبوری از نمونه کنترل می‌شود. امپدانس الکتریکی حاصل از نمونه به عنوان نسبت ولتاژ اضافه جریان محاسبه می‌شود. روش طیف سنجی امپدانس شامل یک سیستم سه الکترودی و یک پتانسیواستات است. سه الکترود عبارت‌اند از الکترود کار که اندازه‌گیری جریان را فراهم می‌کند، الکترود کمکی که جریان را به سلول ارائه می‌دهد و الکترود مرجع برای اندازه گیری ولتاژ. پتانسیواستات به عنوان یک ارائه دهنده امپدانس ورودی بالا عمل می‌کند تا ولتاژ الکترود را حفظ کند. طیف سنجی امپدانس به طور گسترده توسط بسیاری از گروه‌های تحقیقاتی برای تشخیص سلول‌های سرطانی، ویروس‌ها، باکتری‌ها و عوامل بیماری‌زا مورد استفاده قرار گرفته است. تحقیقات اخیر پیشرفت و کاربرد حسگر زیستی امپدانس را در تشخیص باکتری‌های بیماری‌زای ناشی از غذا نشان داده است (Perumal and Hashim, 2014; Sezgintürk, 2020).

بیوسنسورها در صنایع غذایی

تعیین ترکیبات موجود در ماده غذایی بخصوص ترکیبات آلی در صنایع غذایی بسیار مهم می‌باشد. از آنجایی‌که روش‌های متداول اغلب نیاز به واکنش‌های طولانی و مراحل پیچیده دارند، بیوسنسورها با بیوکاتالیزوهای تثبیت شده که محاسن فراوانی دارند به‌کار گرفته می‌شوند. در سال‌های اخیر بیوسنسورها کاربردهای فراوانی در بخش‌های مختلف در صنایع غذایی پیدا کرده‌اند. به‌کارگیری حسگرهای زیستی برای اطمینان از ایمنی غذا با رشد بازار از ۱۷ میلیارد دلار در سال ۲۰۱۸ به ۲۴/۶ میلیارد دلار در سال ۲۰۲۳ پیش بینی می‌شود (Schaertel and Firstenberg-Eden, 1988; Griesche and Baeumner, 2020).

بیوسنسورها برای شناسایی ترکیبات مختلف در مواد غذایی مانند ساکاریدها، الکل‌ها، اسیدآمینه‌ها، نوکلئوتیدها، منتل‌ها، اسیدهای کربوکسیلیک، آمین‌های بیوژنیک، ترکیبات هتروسیکلیک و ترکیبات آلی و غیرآلی و آلاینده‌ها و افزودنی‌ها به کار می‌روند. به طور کلی بیوسنسورها در فرایند تولید مواد غذایی در صنایع مختلفی نظیر پخت (مانند میزان رطوبت و پروتئین در آرد، مرحله تخمیر)، گوشت و ماهی (بازرسی فساد تجزیه‌ای و باکتریایی، میزان رطوبت و چربی)، لبنیات (اندازه‌گیری چربی کل و جامدات شیر، میزان رطوبت در تولید پنیر)، تخمیر (پایان فرایند تخمیر لاکتیکی)، نوشیدنی‌ها (جامدات در آب پرتقال و جامدات شیر، کنترل رنگ)، چربی‌ها و روغن‌ها (کنترل ویسکوزیته روغن سرخ کردنی)، میوه‌جات و سبزیجات (شناسایی تازگی) کاربرد دارند. همچنین بیوسنسورها در صنعت بسته‌بندی مواد غذایی نیز کاربرد دارند. پایداری مواد غذایی در برابر اکسایش به غلظت ترکیبات، فعالیت

ترکیب‌های واکنش‌دهنده مانند پراکسیدان‌ها و آنتی اکسیدان‌های موجود بستگی دارد. گرچه مواد غذایی مانند گوشت می‌توانند به‌صورت مناسب در محیط‌های بدون اکسیژن بسته‌بندی گردند (مانند استفاده از بسته‌بندی با اتمسفر اصلاح شده یا بسته‌بندی تحت خلأ) اما این روش‌ها اکسیژن موجود را به‌طور کامل خارج نمی‌کنند و نفوذ گاز اکسیژن از راه ماده بسته‌بندی باعث فساد ماده غذایی می‌گردد، زیرا در چنین شرایطی اکسایش چربی با توجه به میزان اکسیژن باقیمانده در بسته ماده غذایی و فلور میکروبی موجود می‌تواند صورت بگیرد. گازهای اکسیژن و دی‌اکسیدکربن مهم‌ترین گازهای غیر خنثی در فرآورده‌های بسته‌بندی شده با اتمسفر اصلاح شده می‌باشند و فشار جزئی آن‌ها در فضای بسته به‌عنوان شاخصی مناسب برای ارزیابی وضعیت کیفی بسته مورد استفاده قرار می‌گیرد. میزان اکسیژن و دی‌اکسیدکربن با گذشت زمان تغییر می‌کند که این تغییر تحت تأثیر عواملی مانند نوع فرآورده، تنفس، ماده بسته‌بندی، اندازه بسته، نسبت‌های حجمی، شرایط نگهداری، بی‌عیبی بسته و غیره قرار دارد. بیوسنسورها از طریق اندازه‌گیری میزان برخی مواد در محصولات غذایی، ترکیبات سنتز شده توسط گیاه و به‌طور کلی مواد ذخیره میزان طراوت و تازگی آن‌ها را کنترل می‌کنند (Schaertel and Firstenberg-Eden, 1988; Payan and Hamedi, 2013).

ترکیبات هدف عمدتا خطرات مربوط به مواد غذایی هستند که شامل عوامل بیماری زا، میکروارگانیسم‌های فاسد کننده، متابولیت‌های ثانویه (گلیکوزیدهای سیانوژنیک، گلیکوآکلوئیدها، آفلاتوکسین، بوتولینوم، انتروتوکسین‌ها)، متابولیت های ناشی از فرآیند (آکریلامید، بنزن، آکرولئین، متیل ایمیدازول‌ها، فوران، آمین‌های آروماتیک هتروسیکلیک، نیتروزوآمین‌ها، باقی مانده آنتی بیوتیک‌ها (کلرامفنیکل، بی لاکتام‌ها، فلوروکینولون‌ها و سولفونامیدها)، بقایای آفت کش‌ها (اندوسولفان، مالاتیون، پاراتیون، پاراکوات)، فلزات سنگین (جیوه، آرسنیک، کادمیم، سرب) و آلاینده‌های بسته بندی (بیسفنول A، فتالات، استالدهید) می‌باشند. علاوه بر این، اجزای مختلف (مواد تشکیل دهنده، ترکیبات آلی فرار، میزان رسیدن یا طراوت در میوه‌ها و سبزیجات، کلسترول، گلوکز، آدنوزین تری فسفات، پلی فنول‌ها، مواد حساسیت زا)، عمر مفید و اصالت سیستم غذایی به منظور برآورد کیفیت مواد غذایی با استفاده از حسگرهای خوراکی ارزیابی می‌شوند (Ragavan and Neethirajan, 2019).

پـاتـوژن

با توجه به شیوع بالای بیماری‌های ناشی از غذا، عوامل بیماری‌زای ناشی از غذا به عنوان تهدید اصلی برای سلامت عمومی توجه جهانی را به خود جلب کرده است. مواد غذایی آلوده به پاتوژن های غذایی منجر به برخی بیماری های شدید انسان مانند دل درد و استفراغ شدید می شود. علاوه بر این، گزارش شده است که درصد جمعیت مبتلا به بیماری‌های ناشی از غذا هر ساله به ۳۰ درصد در برخی از کشورهای صنعتی رسیده است که عمدتاً به آب آشامیدنی یا مواد غذایی آلوده به عوامل بیماری‌زا منتقل می‌شود. با توجه به اهمیت کنترل و پیشگیری از بیماری‌های ناشی از غذا بیوسنسورها نقش کلیدی در تشخیص پاتوژن‌ها ایفا می‌کنند. از شایع‌ترین این باکتری‌های مرتبط با بیماری های ناشی از آب و غذا، می توان به ایی.کولای، سالمونلا و لیستریا اشاره نمود. ایی.کولای یک باکتری شناخته شده است که به طور معمول در روده انسان ها و حیوانات یافت می‌شود. بیشتر سویه های ایی.کولای بی ضرر هستند. با این حال چندین سروتیپ باعث آلودگی جدی مواد غذایی می شوند که ممکن است در غذاهای خام مانند شیر خام و گوشت چرخ کرده گاو نیم پز یافت شوند. سالمونلا یک پاتوژن روده ای است که باعث مسمومیت غذایی می‌شود. سروتیپ های غالب در بین

کشورها متفاوت است. مطالعات نشان می دهد که سالمونلاها سموم را در غذا ترشح نمی‌کنند، اما باکتری های بلعیده شده به مخاط روده حمله کرده و سم تولید می‌کنند. بیماری سالمونلا معمولاً با تخم مرغ، گوشت و محصولات لبنی مرتبط است. لیستریا باکتری های گرم مثبت میله ای کوچکی هستند که می توانند در دمای یخچال (۴ الی ۱۰ درجه سانتی‌گراد) رشد کنند. همچنین، این باکتری قادر است در محدوده وسیعی از pH و غلظت نمک زنده بماند و بیشتر در گوشت، مرغ و محصولات دریایی یافت می شوند (Zhang et al., 2019; Eyvazi et al., 2021; Kotsiri et al., 2022).

مایکوتوکسین

از دیگر ترکیبات قابل تشخیص توسط بیوسنسورها مایکوتوکسین است. مایکوتوکسین به عنوان یکی از رایج ترین آلاینده های غذایی به دلیل رشد گسترده قارچ ها ظاهر می شود. با این حال، مایکوتوکسین‌ها به سختی در فرآیندهای کلی آماده‌سازی مواد غذایی حذف می‌شوند. مایکوتوکسین‌ها با غلظت کم نیز می‌توانند منجر به برخی بیماری‌های جدی مانند بیماری‌های کبد، بیماری کلیوی، سرطان و حتی مرگ شوند. بنابراین، تشخیص مایکوتوکسین ها برای محافظت از انسان در برابر خطرات سلامتی بسیار مهم است. شایع ترین آن‌ها سم آفلاتوکسین و سم بوتولینوم می باشد. آفلاتوکسین‌ها ترکیبات پلی کتایدی هستند که توسط مسیر متابولیک ثانویه در گونه های قارچی تولید می شوند. پایدار در برابر حرارت، بسیار سمی و سرطان زا هستند که منجر به عواقب جدی برای سلامتی می شود. علائم پس از مصرف سم به گونه، سن، جنس و وضعیت تغذیه بستگی دارد. در انسان علائم شامل خونریزی، آسیب حاد کبد، مشکلات گوارشی و مرگ است. بوتولینوم کشنده ترین سم شناخته شده است که نوروتوکسین های بوتولینوم منجر به بوتولیسم می شود که موجب فلج عضلانی می شود (Griesche and Baeumner, 2020; Eyvazi et al., 2021; Hua et al., 2021).

افزودنی های غیر مجاز

افزودنی های غیر مجاز نشان دهنده وجود یا مصرف بیش از حد برخی از مواد در محصولات کشاورزی، مواد غذایی و دامپروری است که توسط قوانین ممنوع شده‌اند. این افزودنی های غیر مجاز ممکن است به طور فریبنده‌ای محتوای ظاهری برخی مواد غذایی را بهبود دهند یا اهداف غیرقانونی دیگری داشته باشند. افزودنی های غیرمجاز مانند مالاشیت گرین در ماهی، ملامین در شیر، اریتروزین در آب هویج می‌باشد که می تواند برای بدن انسان مضر باشد. تشخیص افزودنی های غیرمجاز به روشی ساده و در محل با استفاده از بیوسنسورها می تواند به مصرف کنندگان کمک کند تا دچار فریب سودجویان نشوند (Lv et al., 2018; Hua et al., 2021).

آنتی بیوتیک ها

آنتی بیوتیک ها به عنوان داروهای انسانی و دامپزشکی به طور گسترده در درمان عفونت باکتریایی و پیشگیری از بیماری‌های دام استفاده می شود. با این حال، بقایای این داروها و متابولیت های آنتی بیوتیکی ممکن است در برخی از محصولات دامی از جمله تخم‌مرغ، گوشت، شیر و غیره جمع شود، کیفیت غذا متعاقبا تحت تأثیر قرار می‌گیرد و باعث اثرات منفی بر سلامتی مصرف‌کنندگان مانند آلرژی‌های پوستی و مقاومت میکروبی می‌شود. با توجه به تهدید فزاینده سوء مصرف آنتی بیوتیک، ایجاد استراتژی‌های جدید برای تشخیص دقیق داروهای آنتی بیوتیک و باقی مانده های متابولیت در ماتریس های غذایی پیچیده اهمیت فزاینده ای پیدا کرده است (Lv et al., 2018; Griesche and Baeumner, 2020).

بقایای آفت کش‌ها

آفت کش ها به موادی اطلاق می‌شود که به طور عمدی برای پیشگیری، از بین بردن، دفع، جذب یا کنترل هر گونه آفت، از جمله گونه های ناخواسته گیاهی یا جانوری استفاده می‌شوند. اگرچه آفت‌کش‌ها می‌توانند از آفات گیاهان جلوگیری کنند، اما مصرف بیش از حد آفت‌کش‌ها می‌تواند بقایا و متابولیت‌های کنترل‌نشده‌ای را در محیط باقی بگذارد. آفت کش‌ها به طور گسترده در زمینه کشاورزی استفاده می شوند که بیشتر آن‌ها سرطان زا هستند و به طور دائم در مواد غذایی باقی می مانند. بقایای آفت کش‌ها برای مدت طولانی در اندام ها انباشته می‌شوند و قابل هضم نیستند و به طور قابل توجهی به سلامت انسان آسیب می‌رسانند. آفت کش‌ها را می توان در غلات، سبزیجات و سایر غذاها یا آب های آلوده یافت. دریافت آلودگی توسط انسان می تواند علائمی از جمله سردرد، استفراغ، خارش و تحریک پوست، مشکلات تنفسی و غیره را ایجاد کند. تشخیص آفت‌کش‌ها می‌تواند به‌طور مقدماتی محصولات فاقد صلاحیت را برای اطمینان از ایمنی مواد غذایی حذف کند (Lv et al., 2018; Hua et al., 2021).

فلزات سنگین

وجود بیش از حد مجاز فلزات سنگین، مانند جیوه، کادمیم و سرب در مواد غذایی، تهدید بزرگی برای سلامت عمومی هستند. مصرف طولانی مدت غذای آلوده به فلزات سنگین باعث عوارض شدید مانند اختلال عصبی و نقص شناختی می‌شود. برای تشخیص یون‌های فلزات سنگین، روش‌های متعددی مانند طیف‌سنجی جرمی پیشنهاد شده‌اند. با این حال، این فناوری های سنتی به تجهیزات حجیم یا فرآیندهای پیش تصفیه پیچیده نیاز دارند. استفاده از بیوسنسورها برای تشخیص فلزات سنگین روشی کارآمد، سریع و کم هزینه می‌باشد (Lv et al., 2018).

آکریل آمید

آکریل آمید وقتی تشکیل می‌شود که برخی از غذاهای غنی از کربوهیدرات در دمای بالاتر از ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد سرخ‌شده، پخته یا بوداده شوند، این ترکیب به‌عنوان یک ماده سرطان‌زای احتمالی نگران‌کننده است. آکریل آمید به‌طور تصادفی در آوریل ۲۰۰۲ توسط آژانس ملی غذا سوئد و دانشگاه استکهلم در غذاها کشف شد. آن‌ها گزارش دادند که آکریل آمید در غلظت‌های بالای ۳۰ الی ۲۳۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم در غذاهای نشاسته‌ای، مانند سیب‌زمینی سرخ‌شده و نان سرخ‌شده یا پخته‌شده و در غذاهای آب‌پز نشده وجود دارد. در غذاهای سرخ‌شده یا پخته‌شده، اکریل آمید ممکن است در اثر واکنش بین آسپاراژین و قندهای احیاکننده (فروکتوز، گلوکز و غیره) یا کربونیل‌های واکنش‌پذیر در دمای بالاتر از ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد (۲۴۸ درجه فارنهایت) تولید شود. آکریل آمید در صورت مصرف خوراکی با دوز بالا، باعث ایجاد سرطان در موش‌های صحرایی می‌شود، باعث افزایش تومورهای سیستم عصبی، حفره دهان، صفاق، غده تیروئید، غده پستانی و رحم می‌شود. آکریل آمید همچنین مسمومیت عصبی در مهره‌داران، جهش‌زایی در سلول‌های سوماتیک و جوانه‌ای و سرطان‌زایی را در حیوانات آزمایشگاهی نشان می‌دهد. این یافته توجه جهانیان را به مسئله بهداشت عمومی متمرکز کرده است (Thakur and Ragavan, 2013; Pundir et al., 2019).

بنزن

وجود بنزن در نوشیدنی‌های حاوی نگهدارنده به دلیل سرطان‌زایی بنزن، خطری برای سلامت انسان است. در سال ۱۹۹۳، گاردنر و همکارانش گزارش دادند بنزن از اسید بنزوئیک در حضور ویتامین C تشکیل می‌شود. بنزن در اثر دکربوکسیلاسیون اسید بنزوئیک نگهدارنده در حضور اسید اسکوربیک (ویتامین C)، یا اسید اریتوربیک، به‌ویژه در گرما و نور حاصل می‌شود. بنزوئیک اسید معمولاً

به‌عنوان یک نگهدارنده غذا به شکل نمک‌های آن مانند بنزوات سدیم، بنزوات پتاسیم یا بنزوات کلسیم اضافه می‌شود. تصور نمی‌شود که اسیدسیتریک باعث تولید قابل توجهی بنزن در ترکیب با اسید بنزوئیک شود، اما برخی شواهد نشان می‌دهد که در حضور اسید اسکوربیک یا اریتوربیک و اسید بنزوئیک، اسیدسیتریک ممکن است تولید بنزن را تسریع کند. از دیگر عواملی که در تشکیل بنزن تأثیر می‌گذارد، گرما و نور است. نگهداری نوشیدنی‌ها در شرایط گرم باعث سرعت بخشیدن به تشکیل بنزن می‌شود (Thakur and Ragavan, 2013).

طراوت و تازگی ماهی

روش‌های آنالیز استاندارد برای ارزیابی طراوت و تازگی ماهی بر اساس اندازه‌گیری خصوصیات شیمیایی و فیزیکی مربوط به شکل ظاهری ماهی، رنگ، خاصیت کشسانی یا بافت گوشت، بو و طعم آن است. این روش‌ها معایب زیادی دارند، ازجمله تخریب ماهی، گران بودن و همچنین وقت‌گیر بودن. همه این تکنیک‌ها نیاز به اپراتورهای بسیار ماهر دارند. در دهه گذشته، پیشرفت سریع در توسعه تکنیک‌های جدید برای ارزیابی ویژگی‌های کیفیت غذا منجر به توسعه تکنیک‌های ابزار غیرتهاجمی و غیر مخرب مانند حسگرهای زیستی، سنسورهای الکترونیکی و روش‌های طیف‌سنجی شده است. گزارش‌های علمی موجود نشان می‌دهد که همه این تکنیک‌های جدید تنها با یک آزمایش اطلاعات زیادی را فراهم می‌کند و آن‌ها را برای کنترل فرآیند آنلاین مناسب می‌کند. علاوه بر این، در این تکنیک‌ها اغلب زمان آماده‌سازی نمونه بسیار کوتاه است و یا اصلا نیازی به آماده‌سازی ندارند و اجازه می‌دهند از تخریب نمونه جلوگیری شود (Franceschelli et al., 2021).

صنایع لبنی

در حال حاضر تمایل به تولید دستگاه‌های آنالیزی جدید برای آزمایش دقیق شیر و محصولات لبنی در صنایع غذایی وجود دارد. حسگرهای زیستی به‌عنوان یک فناوری جذاب ظهور کرده‌اند که می‌تواند جایگزین روش‌های تحلیلی سنتی برای غربالگری محتوای شیر، عوامل بیماری‌زای منتقله از مواد لبنی، آلاینده‌های محیطی و مواد شیمیایی شود. در ترکیب با نانومواد و میکروسیالات، تعداد حسگرهای زیستی توسعه یافته برای آنالیز شیر طی یکی دو دهه اخیر به‌طور تصاعدی رشد کرده است. به همین ترتیب، توسعه حسگرهای زیستی برای غربالگری معمول تحلیلی در حال تبدیل شدن به واقعیت است (Ashley, 2021).

گوشت

صنعت گوشت که با خطرات بهداشتی مانند عوامل بیماری‌زای کشنده، داروهای دامپزشکی، بقایای سموم دفع آفات، سموم و فلزات سنگین همراه است، به ابزاری برای مقابله با این مشکلات و تضمین محصول ایمن برای مصرف‌کننده نیاز دارد. رشد صنعت، سناریوی تجارت جهانی، قوانین سختگیرانه و آگاهی مصرف‌کننده مسئولیت بیشتری را برای پاسخگویی به انتظارات و خواسته‌ها بر عهده صنعت گوشت قرار داده است. حسگرهای زیستی جدیدترین ابزار تشخیص در صنایع با رشد سریع از جمله صنایع غذایی است. از این رو امکان استفاده از حسگرهای زیستی به‌عنوان ابزاری برای ایمنی برای محافظت از سلامت مصرف‌کننده و پرداختن به موضوعات ایمنی در صنعت گوشت بسیار رواج پیدا کرده است (Singh et al., 2016; Meshram et al., 2018).

در جدول ۱ نتایج بررسی محققان بر روی تشخیص ترکیبات مواد غذایی با استفاده از بیوسنسورها گزارش شده است. نوع آنالیت، عنصر بیولوژیکی، نوع مبدل به کار گرفته شده، حد تشخیص بیوسنسور و همچنین کاربرد بیوسنسور در صنایع غذایی ارائه شده است.

جدول ۱:تحقیقات انجام شده بر روی کاربرد بیوسنسور در صنایع غذایی

آنالیت	کاربرد	عنصر بیولوژیکی	مبدل	گستره تشخیص	منبع
گلوکز	نوشابه، آب میوه و شیر	گلوکز اکسیداز	آمپرومتری	۵۰ - ۵۰۰ mM	(Centonze et al., 1997)
گلوکز	نوشیدنی‌ها	گلوکز اکسیداز	آمپرومتری	۸×۱۰$^{-۴}$–۱×۱۰$^{-۵}$ mol/l	(del Cerro et al., 1997)
گلوکز	آب میوه و عسل	گلوکز اکسیداز	آمپرومتری	۰/۵ - ۱۰ mM	(Gavalas et al., 2000)
فروکتوز	عسل	دی-فروکتوز دهیدروژناز	آمپرومتری	< ۱/۰ mM	(Bassi et al., 1998)
۱-گلوتامات	سس سویا	ال-گلوتامیناز اکسیداز	آمپرومتری	< ۱/۶ mM	(Kwong et al., 2000)
هیستامین	غذاهای دریایی	هیستامین اکسیداز	آمپرومتری	< ۱۰$^{-۷}$×۹/۵ M	(Hibi and Senda, 2000)
آفت کش	سبزیجات	استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز	آمپرومتری	۵×۱۰$^{-۵}$ – ۵۰ mg/kg	(Nunes et al., 1998)
ال-لیزین	شیر و ماکارونی	ال-لیزین-آ-اکسیداز	آمپرومتری	۱۰$^{-۵}$ - ۱۰$^{-۳}$ mol/l	(Curulli et al., 1998)
کاتکول	نوشیدنی‌ها	پلی فنل اکسیداز	آمپرومتری	۲×۱۰$^{-۶}$ - ۱×۱۰$^{-۵}$ M	(Eggins et al., 1997)
پلی فنول‌ها	عصاره‌های چای سبز، انگور و زیتون	تیروزیناز	آمپرومتری	۱۰-۱۰۰mmol/l	(Romani et al., 2000)
پلی فنول‌ها	روغن زیتون	تیروزیناز	آمپرومتری	۰/۳ – ۳۰ mM	(Dall'Orto et al., 1999)
گلوکز و لاکتات	آب گوجه	گلوکز اکسیداز	آمپرومتری	۲۰–۱۰۰ mM	(Palmisano et al., 2000)
گلوکز و گالاکتوز	ماست و شیر	گلوکز اکسیداز ، گالاکتوز اکسیداز و پراکسیداز	آمپرومتری	۴-۲۵۰ mg/l	(Mannino et al., 1999)
ال- لاکتات	نوشیدنی‌ها	ترانس آمیناز پیرورویک گلوتامیک و دهیدروژناز ال- لاکتات	آمپرومتری	۶×۱۰$^{-۷}$– ۸/۵×۱۰$^{-۵}$ M	(Lobo-Castanon et al., 1997)
آمین‌ها	طراوت و تازگی میگو	اورنیتین کاربامیل ترانسفراز، نوکلئوزید فسفریلاز و گزانتین اکسیداز	آمپرومتری	۰–۴۰ mM	(Shin et al., 1998)
آمین‌ها	میوه و سبزیجات	الف) دی آمین اکسیداز ب) پلی آمین اکسیداز	آمپرومتری	الف) ۲×۱۰$^{-۳}$–۲×۱۰$^{-۶}$ mol/l ب) ۱×۱۰$^{-۳}$–۲×۱۰$^{-۶}$ mol/l	(Mello and Kubota, 2002)

آفلاتوکسین	برنج و گندم	DNA	ولتامتری	۰/۰۵-۲۰۰ ng/mL	(Xiong et al., 2020)
آفلاتوکسین	روغن و سس سویا	آپتامر	ایمپدیمتری	۰/۰۰۱-۰/۱ ng/mL	(Lin and Shen, 2020)
فومنوسین B1	ذرت	اکسید گرافن احیاشده	ولتامتری	۰/۲-۴/۵ppm	(Lu et al., 2016)
اوکراتوکسین	دانه‌های کاکائو	آپتامر	ایمپدیمتری	۰/۱۵-۲/۵ng/mL	(Mishra et al., 2015)
اوکراتوکسین	آب میوه	DNA	ولتامتری	۰/۲-۵۰۰ nM	(Zhu et al., 2018)
سالمونلا	شیر	نانوذرات طلا	ولتامتری	۱۰-۱۰^{5}CFU/mL	(Xiang et al., 2015)
سالمونلا	گوشت مرغ	اکسیدگرافن	ولتامتری	۱۰-۱۰^{۶} CFU/mL	(Dinshaw et al., 2017)
ایی. کولای	شیر و آبمیوه	اکسید گرافن احیاشده	ایمپدیمتری	۱۰-۱۰^{۸}CFU/mL	(Pandey et al., 2017)
استافیلوکوکوس	عسل	DNA	ولتامتری	۳۰-۳۰× ۱۰^{۸}CFU/mL	(Cai et al., 2021)
استافیلوکوکوس	شیر	پلی (۳-تیوفن استیک اسید)	ایمپدیمتری	۱۰-۱۰^{۸} CFU/mL	(Wang et al., 2021)
لیستریا	آب سبزیجات	آپتامر	ایمپدیمتری	۱۰^{۲}-۱۰^{۴} CFU/mL	(Sidhu et al., 2020)
فنیتروتیون	آب پرتقال	پروتئین	ولتامتری	$^{-۷}$-۱/۲×۱۰$^{-۵}$M ۹/۹×۱۰	(Itkes et al., 2019)
فنیتروتیون	آب	سلولز	ولتامتری	۰/۰۳-۱۳۳۳/۸ µM	(Velusamy et al., 2019)
پاراتیون	آبمیوه سیب و توت فرنگی	آلبومین	ولتامتری	۱۰$^{-۱۰}$ – ۵×۱۰$^{-۶}$ M	Kumar and (Sundramoorthy, 2019
پاراکسون	گلابی و خیار	استیل کولین استراز	آمپرومتری	۰/۱-۱۰۰۰ µg/L	(Zhao et al., 2020)
فنیتروتیون	گوجه	اکسید گرافن احیاشده	ولتامتری	۰/۰۵-۱µM	(Özcan et al., 2019)
فوسمت	آرد گندم	استیل کولین استراز	آمپرومتری	۵-۱۲۵ nM	(Bilal et al., 2021)

۲.نتیجه گیری

در صنایع غذایی کنترل کیفیت اهمیت زیادی دارد و برای همیت روش‌های سریع برای نظارت بر کیفیت مواد غذایی ضروری است. روش‌های سنتی متداول معمولا پیچیده، وقت گیر و پرهزینه هستند. توسعه حس‌گرهای کارآمد نه تنها فرآیند تشخیص و کنترل کیفیت را تسریع می‌کند بلکه مقرون به صرفه نیز خواهد بود. به طور کلی، استفاده از حس‌گرهای زیستی برای آنالیز مواد غذایی می‌تواند راهکاری برای یک روش اختصاصی، حساس، سریع و ارزان برای نظارت بر طیف وسیعی از آنالیت‌های هدف فراهم کند. برای ساخت بیوسنسورها باید تثبیت عنصر بیولوژیکی و انتخاب نوع مبدل به درستی صورت گیرد. در زمینه حسگرهای زیستی الکتروشیمیایی برای ایمنی مواد غذایی دستاوردهای زیادی به دست آمده است، اما همچنان نیاز به انجام تحقیقات بیشتر جهت کاربردی کردن بیوسنسورها در صنایع غذایی می‌باشد. با ساخت بیوسنسورهای دستی، قابل حمل و هوشمند می‌توان سموم شیمیایی

و بیولوژیکی را در هنگام فرآیند تولید و فرآوری ماده غذایی تشخیص داد تا نظارت و کنترل دقیقی بر روی نمونه‌های غذایی انجام شود. در این مطالعه به مروری بر بیوسنسور و نحوه کار آن و تحقیقات انجام شده بر روی بیوسنسور الکتروشیمیایی و کاربرد آن بر صنایع غذایی پرداخته شد.

منابع

1. Ashley, J. 2021. Biosensors. Handbook of Dairy Foods Analysis. CRC Press.
2. Bagheryan, Z., Raoof, J. B. and Ojani, R. 2015. Development of a new gquadruplex biosensor with the functionalized SBA-15-Au nanoparticles: A platform for selecting gquadruplex-binding ligands. Sensors and Actuators B: Chemical, 213: 124-130.
3. Bassi, A., Lee, E. and Zhu, J.-X. 1998. Carbon paste mediated, amperometric, thin film biosensors for fructose monitoring in honey. Food research international, 31(2): 119-127.
4. Bilal, S., Hassan, M. M., ur Rehman, M. F., Nasir, M., Sami, A. J. and Hayat, A. 2021. An insect acetylcholinesterase biosensor utilizing WO3/g-C3N4 nanocomposite modified pencil graphite electrode for phosmet detection in stored grains. Food Chemistry, 346: 128894.
5. Cai, R., Zhang, Z., Chen, H., Tian, Y. and Zhou, N. 2021. A versatile signal-on electrochemical biosensor for Staphylococcus aureus based on triple-helix molecular switch. Sensors and Actuators B: Chemical, 326: 128842.
6. Cass, T. 2004. Biosensors. Oxford University Press.
7. Centonze, D., Losito, I., Malitesta, C., Palmisano, F. and Zambonin, P. 1997. Electrochemical immobilisation of enzymes on conducting organic salt electrodes: characterisation of an oxygen independent and interference-free glucose biosensor. Journal of Electroanalytical Chemistry, 435(1-2): 103-111.
8. Curulli, A. 2021. Electrochemical Biosensors in Food Safety: Challenges and Perspectives. Molecules, 26(10): 2940.
9. Curulli, A., Kelly, S., O'sullivan, C., Guilbault, G. and Palleschi, G. 1998. A new interference-free lysine biosensor using a non-conducting polymer film. Biosensors and Bioelectronics, 13(12): 1245-1250.
10. Dall'Orto, V. C., Danilowicz, C., Rezzano, I., Carlo, M. D. and Mascini, M. 1999. Comparison between three amperometric sensors for phenol determination in olive oil samples.
11. del Cerro, M. A., Cayuela, G., Reviejo, A. J., Pingarrón, J. M. and Wang, J. 1997. Graphite-teflon-peroxidase composite electrodes. Application to the direct determination of glucose in musts and wines. Electroanalysis, 9(14): 1113-1119.
12. Dinshaw, I. J., Muniandy, S., Teh, S. J., Ibrahim, F., Leo, B. F. and Thong, K. L. 2017. Development of an aptasensor using reduced graphene oxide chitosan complex to detect Salmonella. Journal of Electroanalytical Chemistry, 806: 88-96.
13. Eggins, B. R., Hickey, C., Toft, S. A. and Zhou, D. M. 1997. Determination of flavanols in beers with tissue biosensors. Analytica chimica acta, 347(3): 281-288.
14. Ensafi, A. A. 2019. An introduction to sensors and biosensors. Electrochemical Biosensors. Elsevier.
15. Eyvazi, S., Baradaran, B., Mokhtarzadeh, A. and de la Guardia, M. 2021. Recent advances on development of portable biosensors for monitoring of biological contaminants in foods. Trends in Food Science & Technology.
16. Franceschelli, L., Berardinelli, A., Dabbou, S., Ragni, L. and Tartagni, M. 2021. Sensing Technology for Fish Freshness and Safety: A Review. Sensors, 21(4): 1373.

17. Gavalas, V. G., Fouskaki, M. G. and Chaniotakis, N. A. 2000. Novel pre-oxidizing cell for elimination of electroactive interferents during biosensor analysis. Application to glucose determination in real samples.
18. Griesche, C. and Baeumner, A. J. 2020. Biosensors to support sustainable agriculture and food safety. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 128: 115906.
19. Griffiths, M. 1993. Applications of bioluminescence in the dairy industry. Journal of dairy science, 76(10): 3118-3125.
20. Hibi, T. and Senda, M. 2000. Enzymatic assay of histamine by amperometric detection of H2O2 with a peroxidase-based sensor. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 64(9): 1963-1966.
21. Hua, Z., Yu, T., Liu, D. and Xianyu, Y. 2021. Recent advances in gold nanoparticles-based biosensors for food safety detection. Biosensors and Bioelectronics: 113076.
22. Itkes, M. P., de Oliveira, G. G., Silva, T. A., Fatibello-Filho, O. and Janegitz, B. C. 2019. Voltammetric sensing of fenitrothion in natural water and orange juice samples using a single-walled carbon nanohorns and zein modified sensor. Journal of Electroanalytical Chemistry, 840: 21-26.
23. Karunakaran, C., Rajkumar, R. and Bhargava, K. 2015. Introduction to biosensors. Biosensors and bioelectronics. Elsevier.
24. Korotkaya, E. 2014. Biosensors: design, classification, and applications in the food industry. Foods and Raw materials, 2(2).
25. Kotsiri, Z., Vidic, J. and Vantarakis, A. 2022. Applications of biosensors for bacteria and virus detection in food and water–A systematic review. Journal of Environmental Sciences, 111: 367-379.
26. Kulkarni, A. S., Joshi, D. and Tagalpallewar, G. 2014. Biosensors for food and dairy industry. Asian Journal of Dairy and Food Research, 33(4): 292-296.
27. Kumar, H. and Neelam, R. 2016. Enzyme-based electrochemical biosensors for food safety: A review. Nanobiosensors in Disease Diagnosis, 5: 29-39.
28. Kumar, T. V. and Sundramoorthy, A. K. 2019. Electrochemical biosensor for methyl parathion based on single-walled carbon nanotube/glutaraldehyde crosslinked acetylcholinesterase-wrapped bovine serum albumin nanocomposites. Analytica chimica acta, 1074: 131-141.
29. Kwong, A. W., Gründig, B., Hu, J. and Renneberg, R. 2000. Comparative study of hydrogel-immobilized L-glutamate oxidases for a novel thick-film biosensor and its application in food samples. Biotechnology letters, 22(4): 267-272.
30. Lin, T. and Shen, Y. 2020. Fabricating electrochemical aptasensors for detecting aflatoxin B1 via layer-by-layer self-assembly. Journal of Electroanalytical Chemistry, 870: 114247.
31. Lobo-Castanon, M., Miranda-Ordieres, A. and Tunon-Blanco, P. 1997. A bienzyme-poly-(o-phenylenediamine)-modified carbon paste electrode for the amperometric detection of L-lactate. Analytica chimica acta, 346(2): 165-174.
32. Lu, L., Seenivasan, R., Wang, Y.-C., Yu, J.-H. and Gunasekaran, S. 2016. An electrochemical immunosensor for rapid and sensitive detection of mycotoxins fumonisin B1 and deoxynivalenol. Electrochimica Acta, 213: 89-97.
33. Lv, M., Liu, Y., Geng, J., Kou, X., Xin, Z. and Yang, D. 2018. Engineering nanomaterials-based biosensors for food safety detection. Biosensors and Bioelectronics, 106: 122-128.
34. Mannino, S., Cosio, M. and Buratti, S. 1999. Simultaneous determination of glucose and galactose in dairy products by two parallel amperometric biosensors. Italian journal of food science, 11(1): 57-65.
35. Mehrotra, P. 2016. Biosensors and their applications–A review. Journal of oral biology and craniofacial research, 6(2): 153-159.
36. Mello, L. D. and Kubota, L. T. 2002. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. Food chemistry, 77(2): 237-256.

37. Meshram, B., Agrawal, A., Adil, S., Ranvir, S. and Sande, K. 2018. Biosensor and its application in food and dairy industry: a review. Int J Curr Microbiol Appl Sci, 7(2): 3305-3324.
38. Mishra, G. K., Barfidokht, A., Tehrani, F. and Mishra, R. K. 2018. Food safety analysis using electrochemical biosensors. Foods, 7(9): 141.
39. Mishra, R. K., Hayat, A., Catanante, G., Ocaña, C. and Marty, J.-L. 2015. A label free aptasensor for Ochratoxin A detection in cocoa beans: An application to chocolate industries. Analytica chimica acta, 889: 106-112.
40. Najafpour, G. and Zare, H. 2015. Chapter 4 - Fermentation Process Control. Biochemical engineering and biotechnology. Elsevier.
41. Nunes, G. S., Skládal, P., Yamanaka, H. and Barceló, D. 1998. Determination of carbamate residues in crop samples by cholinesterase-based biosensors and chromatographic techniques. Analytica Chimica Acta, 362(1): 59-68.
42. Özcan, A., Topçuoğulları, D. and Özcan, A. A. 2019. Fenitrothion sensing with reduced graphene oxide decorated fumed silica nanocomposite modified glassy carbon electrode. Sensors and Actuators B: Chemical, 284: 179-185.
43. Palmisano, F., Rizzi, R., Centonze, D. and Zambonin, P. 2000. Simultaneous monitoring of glucose and lactate by an interference and cross-talk free dual electrode amperometric biosensor based on electropolymerized thin films. Biosensors and Bioelectronics, 15(9-10): 531-539.
44. Pandey, C. M., Tiwari, I., Singh, V. N., Sood, K., Sumana, G. and Malhotra, B. D. 2017. Highly sensitive electrochemical immunosensor based on graphene-wrapped copper oxide-cysteine hierarchical structure for detection of pathogenic bacteria. Sensors and Actuators B: Chemical, 238: 1060-1069.
45. Payan, M. and Hamedi, M. 2013. Application of active packaging in foods-A review.
46. Perumal, V. and Hashim, U. 2014. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. Journal of applied biomedicine, 12(1): 1-15.
47. Pundir, C. S., Yadav, N. and Chhillar, A. K. 2019. Occurrence, synthesis, toxicity and detection methods for acrylamide determination in processed foods with special reference to biosensors: A review. Trends in food science & technology, 85: 211-225.
48. Ragavan, K. and Neethirajan, S. 2019. Nanoparticles as Biosensors for Food Quality and Safety Assessment. Nanomaterials for Food Applications. Elsevier.
49. Reddaiah, K. and Reddy, T. M. 2014. Electrochemical biosensor based on silica sol–gel entrapment of horseradish peroxidase onto the carbon paste electrode toward the determination of 2-aminophenol in non-aqueous solvents: a voltammetric study. Journal of Molecular Liquids, 196: 77-85.
50. Romani, A., Minunni, M., Mulinacci, N., Pinelli, P., Vincieri, F., Del Carlo, M. and Mascini, M. 2000. Comparison among differential pulse voltammetry, amperometric biosensor, and HPLC/DAD analysis for polyphenol determination. Journal of agricultural and food chemistry, 48(4): 1197-1203.
51. Schaertel, B. and Firstenberg-Eden, R. 1988. Biosensors in the food industry: present and future. Journal of food protection, 51(10): 811-820.
52. Sezgintürk, M. K. 2020. Introduction to commercial biosensors. Commercial Biosensors and their Applications. Elsevier.
53. Shin, S. J., Yamanaka, H., Endo, H. and Watanabe, E. 1998. Development of an octopine biosensor and its application to the estimation of scallop freshness. Enzyme and microbial technology, 23(1-2): 10-13.
54. Sidhu, R. K., Cavallaro, N. D., Pola, C. C., Danyluk, M. D., McLamore, E. S. and Gomes, C. L. 2020. Planar interdigitated aptasensor for flow-through detection of Listeria spp. in hydroponic lettuce growth media. Sensors, 20(20): 5773.

55. Singh, P. K., Jairath, G., Ahlawat, S. S., Pathera, A. and Singh, P. 2016. Biosensor: an emerging safety tool for meat industry. Journal of food science and technology, 53(4): 1759-1765.
56. Thakur, M. and Ragavan, K. 2013. Biosensors in food processing. Journal of food science and technology, 50(4): 625-641.
57. Velusamy, V., Palanisamy, S., Chen, S.-W., Balu, S., Yang, T. C. and Banks, C. E. 2019. Novel electrochemical synthesis of cellulose microfiber entrapped reduced graphene oxide: a sensitive electrochemical assay for detection of fenitrothion organophosphorus pesticide. Talanta, 192: 471-477.
58. Viswanathan, S. and Radecki, J. 2008. Nanomaterials in electrochemical biosensors for food analysis-a review. Polish journal of food and nutrition sciences, 58(2).
59. Wang, R., Wang, L., Yan, J., Luan, D., Wu, J. and Bian, X. 2021. Rapid, sensitive and label-free detection of pathogenic bacteria using a bacteria-imprinted conducting polymer film-based electrochemical sensor. Talanta, 226: 122135.
60. Xiang, C., Li, R., Adhikari, B., She, Z., Li, Y. and Kraatz, H.-B. 2015. Sensitive electrochemical detection of Salmonella with chitosan–gold nanoparticles composite film. Talanta, 140: 122-127.
61. Xiong, X., Yuan, W., Li, Y., Lu, Y., Xiong, X., Li, Y., Liu, Y. and Lu, L. 2020. Sensitive electrochemical detection of aflatoxin B1 using DNA tetrahedron-nanostructure as substrate of antibody ordered assembly and template of aniline polymerization. Food chemistry, 331: 127368.
62. Zare, H., Najafpour, G. D., Jahanshahi, M., Rahimnejad, M. and Rezvani, M. 2017. Highly stable biosensor based on glucose oxidase immobilized in chitosan film for diagnosis of diabetes. Romanian Biotechnological Letters, 22(3): 12611-12619.
63. Zhang, X., Wu, D., Zhou, X., Yu, Y., Liu, J., Hu, N., Wang, H., Li, G. and Wu, Y. 2019. Recent progress in the construction of nanozyme-based biosensors and their applications to food safety assay. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 121: 115668.
64. Zhao, F., Yao, Y., Jiang, C., Shao, Y., Barceló, D., Ying, Y. and Ping, J. 2020. Self-reduction bimetallic nanoparticles on ultrathin MXene nanosheets as functional platform for pesticide sensing. Journal of hazardous materials, 384: 121358.
65. Zhu, X., Kou, F., Xu, H., Han, Y., Yang, G., Huang, X., Chen, W., Chi, Y. and Lin, Z. 2018. Label-free ochratoxin A electrochemical aptasensor based on target-induced noncovalent assembly of peroxidase-like graphitic carbon nitride nanosheet. Sensors and Actuators B: Chemical, 270: 263-269.

Investigation of interactions between genes affecting the increase of pulmonary artery pressure in broilers

Abdolmohammad Sedaghat Fard[1]; Maryam Karami[2*]; Masoud Saki Hosseini[3], Arash Javanmard[4], Ali Esmailizadeh Koshkoiyeh[5], Seyed Abbas Rafat[6]

1&2- Ph.D in Animal Breeding and Genetics, Nahadehay Dami Jahed (NDJ) company, Tehran, Iran
3- Graduated Master of Science in Animal Breeding and Genetics, Department of Animal Science Agriculture Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Ahwaz, Iran
4&6- Faculty Members, Department of Animal Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran
5- Faculty Member, Department of Animal Science, University of Shahid Bahonar Kerman, Kerman, Iran

* Email: phd.karami@asnrukh.ac.ir

Abstract

Onset of ascites, a common metabolic abnormality in broilers; with pulmonary artery hypertension syndrome. In fact, the occurrence of pulmonary hypertension plays a major role in the development of subsequent ascites. BMPR2 is known to be a major gene associated with pulmonary hypertension in humans, and there are reports that mutations in this gene are associated with high blood pressure. In several studies, differences in the expression of this gene have been reported in susceptible and resistant ascites poultry. Due to the fact that different diseases have not been sufficiently studied in chicken and on the other hand due to the phenotypic and physiological similarity of ascites with this disease in humans, the present study was performed to confirm the biological role of BMPR2 gene and its interaction with other Genes related to ascites were performed in chickens. For this purpose, the relationship between this gene and the desired genes in broiler chickens with ascites was investigated using the String database (version 11.5). The minimum required interaction score (medium confidence) was considered to be 0.400. Also, the effects of this gene were performed individually using the GeneCards database (version 5.7). The gene network resulting from the interaction of this gene with other genes associated with ascites showed that the association of BMPR2 with genes of the cytokine family and the proteins encoded by them (Interleukin receptors), the family of Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK11) and two important genes affected by these protein kinases, including STAT5B and STAT3, are more than expected, indicating that the protein produced by the BMPR2 gene is closely related to the bird's response to ascites and may play an important role in the processes leading to ascites in broilers.

Keywords: Ascites, chicken, gene network

بررسی تعاملات بین ژن‌های مؤثر بر افزایش فشار سرخرگ ریوی در جوجه‌های گوشتی

عبدالمحمد صداقت‌فرد[۱]؛ مریم کرمی[۲*]؛ مسعود ساکی حسینی[۳]؛ آرش جوانمرد[۴]؛ علی اسمعیلی‌زاده کشکوئیه[۵] ؛ سیدعباس رأفت[۶]

۱و۲- دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، شرکت نهاده‌های دامی جاهد، تهران، ایران
۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، اهواز، ایران
۴و۶- اعضای هیئت علمی گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۵- عضو هیئت علمی گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

Email: phd.karami@asnrukh.ac.ir

چکیده

شروع آسیت که یک ناهنجاری متابولیکی شایع در جوجه‌های گوشتی می‌باشد؛ با سندروم افزایش فشار سرخرگ ریوی است. در واقع بروز هایپرتنشن ریوی، نقش اصلی را در بروز آسیت متعاقب بازی می‌کند. BMPR2 به عنوان یک ژن اصلی در ارتباط با هایپرتنشن ریوی در انسان شناخته شده است و گزارش‌هایی وجود دارد که جهش در این ژن با فشار خون بالا مرتبط است. در چندین مطالعه نیز تفاوت بیان این ژن در طیور حساس و مقاوم به آسیت گزارش شده است. به دلیل اینکه در مرغ بیماری‌های مختلف به اندازه کافی مورد بررسی قرار نگرفته‌اند و از طرفی به علت شباهت فنوتیپی و فیزیولوژی آسیت با این بیماری در انسان، پژوهش حاضر به منظور تأیید نقش‌های بیولوژیکی ژن BMPR2 و تعامل آن با دیگر ژن‌های مرتبط با آسیت در مرغ انجام شد. بدین منظور با استفاده از پایگاه داده String (نسخه ۱۱/۵) ارتباط این ژن با ژن‌های مورد نظر در جوجه‌های گوشتی مبتلا به آسیت بررسی شد. حداقل نمره تعامل مورد نیاز (medium confidence) برابر با ۰/۴۰۰ در نظر گرفته شد. همچنین با استفاده از پایگاه داده GeneCards (نسخه۵/۷) بررسی انفرادی اثرات این ژن صورت گرفت. شبکه ژنی حاصل از برهم‌کنش ژن مذکور با سایر ژن‌های مرتبط با آسیت نشان داد که ارتباط BMPR2 با ژن‌های خانواده سیتوکین‌ها و پروتئین‌های رمزگذاری شده توسط آن‌ها (گیرنده‌های اینترلوکین)، ژن‌های خانواده پروتئین کینازهای فعال شده با میتوژن (MAPK11) و دو ژن مهم تحت تأثیر این پروتئین کینازها شامل STAT5B و STAT3 که جز اولین دسته ژن‌های مداخله‌گر در پروسه حساسیت/مقاومت به آسیت به شمار می‌روند و نقش کلیدی در فرآیند التهاب داشته، بیش از انتظار است که نشان می‌دهد پروتئین تولیدی توسط ژن BMPR2 ارتباط تنگاتنگی با واکنش بدن پرنده در مقابل عوامل ایجادکننده آسیت داشته و می‌تواند نقش بسزایی در فرآیندهای منتهی به آسیت در جوجه‌های گوشتی ایفا کند.

واژگان کلیدی:آسیت، شبکه ژنی، مرغ

۱.مقدمه

شواهد تجربی از این فرضیه پشتیبانی می‌کند که آسیت که یک ناهنجاری متابولیکی شایع در جوجه‌های تیپ گوشتی نیز می‌باشد، نتیجه یک عامل اولیه پاتوفیزیولوژیک است که با فشار خون بیش از حد در گردش خون ریوی (هایپرتنشن ریوی) آغاز می‌شود. در

واقع از دیدگاه علمی هایپرتنشن ریوی و سندروم آسیت به طور مترادف استفاده می‌شوند (Wideman et al., 2007؛ Bamidele et al., 2012). شواهد نشان می‌دهد که پاتوژنز هایپرتنشن ریوی شامل ویژگی‌های یک بیماری التهابی خودایمنی متشکل از چند عامل ژنتیکی، محیطی و اجزای سیستم ایمنی است. به نظر می‌رسد هایپرتنشن ریوی مولتی ژنیک حساس به فشار خون بالا، حساسیت به استرس عملکرد نابه‌جا و نامنظم عروق ریوی و همچنین فعالیت‌های نابه‌جای ذاتی و تطبیقی سیستم ایمنی بدن را آشکار می‌کند. بررسی‌های متعدد تأثیرت بالا و عمده وراثت و ژن در مستعد شدن به هایپرتنشن ریوی را نشان می‌دهد. انتخاب فشارهای زیاد که بر عروق ریوی متمرکز بوده و ظرفیت عروق را به چالش می‌کشد به آسانی نشان می‌دهد که هایپرتنشن ریوی خودبه‌خودی در جوجه‌های گوشتی پایه ژنتیکی دارد. همچنین استفاده از جوجه گوشتی به عنوان یک مدل حیوانی برای مطالعه بیماری فشار خون بالای سرخرگ ریوی به موازات تحقیقات انسانی نشان از مبنای ژنتیکی این بیماری در طیور دارد (داوودی و احسانی، 2019). از آنجا که ارتباط موتاسیون در ژن BMPR2 با بیماری فشارخون بالا در انسان به اثبات رسیده است (Deng et al., 2000) ؛ و به دلیل اینکه در مرغ بیماری‌های مختلف به اندازه کافی مورد بررسی قرار نگرفته‌اند و همچنین به علت شباهت فنوتیپی و فیزیولوژی آسیت با این بیماری در انسان، پژوهش حاضر به منظور تأیید نقش‌های بیولوژیکی ژن BMPR2 و تعامل آن با دیگر ژن‌های دخیل در افزایش فشار سرخرگ ریوی در جوجه‌های گوشتی مبتلا به آسیت انجام شد.

۲.مواد و روش‌ها

۲-۱-استراتژی جستجو و آماده‌سازی داده‌ها برای تجزیه و تحلیل

ابتدا مجموعه‌ای از ژن‌های در ارتباط با افزایش فشار سرخرگ ریوی درجوجه‌های گوشتی مبتلا به آسیت از منابع علمی انتخاب گردید. مهم‌ترین این مجموعه‌های ژنی شامل ژن‌های بیش‌بیان در بافت سرخرگ ریوی پرندگان بیمار شامل 14و 9 و 8 و 7 و RPL 5 و ژن‌های کم‌بیانIL- 6، K60، STAT3، STAT5 Pim 1، SOCS3، IKKα، IkB، P38 و تعداد پنج سیتوکین شامل IL-6، IL8، IL-1β، IL-18 و MIP-1β و همچنین تعداد هفت ژن تنظیم‌کننده مهم در ارتباط با افزایش فشار سرخرگ ریوی شامل CYP1B1، ALDH7A1، MYLK، CAMK4، BMP7، INOS و CaM و تعدادی ژن‌های دیگر مرتبط با این گروه‌های ژنی بود (Yang et al., 2016) بودند. در ادامه با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک و پایگاه داده‌های مختلف نوع ارتباط این ژن‌ها با یکدیگر و نحوه تعامل آن‌ها با ژن BMPR2 با رسم شبکه ژنی و همچنین ارتباط ژنBMPR2 با بیماری آسیت با استفاده از بررسی انفرادی ژن مورد واکاوی قرار گرفت.

۲-۲-رسم شبکه ژنی

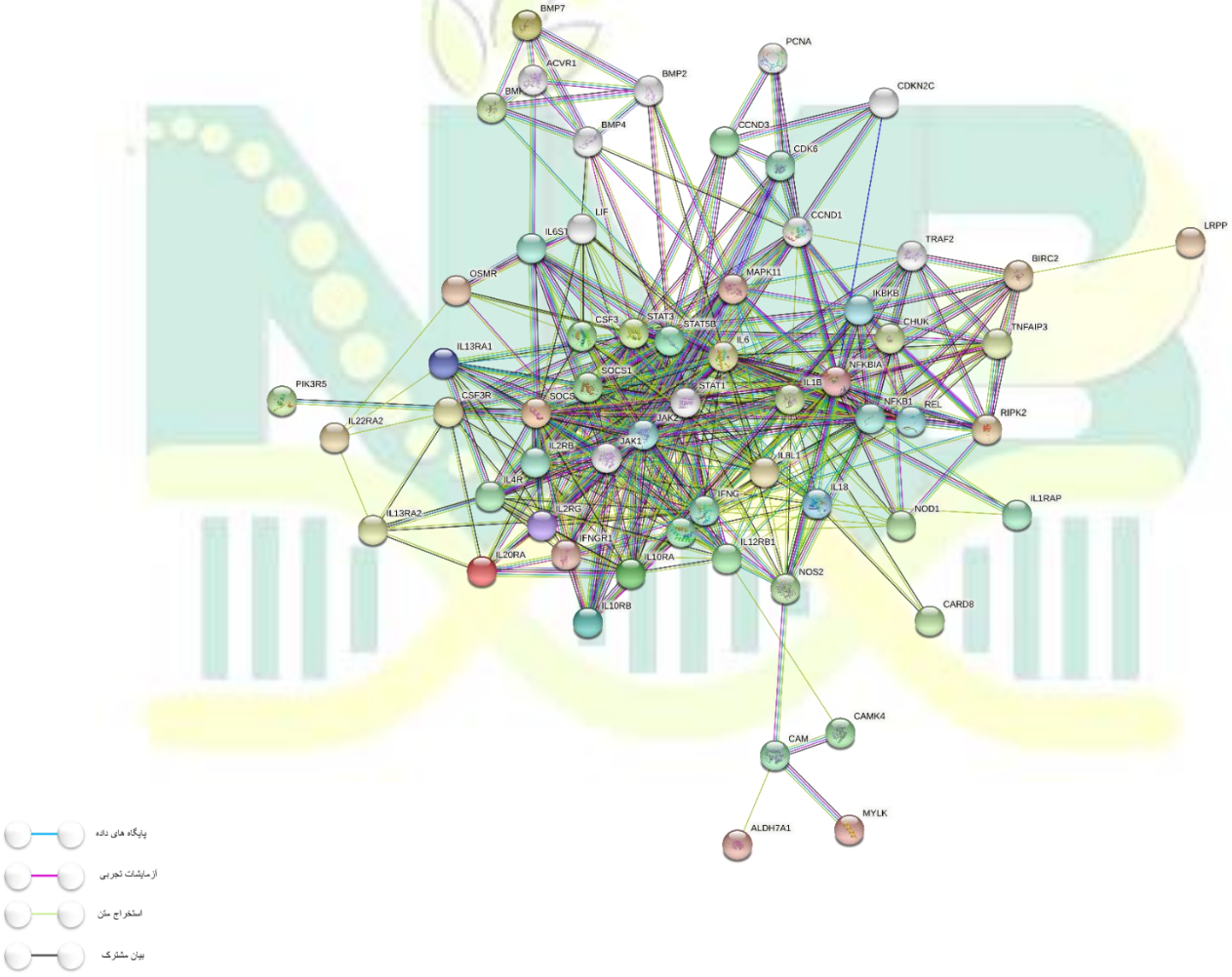
جهت ترسیم شبکه ژنی ژن‌های انتخابی از پایگاه داده String (نسخه ۱۱/۵) به آدرس https://string-db.org استفاده شد. این پایگاه داده فعل و انفعالات عملکردی بین ژن‌های انتخاب شده، غنی‌سازی آن‌ها و تجزیه و تحلیل عمکردی آن‌ها را انجام می‌دهد و ژن‌ها را براساس فعل و انفعات پیش‌بینی شده محصول پروتئین آن‌ها از جمله ارتباطات مستقیم (فیزیکی) و غیرمستقیم (عملکردی) متصل می‌کند. در پژوهش حاضر ژن‌های انتخابی به عنوان ورودی به پایگاه داده شد که پایگاه مذکور تعاملات بین آن‌ها را جستجو و سپس شبکه تعامل پروتئین-پروتئین (PPI) متشکل از محصولات پروتئینی آن‌ها و همه فعل و انفعالات بین آن‌ها را ایجاد کرد. تعاملات بر اساس آزمایشات تجربی، استخراج متن، بیان مشترک و پایگاه‌های داده تعیین شدند. حداقل نمره تعامل مورد نیاز (medium confidence) برابر با ۰/۴۰۰ در نظر گرفته شد. تعدادی از غنی‌سازی‌های عملکردی مربوطه بدون در نظر گرفته شدن مقدار FDR خاص مطالعه گردیدند.

۳-۲-بررسی انفرادی ژن

در ادامه با استفاده از پایگاه داده GeneCards (نسخه۵/۷) به آدرس http://www.genecards.org، ارتباط ژنBMPR2 با بیماری-های ژنتیکی در انسان همچنین اطلاعات مربوط به بیان ژن، بیماری‌های ژنتیکی، مقالات چاپ شده در مجلات معتبر و خلاصه‌ای از عملکرد و دسته‌بندی ژنی مرتبط با آن مورد بررسی قرار گرفت.

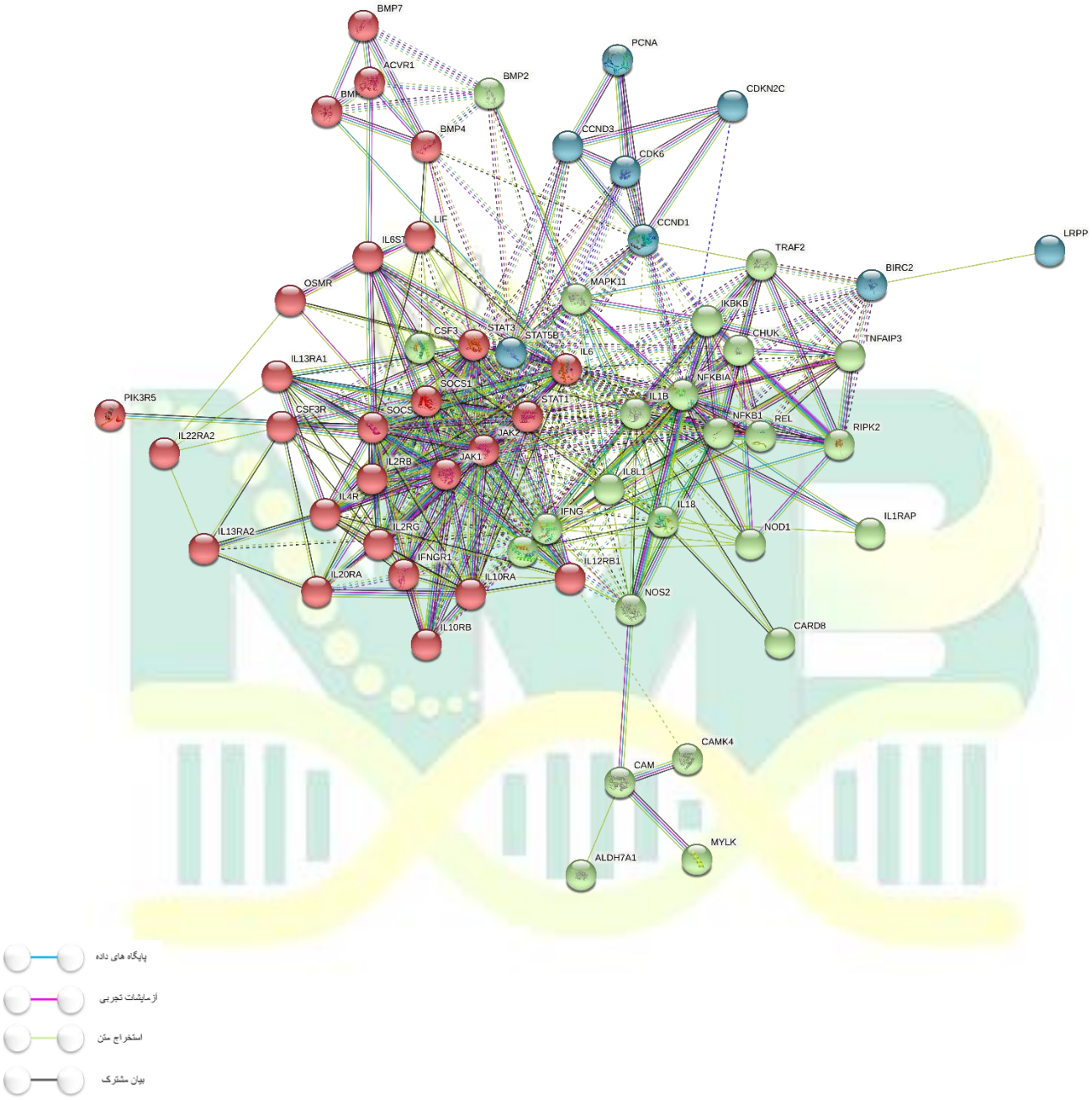
۳. نتایج و بحث

در پژوهش حاضر برای تأیید نقش‌های بیولوژیکی ژن BMPR2 و تعامل آن با دیگر ژن‌های در ارتباط افزایش فشار سرخرگ ریوی در جوجه‌های گوشتی مبتلا به آسیت از پایگاه داده String استفاده شد. به طوری که برهم کنش پروتئین-پروتئین با ۵۹ گره به همراه ۴۱۱ یال در یک شبکه ژنی به نمایش درآمد (شکل۱) و خوشه‌های تحت شبکه نیز ترسیم شد (شکل ۲).



شکل۱:شبکه حاصل از برهمکنش ژن BMPR2 با ژن‌های دیگر دخیل در افزایش فشار سرخرگ ریوی در جوجه‌های گوشتی مبتلا به آسیت

(PPI enrichment p-value: $<1.0\ e^{-16}$)



شکل۲: نمایش خوشه‌ها در شبکه حاصل از برهمکنش ژن BMPR2 با ژن‌های دیگر دخیل در افزایش فشار سرخرگ ریوی در جوجه‌های گوشتی مبتلا به آسیت (ارتباط خوشه‌های تحت شبکه با یکدیگر که هریک دارای رنگ متفاوت بوده با خطوط منقطع مشخص شده است)

(PPI enrichment p-value: $<1.0\ e^{-16}$)

هر گره نشان دهنده تمام پروتئین‌های تولید شده توسط یک منبع ژن کدکننده پروتئین و یال‌ها نشان دهنده ارتباط پروتئین-پروتئین هستند. ارتباط یال‌ها از نوع عملکردی و فیزیکی بوده و همان‌طور که در شکل‌های ۱ و۲ مشاهده می‌شود ارتباطات خاص و معنی‌دار است یعنی پروتئین‌ها به طور مشترک به یک عملکرد مشترک کمک می‌کنند. هر چه تعداد یال‌ها بیشتر باشد، ارتباطات معتبرتری نیز وجود دارد. هر رنگ در یال‌ها معنی خاصی دارد و رنگ نشان دهنده نوع شواهد برهم‌کنش است. خط بنفش شواهد تجربی، خط آبی شواهد پایگاه داده، خط زرد شواهد حاصل از استخراج متن و خط سیاه بیان مشترک را نشان می‌دهد.

اخیراً فعالیت‌های بسیار ویژه‌ای برای شناسایی ژن‌های مؤثر بر آسیت انجام شده است. داوودی و احسانی (2019) با جمع‌بندی مطالعات منتشر شده بر روی آسیت نشان دادند که ۱۲ کروموزوم بیشترین نقاط مؤثر بر روی بروز آسیت را دارا می‌باشند. بر طبق همین تحقیق، ژن BMPR2 یکی از مهم‌ترین ژن‌های شناخته شده مؤثر بر روی آسیت بود. در مطالعه دیگری احتمال وقوع موتاسیون مرتبط با آسیت در این ژن در طیور بررسی شده بود ولی تفاوتی در توالی این ژن در دو گروه سالم و مبتلا به آسیت مشاهده نشد (Cisar et al., 2003). از لحاظ بیولوژیکی، ژن BMPR2 گیرنده پروتئین مغز استخوان (BMP) از خانوده سرین/ترئونین کینازها را کد می‌کند. لیگاندهای این ژن گیرنده BMPها هستند که از خانواده اصلی TGF-β محسوب می‌شوند.BMP ها در تشکیل مغز استخوان و جنین‌زایی نقش دارند. این پروتئین‌ها سیگنال‌های خود را از طریق تشکیل کمپلکس‌های هترومری دو نوع مختلف گیرنده‌های سرین (ترئونین) کیناز منتقل می‌کنند. گیرنده‌های نوع I حدود ۵۰ تا ۵۵ کیلودالتون و گیرنده‌های نوع II ۷۰ تا ۸۰ کیلودالتون هستند. گیرنده‌های نوع II در غیاب گیرنده‌های نوع I به لیگاند متصل می‌شوند اما برای سیگنال‌دهی به گیرنده‌های نوع I مربوطه نیاز دارند، در حالی که گیرنده‌های نوع I برای اتصال لیگاند به گیرنده‌های نوعII مربوطه نیاز دارند. جهش در این ژن با افزایش فشار خون اولیه ریوی مرتبط است. مسیرهای بیولوژیکی آن شامل دو مسیر تعامل بین گیرنده‌های سیتوکین-سیتوکین و مسیر سیگنالینگ TGF-β است (NCBI, 2018 ; KEGG,1995-2018). این ژن بر روی کروموزوم شماره هفت مرغ قرار دارد و به عنوان یک ژن اصلی در ارتباط با آسیت در انسان شناخته شده است (Soubrier et al., 2013; Cartron et al., 2001). همچنین تفاوت بیان این ژن در طیور حساس و مقاوم به آسیت نیز گزارش شده است (Anthony, 2006). Yang و همکاران (2016) با بررسی تغییرات سرخرگ‌های ریه و ارتباط آن با میزان بیان ژنBMP7 از خانواده BMP به همراه ژن‌های CYP1B1، ALDH7A1، MYLK ، BMP7،CAMK4 و INOS گزارش کردند که این ژن‌ها در گروه حساس به آسیت در مقایسه با گروه مقاوم به این سندروم به میزان بالاتری بیان می‌گردند و متناسب با آن نسبت دیواره رگ به کل رگ و ضخامت دیواره افزایش می‌یابد که این هماهنگی و تناسب می‌تواند بیانگر نقش این گروه ژن‌ها در آسیب به سرخرگ و فشارخون ریه باشد. در پژوهش حاضر تعامل ژن BMPR2 به طور مستقیم با ژن مهم سببی آسیت BMP7 به طور واضح مشهود بوده که نشان می‌دهد ژن BMPR2 و پروتئین‌های تولیدی آن احتمالاً در گروه بیولوژیکی در ارتباط با حساسیت به آسیت در طیور مرتبط هستند. بررسی خوشه‌های ژنی تحت شبکه نشان داد که ارتباط

BMPR2 با ژن‌های مورد نظر مؤثر بر آسیت مخصوصاً دسته‌ژن‌های خانواده سیتوکین‌ها و پروتئین‌های رمزگذاری شده توسط آن‌ها (گیرنده‌های اینترلوکین) ژن‌های خانواده پروتئین کینازهای فعال شده با میتوژن (MAPK11) و دو ژن مهم تحت تأثیر این پروتئین کینازها شامل STAT5B و STAT3 که جز اولین دسته ژن‌های مداخله‌گر در پروسه حساسیت/مقاومت به آسیت به شمار می‌روند بیش از انتظار است که نشان می‌دهد پروتئین تولیدی توسط ژنBMPR2 ارتباط تنگاتنگی با واکنش بدن پرنده در مقابل عوامل ایجادکننده آسیت داشته و می‌تواند نقش بسزایی در هایپرتنشن اولیه ریوی منتهی به آسیت در جوجه‌های گوشتی ایفا کند. هیپوکسی مشخص‌ترین ویژگی بالینی این ناهنجاری متابولیکی بوده و عواملی که به هر دلیل سبب کاهش اشباع شدن اکسیژن خون از ریه‌ها می‌گردند، باعث شروع سندروم آسیت می‌شوند. همچنین نشان داده شده است که مسیر بیولوژی تعامل گیرنده-ماتریس خارج سلولی نقش کلیدی در فرآیند التهاب داشته و زمینه ساز اتفاقات پیاپی در پاسخ به استرس‌های متابولیکی از نوع تنش اکسیداتیو ناشی از هایپوکسمیا است که در نهایت منجر به عارضه آسیت می‌شود (کرمی، ۱۳۹۹). بررسی انفرادی ارتباط ژنBMPR2 با بیماری‌های ژنتیکی در انسان نیز نشان داد که جهش در این ژن با هایپرتنشن اولیه ریوی هر دو نوع خانوادگی (ارثی) و وابسته به Fenfluramine (Evans et al., 2016) و بیماری انسداد سرخرگ ریوی اتوزومال غالب (Girerd et al., 2017) مرتبط است.

با وجود بدست آمدن اطلاعات مهم در مورد معماری ژنتیکی رخداد آسیت از طریق روش‌های مبتنی بر رسم شبکه‌های ژنی و بررسی تعاملات بین ژن‌ها، چون مکانیسم‌های آسیب سلولی دخیل در بروز این سندروم مشخص نشده است، پژوهش‌های این‌چنینی تنها در جهت کامل کردن ساز و کار آسیت انجام شده و پیداکردن علت این عارضه و مکانیسم‌های کنترلی وابسته به تغییرات مشاهده شده در پروسه‌های سلولی مربوط به حساسیت/مقاومت به آن نیاز به بررسی‌های مستمر با استفاده از ترکیب پروفایل بیان ژن بافت‌های مرتبط با سندروم آسیت که با استفاده‌از تکنولوژی ترنسکریپتومیکس به‌دست آمده اند با اطلاعات شبکه سلولی ژن‌های مسبب بیماری دارد.

۴. نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر حاکی از این مسأله بود که ژن BMPR2 و پروتئین‌های تولیدی آن احتمالاً در گروه بیولوژیکی در ارتباط با حساسیت به آسیت در طیور مرتبط هستند و ارتباط BMPR2 با ژن‌های مورد نظر مؤثر بر آسیت مخصوصاً دسته‌ژن‌های خانواده سیتوکین‌ها، پروتئین کینازهای فعال شده با میتوژن و ژن‌های تحت تأثیر این پروتئین کینازها که جز اولین دسته ژن‌های مداخله‌گر در پروسه حساسیت/مقاومت به آسیت به شمار می‌روند بیش از انتظار است که نشان می‌دهد پروتئین تولیدی توسط ژنBMPR2 ارتباط تنگاتنگی با واکنش بدن پرنده در مقابل عوامل ایجادکننده آسیت داشته و می‌تواند نقش بسزایی در هایپرتنشن اولیه ریوی منتهی به آسیت در جوجه‌های گوشتی ایفا کند.

منابع

۱- کرمی، م. (۱۳۹۹). بررسی مکانیزم حساسیت و مقاومت ژنتیکی به سندروم آسیت با استفاده از داده‌های فنوتیپی و ترانسکریپتومی. رساله دکتری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان.

2- Anthony N.B. (2006) Classical and molecular genetic examination of ascites in broiler chickens. University Of Arkansas.

3- Bamidele O., Van As P. and Elferink M.G. 2012. Molecular characterization of the leptin receptor gene as a candidate gene in the pulmonary hypertension syndrome in broiler chickens. Pakistan Journal of Biological Sciences. 15: 1187-1190.
4- Cisar R., Balog J.M., Anthony N.B. and Donoghue A.M. 2003. Sequence analysis of bone morphogenetic protein receptor type II mRNA from ascitic and nonascitic commercial broilers. Poultry Science. 82:1494-1499.
5- Davoodi P. and Ehsani A. 2019. In-silico investigation of genomic regions related to ascites and identifying their pathways in broilers. World's Poultry Science Journal. 75:193-206.
6- Deng Z., Morse J.H., Slager S.L., Cuervo N., Moore K.J., Venetos G., Kalachikov S., Cayanis E., Fischer S.G., Barst R.J., Hodge S.E. and Knowles J.A. 2000. Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. The American Journal of Human Genetics. 67: 737-744.
7- Evans J. D. W ., Girerd B., Montani D., JianWang X., Galie N., Austin E.D., Elliott G., Asano K., Yan Y., Cheng Jing Z., Manes A., Palazzini M., Wheeler L.A., Nakayama I., Satoh T., Eichstaedt C., Hinder hofer K. and Morrell W.N. 2017. BMPR2 mutations and survival in pulmonary arterial hypertension: an individual participant data meta-analysis. Respiratory Medicine. 4(2): 129-137.
8- Girerd B, Weatherald J, Montani D, et al. Heritable pulmonary hypertension: from bench to bedside. Eur Respir Rev 2017; 26: 170037.
9- KEGG 1995-2018 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Kanehisa Labs, Catron, T., Mendiola, M.A., Smith, S.M., Born, J. and Walker, M.K. (2001) Hypoxia Regulates Avian Cardiac Arnt and HIF-1a mRNA Expression. Biochemical and Biophysical Research Communications 282: 602-607.
10- NCBI (2018) The National Center for Biotechnology Information National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine.
11- Soubrier F., Chung W.K., Machado R., Grunig, E., Aldred, M., Geraci, M., Loyd, J.E., Elliott, G., Trembath, R.C., Newman, J.H. and Humbert, M. (2013) Genetics and Genomics of Pulmonary Arterial Hypertension. Journal of the American College of Cardiology 62: D13-21.
12- Wideman R.F., Chapman M.E., Hamal K., Bowen R.O.T., Lorenzoni A.G., Erf G.F. and Anthony N.B. 2007. An inadequate pulmonary vascular capacity and susceptibility to pulmonary arterial hypertension in broilers. Poultry Science. 86: 984–998.
13- Yang F., Cao H., Xiao Q., Guo X., Zhuang Y., Zhang C., Wang T., Lin H., Song Y., Hu G. and Liu P. 2016. Transcriptome analysis and gene identification in the pulmonary artery of broilers with ascites syndrome. PloS one. 11(6): 0156045.

Latent Autoimmune Diabetes in Adults: Epidemiology and Comparison of its Clinical Manifestations with Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus

Sargazi, Fatemeh; Mohammadi, Malihe*; Mehranpoor, Mahdieh; Lagzian, Milad

Department of Biology, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan

Email: mmohammadi@science.usb.ac.ir

Abstract

Adult autoimmune diabetes (LADA) is a complex metabolic disorder that falls into separate categories called hybrid forms of diabetes under the World Health Organization's new classification. There are three criteria for patients to be in this group: 1- Age over 30 years at the time of diagnosis 2- Presence of at least one type of autoantibody in plasma and 3- No need for insulin therapy for at least the first six months after diagnosis. Clinical characteristics of LADA patients are classified between TIDM and T2DM in terms of type, number and titer of autoantibody, peptide-C level and age of onset. Because the disease occurs in people over the age of 30 and can only be detected by performing immunological tests to detect autoantibodies, and because these tests are uncommon and expensive, they are often mistaken for Type 2 diabetes and they receive the same common treatment for T2DM that is not effective for these patients. Therefore, proper identification of these patients is essential in order to use the correct treatment for them. The aim of this study, which reviewed 40 articles in the *PubMed*, *Web of Science*, and *Google Scholar* databases, was to compare the prevalence and clinical manifestations of LADA with type 1 and 2 diabetes.

Keywords: Latent autoimmune diabetes in adults, type 1 diabetes, type 2 diabetes, prevalence, clinical manifestations

دیابت اتوایمن نهفته در بزرگسالان: اپیدمیولوژی و مقایسه تظاهرات بالینی آن با دیابت نوع ۱ و دیابت نوع ۲

فاطمه سرگزی، ملیحه محمدی*،مهدیه مهرانپور، میلاد لگزیان

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان

ایمیل نویسنده مسئول: *mmohammadi@science.usb.ac.ir*

چکیده

دیابت خودایمن نهفته در بزرگسالان (LADA) نوعی اختلال پیچیده متابولیکی است که بر اساس تقسیم‌بندی جدید سازمان بهداشت جهانی در طبقه‌ای مجزا به نام اشکال هیبرید دیابت قرار گرفته است. سه معیار برای قرار گرفتن بیماران در این گروه وجود دارد: ۱-سن بالاتر از ۳۰ سال در زمان تشخیص بیماری ۲-وجود حداقل یک نوع اتوآنتی‌بادی در پلاسما و ۳-عدم نیاز به انسولین درمانی در حداقل شش ماه اول بعد تشخیص بیماری. ویژگیهای بالینی بیماران LADA بر حسب نوع، تعداد و تیتر اتوآنتی‌بادی، سطح پپتید-C و سن شروع بیماری بینابین ویژگی‌های بالینی بیماران دیابتی نوع ۱ و نوع ۲ قرار می‌گیرد. از آنجاکه این بیماری در سنین بالاتر از ۳۰ سال بروز می‌یابد و فقط با انجام دادن تست های ایمونولوژیک برای شناسایی اتوآنتی‌بادی‌ها قابل شناسایی است و به دلیل رایج نبودن و گران بودن این تست‌ها، غالبا" به اشتباه دیابت نوع ۲ تشخیص داده می‌شوند و همان درمان رایج دیابت نوع ۲ را دریافت می‌کنند که برای این بیماران موثر نمی‌باشد. بنابراین شناسایی صحیح این بیماران به منظور بکارگیری روش درست درمانی مخصوص آنها ضروری است. مطالعات اپیدمیولوژی و بررسی تظاهرات بالینی این بیماران به این امر کمک زیادی می‌کند. هدف از مطالعه حاضر، که با بررسی ۴۰ مقاله در پایگاه‌های اطلاعاتی Pubmed, Web of science و Google Scholar انجام شده است، بررسی مقایسه‌ای بین میزان شیوع و تظاهرات بالینی LADA با دیابت نوع ۱ و ۲ است.

کلمات کلیدی: دیابت خودایمن نهفته در بزرگسالان، دیابت نوع ۱، دیابت نوع ۲، شیوع، تظاهرات بالینی

۱.مقدمه

دیابت ملیتوس[۳۶]یک مشکل عمده بهداشتی در سراسر جهان است (۱). که شامل گروهی از اختلالات متابولیسم کربوهیدرات می‌باشد که به دلیل سطح بالای گلوگز مزمن خون، در نتیجه ناتوانی سلولهای بتای پانکراس برای تولید انسولین کافی یا استفاده ناکارآمد از انسولینی که توسط سلولهای پانکراس تولید می‌شود، مشخص می‌شود (۲). تعداد مبتلایان به دیابت به دلیل رشد جمعیت، پیری، شهرنشینی، عدم تحرک و چاقی و تغییر نوع تغذیه در حال افزایش است (۳،۴). شیوع این بیماری در کشورهای توسعه نیافته و یا در حال توسعه بیش از کشورهای توسعه یافته گزارش شده است(۵). بر اساس مطالعات IDF[37]، پیش بینی می‌شود تعداد مبتلایان به دیابت تا سال ۲۰۴۵ به ۶۲۵ میلیون نفر برسد. همچنین این بیماری در سال ۲۰۱۷، ۸۵۰ بیلیون دلار بار مالی داشته است. (۶) عوامل متعددی چون نژاد، سن، سبک زندگی و فاکتورهای ژنتیکی در بروز این بیماری نقش دارند (7).

انواع دیابت

به طور کلاسیک دیابت قندی به دو دسته اصلی نوع ۱ و دیابت نوع ۲ تقسیم می‌شود. ولی سالهاست مشخص شده است که دسته‌ای از مبتلایان به دیابت نوع ۲، دارای برخی از ویژگیهای ایمونولوژیک دیابت نوع ۱ مانند دارا بودن اتوآنتی‌بادی هستند.(۸) امروزه WHO این گروه از بیماران را در دسته مجزایی به نام اشکال هیبرید دیابت[۳۸] قرار داده است که معیارها و تظاهرات بالینی مربوط به خود را دارند. این گروه تحت عنوان دیابت اتوایمن نهفته در بزرگسالان(LADA)[۳۹] و یا دیابت آهسته پیشرونده با واسطه ایمنی در بزرگسالان[۴۰] و دیابت نوع ۱.۵ نامیده می‌شود (۹،۱۰).

دیابت نوع ۱

دیابت نوع ۱(T1DM) یا دیابت وابسته به انسولین[۴۱] (IDDM) یک بیماری خودایمن است که با ویژگی‌های ژنتیکی، ایمونولوژیکی و متابولیکی مشخص می‌شود. ارتباط این بیماری با تغییر بیان برخی ژنها مانند ژن کد کننده‌ی آنتی‌ژن لکوسیت انسانی (HLA) مشخص شده است. در زمان تشخیص این بیماری در ۷۰ تا ۹۰٪ موارد، حداقل یک یا چند مورد از اتوآنتی‌بادی‌ها علیه برخی ترکیبات

[36]Diabetes Mellitus
[37] International Diabetes Federation
[38] Hybrid forms of diabetes
[39] Latent autoimmune diabetes in adults
[40] Slowly evolving immune-mediated diabetes of adults
[41] Insulin dependent Diabetes Mellitus

نظیر گلوتامیک‌اسید دکربوکسیلاز[۴۲] (GAD)، انسولین[۴۳] (IAA)، ترانسپورتر روی[۴۴] (ZnT8)، تیروزین فسفاتاز[۴۵] (IA-2) و سلولهای جزایر لانگرهانس[۴۶] (ICA) که نشانه پاسخ‌های ایمنی در این بیماران است، دیده می‌شود (۱۱،۱۲،۱۳). ویژگی‌های بالینی اصلی این بیماران شامل شاخص توده بدنی (BMI) پایین، نیاز به انسولین درمانی در شش ماهه اول پس از تشخیص بیماری و کتواسیدوزیس دیابتی است. (۱۴) در صورت کنترل نشدن دیابت نوع ۱ علائمی مانند تشنگی شدید، افزایش حجم ادرار و شب ادراری، افزایش اشتها و کاهش وزن بوجود می‌آید (۵).

دیابت نوع ۲

دیابت نوع ۲ یکی از شایع‌ترین اختلالات متابولیک در جهان است. برخلاف دیابت نوع ۱ که نوعی بیماری ایمونولوژیکی محسوب می‌شود، بروز TD2M بیشتر تحت تاثیر عوامل محیطی از قبیل سبک زندگی و نوع تغذیه قرار دارد. بطوریکه افزایش BMI، کم تحرکی، افزایش سن و سندرم متابولیک از مهمترین ریسک فاکتورهای این بیماری هستند. (۱۱) البته دخالت برخی ژنها مانند ژن TCF7L2[۴۷] هم در بروز T2DM اثبات شده است. در بسیاری از بیماران مبتلا به T2DM، سابقه ابتلا خانوادگی به دیابت گزارش شده است (۱۵). بر خلاف دیابت نوع ۱، در دیابت نوع ۲، سلولهای پانکراس تخریب نمی‌شوند و این افراد معمولا" مشکلی در سنتز و ترشح انسولین ندارند. بطوریکه سطح پپتید-C در این بیماران با افراد سالم تفاوت چندانی ندارد و یا بالاتر است. ولی از مهمترین تظاهرات بالینی T2DM، پدیده مقاومت به انسولین[۴۸] است که با کاهش حساسیت گیرنده‌های انسولین نسبت به انسولین مشخص می‌شود. (۱۶،۱۷) در مراحل اولیه بیماری، معمولا" با تغییر سبک زندگی و افزایش فعالیت فیزیکی و رژیم غذایی مناسب و یا استفاده از داروهای خوراکی مانند گلی‌بن گلامید و متفورمین این بیماری قابل کنترل است و حداقل در سالهای اولیه پس از تشخیص بیماری نیاز به انسولین درمانی نمی‌باشد. (۱۸)

دیابت خودایمن نهفته در بزرگسالان

[42] Glutamic acid decarboxylase
[43] Insulin autoantibodies
[44] Zinc transporter 8
[45] Protein tyrosine phosphatase
[46] Islet cell autoantibodies
[47] transcription factor 7 like 2
[48] Insulin resistance

در سال ۱۹۷۷، ایروین و همکاران نشان دادند که ۱۱٪ از افرادی که در ابتدا با دیابت نوع ۲ تشخیص داده می‌شوند، دارای آنتی‌بادی علیه سلول‌های بتا تولید کننده انسولین هستند که این ویژگی شبیه دیابت نوع ۱ و نشان دهنده پاتوژنز خود ایمنی است (۱۹). سه مولفه برای تشخیص وتمایز این بیماران از T1DM و T2DM وجود دارد: ۱) سن بیمار در زمان تشخیص بیماری بالاتر یا مساوی ۳۰ سال باشد. ۲) در پلاسمای بیمار حداقل یکی از اتوآنتی‌بادی‌ها (GAD، ICA، IAA، IA-2 و ZnT8) قابل شناسایی باشد و ۳) حداقل در بازه زمانی شش ماه پس از تشخیص بیماری نیازی به انسولین درمانی نداشته باشند (۲۰،۲۱). از بین اتوآنتی‌بادی‌های ذکر شده، GADA رایج ترین و حساس‌ترین آنها بوده و مدت زمان ماندگاری آن در پلاسما بیش از بقیه می‌باشد (۲۲،۲۳). ICA اولین آنتی‌بادی سرم کشف شده در بیماران LADA بود. اما از نظر عملی، دشوارترین آنتی‌بادی برای اندازه‌گیری است. با این حال به عنوان یک نشانگر خوب در تشخیص LADA پیشنهاد می‌شود (۲۴،۲۵،۲۶). همچنین IAA اولین آنتی‌بادی جزیره‌ای است که در طی پیشرفت دیابت نوع ۱ ایجاد می‌شود و چندین سال قبل ازشروع علائم بالینی قابل تشخیص است. ارتباط بین آنتی‌ژن‌های خاص لکوسیت‌های انسانی و سطح IAA نشان دادند که به شدت با HLA-Q وDR (روی کروموزوم ۶) و ژن انسولین روی کروموزوم ۱۱ مرتبط است. (۲۶،۲۷،۲۸) علاوه بر این‌ها، آنتی‌بادی علیه گیرنده روی (ZnT8) در ۷۰ درصد بیماران دیابتی تشخیص داده می‌شود. ZnT8 در کودکان بیشتر از نوجوانان دیده می‌شود و همراه با آنتی‌بادی‌های دیگر می‌توانند عملکرد تشخیصی را بهبود بخشد (۲۹).

بطور کلی مطالعات اپیدمیولوژیک میزان شیوع LADA در دنیا را بین ۲-۱۲ درصد نشان می‌دهند. (۲۰) البته این میزان در مطالعات مختلف تفاوت دارد. که علت آن تفاوت در اندازه جمعیت مورد مطالعه، بازه سنی شرکت‌کنندگان، سن شروع بیماری و اینکه از چه نوع یا چه تعداد اتوآنتی‌بادی برای تبیین LADA استفاده می‌شود، می‌باشد. همچنین تفاوت‌های نژادی و قومیتی نیز در این امر دخیل است. (۳۰). همچنین در اکثر مطالعات ارتباط معنی‌داری بین جنسیت و شیوع LADA گزارش نشده است (۳۱)

ویژگی های بالینی دیابت خودایمن نهفته در بزرگسالان

از نظر ویژگی‌های ژنتیکی، داده‌های موجود درباره حساسیت ژنتیکی نشان می‌دهد که LADA مولفه ژنتیکی پایین‌تری را نسبت به T1DM نشان می‌دهد. به طور خاص آنتی‌ژن لکوسیت انسانی(HLA-DRB1*04-DQB1*0302وHLA-DRB1*0301-DQB1*0201 که در T1DM بسیار شایع است و با افزایش سن در شروع بیماری فراوانی آن کاهش می‌یابد، در LADA کمتر از T1DM بزرگسالان است. همچنین در برخی مطالعات ارتباط این بیماری با ژنوتیپ CT/TT rs7903146 در ژن TCF7L2 که با بروز T2DM ارتباط دارد، مشخص شده است (۳۲،۳۳،۳۴).

یکی از مهمترین بحث‌ها در ارتباط با دیابت خودایمن، عملکرد سلولهای β پانکراس است که با اندازه‌گیری پپتید-C مشخص می‌شود. غلظت ناشتای پپتید-C در افراد سالم در محدوده 0.26-0.62 nmol/L قرار دارد (۳۵). هر چه این عدد پایین‌تر باشد نشانه تولید کمتر انسولین و درنتیجه بازتاب تخریب بیشتر سلولهای تولید کننده انسولین در پانکراس است. در T1DM این عدد معمولا" کمتر از ۰.۳ بوده و T2DM عموما" در محدوده افراد سالم و یا بالاتر قرار می‌گیرد. در بیماران LADA، بر حسب تعداد و تیتر آنتی بادی، غلظت پپتید-C متغیر است. درآن دسته از بیماران LADA که بیش از یک نوع اتوآنتی‌بادی دارند و یا تیتر GADA بالا است، میزان پپتید C کم بوده و از این نظر بیشتر شبیه T1DM است. ولی در بیمارانی که فقط یک نوع آنتی‌بادی داشته باشند و تیتر اتوآنتی‌بادی کم باشد، این عدد به T2DM نزدیکتر می‌شود. همچنین سطح پپتیدC با سن زمان تشخیص بیماری و مدت زمان بیماری ارتباط دارد. بطوریکه هر چه سن زمان تشخیص بیماری کمتر باشد و از زمان تشخیص LADA مدت زمان بیشتری گذشته باشد، سطح پپتیدC پایین‌تر خواهد بود (۳۶).

مطالعات مختلف نشان می‌دهند که بر خلاف T2DM، که شاخص توده بدنی (BMI) اکثر بیماران در محدوده دارای اضافه وزن (25.0–29.99 kg/m2) و چاق (≤ ۳۰.۰ kg/m2) قرار دارد، BMI بیماران LADA در محدوده نرمال (18.5–24.99 kg/m2) و یا دارای اضافه وزن قرار دارد. یعنی چاقی ریسک فاکتور بروز LADA نمی‌باشد و از این نظر شباهت بیشتری به T1DM دارند. تنها ارتباط بین دارا بودن IA-2 با بالابودن BMI در بیماران اتوایمن شناخته شده است و این دسته از بیماران از نظر BMI بیشتر شبیه T2DM می‌باشند (۳۷،۱۵). همچنین در بیشتر مطالعات صورت گرفته بین سندرم متابولیک و بروز LADA، بر خلاف T2DM ارتباط معنی‌داری دیده نشده است (۱۵).

بین بروز LADA و ابتلا به برخی بیماریهای اتوایمن دیگر هم ارتباط دیده شده است. بطوریکه در برخی از مطالعات مشخص شده که در بیماران LADA، اتوانتی‌بادی علیه تیروئید پراکسیداز (TPO) هم وجود دارد (۳۸).

۲-۲ درمان

بسیاری از بیماران LADA با داروهای خوراکی درمان را آغاز می‌کنند .داروهای معمول کاهش قند خون به عنوان مثال، سولفونیل اوره(SUS) ،متفورمین یا تیازولیدین دیون(TZDs)و مهار کننده‌های DPP-4 در حفظ سطح گلوکز خون در کوتاه مدت بسیار خوب هستند، برای درمان دراز مدت LADA ،انسولین درمانی طی ۵ سال از زمان تشخیص لازم است. انسولین درمانی و همچنین سه مهارکننده DPP-4(سیتاگلیپتین، لیناگلیپتین و ساکساگلیپتین) می‌توانند عملکرد سلول‌های بتا را حفظ کنند، در حالیکه سولفونیل

اوره‌ها ممکن است وابستگی به انسولین را تسریع کنند (۳۹،۴۰). بر اساس جدیدترین دستورالعمل ADA[۴۹]، ملاک درمان LADA، سطح پپتید-C پلاسما است. اگر سطح پپتید C کمتر از 0.3 nmol/L باشد، این افراد باید بلافاصله از رژیم درمانی T1DM تبعیت کرده و انسولین درمانی آغاز شود. ب) میزان پپتید-C بزرگتر یا مساوی ۰.۳ تا کوچکتر یا مساوی ۰.۷: این دسته از لحاظ سطح بیماری بین T1DM و T2DM قرار گرفته و باید تحت درمان تغییر شکل یافته T2DM قرار بگیرند. یعنی ابتدا درمان با داروهای خوراکی و در صورت افت سطح پپتید-C استفاده از انسولین درمانی. ج) سطح پپتید-C بزرگتر از ۰.۷: این دسته میتوانند از رژیم درمانی خیلی کم تغییر یافته T2DM استفاده کنند. پزشک باید بیمار را در فواصل منظم بررسی کرده و با اندازه‌گیری پپتید-C در مورد تغییر روش درمان تصمیم گیری کند (۳۶).

نتیجه گیری:

بیماری دیابت اتوایمن نهفته در بزرگسالان از نظر ژنتیکی، متابولیکی و تظاهرات بالینی بسیار پیچیده بوده و بر حسب تعداد، تیتر و یا نوع اتوآنتی‌بادی، سن شروع بیماری و مدت زمان بیماری می‌تواند نوع هیبریدی از T1DM و T2DM باشد. شیوع این بیماری در جهان قابل ملاحظه است. اتیولوژی و پاتولوژی این بیماری جنبه های ناشناخته زیادی دارد که باید بررسی شوند. در غالب موارد تمایز بیماران LADA، به دلیل رایج نبودن انجام دادن تست های ایمونولوژیک در شناسایی دیابت و به دلیل اینکه این بیماری خود را در سنین بالاتر از ۳۰ سال نشان می‌دهد، با دیابت نوع ۲ مشکل است و این بیماران به اشتباه درمان رایج برای T2DM را دریافت می‌کنند که باعث از دست رفتن باقیمانده عملکرد سلولهای β در این بیماران می‌شود. مطالعات اپیدمیولوژیک و بررسی پارامترهای بالینی این بیماران و مقایسه با T2DM و T1DM می‌تواند تا حد زیادی به شناسایی این بیماران کمک کند. به منظور شناسایی سریع و موثر این بیماران، در تمامی افراد تازه تشخیص داده شده با T2DM، انجام تست سنجش GADA توصیه می‌شود.

منابع

1- Berbudi, A., Rahmadika, N., Tjahjadi, A. I., & Ruslami, R.(2020). Type 2 Diabetes and its Impact on the Immune System. Current diabetes reviews, 16(5), 442–449. https://doi.org/10.2174/1573399815666191024085838

[49] American Diabetes Association

2- Singh, M., Kumar, N., Sood, S., Makkar, B., & Arora, V.(2010). Historical Milestones in Diabetes. Australasian Medical Journal (Online), 3(13), 860.

3- King, H., & Rewers, M. (1993). Global estimates for prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in adults. Diabetes care, 16(1), 157-177.

4- Amos, A. F., McCarty, D. J., & Zimmet, P. (1997). The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. Diabetic medicine, 14(S5), S7-S85.

5- World Health Organization. (2017). Global diffusion of eHealth: making universal health coverage achievable: report of the third global survey on eHealth. World Health Organization.

6- Cho, N., Shaw, J. E., Karuranga, S., Huang, Y. D., da Rocha Fernandes, J. D., Ohlrogge, A. W., & Malanda, B. (2018). IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. Diabetes research and clinical practice, 138, 271-281.

7- Qi X, Sun J, Wang J, Wang PP, Xu Z, Murphy M, et al. Prevalence and correlates of latent autoimmune diabetes in adults in Tianjin, China. Diabetes Care 2011; 34(1): 66-70.

8- Tuomi T, Groop LC, Zimmet PZ, Rowley MJ, Knowles W, Mackay IR. Antibodies to glutamicacid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a non-insulin dependent onset of disease. Diabetes 1993; 42(2): 359-62.

9- Pihoker C, Gilliam LK, Hampe CS, Lernmark A. Autoantibodies in diabetes. Diabetes 2005; 54(S 2): 52-61.

10- Laugesen E, Østergaard JA, Leslie RD. Latent autoimmune diabetes of the adult: current knowledge and uncertainty. Diabet Med. 2015; 32(7): 843-52

11- Global reports on diabetes. Geneva: World Health Organization; 2016.

12- Gregg EW, Williams DE, Geiss L. Changes in diabetes-related complications in the United States [Letter]. N Engl J Med. 2014;371:286-7. [PMID: 25014698]

13- American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--- 2014. Diabetes Care. 2014;37 Suppl 1:S14-80. [PMID: 24357209]

14- Maahs, D. M., West, N. A., Lawrence, J. M., & Mayer-Davis, E. J. (2010). Epidemiology of type 1 diabetes. Endocrinology and metabolism clinics of North America, 39(3), 481–497. https://doi.org/10.1016/j.ecl.2010.05.011

15- Al-Zubairi, T., Al-Habori, M., & Saif-Ali, R. (2021). Latent Autoimmune Diabetes in Adults (LADA) and its Metabolic Characteristics among Yemeni Type 2 Diabetes Mellitus Patients. Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy, 14, 4223–4232. https://doi.org/10.2147/DMSO.S332416

16- Inzucchi, S. E., Bergenstal, R. M., Buse, J. B., Diamant, M., Ferrannini, E., Nauck, M., ... & Matthews, D. R. (2012). Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). Diabetes Spectrum, 25(3), 154-171.

17- Ceriello, A., & Colagiuri, S. (2008). International Diabetes Federation guideline for management of postmeal glucose: a review of recommendations. Diabetic Medicine, 25(10), 1151-1156.

18- National Collaborating Centre for Chronic Conditions (Great Britain), & National Institute for Clinical Excellence (Great Britain). (2008). Osteoarthritis: national clinical guidelines for care and management in adults. Royal College of Physicians.

19- Irvine, W. J., Gray, R. S., McCallum, C. J., & Duncan, L. J. P. (1977). Clinical and pathogenic significance of pancreatic-islet-cell antibodies in diabetics treated with oral hypoglycaemic agents. The Lancet, 309(8020), 1025-1027.

20- Naik RG, Brooks-Worrell BM, Palmer JP. Latent autoimmune diabetes in adults. J Clin Endocrinol Metab. 2009; 94(12): 4635-644.

21- Takeda, H., Kawasaki, E., Shimizu, I., Konoue, E., Fujiyama, M., Murao, S. & Makino, H. (2002). Clinical, autoimmune, and genetic characteristics of adult-onset diabetic patients with GAD autoantibodies in Japan (Ehime Study). Diabetes care, 25(6), 995-1001.

22- Li, X., Zhou, Z. G., Huang, G., Yan, X., Yang, L., Chen, X. Y., & Wang, J. P. (2004). Optimal cutoff point of glutamate decarboxylase antibody titers in differentiating two subtypes of adult-onset latent autoimmune diabetes. Annals of the New York Academy of Sciences, 1037(1), 122-126.

23- Van Deutekom, A. W., Heine, R. J., & Simsek, S. (2008). The islet autoantibody titres: their clinical relevance in latent autoimmune diabetes in adults (LADA) and the classification of diabetes mellitus. Diabetic medicine, 25(2), 117-125.

24- Gozashti MH SM, Esmaeilian S, Najafipour H, Mashrouteh M. The prevalence of latent autoimmune diabetes in adults and its correlates in patients with type 2 diabetes in Kerman, Iran, 2011. Diabetes Metab Syndr. 2015;9(2):104-7; doi: http://dx.doi./10.1016/j.dsx,2014,04.014.

25- Sanyal D, Batabyal SK, Maity S, Chatterjee S. Changing profile of GAD and IA2 antibody positivity in Indian children with recently diagnosed type 1 diabetes mellitus. Clinical Diabetology. 2019;8(2):116-20; doi: http://10.5603/DK.2019.0005

26- Herawati E, Susanto A, Sihombing CN. Autoantibodies in Diabetes Mellitus. Molecular and Cellular Biomedical Sciences. 2017;1(2):58-64; doi: http://10.21705/mcbs.v1i2.8..

27- Hall T, Thomas J, Padoa C, Torn C, Landin-Olsson M, Ortqvist E, et al. Longitudinal epitope analysis of insulin-binding antibodies in type 1 diabetes. Clinical & Experimental Immunology. 2006;146(1):9-14; doi: http://10.1111/j.1365-2249.2006.03178.x.

28- Kong YH, Kim MS, Lee DY. Comparison of the prevalence of islet autoantibodies according to age and disease duration in patients with type 1 diabetes mellitus. Ann Pediatr Endocrinol Metab. 2013;18(2):65-70; doi: http://10.6065/apem.2013.18.2.65.

29- Banerjee P, Khan N. Latent autoimmune diabetes in adults: complication, management and treatment modalities. Endocrinol Metab Int J. 2019;7(3):67-72; doi: http://10.15406/emij.2019.07.00246.]

30- Kumar A, de Leiva A. Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) in Asian and European populations. Diabetes/ Metab Res Rev. 2017;**33**(5):e2890. doi:10.1002/dmrr.2890 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

31- AL-Hasnawi, S. M. J. (2009). The Diagnostic role ofC-peptide & insulin auto antibody (IAA) in Diabetes Mellitus (Doctoral dissertation, Kufa University).

32- Pozzilli P, Pieralice S. Latent Autoimmune Diabetes in Adults: Current Status and New Horizons. Endocrinol Metab (Seoul). 2018;33(2):147-59; doi: http://10.3803/EnM.2018.33.2.147.

33- Hjort R, Ahlqvist E, Carlsson PO, Grill V, Groop L, Martinell M, et al. Overweight, obesity and the risk of LADA: results from a Swedish case-control study and the Norwegian HUNT Study. Diabetologia. 2018;61(6):1333-43; doi: http://10.1007/s00125-018-4596-0.

34- Andersen MK, Lundgren V, Turunen JA, Forsblom C, Isomaa B, Groop PH, et al. Latent autoimmune diabetes in adults differs genetically from classical type 1 diabetes diagnosed after the age of 35 years. Diabetes Care. 2010;33(9):2062-4; doi: http://10.2337/dc09-2188.

35- Bell, D. S., & Ovalle, F. (2004). The role of C-peptide levels in screening for latent autoimmune diabetes in adults. American journal of therapeutics, 11(4), 308–311. https://doi.org/10.1097/01.mjt.0000102372.28723.2b

36- Buzzetti, R., Tuomi, T., Mauricio, D., Pietropaolo, M., Zhou, Z., Pozzilli, P., & Leslie, R. D. (2020). Management of Latent Autoimmune Diabetes in Adults: A Consensus Statement From an International Expert Panel. Diabetes, 69(10), 2037–2047. https://doi.org/10.2337/dbi20-0017

37- Niu X, Luo S, Li X, et al. Identification of a distinct phenotype of elderly latent autoimmune diabetes in adults: LADA China Study 8. Diabetes Metab Res Rev. 2019;**35**:e3068. doi:10.1002/dmrr.3068 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

38- Murao, S., Kondo, S., Ohashi, J., Fujii, Y., Shimizu, I., Fujiyama, M., Ohno, K., Takada, Y., Nakai, K., Yamane, Y., Osawa, H., & Makino, H. (2008). Anti-thyroid peroxidase antibody, IA-2 antibody, and fasting C-peptide levels predict beta cell failure in patients with latent autoimmune diabetes in adults (LADA)--a 5-year follow-up of the Ehime study. Diabetes research and clinical practice, 80(1), 114–121. https://doi.org/10.1016/j.diabres.2008.01.024

39- Laugesen E, Østergaard JA, Leslie RD. Latent autoimmune diabetes of the adult: current knowledgeanduncertainty.DiabetMed.2015;32(7):84352;doi:http://10.1111/dme.12700.

40- Page CP, Fitzgerald B, Hawes EM. Latent autoimmune diabetes of adulthood: case report. Clin Diabetes Endocrinol. 2017;3:11; doi: http://10.1186/s40842- 017-0049-9.

Primary Congenital Glaucoma

Zahra Nemati [1], Issa Jorjani [2*], Mona Entezam [3], Hossein Sabouri [4]

1- Master student of cellular and molecular biology, Department of Biology, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Genetics, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

4- Associate Professor, Department of Plant Production, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran.

Email: eisa_jorjani@yahoo.com

Abstract

Primary Congenital Glaucoma (PCG) is a type of childhood glaucoma and one of the major causes of irreversible blindness in children due to developmental defects of the aqueous humor outflow pathway structures. The disease is clinically and genetically heterogeneous. PCG often presents with an autosomal recessive pattern, due to obstruction in the drainage of the aqueous humor due to congenital anomalies of trabecular meshwork growth and anterior chamber angle structures during fetal development. This disease is characterized by an increase in congenital intraocular pressure (IOP) due to decreased aqueous humor outflow due to dysfunction of the trabecular meshwork. Elevated IOP leads to optic nerve damage and gradual loss of vision. PCG occurs mainly in the first 3 years of life. The most common classic symptoms of PCG include epiphora, photophobia, and blepharospasm. Several different genes have been reported as major genes involved in the pathogenesis of PCG. Among these, the CYP1B1 gene is the most common gene reported and is currently the main known genetic cause of PCG. CYP1B1 expression plays an important role in regulating the development and functions of the trabecular meshwork. This gene was isolated and mapped at chromosome 2p21-22 using positional simulation and in situ hybridization by Tang et al. The CYP1B1 gene consists of three exons and two introns and 8.5 kb long. The translation product of the CYP1B1 gene encodes a 543 amino acid protein and its transcript has 1629 base paire. Pathogenic variants of the CYP1B1 gene reduce enzymatic activity.

The enzyme encoded by the CYP1B1 gene plays an important role in the growth of the anterior segment and the regulation of corneal transparency and fluid secretion. The CYP1B1 gene is highly expressed in the iris and ciliary body of the human eye. CYP1B1 gene expression also plays an important role in regulating the development and functions of the trabecular meshwork (TM). To date, more than 186 PCG-related mutations have been found in the CYP1B1 gene, accounting for a significant proportion of genetic, familial, and sporadic cases of PCG. By identifying the genes involved in the disease, performing sequencing, analysis of mutations and diagnosing the disease, treatment and prevention can be done with insight and awareness.

Keywords: Primary congenital glaucoma, CYP1B1 gene, intraocular pressure

گلوکوم مادرزادی اولیه

زهرا نعمتی[۱]، عیسی جرجانی[۲*]، مونا انتظام[۳]، حسین صبوری[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی-ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشگاه علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران.

۲- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران.

۳- استادیار گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

۴- دانشیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران.

Email: eisa_jorjani@yahoo.com

چکیده

گلوکوم مادرزادی اولیه (PCG: Primary Congenital Glaucoma) نوعی گلوکوم دوران کودکی و یکی از علل مهم نابینایی برگشت ناپذیر در کودکان است که ناشی از نقایص رشد ساختارهای مسیر خروجی مایع زلالیه می‌باشد. این بیماری از نظر بالینی و ژنتیکی ناهمگن است. PCG اغلب با الگوی اتوزومی مغلوب، ناشی از انسداد در تخلیه مایع زلالیه به دلیل ناهنجاری‌های مادرزادی رشد شبکه ترابکولار و ساختارهای زاویه محفظه قدامی در طول رشد جنین به وجود می‌آید. این بیماری با افزایش فشار داخل چشم مادرزادی (IOP)ناشی از کاهش خروج مایع زلالیه به دلیل نقص عملکرد شبکه ترابکولار مشخص می‌شود. IOP افزایش یافته، منجر به آسیب دیدگی عصب بینایی و از بین رفتن تدریجی بینایی می شود. PCG عمدتاً در ۳ سال اول زندگی بروز پیدا می کند. رایج ترین علائم کلاسیک PCG شامل: اپیفورا ، فتوفوبیا و بلفارواسپاسم است. چند ژن متفاوت به عنوان ژنهای اصلی درگیر در پاتوژنز بیماری PCG گزارش شده اند. در این بین ژن CYP1B1 شایعترین ژن گزارش شده و در حال حاضر علت اصلی ژنتیکی شناخته شده PCG است. این ژن با استفاده از شبیه سازی موقعیتی و هیبریداسیون درجا توسط تانگ و همکاران در مکان کروموزومی 2p21-22 جدا و نقشه برداری شد. ژن CYP1B1 شامل سه اگزون و دو اینترون است و ۸٫۵ کیلوباز طول دارد.محصول ترجمه ژن CYP1B1 پروتئینی به طول ۵۴۳ آمینو اسید را کد گذاری می کند و رونوشت آن ۱۶۲۹ باز دارد. واریانت‌های بیماری زای CYP1B1 فعالیت آنزیمی را کاهش می‌دهد. آنزیم کد شده توسط ژن CYP1B1 نقش مهمی در رشد بخش قدامی و تنظیم شفافیت قرنیه و ترشح مایع زلالیه دارد. ژن CYP1B1 در عنبیه و جسم مژگانی چشم انسان بیان بالایی دارد. همچنین بیان ژن CYP1B1 نقش مهمی در تنظیم نمو و عملکردهای شبکه ترابکولار (TM) ایفا می‌کند. تا به امروز، بیش از ۱۸۶ جهش مرتبط با PCG در CYP1B1 یافت شده است که بخش قابل توجهی از موارد ژنتیکی، فامیلی و تک گیر PCG را تشکیل می دهد. با شناسایی ژن های دخیل در بیماری، انجام توالی یابی، بررسی جهش‌ها و تشخیص بیماری، می توان برای درمان و پیشگیری، با بینش و آگاهی اقدام کرد.

واژگان کلیدی: گلوکوم مادرزادی اولیه، ژن CYP1B1، فشار داخل چشم

بیماری گلوکوما[50]

گلوکوم یک بیماری پاتولوژیک[51] است که با مرگ تدریجی سلول‌های گانگلیون شبکیه، تخریب عصب بینایی و نهایتا از بین رفتن بینایی همراه است (Sarfarazi et al., 2003). گلوکوم دومین علت شایع نابینایی در سراسر جهان است و حدود ۶۶ میلیون نفر در سراسر جهان به این بیماری مبتلا هستند، در حالی که بیماران مبتلا به گلوکوم در آسیا تقریباً ۵۰ درصد از کل موارد را تشکیل می دهند. (Gomes et al., 2018) علت واقعی مرگ سلول‌های گانگلیونی شبکیه هنوز مشخص نیست، اما میزان فشار داخل چشم نقش اساسی را ایفا می‌کند (Abeshi et al., 2017; Yang et al., 2017).

طبقه بندی گلوکوم

طبقه‌بندی متداول گلوکوم، براساس اتیولوژی (اولیه و ثانویه) ، آناتومی اتاق قدامی (زاویه باز و زاویه بسته)، زمان شروع (نوزادان، نوجوانان و بزرگسالان) و پاتوژنز (مادرزادی و اکتسابی) می باشد.(Faiq et al., 2013)

گلوکوم مادرزادی اولیه[52]

PCG نوعی گلوکوم دوران کودکی است که در ۳ سال اول زندگی بروز پیدا می کند(Badeeb et al., 2014) و یکی از علل مهم نابینایی برگشت‌ناپذیر در کودکان است و از نقایص رشد ساختارهای مسیر خروجی مایع زلالیه ناشی می‌شود. (Souzeau et al., 2019). PCG اغلب به عنوان یک شکل شدید گلوکوم اتوزومال مغلوب ناشی از انسداد در تخلیه مایع زلالیه به دلیل ناهنجاری های مادرزادی رشد در ساختارهای زاویه محفظه قدامی (Faiq et al., 2013) و ناهنجاری شبکه ترابکولار بوده، در طول رشد جنین به ارث می‌رسد(Ou et al., 2018).

علائم PCG

مشخصه اصلی PCG، IOP[53] بالا می‌باشد که باعث افزایش قطر قرنیه[54]، بزرگ‌شدن کره چشم[55] و آسیب برگشت‌ناپذیر به عصب چشم و در نتیجه منجر به نابینایی می شود (Milla et al., 2013) گلوکوم با علائم سه گانه کلاسیک مانند اپیفورا[56] (اشک ریزی بیش از حد) ، فتوفوبیا[57] (حساسیت بیش از حد به نور) و بلفارواسپاسم[58] (انقباض پلک ها) خود را نشان می‌دهد. (Yu-Wai-Man et al., 2018) از نظر بالینی، همه گلوکوم ها با محدود شدن تدریجی میدان دید و اشک ریزی مشخص می‌شوند. سایر خصوصیات

[50] Glaucoma
[51] Pathologic
[52] Primary congenital glaucoma: PCG
[53] Intra Ocular Pressure: IOP
[54] megalocornea
[55] buphthalmos
[56] epiphora
[57] photophobia
[58] Blepharospasm

بالینی عبارتند از: بزرگ شدن کره چشم، ادم قرنیه و فتوفوبیا (Abeshi et al., 2017)، کدورت قرنیه، شکاف در غشای دسمه (Yu-Wai-Man et al., 2018) ، فنجانی شدن دیسک بینایی ، بزرگ شدن قطر قرنیه (Souzeau et al., 2019)

فراوانی و شیوع در جمعیتهای مختلف

PCG اگر چه شایع ترین و رایج ترین گلوکوم در جمعیت کودکان است اما مطالعات اپیدمیولوژیک بزرگ دشوار است(Abdolrahimzadehet al., 2015). PCG یک فرم نادر است که ۱ تا ۵ درصد از کل موارد گلوکوم را شامل می‌شود. . (Sharafieh et al., 2011) میزان بروز PCG در کشورهای مختلف و بر اساس قومیت، متفاوت است. (Yang et al., 2017). ناهمگونی قابل توجه در بیماری نادر گلوکوم دوران کودکی وجود دارد. بیشتر موارد PCG به صورت پراکنده رخ می دهد(Chan et al., 2015). با این حال، ۱۰ تا ۴۰ درصد فامیلی هستند و معمولاً وراثت اتوزومی مغلوب و نفوذ متغیر دارند. (Gencik et al., 1989). به نظر می‌رسد جهش‌های ژن CYP1B ٪۸۷ موارد فامیلی و ٪۲۷ موارد تک گیر را تشکیل می‌دهند (Abdolrahimzadeh et al., et al., 2015) . تقریبا ٪۵۰ از مبتلایان PCG در هنگام تولد و ٪۸۰ از بیماران تا یک سالگی علائم را نشان می‌دهند. این بیماری در بین پسران شایع‌تر است، ۶۵ درصد از بیماران، پسر هستند (Abeshi et al., 2017) و ۷۰ تا ۸۰ درصد از بیماران علائم را در هر دو چشم دارند. (François et al., 1980) در بعضی نژادها میانگین سن بروز PCG با شیوع بیشتر و در سنین پایین تر اتفاق می‌افتد. میانگین سن ظهور PCG در جمعیت آسیایی‌ها، عربستان سعودی و هندی‌ها بین ۳ تا ۴ ماه و در کشورهای غربی تا ۱۱ ماه است. (Tamcelik et al., 2014) جهش ژن CYP1B1 بیان متغیر و نفوذ تقریباً کامل ٪۱۰۰-۴۰ را نشان می‌دهد (Ou et al., 2018)

تشخیص بیماری و ضرورت آن

این بیماری معمولاً در بدو تولد یا در ماه های اول زندگی تشخیص داده می‌شود. هنگامی که کودک ویژگی‌های علائم کلاسیک را نشان دهد، تشخیص PCG می تواند نسبتاً آسان باشد. رایج ترین علایم سه گانه کلاسیک PCG شامل: اپیفورا ، فتوفوبیا و بلفارواسپاسم است(Badawi et al., 2019) کودکانی که به PCG مشکوک هستند، برای معاینه‌های مکرر تحت بیهوشی عمومی قرار می‌گیرند. معاینات از جمله اندازه گیری قطر قرنیه، اندازه‌گیری IOP[59] ، گونیوسکوپی، معاینه عصب بینایی (Faiq et al., 2013)، سونوگرافی چشم و تست خودکار میدان بینایی را می‌توان معرفی کرد. توموگرافی انسجام نوری دامنه طیفی همچنین می‌تواند برای ارزیابی عصب بینایی و لایه فیبر عصبی شبکیه در بیماران PCG می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (Srinivasan et al., 2014) فنجانی شدن عصب بینایی ممکن است به سرعت در نوزادان پیشرفت کند و در صورتی که IOP طبیعی به سرعت ترمیم شود می‌تواند برگشت پذیر باشد(Yu-Wai-Man et al., 2018) هنگامی که نابینایی ناشی از گلوکوما پیشرفت کند، هیچ درمان شناخته شده‌ای برای ترمیم بینایی وجود ندارد. نابینایی ناشی از گلوکوم تقریباً در همه موارد قابل پیشگیری است. آنچه برای این پیشگیری لازم است تشخیص زودهنگام و درمان سریع است. تشخیص زود هنگام با مشاوره ژنتیک و آزمایش مولکولی مناسب احتمالاً شیوع نابینایی گلوکوم را کاهش می دهد(Mohanty et al., 2013) بنابراین، تشخیص زودهنگام و درمان سریع به ویژه برای بیماران مبتلا به PCG ضروری

است تا عملکرد بینایی خود را در طول زندگی حفظ کنند. از طرف دیگر، شناسایی مکانیسم بیماری زای PCG ممکن است به توسعه درمان هایی کمک کند که پیشرفت نابینایی ناشی از آن را کاهش دهد.(Ling et al., 2020)

درمان بیماری

برای PCG درمان های دارویی و جراحی وجود دارد و می توان کودکان را در سنین پایین درمان کرد تا از کاهش بینایی جلوگیری شود. پیش آگهی تا حد زیادی با زمان بروز آن مربوط می‌شود. تشخیص زودهنگام و درمان سریع جراحی، بینایی را به طور قابل توجهی بهبود می‌بخشد(Yu-Wai-Man et al., 2018) هدف از درمان، کاهش IOP بالا به سطحی است که عملکرد بینایی بدون ایجاد آسیب وسیع به عصب بینایی و یا شبکیه حفظ شود. در مواردی که چشم هنوز پتانسیل خوبی برای بازیابی بینایی دارد ، جلوگیری از زوال بیشتر بینایی بسیار مهم است. در موارد دیررس، مقدار قابل توجهی آسیب جبران ناپذیر رخ داده است و درمان در چنین مواردی حفظ وضعیت بینایی فعلی و جلوگیری از زوال بینایی چشم دیگر است. درمان جراحی در موارد PCG درمان اصلی است، با این حال، درمان دارویی نقش مهمی در زمینه های مختلف بالینی دارد(Badawi et al., 2019) در حال حاضر، امیدوار کننده ترین استراتژی درمانی برای PCG مداخله جراحی همراه با درمان دارویی است(Ling et al., 2020)

ژن ها و جایگاه های مرتبط با PCG

PCG یک بیماری ناهمگون از نظر ژنتیکی[60] است. تا به امروز چهار لوکوس[61] مرتبط با PCG در زیر گروه GLC3 به نام‌های GLC3A (2p21-22)، GLC3B (1p36.2-36.1)، GLC3C (14q24.3-14q31.1) و GLC3D (14q24) طبقه‌بندی شده‌اند. (Cascella et al., 2015) در جدول ۱ ژن ها و لوکوس های مرتبط با PCG نشان داده شده است.

تغییرات در ژن هایTEK ، MYOC، ASB10، NTF4، OPA1، WDR36 و OPTN دارای توارث اتوزومال غالب و تغییرات در ژن های CYP1B1 و LTBP2 دارای توارث اتوزومال مغلوب هستند. ژن های CYP1B1 وLTBP2 ,TEK با گلوکوم مادرزادی مرتبط هستند. مطالعات نشان می‌دهند که گلوکوم نوجوانان با تغییرات در ژن‌هایCYP1B1 ، MYOC، ASB10، NTF4، OPA1، WDR36 و OPTN تعیین می‌شود(Abeshi et al., 2017) .

اولین لوکوس مرتبط با PCG، GLC3A است که در ناحیه کروموزومی 2p21 نقشه‌برداری شد. (Cascella et al., 2015)

GLC3B به عنوان دومین مکان کروموزومی مرتبط با PCG در ناحیه 1p36.2-1p36.1 قرار دارد. GLC3B یک منطقه غنی از GC است. ژن‌های سرکوبگر تومور زیادی در این ناحیه وجود دارد. تعداد بسیار زیادی از ژن‌ها در ناحیه 1p36 قرار دارند اما هیچ کدام به عنوان عامل مسبب PCG در نظر گرفته نشده است (Faiq et al., 2013) .

GLC3C سومین مکان کروموزومی مرتبط با PCG در ناحیه 14q24.3-14q31.1 قرار دارد. در این ناحیه هیچ ژن مرتبط با PCG تاکنون شناخته نشده است (Cascella et al., 2015) .

GLC3D چهارمین مکان کروموزومی مرتبط با PCG در ناحیه 14q24 قرار دارد. در این ناحیه ژن LTBP2 مرتبط با PCG دارد. (Cascella et al., 2015)

جدول۱: لوکوس ها و ژنهای مرتبط با PCG

[60] genetic heterogeneity
[61] Locus

Locus	*Chromosomal location*	*Gene*	
GLC3A	2p21-22	CYP1B1	Autosomal recessive
GLC3B	1p36.2-36.1	Unknown	
GLC3C	14q24.3-14q31.1	Unknown	
GLC3D	14q24	LTBP2	

ژنتیک CYP1B1[62]

CYP1B1 (OMIM 601771) شایعترین ژن گزارش شده و در حال حاضر علت اصلی ژنتیکی شناخته شده PCG است. جهش در این ژن تقریباً نیمی از موارد PCG را توضیح می دهد(Yang et al., 2017) . ژن CYP1B1 در مکان کروموزومی 2p21 قرار دارد. از آنجایی که سطح رونویسی CYP1B1 پنج برابر بیشتر از سایر P450 ها در چشم انسان و موش است، نقش مهمی را در رشد چشم ایفا می کند(Faiq et al., 2013)

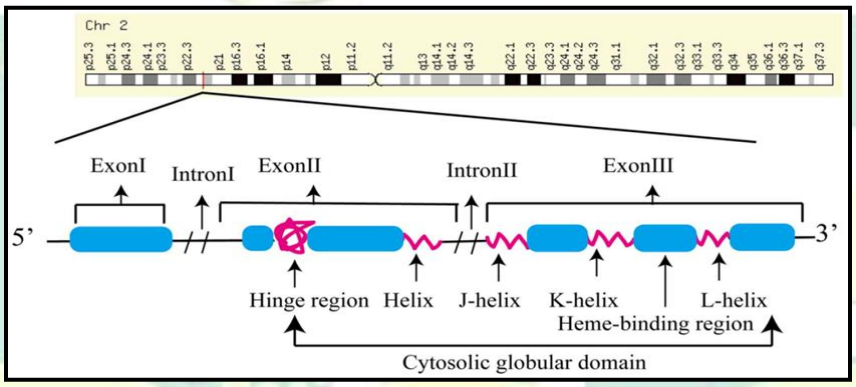
این ژن با استفاده از شبیه سازی موقعیتی[63] و هیبریداسیون درجا[64] توسط تانگ و همکاران (۱۹۹۴) در محل کروموزومی 2p21-22 جدا و نقشه برداری شد (Tang1994) .

در انسان، ژن CYP1B1 شامل سه اگزون (با چارچوب باز خواندن که از اگزون II شروع می شود) و دو اینترون است و ۸،۵ کیلوباز طول دارد. طول این سه اگزون به ترتیب ۳۷۱ ، ۱۰۴۴ و ۳۷۰۷ جفت باز است. دو اینترون آن نیز ۳۹۰ و ۳۰۳۲ جفت باز طول دارند. منطقه کد کننده ژن CYP1B1 در انتهای ′۵ اگزون دوم شروع می شود و در آخرین اگزون به پایان سد.(Faiq 2013). محصول ترجمه ژنCYP1B1 پروتئینی به طول ۵۴۳ آمینو اسید را کد گذاری می کند(Sutter et al.,1994) و رونوشت آن ۱۶۲۹ باز دارد. آنزیمهای CYP450 معمولاً یک اتم اکسیژن را در سوبسترای خود ترکیب می کنند و گروههای عملکردی هیدروکسیل (OH) ، آمینو (NH2) یا کربوکسیل (COOH) را ایجاد می کنند، بنابراین احتمالاً در اکسیژن رسانی گونه های زیستی و در نتیجه در انتقال سیگنال نقش ایفا می کنند.(Faiq 2013) جهش در CYP1B1 ، چه در پایانه NH2 و چه در COOH، می‌تواند با خواص اساسی مولکولی ژن CYP1B1 مانند توانایی اتصال آن به هم (heme) و یا شکل گیری منظم آن تداخل داشته باشد و منجر به اختلال در عملکرد آنزیمی می‌شود. (Rauf et al., 2016) ژنCYP1B1 در بسیاری از بافتها از جمله سلولهای ترشحی مغز و پستان و غدد فوق کلیوی، تخمدان ها، بیضه ها و بیش از ۱۵ بافت غیر چشمی دیگر بیان می‌شود. ژنCYP1B1 در چشم، در ناحیه جسم مژگانی[65] ، عنبیه، شبکیه و همچنین در شبکه ترابکولار[66] TM و محفظه بخش قدامی چشم بیان می‌شود (Faiq 2013) و نقش مهمی در پاتوژنز و اختلالات محفظه قدامی، از جمله گلوکوم ایفا می‌کند (Abu-Amero et al., 2018) . ژنCYP1B1 بسیاری از واکنش‌های دخیل در متابولیسم ترکیبات درون زا شامل β۱۷- استرادیول، رتینال‌ها، اسید آراشیدونیک و ملاتونین را کاتالیز می‌کند. رتینوئیک اسید (RA) برای رشد چشم ضروری است و ممکن است CYP1B1 در متابولیسم RA و ایجاد PCG نقش داشته باشد. (Banerjee et al., 2016) محصول ژنی CYP1B1 ویتامین A را در دو مرحله به آل ترانس رتینال (فرم آلدئید) و اسید آل ترانس رتینوئیک (به شکل کربوکسیلیک اسید) متابولیزه می‌کند. آل ترانس رتینوئیک اسید یک مورفوژن موثر است و رشد، نمو و تمایز در دوران جنینی (جنین) را تنظیم می‌کند. (Faiq 2013) تغییر فعالیت کاتالیزوری CYP1B1 می تواند شکل گیری مسیرخروجی زاویه را مختل کرده و منجر به افزایش

[62] Cytochrome P450 Family 1 Subfamily B Member 1: CYP1B1
[63] positional simulation
[64] in situ hybridization
[65] Ciliary body
[66] Trabecular Meshwork: TM

IOP و گلوکوم شود. از بین رفتن کامل فعالیت کاتالیزوری CYP1B1 شدیدترین فنوتیپ ها را ایجاد می‌کند و جهش‌هایی که فعالیت ژن را به طور کامل از بین نمی‌برند می‌توانند فنوتیپ خفیف‌تری نشان دهند.(Campos et al., 2009) مطالعات نشان داده است که واریانت‌های بیماری زای CYP1B1 فعالیت آنزیمی را کاهش می‌دهد (Souzeau et al., 2015). آنزیم کد شده توسط ژن CYP1B1 نقش مهمی در رشد بخش قدامی و تنظیم شفافیت قرنیه و ترشح مایع زلالیه دارد(Stoilov et al.,1997). همچنین بیان CYP1B1 نقش مهمی در تعدیل رشد و عملکردهای شبکه ترابکولار (TM) ایفا می‌کند. در موش‌های فاقد CYP1B1 نیز نقایص رشد و تکامل در TM مشابه موارد گزارش شده در بیماران مبتلا به گلوکوم مادرزادی مشاهده شد (Zhao et al., 2015) .

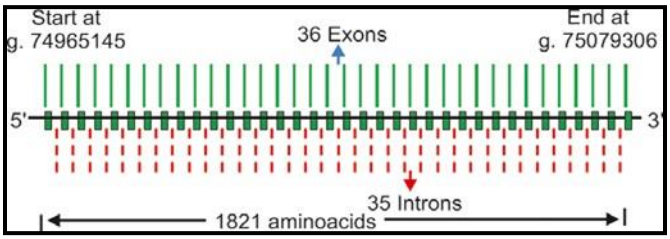
ژن CYP1B1 علاوه بر گلوکوم، ممکن است عامل سرطان زایی باشد. بر خلاف گلوکوم که عملکرد ژن از بین می‌رود، بیان بالای این ژن و افزایش بروز آلل های کدکننده ایزوفرم های فعال آن در برخی سرطان ها شناسایی شده است(Kheradpajouh et al., 2017) . شکل ۱ ژن CYP1B1 را نشان می دهد.



شکل ۱: ژن CYP1B1 در انسان(Ling et al., 2019)

ژن Latent transforming growth factor (TGF)-β binding protein 2 (LTBP2)

ژن LTBP2 (OMIM 602091) واقع در کروموزوم 14q24.2-24.3، در مکان کروموزومیGLC3C قرار دارد و یک پروتئین ۱۸۲۱ اسید آمینه ای LTBP2 را کد می‌کند که با PCG مرتبط است(Ali et al., 2009). حدود ۱.۳ مگاباز دارد(Ling et al., 2019) ژن LTBP2شامل ۳۶ اگزون است(Suri et al., 2018) . LTBP2 در چشم انسان از جمله شبکه ترابکولار بیان می شود و ممکن است در تکامل شبکه ترابکولار نقش داشته باشد، اما عملکرد دقیق آن در داخل بدن هنوز روشن نشده است (Mohanty et al., 2013).در سال ۲۰۰۹، ژن کاندید LTBP2، در بیماران PCG در پاکستان و ایران شناسایی شد(Ali et al., 2009). شکل ۲ ژنLTBP2 را نشان می دهد.



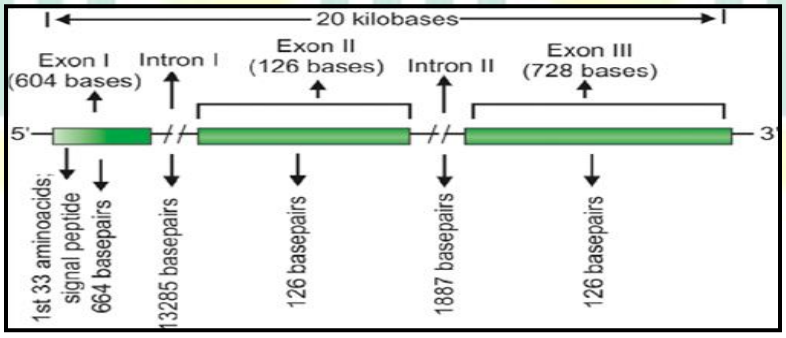
شکل ۲: ژنLTBP2

سایر ژن های مرتبط با گلوکوما

طی مطالعات ژنتیکی انجام شده همچنان خانواده‌هایی وجود دارند که جهش در هیچ یک از ژن‌های شناخته شده مرتبط با PCG را نشان نداده‌اند. بر این اساس احتمال وجود ژن‌ها و لوکوس‌های دیگری در این بیماری مطرح است که هنوز شناخته نشده‌اند و مطالعات ژنتیکی آینده، در این زمینه راهگشا خواهد بود. همچنین وجود جهش‌های هتروزیگوت در دیگر ژن های ایجاد کننده گلوکوما از جمله MYOC و FOXC1 در تعدادی خانواده مبتلا گزارش شده است که می‌تواند بیانگر احتمال وجود وراثت های پیچیده و دی ژنیک و یا اثر ژن های تعدیل کننده[۶۷] باشد.

ژن Myocilin

MYOC روی کروموزوم lq24.3 - q25.2 قرار دارد و شامل سه اگزون (طول ۶۰۴، ۱۲۶ و ۷۸۲ جفت باز) است. MYOC پروتیینی به طول ۵۰۴ آمینو اسید را کدگذاری می کند. این ژن در انواع مختلف بافت چشمی از جمله TM ، اسکلرا[۶۸] (سفیدی چشم یا صلبیه)، جسم مژگانی و شبکیه بیان می شود. اکثر جهش های شناسایی شده این ژن در اگزون سوم قرار دارند. جهش های ژن MYOC ممکن است منجر به تغییرات ساختاری در TM و جسم مژگانی شود که این تغییر مانع جریان مایع زلالیه و افزایش IOP می شود.(wang et al., 2019). شکل ۳ ژن MYOC را نشان می دهد.

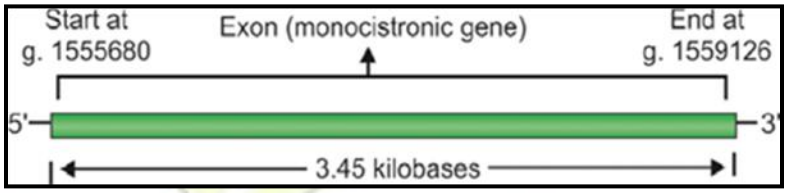


شکل ۳: ژنMYOC

[67] Modifier gene
[68] Sclera

ژن Forkhead box protein C1 (FOXC1)

ژنFOXC1 ، محصولی را که از ۵۵۳ آمینو اسید تشکیل شده است کد می‌کند. FOXC1 در قرنیه، شبکه ترابکولار و عصب بینایی بیان می‌شود. FOXC1 در سلول‌های مشتق شده از مزودرمال و سلولهای تاج عصبی، از جمله سلول‌های قسمت قدامی چشم وجود دارد و مسیر خروجی و IOP زلالیه را تنظیم می‌کند. بیماران مبتلا به انواع PCG به علت جهش در ژن FOXC1 اغلب با ویژگی های سیستمیک مرتبط با سندرم Axenfeld -Rieger ، از جمله کاهش شنوایی، صدای غیر عادی قلب[۶۹] و تاخیر در رشد، مرتبط هستند (Siggs et al., 2019). شکل ۴ ژن FOXC1 را نشان می دهد.



شکل ۴: ژنFOXC1

روش شناسایی ژن های مرتبط با PCG

فناوری‌های موجود برای مطالعه ژنتیک PCG شامل تجزیه و تحلیل توالی[۷۰] ، آنالیز هدفمند ژن جهش یافته[۷۱] و تجزیه و تحلیل حذف/مضاعف شدگی[۷۲] است. فناوریهای شناسایی ژنهای مرتبط با PCG شامل آنالیز پیوستگی[۷۳] ، تعیین توالی کل اگزوم[74] و هیبریداسیون ژنومی مقایسه‌ای[۷۵] است(Ling et al., 2020) .

۱.نتیجه گیری

با شناسایی و بررسی جهش‌ها در ژن های دخیل در بیماری و تشخیص بیماری توسط توالی یابی، می توان برای درمان و پیشگیری با بینش و آگاهی اقدام کرد. در خانواده های دارای فرد مبتلا به گلوکوم مادرزادی، برای پیشگیری از شیوع در خانواده بررسی ژنتیکی در مورد ژن ها و جهش های مربوط به بیماری توصیه اکید می‌شود و مشاوره ژنتیک جهت ارائه راهکارهای ضروری در راستای تصمیم‌گیری آگاهانه در مورد بارداریهای بعدی و راهکارهای موجود جهت جلوگیری از بروز مجدد بیماری در خانواده ضروری می‌باشد. با توجه به اینکه PCG وراثت اتوزومال مغلوب دارد، این بیماری در زوج‌هایی با ازدواج خویشاوندی نرخ بروز بالاتری دارد. همچنین لازم به ذکر است که، درکشور ایران با نرخ بالای ازدواج خویشاوندی مواجه می‌باشیم. به این ترتیب، برای کاهش شیوع PCG در چنین جوامعی مشاوره ژتیک پیش از ازدواج از اهمیت خاصی برخوردار است.

منابع

[69] heart murmur
[70] sequence analysis
[71] targeted gene mutant analysis
[72] deletion/duplication analysis
[73] linkage analysis
[74] whole-exome sequencing
[75] comparative genomic hybridization: CGH

Abdolrahimzadeh, S., Fameli, V., Mollo, R., Contestabile, M. T., Perdicchi, A., & Recupero, S. M. (2015). Rare Diseases Leading to Childhood Glaucoma: Epidemiology, Pathophysiogenesis, and Management. *BioMed research international*, *2015*, 781294.

Abeshi, A., Fanelli, F., Beccari, T., Dundar, M., Ziccardi, L., & Bertelli, M. (2017). Genetic testing for Mendelian glaucoma. *The EuroBiotech Journal*, *1*, 70 - 73.

Abu-Amero, K. K., Sultan, T., Al-Obeidan, S. A., & Kondkar, A. A. (2018). Analysis of CYP1B1 sequence alterations in patients with primary open-angle glaucoma of Saudi origin. *Clinical Ophthalmology (Auckland, NZ)*, *12*, 1413.

Ali, M., McKibbin, M., Booth, A., Parry, D. A., Jain, P., Riazuddin, S. A., ... & Inglehearn, C. F. (2009). Null mutations in LTBP2 cause primary congenital glaucoma. *The American Journal of Human Genetics*, *84*(5), 664-671.

Badawi, A. H., Al-Muhaylib, A. A., Al Owaifeer, A. M., Al-Essa, R. S., & Al-Shahwan, S. A. (2019). Primary congenital glaucoma: An updated review. Saudi journal of ophthalmology : official journal of the Saudi Ophthalmological Society, 33(4), 382–388.

Badeeb, O. M., Micheal, S., Koenekoop, R. K., den Hollander, A. I., & Hedrawi, M. T. (2014). CYP1B1 mutations in patients with primary congenital glaucoma from Saudi Arabia. *BMC medical genetics*, *15*(1), 1-5.

Banerjee, A., Chakraborty, S., Chakraborty, A., Chakrabarti, S., & Ray, K. (2016). Functional and Structural Analyses of CYP1B1 Variants Linked to Congenital and Adult-Onset Glaucoma to Investigate the Molecular Basis of These Diseases. PloS one, 11(5), e0156252.

Campos-Mollo, E., López-Garrido, M. P., Blanco-Marchite, C., Garcia-Feijoo, J., Peralta, J., Belmonte-Martínez, J., Ayuso, C., & Escribano, J. (2009). CYP1B1 mutations in Spanish patients with primary congenital glaucoma: phenotypic and functional variability. *Molecular vision*, *15*, 417–431.

Cascella, R., Strafella, C., Germani, C., Novelli, G., Ricci, F., Zampatti, S., & Giardina, E. (2015). The Genetics and the Genomics of Primary Congenital Glaucoma. *BioMed research international*, *2015*, 321291.

Chan, J. Y. Y., Choy, B. N., Ng, A. L., & Shum, J. W. (2015). Review on the management of primary congenital glaucoma. Journal of current glaucoma practice, 9(3), 92.

Faiq, M., Sharma, R., Dada, R., Mohanty, K., Saluja, D., & Dada, T. (2013). Genetic, Biochemical and Clinical Insights into Primary Congenital Glaucoma. *Journal of current glaucoma practice*, *7*(2), 66–84.

François J. (1980). Congenital glaucoma and its inheritance. *Ophthalmologica. Journal international d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift fur Augenheilkunde*, *181*(2), 61–73.

Gencik A. Epidemiology and genetics of primary congenital glaucoma in Slovakia. Description of a form of primary congenital glaucoma in gypsies with autosomal-recessive inheritance and complete penetrance. Dev Ophthalmol 1989;16:76-115

Gomes, H. A., Moreira, B. S., Sampaio, R. F., Furtado, S., Cronemberger, S., Gomes, R. A., & Kirkwood, R. N. (2018). Gait parameters, functional mobility and fall risk in individuals with early to moderate primary open angle glaucoma: a cross-sectional study. *Brazilian journal of physical therapy*, *22*(5), 376–382.

Kheradpajouh S, Assar M. The Role of Genetic Counseling in Prevention of Primary Congenital Glaucoma, Jentashapir J Cell Mol Biol. 2017 ; 8(6):e62925.

Ling, C., Zhang, D., Zhang, J., Sun, H., Du, Q., & Li, X. (2020). Updates on the molecular genetics of primary congenital glaucoma (Review). Experimental and Therapeutic Medicine, 20, 968-977.

Milla E, et al. (2013) Survey of familial glaucoma shows a high incidence of cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1 (CYP1B1) mutations in non-consanguineous congenital forms in a Spanish population. Mol Vis 19: 1707–1722.

Mohanty, K., Tanwar, M., Dada, R., & Dada, T. (2013). Screening of the LTBP2 gene in a north Indian population with primary congenital glaucoma. Molecular vision, 19, 78–84.

Rauf, B., Irum, B., Kabir, F. et al. A spectrum of CYP1B1 mutations associated with primary congenital glaucoma in families of Pakistani descent. Hum Genome Var **3,** 16021 (2016).

Sarfarazi, M., Stoilov, I., & Schenkman, J. B. (2003). Genetics and biochemistry of primary congenital glaucoma. *Ophthalmology clinics of North America*, *16*(4), 543–vi.

Sharafieh, R. A. H. Child, and Sarfarazi, M. "Molucular genetics of primary congenital glaucoma," in Genetic Disease of the Eye, Trabulosi, Ed., chapter 17, pp. 295–307, 2011.

Siggs, O. M., Souzeau, E., Pasutto, F., Dubowsky, A., Smith, J. E., Taranath, D., ... & Craig, J. E. (2019). Prevalence of FOXC1 variants in individuals with a suspected diagnosis of primary congenital glaucoma. *JAMA ophthalmology*, *137*(4), 348-355.

Souzeau, E., Hayes, M., Ruddle, J. B., Elder, J. E., Staffieri, S. E., Kearns, L. S., Mackey, D. A., Zhou, T., Ridge, B., Burdon, K. P., Dubowsky, A., & Craig, J. E. (2015). CYP1B1 copy number variation is not a major contributor to primary congenital glaucoma. Molecular vision, 21, 160–164.

Souzeau, E., Dubowsky, A., Ruddle, J. B., & Craig, J. E. (2019). Primary congenital glaucoma due to paternal uniparental isodisomy of chromosome 2 and CYP1B1 deletion. *Molecular genetics & genomic medicine*, *7*(8), e774. https://doi.org/10.1002/mgg3.774

Srinivasan, S., Addepalli, U. K., Rao, H. L., Garudadri, C. S., & Mandal, A. K. (2014). Spectral domain optical coherence tomography in children operated for primary congenital glaucoma. *The British journal of ophthalmology*, *98*(2), 162–165.

Stoilov, I., Akarsu, A.N. and Sarfarazi, M. (1997) Identification of three different truncating mutations in cytochrome P4501B1 (CYP1B1) as the principal cause of primary congenital glaucoma (Buphthalmos) in families linked to the GLC3A locus on chromosome 2p21. Hum. Mol. Genet. 6, 641–647,

Suri, F., Yazdani, S., & Elahi, E. (2018). LTBP2 knockdown and oxidative stress affect glaucoma features including TGFβ pathways, ECM genes expression and apoptosis in trabecular meshwork cells. Gene, 673, 70–81.

Sutter, T. R., Tang, Y. M., Hayes, C. L., Wo, Y. Y., Jabs, E. W., Li, X., Yin, H., Cody, C. W., & Greenlee, W. F. (1994). Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2. *The Journal of biological chemistry*, *269*(18), 13092–13099.

Ou, Z., Liu, G., Liu, W., Deng, Y., Zheng, L., Zhang, S., & Feng, G. (2018). Bioinformatics analysis of CYP1B1 mutation hotspots in Chinese primary congenital glaucoma patients. Bioscience reports, 38(4), BSR20180056.

Tamçelik, N., Atalay, E., Bolukbasi, S., Çapar, O., & Ozkok, A. (2014). Demographic features of subjects with congenital glaucoma. *Indian journal of ophthalmology*, *62*(5), 565.

Tang YM, Wo YY, Stewart J, Hawkins AL, Griffin CA, Sutter TR, Greenlee WF. Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene. J Biol Chem 1994 Nov;271(45):28324-28330.

Wang, S. L., Piao, S. Y., Xu, M. Y., Zhang, W., Ma, J. Q., Hao, J., Chi, H., Xue, Z. Q., Ha, S. P., & Zhuang, W. J. (2019). Evaluating correlation between the ocular biometry and genetic variants of *MYOC* and *ABCA1* with primary angle-closure glaucoma in a cohort from northern China. *International journal of ophthalmology*, *12*(8), 1317–1322.

Yang, Y., L. Zhang, S. Li, X. Zhu and P. Sundaresan (2017). Candidate gene analysis identifies mutations in CYP1B1 and LTBP2 in Indian families with primary congenital glaucoma. Genetic testing and molecular biomarkers 21(4): 252-258.

Yu-Wai-Man, C., Arno, G., Brookes, J., Garcia-Feijoo, J., Khaw, P. T., & Moosajee, M. (2018). Primary congenital glaucoma including next-generation sequencing-based approaches: clinical utility gene card. *European journal of human genetics : EJHG*, *26*(11), 1713–1718.

Zhao, Y., Sorenson, C. M., & Sheibani, N. (2015). Cytochrome P450 1B1 and Primary Congenital Glaucoma. *Journal of ophthalmic & vision research*, *10*(1), 60–67.

A review of the pathogenesis, structure, immune response and treatment of SARS-coV-2

Hashem Kazemi1[1], Zahra Shahpouri*[2], Fatemeh Talebizadeh[2]

1- Department of Biology, Dezful Branch, Islamic Azad University, Dezful, Iran.
2- Department of Genetics, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Email: Zahra_30sh@yahoo.com

Abstract

Despite the fact that two years have passed since the SARS-CoV-2 epidemic, Corona virus disease (COVID-19) is still a major global challenge for scientists to understand the different aspects of infections and find ways to prevent, treat, and develop vaccines against this disease. On January 30, 2020, the World Health Organization (WHO) officially announced the presence of this new virus. The COVID-19 virus has been reported as an international health emergency while many of its biological aspects and pathogenicity mechanisms are still unclear. Seven pathogenic strains that can cause mild to severe infections in humans belong to beta-Coronaviridae family. Previous pathogenic human coronaviruses were SARS-CoV and MERS-CoV, but the new virus, first reported in Wuhan, China, is a beta-Coronaviridea and has a single-stranded RNA in a positive sense, with a genome size of 29.9 kb. The virus is 88% similar to the sequence of viruses isolated from bats which were infected with SARS-like coronaviruses and appears to cause acute symptoms through causing a cytokine storm and severe stimulation of the immune response to the virus. Understanding the structure and organization of the SARS-CoV-2 genome plays a crucial role in determining the mechanisms of viral replication. Molecules and proteins that induce host immune responses can help find potential drugs for treatment and vaccine development to prevent COVID-19. Despite many global efforts made to control SARS-CoV-2, there are still problems and challenges in controlling COVID-19 infection. These problems include different mutations, the emergence of different types of highly transmissible viruses, short-term immunity against the virus, the possibility of reinfection of vaccinated patients, the absence of specific drugs, and developing problems. In this review, the results of current trends and the latest research studies done on the structure and characteristics of the SARS-CoV-2 genome, mutations and different types of SARS-CoV-2, the most important clinical features, pathogenesis mechanisms, immune response, virus diagnostic tests and potential therapies are discussed. In addition, we have tried to study the structure of the virus to better understand the pathogenicity mechanism of the disease, the cause of new mutations, and how to prevent its pathogenicity through various therapies.

Keywords: SARS-Cov-2, Cytokine storm, Pathogenic mechanism, Drug therapy, Structure of SARS-Cov-2

مروری بر پاتوژنز،ساختار، پاسخ ایمنی و درمان SARS- CoV-2

۱-دانش آموخته، گروه زیست شناسی، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلا می، دزفول
۲- گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز

*Email: Zahra_30sh@yahoo.com

چکیده

با وجود گذشت دو سال از همه‌گیری بیماری کرونا ویروس (COVID-19)، هنوز یک چالش بزرگ جهانی برای دانشمندان از نظر درک ابعاد مختلف عفونت‌های ناشی از آن و یافتن راه‌هایی برای پیشگیری، درمان و توسعه واکسن علیه این بیماری است. در ۳۰ ژانویه ۲۰۲۰ سازمان بهداشت جهانی (WHO) رسماً حضور این ویروس جدید را اعلام کرد. ویروس SARS-CoV-2در حالی به عنوان یک فوریت بهداشتی بین المللی اعلام شد که بسیاری از ابعاد بیولوژیکی و مکانیسم‌های بیماری‌زایی این ویروس هنوز نامشخص است. هفت سویه بیماری‌زا که می‌توانند باعث ایجاد عفونت‌های خفیف تا شدید در انسان شوند متعلق به خانواده کروناویروس‌ها هستند.کروناویروس‌های قبلی که قابلیت بیماری‌زایی انسانی داشته‌اند شامل SARS-Cove و MERS-Cove بوده‌اند ولی ویروس جدید که برای اولین بار در ووهان چین گزارش شد از جنس Beta coronavirus بوده و واجد RNA تک رشته‌ای به صورت سنس مثبت با اندازه ژنوم ۲۹.۹ کیلوبازی است. این ویروس دارای ۸۸٪ شباهت به توالی ویروس‌های جدا شده از خفاش‌های آلوده با کروناویروس‌های مشابه SARS است و به نظر می‌رسد که با ایجاد طوفان سایتوکاینی و تحریک شدید پاسخ ایمنی در مقابله با ویروس، منجر به علائم حاد بیماری می‌شود. درک ساختار و سازمان ژنوم SARS-CoV-2 نقش تعیین‌کننده‌ای در تعیین مکانیسم‌های تکثیر ویروسی دارد. مولکول ها و پروتئین‌هایی که پاسخ‌های ایمنی میزبان را القا می‌کنند می‌توانند به یافتن داروهای بالقوه برای درمان و توسعه واکسن برای پیشگیری از COVID-19 کمک کنند. علیرغم تلاش‌های فراوان جهانی برای کنترل پاندمی COVID-19، همچنان مشکلات و چالش‌هایی وجود دارد. این مشکلات شامل جهش‌های مختلف، ظهور انواع متفاوت ویروس با قابلیت انتقال بالا، دوره کوتاه ایمنی بدن در برابر ویروس، احتمال عفونت مجدد در افراد بهبود یافته، امکان ابتلای مجدد افراد واکسینه شده ، فقدان داروهای اختصاصی و مشکلات در حال توسعه است. در این بررسی، نتایج روندهای فعلی و آخرین مطالعات تحقیقاتی در مورد ساختار و ویژگی‌های ژنوم SARS-CoV-2، جهش‌ها و انواع مختلف SARS-CoV-2، مهم ترین ویژگی های بالینی، مکانیسم بیماری‌زایی، پاسخ ایمنی، تست‌های تشخیصی ویروس و درمان‌های بالقوه را ارائه می‌کنیم. علاوه بر این سعی شده است تا با بررسی ساختار ویروس به درک درست تری از مکانیسم پاتوژنسیتی بیماری ،علت بروز جهش های جدید، نحوه‌ی مهار بیماری‌زایی آن از طریق روش‌های مختلف درمانی باشیم.

واژگان کلیدی: SARS-Cov-2 ،طوفان سایتوکاینی، مکانیسم بیماری زایی، ساختار ویروس کووید-۱۹، دارودرمانی

۱.مقدمه

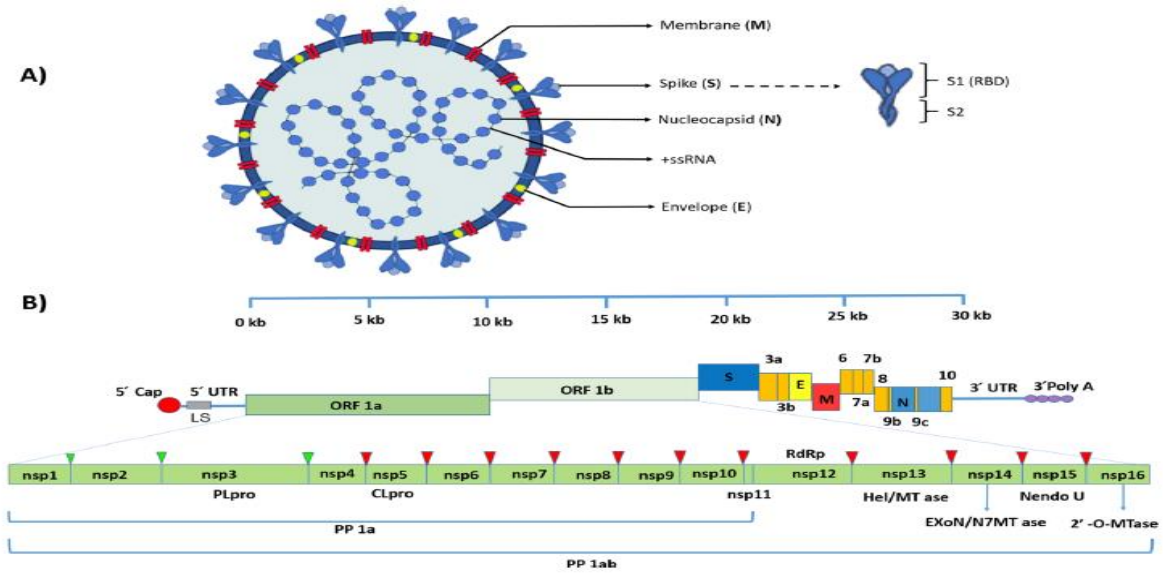
بیماری کروناویروس (COVID-19) که توسط ویروس کرونای مرتبط با سندرم حاد تنفسی (SARS-CoV-2) ایجاد می‌شود، در طی دوسال اخیر یک تهدید همه‌گیر برای سلامت عمومی جهانی بوده است. SARS-CoV-2 سومین عضو از خانواده ویروس کرونا است که قابلیت بیماریزایی بسیاری در جمعیت انسانی داشته و تأثیرات مخربی بر دستگاه تنفسی فوقانی دارد. تاکنون بیش از ۲۶۸.۰۳۹.۰۹۰۲ مورد مبتلا به کووید۱۹ تایید شده و مسئول بیش از ۵.۲۹۳.۹۵۱ مورد مرگ در سراسر جهان بوده است(۱). خانواده coronaviridae شامل ۳۴-۲۷ کیلوباز RNA به صورت سنس مثبت و تک رشته است که بزرگترین ژنوم در بین ویروس‌های RNAدار به شمارمی‌آید(۲). هفت سویه بیماری‌زا که می‌توانند باعث ایجاد عفونت‌های خفیف تا شدید در انسان شوند متعلق به خانواده coronaviridae هستند. کروناویروس‌های قبلی که قابلیت بیماری‌زایی در انسان داشته‌اند شامل SARS-CoV و MERS-CoV بوده‌اند. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی تایید می‌کند که SARS-CoV-2 به طور نزدیک با RaTG13 دسته‌بندی می‌شود. شباهت ژنتیکی بالا بین SARS-CoV-2 و RaTG13 از این فرضیه پشتیبانی می‌کند که SARS-CoV-2 احتمالاً از خفاش ها سرچشمه گرفته است (۳). سندرم حاد تنفسی ویروس کرونا ۲ (SARS-CoV-2) یک سویه جدید از ویروس کرونا است که قبلاً در انسان شناسایی نشده بود (۴). همان‌طور که گزارش شده است، برخی از افراد آلوده برای اولین بار در بازار غذاهای دریایی و حیوانات مرطوب در ووهان، استان هوبی چین در دسامبر ۲۰۱۹ شناسایی شدند(۵). همان‌طور که گزارش شده است، برخی از افراد آلوده برای اولین بار در بازار غذاهای دریایی و حیوانات مرطوب در ووهان، استان هوبی چین در دسامبر ۲۰۱۹ شناسایی شدند(۵). با این وجود برخی از دانشمندان SARS-CoV-2 را به عنوان یک ویروس با منشاء مشترک حیوانی می‌دانند. با این حال، به دلیل فقدان شواهد کافی، اولین منشاء SARS-CoV-2 ناشناخته مانده است (۶). SARS-CoV-2 به عنوان یک بتاکوروناویروس جدید، واجد ۷۹ درصد شباهت ژنتیکی با SARS- CoV و ۵۰ درصد شباهت ژنتیکی با MERS-CoV می‌باشد (۷). ویروس‌های کرونا شامل چهار جنس هستند: alpha-CoV ، beta-CoV، gamma-CoV،و delta-CoV. این جنس‌ها می‌توانند با سرعت نوترکیبی بالا در انسان و حیوانات باعث عفونت شوند و باعث بیماری‌های مختلف از جمله سندرم تنفسی، اختلالات کلیوی، روده‌ای و عصبی شوند. تعین توالی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی ویروس SARS-CoV-2 نشان داد که از جنس betacoronavirus است که شامل کروناویروس‌هایی (SARS-CoV، CoV شبه SARS خفاش، و سایرین) است که در انسان، خفاش و سایر حیوانات وحشی کشف شده است (۸).

SARS-CoV-2 بسیار مسری است و از طریق قطرات تنفسی، تماس مستقیم و تماس با اجسام آلوده منتقل می‌شود. هدف اولیه SARS-CoV-2 دستگاه تنفسی تحتانی است. اگرچه برخی علائم شایع بیماری آنفولانزا مانند سرفه خشک، تب، خستگی، بدن درد و دردهایی شبیه علائم دو کروناویروس قدیمی است، برخی از علائم جدید مانند از دست دادن طعم یا بو، میوکاردیت، تنگی نفس، اختلالات گوارشی، علائم عصبی و پوستی نیز برای این بیماری معرفی می‌شوند(۹). SARS-CoV-2 می‌تواند عفونت‌های خفیف تنفسی، ذات الریه و همچنین مشکلات جدی بهداشتی مانند سندرم پریشانی حاد تنفسی (ARDS) را ایجاد کند. بسیاری از بیماران COVID 19 بدون علایم هستند و یا علایم خفیف تا متوسط را نشان می‌دهند. عده‌ای از مبتلایان نیز علایم شدید نشان می‌دهند و نیاز به بستری در بیمارستان دارند به خصوص افراد دیابتی، سالخوردگان و زنان باردار (۱۲).حدود ۵٪ در نهایت به سندرم پریشانی تنفسی حاد (ARDS)، شوک سپتیک و یا نارسایی ارگان‌های متعدد دچار می‌شوند (۱۰). این علائم متنوع COVID-19 تا حدی

منعکس‌کننده این واقعیت است که SARS-CoV-2 می‌تواند طیف گسترده‌ای اوز انواع سلول‌های انسانی را آلوده کند (۱۱). COVID19 در اطفال اغلب هیچ علامتی ندارد یا علائم خفیفی دارد و همین می‌تواند نقش مهمی در گسترش عفونت SARS-CoV-2 داشته باشد.

ساختار و سازمان ژنوم SARS-CoV-2

نشان داده شده است SARS-CoV-2 واجد RNA تک رشته‌ای به صورت سنس مثبت با اندازه ژنوم ۲۹.۹ کیلوبازی و دارای ۸۸٪ شباهت به توالی ویروس‌های جدا شده از خفاش‌های آلوده با کروناویروس‌های مشابه SARS است(۱۳). ژنوم SARSCoV-2 شامل ۱۴ فریم باز خواندن عملکردی (ORF) است و شانزده پروتئین غیر ساختاری درگیر در تکثیر و رونویسی ویروس مانند RNA پلیمراز وابسته به RNA و پروتئین‌های ساختاری مختلف مانند گلیکوپروتئین سطح اسپایک، پروتئین نوکلئوکپسید و پروتئین‌های پوششی و ماتریکس را کد می‌کند (۱۵،۱۴)



شکل ۱: نمودار کلی ساختار SARS-CoV-2 و سازمان ژنومی. A. ساختار ویروس SARS-CoV-2 از چهار پروتئین ساختاری شامل اسپایک (S) ، پاکت (E) ، غشاء (M) در پاکت و پروتئین نوکلئوکپسید (N) تشکیل شده است. ژنوم RNA (+sera) است. پروتئین اسپایک شامل دو زیر واحد شامل S1 و S2 است که به عنوان یک اتصال‌دهنده و ادغام‌دهنده غشای سلولی عمل می‌کنند. ب. mRNA مثبت تک رشته ای ازابتدای ۵ ′ تا انتهای ۳ ′ به ترتیب حاوی ۵cap ′ ، دنباله رهبر (LS)، ۵ ′UTR ، ORF1a، ORF1b ، اسپایک(S)، ORF3a، ORF3b ، پاکت (E) ، غشاء (M)، ORF6، ORF7a، ORF7b، ORF8، (N) ، ORF9، ORF10، ۳ ′UTR و poly-A tail می باشد .از دو سوم انتهای ۵ ′ ژنوم ، شامل ORF1a وORF1b ، به دو پلی پروتئین بزرگ شامل pp1a و pp1ab ترجمه سپس این پلی پروتئین ها که به ۱۶ پروتئین غیر ساختاری پردازش می شوند. پروتئین های nsp1 تا nsp3 توسط پروتئین پروتئاز شبه پاپائینی (PLpro) و پروتئین های nsp4 به nsp16 توسط یک پروتئین سرین C۳ مانند (CLpro3) (به ترتیب با مثلث سبز و قرمز نشان داده شد) برش می خورند. پروتئین های nsp12 تا nsp16 به ترتیب RNA پلیمراز وابسته به RNA (RdRp) ، هلیکاز (Hel/MTase) و اگزونوکلئاز (ExonN) ، اندونوکلئاز (Nendo U) و متیل ترانسفراز ۲ ′ -(2'-O-MTase) O-RNA را کد می‌کند. انتهای سوم این ژنوم SARS-CoV-2 پروتئین‌های ساختاری (S، E، M و N) و اضافی را کد می‌کند. توالی پروتئین‌های جانبی به رنگ نارنجی نمایش داده می‌شود.

پروتئین S در برخی از کروناویروس‌ها نقش اساسی در ادغام غشای سلول و ویروس دارد. که یک استراتژی اصلی برای انتقال سلول به سلول ویروس محسوب می‌شود و عملکرد خنثی سازی آنتی‌بادی‌ها را مختل می‌کند. پروتئین S یک گزینه ایده‌آل برای طراحی واکسن در نظر گرفته شده است. آنتی‌بادی‌ها می‌توانند اتصال سلول S پروتئین را مختل کرده و همچنین ویروس را خنثی کنند(۱۶،۱۷).پروتئین N بسیار فسفریله شده، بالاترین میزان بیان را دارد. بیان در سلول‌های میزبان، از نظر ساختاری به ژنوم مرتبط است و نقش ضروری در فرایند چرخه تکثیررا دارد. پروتئین غشایی M که رایج‌ترین پروتئین ساختاری است، شکل پوشش را تشکیل می‌دهد و با اتصال به نوکلئوکپسید N به تکمیل فرآیند مونتاژ ویروس کمک می‌کند. پس از شروع بیماری پروتئین E که یک پروتئین ساختاری است به عنوان یک کانال یونی عمل می‌کند. بسیاری از عملکردهای مرتبط با پروتئین‌های غیرساختاری (NSP)ها نامشخص باقی مانده‌اند. Nsp14 با فعالیت اگزونوکلئازی می‌تواند آنالوگ‌های نوکلئوزیدی موجود در RNA ویروسی را از بین ببرد و کارایی آنها را کاهش دهد (۱۸). با توجه به نقش حیاتی RNA پلیمرازهای وابسته به RNA ویروسی (RdRp)[۷۶] همراه با دیگر آنزیم های اصلی در چرخه تکثیر ویروس RNA و پاتوژنز ویروس، به نظر می‌رسد که آن‌ها انتخابی برتر برای طراحی داروهای کارآمد برای پیشگیری یا درمان چندین بیماری ویروسی باشند. تا به امروز، امیدوارکننده‌ترین دسته بازدارنده‌های RdRp ویروسی با طیف وسیع، آنالوگ‌های نوکلئوزیدی (NAs)[۷۷] هستند که بیش از ۲۵ مورد برای درمان چندین بیماری ویروسی مهم پزشکی تأیید شده‌اند(۱۹). با این حال، در ویروس کرونا، دومین[۷۸] اگزونوکلئاز (ExoN) یک مانع جدی برای دستیابی به داروهای آنالوگ‌های نوکلئوزیدی می‌باشد زیرا باعث مقاومت در برابر بسیاری از این ضد ویروس‌ها می‌شود. علی‌رغم این مکانیسم آسیب‌رسان، آنالوگ‌های نوکلئوزیدی را می‌توان به دلیل RdRps بسیار حفاظت‌شده و حفاظت ساختاری ویژه‌شان از مکان‌های اتصال به نوکلئوتید، انتخابی کارآمد از داروها در کووید در نظر گرفت. تعامل ExoN با Nsp12، Nsp7 و Nsp8 فعالیت تصحیح را ترویج می‌کند(۲۰). تجزیه و تحلیل ساختار و عملکرد ویروس سارس کووید و RNA پلیمرازهای وابسته به RNA ، برای مطالعات آینده مفید است. شایان ذکر است که برخی از تفاوت‌های قابل توجه بین کروناویروس جدید و سایر ژنوم‌های کووید، در قسمت‌هایی مانند پروتئین‌های خار، ORF8 و پروتئین‌های ORF3a، ممکن است تفاوت‌هایی در توانایی انتقال SARSCoV-2 و قدرت بیماری‌زایی آن ایجاد کند.

جهش‌ها و انواع SARS-CoV-2

بر اساس ابتکار جهانی برای به اشتراک‌گذاری تمام داده‌های آنفولانزا (GISAID)، سه دسته اصلی SARS-CoV-2 قابل شناسایی هستند (۲۱). دسته اول به عنوان کلاد G که گونه‌ای از پروتئین اسپایک S-D614G می‌باشد نام‌گذاری شد، درحالی که کلاد V گونه‌ای از پروتئین کدکننده ORF3a NS3-G251 و کلاد S واریانت ORF8-L84S نام‌گذاری شدند (۲۲). در بین ۱۱ ژن، گلیکوپروتئین سطحی، نوکلئوکپسید، ORF1ab و ORF8 جهش‌های مکرری را نشان دادند، در حالی که پوشش غشاء ORF6، ORF7a وORF7b حفاظت از نظر جایگزینی اسید آمینه را نشان دادند (۲۳). برای ارزیابی تنوع ژنتیکی سویه‌های مختلف SARS-CoV-2، منبع جدید کروناویروس ۲۰۱۹، مرکز ملی اطلاعات زیستی چین، ۷۷۸۰۱ توالی ژنومی SARS-CoV-2 را که در سطح جهانی شناسایی شده‌اند، همسو کرد و در مجموع ۱۵۰۱۸ جهش، از جمله ۱۴،۸۲۴ جهش خاص را شناسایی کرد (۲۴). در پروتئین

[76]RNA-dependent RNA polymerases
[77]Nucleoside Analogues
[78]Domain

S، چهار تغییر اسید آمینه V483A، L455I، F456V و G476S، در نزدیکی جایگاه‌های رابط اتصال (RBD)[۷۹] قرار دارند، اما اثرات آنها بر اتصال به گیرنده میزبان ناشناخته است و نشانگر زیرشاخه اصلی کلادG SARS-CoV-2 است. از مارس ۲۰۲۰، انواع SARS-CoV-2 با G614 در پروتئین S جایگزین گونه های اصلی D614 شده و به شکل غالب در گردش جهانی تبدیل شده است. در مقایسه با نوع D614، بارهای ویروسی بالاتری در بیماران مبتلا به واریانت G614 یافت شد، اما داده‌های بالینی هیچ ارتباط معنی‌داری را بین تغییر D614G و شدت بیماری نشان نداد(۲۵). ویروس‌های کاذب حامل پروتئین S با G614 تیترهای عفونی بالاتری نسبت به ویروس‌های حامل پروتئین S با D614 ایجاد کردند که نشان می‌دهد این تغییر ممکن است باعث افزایش عفونت SARS-CoV-2 شده باشد (۲۵). یکی دیگر از جهش‌های نشانگر تکامل SARS-CoV-2، پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی در موقعیت نوکلئوتیدی ۲۸۱۴۴ است که منجر به جایگزینی اسید آمینه سرین (Ser) برای لیزین (Lys) در باقی‌مانده ۸۴ پروتئین ORF8 می‌شود. انواع دارای این جهش زیرشاخه منفرد "کلاد S " را تشکیل می‌دهند (۲۶). شایع‌ترین جهش در C > T۲۹۰۹۵ در ژن N، C > T۸۷۸۲ در ژن ORF1ab و ۲۸۱۴۴ C > T در ژن ORF8 مشاهده شد. نتایج تجزیه و تحلیل درخت فیلوژنتیک نشان می‌دهد که توالی‌های ژنتیکی کروناویروس به دلیل فشار ایمنی در بین مردم سراسر جهان می‌تواند جهش یابد و این موضوع احتمالاً انتقال ویروس را آسان‌تر می‌کند. (۲۷).

مکانیسم پاتوژنز

چرخه زندگی ویروس در میزبان شامل ۵ مرحله است: اتصال به سلول میزبان[۸۰]،نفوذ به سلول میزبان[۸۱]، بیوسنتز[۸۲]، بلوغ ویروس[۸۳]،آزادسازی[۸۴]. اسپایک، تنوع کرونا ویروس‌ها و گرایش میزبان را تعیین می‌کند. اسپایک شامل دو زیر واحد عملکردی است. S1 زیر واحد مسئول اتصال به دامنه اتصال گیرنده (RBD) سلول میزبان است و نقش مهمی را برای ورود مستقیم میزبان ایفا می‌کند (۲۸). زیرواحد S2 در ادغام غشای ویروسی و سلولی نقش دارد. آنزیم مبدل آنژیوتانسین ۲ (ACE2) به عنوان یک گیرنده عملکردی برای SARS-CoV شناسایی شد. به علت میل اتصالی بالای COVID-19 به ACE2، تعداد ویروسی که سلول‌ها را آلوده می‌کند، بیشتر از سایر کرونا ویروس‌هاست (۲۹). بیان ACE2 در ریه، قلب، ایلئوم، کلیه و مثانه بالا است و در فیزیولوژی و پاتولوژی دستگاه تناسلی از جمله بیضه و تخمدان مؤثر است. COVID-19 احتمالاً از این طریق بر تولید اسپرم اثر می‌کند و موجب کاهش تعداد آن می‌شود. این ویروس همچنین بر تولید هورمون‌های جنسی نیز مؤثر است و می‌تواند به کاهش میل جنسی منجر شود (۳۰،۳۱).

SARS-CoV-2 برای ورود به سلول‌های هدف به دو پپتیداز میزبان متصل به غشاء به نام های آنزیم مبدل آنژیوتانسین ۲ (ACE2) و یک ترانس ممبرین پروتئیناز سرین به نام TMPRSS2/TMPS2[85] متکی است. اسپایک SARS-CoVs که یک هموترایمر است ابتدا به غشای اینتگرال نوع I ACE2 برهمکنش می‌کنند و سپس توسط TMPRSS2 به صورت پروتئولیتیکی بریده می‌شوند تا ادغام

[79]Receptor Binding Domains
[80]Attachment
[81]Penetration
[82]Biosynthesis
[83]Maturation
[84]Release
[85]Transmembrane Protease Serine-2 protein (TMPS2)

پوشش ویروسی با غشای سلول میزبان را آغاز کنند (۳۲). TMPRSS2 نقش دوگانه‌ای در فرآیند عفونت ایفا می‌کند زیرا ACE2 را نیز می‌شکافد تا جذب SARS-CoV و احتمالاً ویریون‌های SARS-CoV-2 را افزایش دهد (۳۳). علاوه بر این، TMPRSS2 سایر کروناویروس‌های بیماری‌زای انسانی را نیز فعال می‌کند که باعث سرماخوردگی و همچنین چندین گونه از ویروس‌های آنفولانزای A می‌شوند. کروناویروس ها (CoVs) با استفاده از مسیر اندوزومی و/یا مسیر غیر آندوزومی سطح سلول وارد سلول میزبان می شوند. ورود سلول‌های اندوزومی CoVs توسط pH پایین و کاتپسین‌های سیستئین پروتئاز آندوزومی وابسته به pH تسهیل می‌شود. pH اسیدی لیزوزوم و اندوزوم باعث فعال شدن آنزیم‌های کاتپسین B و L و شکسته شدن S گلیکوپروتئین به دو زیرواحد S1 و S2 می‌شود. زیرواحد S1 برای اتصال و S2 برای ادغام با غشای سلول میزبان استفاده می‌شود (۳۴). ویروس برای ورود به سیتوزول سلول نیز نیاز به محیط اسیدی با pH حدود ۳ دارد. از آنجایی که کروناویروس‌ها یک ژنوم RNA رشته‌ای مثبت دارند، می‌توانند مستقیماً پروتئین‌ها و ژنوم‌های جدید خود را در سیتوپلاسم تولید کنند. در ابتدا، ویروس RNA پلیمراز خود را که فقط RNA های ویروسی را شناسایی و تولید می‌کند، سنتز می‌کند. این آنزیم با استفاده از رشته مثبت به عنوان الگو، رشته منفی را سنتز می‌کند. متعاقبا، این رشته منفی به عنوان الگویی برای رونویسی RNAهای مثبت زیر ژنومی کوچکتر عمل می‌کند که برای سنتز تمام پروتئین‌های دیگر استفاده می‌شود. علاوه بر این، این رشته منفی برای تکثیر ژنوم های RNA رشته مثبت جدید استفاده می‌شود (۳۵). پروتئین N به RNA ژنومی متصل می‌شود و پروتئین M در غشای شبکه اندوپلاسمی (ER) ادغام می‌شود. پس از اتصال، نوکلئوکپسیدهای مونتاژ شده با RNA پیچ خورده مارپیچ به لومن ER جوانه می‌زنند و با غشای آن محصور می‌شوند. این زاده های ویروسی در نهایت توسط وزیکول‌های گلژی به غشای سلولی منتقل می‌شوند و به فضای خارج سلولی اگزوسیتوز می‌شوند و این ویروس‌ها پس از خروج از سلول، سلول‌های مجاور را آلوده می‌کنند. سلول‌های میزبان همچنین با بیان پروتئین اسپایک یا خار در سطح خود باعث اتصال غشایی سلول‌های مجاور به یکدیگر و ایجاد سین‌سیشیوم[۸۶] می‌شوند. ایجاد سین‌سیشیوم علاوه بر اینکه باعث اختلال در عملکرد عضو درگیر می‌شود، زمینه انتشار بیشتر ویروس و فرار از دست سیستم ایمنی را نیز فراهم می‌کند (۳۶). کرونا ویروس‌ها با ایجاد وزیکول‌های دولایه، از بیان رسپتورهای شناسایی‌کننده الگو (PRR)[۸۷] ممانعت کرده و درنتیجه، سیستم ایمنی ذاتی آن‌ها را شناسایی نمی‌کند و درون وزیکول به تکثیر خود ادامه می‌دهند. آن‌ها تولید اینترفرون‌های تیپ I به عنوان یکی از مهم‌ترین فاکتورهای ضدویروس را از کار می‌اندازند. کرونا ویروس‌ها همچنین در عرضه آنتی‌ژن توسط سلول‌های ایمنی اختلال ایجاد می‌کنند (۳۶).

پاسخ ایمنی

تعدادی از بیماران کووید-۱۹ دچار یک دوره کشنده از بیماری می‌شوند، در حالی که بیشتر افراد بیماری خفیف کووید-۱۹ را تجربه می‌کنند؛ اما پیش‌بینی سیر بیماری هنوز امکان‌پذیر نیست. پیشرفت COVID-19 را می‌توان به سه مرحله تقسیم کرد: مرحله عفونت اولیه شامل تکثیر ویروس و علائم خفیف، فاز ریوی شامل تحریک ایمنی تطبیقی و غلبه علائم تنفسی و فاز پرالتهاب شامل شرایط بیش التهابی مانند ARDS. شناخت هر مرحله ممکن است در تصمیم گیری بالینی مناسب در مدیریت COVID-19 بسیار مهم باشد (۳۷).

۱- مرحله اول (مرحله عفونت اولیه): در مرحله عفونت اولیه ، SARS-CoV-2 به پارانشیم ریه نفوذ کرده و شروع به تکثیر می‌کند. این مرحله با وجود علائم خفیف ساختاری و پاسخ اولیه توسط سیستم ایمنی ذاتی مشخص می‌شود. سنتز اینترفرون‌های نوع I (IFN I) پس از تهاجم ویروسی فعال می‌شود و مسیر سیگنال JAK-STAT را برای افزایش بیان ژن‌های تحریک‌شده با IFN

[86]Syncytium
[87]Pattern Recognition Receptor

(ISGs)[۸۸] ارتقا می‌دهد. انتشار ویروس توسط ماکروفاژهای ارائه دهنده آنتی‌ژن و سلول‌های NK محدود می‌شود . مسدود کردن تولید IFN توسط پروتئین SARS-CoV N برای بقای ویروسی به طور مستقیم مهم است. دوره کمون طولانی مدت عفونت ویروسی از نظر تئوری به ویروس کمک می‌کند تا از پاسخ ایمنی ذاتی در مراحل اولیه عفونت فرار کند. در ایمنی تطبیقی، پاسخ ایمنی نوع Th1 برای پاکسازی ویروس مهم است. سلول های T کمک کننده سلول های B وابسته به T را برای ارتقای آنتی‌بادی‌های خاص ویروسی فعال می‌کنند. سلول‌های T سیتوتوکسیک به طور مستقیم سلول‌های آلوده به ویروس را از بین می‌برند. به ویژه، سلول‌های T کمکی مسیر سیگنالینگ NF-kB را برای معرفی سیتوکین‌های پیش التهابی ارتقا می‌دهند (۳۸) .

۲- فاز دوم (فاز ریوی): فاز ریوی با وجود پاسخ التهابی، با آسیب بافتی و نارسایی تنفسی مشخص می‌شود. ورود ویروس به بافت ریه انسان در بیشتر موارد باعث اختلال خفیف دستگاه تنفسی فوقانی می‌شود. مسیرهای التهابی زمانی فعال می‌شوند که ریه در اثر عفونت یا شرایط التهابی آسیب ببیند. سطوح بیش از حد سیتوکین‌ها، ایجاد استرس اکسیداتیو و همچنین وجود التهاب نامنظم و بیش از حد باعث آسیب سلول‌های آلوئولی و نکروز می‌شود، نکروز سلولی و تجمع مایع ادم باعث واکنش التهابی و ایمنی بارزتر می‌شود، در نتیجه باعث هیپوکسمی، اختلال در دفع دی اکسید کربن و نارسایی حاد تنفسی می‌شود(۳۹).

۳- فاز سوم (مرحله پرالتهاب): فاز پرالتهاب با وجود التهاب سیستمیک و آسیب اندام‌های دیگر در نتیجه افزایش پاسخ التهابی میزبان و حالت انعقاد بیش از حد مشخص می‌شود که منجر به نارسایی چند ارگانی (MOF)[۸۹] می‌شود. تعداد لکوسیت‌های بالا همراه با لنفوپنی و افزایش سطح سیتوکین‌های پیش التهابی در بیماران COVID-19 با شرایط شدید پلاسما مشاهده شد که به ویژه همراه با سطوح بالاتر IL-2، IL-6، IL-7، IL-10، پروتئین واکنشی C[۹۰](CRP)، فاکتور تحریک‌کننده کلونی گرانولوسیت (G-CSF)، پروتئین القایی با اینترفرون گاما 10 (IP)، پروتئین شیمی‌جذب مونوسیتی 1[۹۱] (MCP)، پروتئین التهابی ماکروفاژ1α (MIP)[۹۲] و فاکتور نکروز تومور α (TNF) می‌باشد. این "طوفان سیتوکین" آسیب ریه ناشی از التهاب را با عوارض تهدیدکننده زندگی مانند MOF، ARDS، شوک سپتیک، خونریزی،انعقاد، آسیب حاد قلب،کبد،کلیه و عفونت‌های باکتریایی ثانویه آغاز می‌کند. این پدیده مشابه وضعیت عفونت‌های SARS-CoV و MERS-CoV است (۳۹)). SARS-CoV-2 باعث ایجاد پاسخ های سیتوکین،کموکاین بیش از حد و طولانی مدت در برخی افراد آلوده می‌شود که به عنوان طوفان سیتوکین شناخته می‌شود. طوفان سیتوکین باعث ARDS یا اختلال عملکرد چند اندام می‌شود که منجر به زوال فیزیولوژیکی و مرگ می‌شود. کنترل به موقع طوفان سیتوکین در مراحل اولیه آن از طریق ابزارهایی مانند تعدیل‌کننده‌های ایمنی و آنتاگونیست‌های سیتوکین و همچنین کاهش انفیلتراسیون سلول های التهابی ریه می‌باشد.(۴۰)

پس از افزایش لنفوسیت‌های T فعال شده و تولید سیتوکین‌های پیش التهابی مرتبط با ماکروفاژهای تک هسته‌ای، مانند اینترلوکین۶ (IL-6) ، فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF-α) و IL-1β، IL-2، IL-4، IL-7، IL-10، IL-17، IFN ، تبدیل فاکتور رشد-(TGF-β) β

[88]Interferon Stimulated Genes
[89] Multiple organ failure
[90]C-Reactive Protein
[91]monocyte chemoattractant protein-1
Macrophage inflammatory protein[۹۲]

، و IL-8 ، "طوفان سیتوکین" ایجاد می‌شود. مقادیر زیادی سیتوکین در خون آزاد می شود که منجر به واکنش های التهابی سیستمیک می شود.(۴۱). پاسخ‌های شیمیوکاین و نفوذ سلولی التهابی هفت تا ده روز پس از شروع علائم رخ می‌دهد که منجر به اتساع عروق و کاهش فشار خون به دلیل از دست دادن پلاسما در کل سیستم قلبی عروقی می‌شود، و در نهایت با یک فروپاشی کامل گردش خون همراه است. به طور کلی، سیتوکین‌های پیش التهابی بیان مولکول‌های چسبنده سلولی را در سطح نوتروفیل‌ها و سلول های اندوتلیال افزایش می‌دهند. از آنجا که COVID-19 می‌تواند به لکوسیت‌ها آسیب برساند، لکوپنی در بیش از ۸۰ درصد از بیماران شدید تشخیص داده شد(۴۱،۴۲). ایمونوپاتوژنز SARS-CoV-2 (COVID-19) همراه با عفونت خفیف یا بدون علامت در کودکان و آسیب شدید ریه و تظاهرات خارج سلولی در بیماران بزرگسال و مسن می‌شود. به دلیل سطح پایین گیرنده‌های SARS-Cov-2 ، کاهش سایتوکاین‌های پیش التهابی در دستگاه تنفسی سلول‌های اپیتلیال، افزایش سطح اینترفرون‌های نوع I و پاسخ ایمنی ذاتی قوی، کودکان عفونت خفیف یا بدون علامت COVID-19 را نشان داده‌اند.(۴۳) بیماران COVID-19 ارتباط معنی‌داری بین کمبود ACE2 و شدت بالینی این بیماری را نشان می‌دهند. کاهش بیان ACE2 با افزایش سن نیز پیامدهای بالینی برای پیش‌آگهی ضعیف بیماران مسن COVID-19 دارد. از آن‌جایی که ژن ACE2 روی کروموزوم X قرار دارد، این فرضیه وجود دارد که نرخ مرگ و میر بالاتر مردان در بیماران مبتلا به COVID-19 ممکن است با سطوح بیان کمتر ژن ACE2 در بیماران مرد مرتبط باشد. بنابراین، بازگرداندن عدم تعادل RAS ناشی از SARS-CoV-2 به عنوان یک رویکرد بالینی ایده‌آل برای کاهش سرعت پیشرفت اولیه بیماری زایی COVID-19 پیشنهاد شده است.(۴۱)

تشخیص COVID-19

تشخیص بالینی COVID-19 برای مدیریت فعلی شیوع بیماری عمدتا بر اساس ترکیب سابقه اپیدمیولوژیک، معیارهای بالینی همراه با روش RT-PCR، علائم ذات‌الریه در سی‌تی اسکن، اشعه ایکس قفسه سینه و در نهایت، تشخیص ایمونوگلوبولین اختصاصی IgM/IgG سرم با استفاده از روش ایمونوسوربنت مرتبط با آنزیم (ELISA) از بیماران SARS-CoV-2 است.

تست های تشخیصی مولکولی

واکنش زنجیره ای ترانس کریپتاز معکوس (RT-PCR) ظرف پنج تا شش روز از شروع علائم ، تعدادی از موارد COVID-19 دوزهای ویروسی بالایی را در قسمت فوقانی خود نشان داده‌اند. دستگاه تنفسی تحتانی از سواب‌های نازوفارنکس (NP)[۹۳] و حلقی (OP)[۹۴] برای استخراج RNA SARS-CoV-2 قبل از هر دو زمان RT-PCR در زمان واقعی تحت اقدامات ایمنی زیستی و استفاده مناسب از تجهیزات حفاظت شخصی (PPE)[۹۵] استفاده می‌شود. برای تشخیص دیرهنگام بیماران شدید COVID-19 در طول روش لوله‌گذاری، باید از نمونه خلط یا شست‌وشوی برونکوآلوئولار به دلیل بیشترین دوز ویروسی استفاده کرد(۴۴،۴۵). توالی مناطق N (به عنوان غربالگری) و ORF1b (به عنوان تأیید کننده) که در بین ساربکوویروس‌ها (کروناویروس مربوط به SARS) بسیار محافظت می‌شوند. CDC دو هدف پروتئینی نوکلئوکپسید (N1and N2) را توصیه کرده است و WHO ژن E را برای غربالگری خط اول و سپس ژن

[93]Nasopharyngeal
[94]Oropharyngeal
[95]*Personal Protective Equipment*

RdRp به عنوان یک آزمایش تأییدی به دلیل حساسیت و ویژگی بیشتر توصیه کرده است. مطالعات نشان داده است که جهش در ژن N (C29200T) و ژن E (C26340T) بر تشخیص SARS-CoV-2 تأثیر می‌گذارد. WHO برای تشخیص مولکولی، غربالگری نمونه با ژن E (Envelope) کرونا و سپس تأیید آن با ژن RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) را توصیه می‌کند. در آمریکا دو پروتئین نوکلئوکپسید N1 و N2 ویروس بررسی می‌شوند (۴۶). در روش ایمونواسی، آنتی‌بادی ضد پروتئین N که یک آنتی‌ژن غالب ایمنی[96] است، برای تشخیص زودرس بیماری استفاده می‌شود (۴۷). عوامل متعددی برای توصیف تفاوت یا نرخ منفی کاذب بالا (FNR) تا ۳۰ الی ۵۰ درصد از آزمایشات RT-PCR اعلام شده است. این عوامل شامل تعداد و محل آغازگرها، جهش نقطه‌ای در ژن N، بار ویروسی در نقاط مختلف تشریحی بیماران، روش‌های نمونه‌گیری، وضعیت انتقال نمونه و رعایت استانداردهای آزمایشگاهی است که بیشتر به FNR بالا کمک می‌کند. روش‌های مولکولی تعیین توالی عمیق مانند تعیین توالی نسل بعدی و تعیین توالی نسل بعدی متاژنومیک برای تعیین جهش‌های بعدی SARS-CoV-2 ادامه خواهد داشت، با این حال، این روش‌ها در حال حاضر برای تشخیص COVID-19 غیرقابل اجرا هستند. در همین حال، برخی از مطالعات روش‌های جدیدی را برای تشخیص RNA ویروس SARS-CoV-2 ایجاد کردند، مانند تقویت ایزوترمال حلقه (LAMP) با استفاده از روش تشخیص بصری، رنگ‌سنجی و فناوری خوشه‌بندی منظم تکرارهای کوتاه پالیندرومیک (CRISPR)(۴۸).

تست سرولوژیکی

روش‌های سرولوژیکی بر تشخیص آنتی‌بادی‌های سرمی SARS-CoV-2 پاکت (S) پروتئین (حساسیت بالا) و پروتئین N (حساسیت کم) متمرکز شده است. تغیرات در سرم معمولاً پس از دو هفته از شروع علائم اتفاق می‌افتد. آزمایشات IgG بهتر از IgM عمل می‌کند و وقتی نمونه‌ها حداقل سه بار گرفته می‌شوند حساسیت بهتری را نشان می‌دهند (۴۹). مطالعات نشان داده که نتایج مثبت IgM اختصاصی ویروس بین ۲ تا ۸ هفته پس از شروع علائم تا ۸۰ درصد بوده است، سپس در ماه سوم به سرعت به زیر ۳۰ درصد کاهش یافته است. به طور کلی، سنجش ایمنی برای تشخیص سریع آنتی‌بادی‌های SARS-CoV-2 برای سنجش جریان جانبی یا غربالگری در سطح جمعیت برای تشخیص آنتی‌بادی (IgM و IgG) در برابر COVID-19 استفاده می‌شود. تشخیص سرولوژی فقط برای تعیین وضعیت ایمنی بیماران بدون علائم و تشخیص، تأیید موارد دیرهنگام COVID-19 یا برای ارزیابی مصونیت کارکنان مراقبت‌های بهداشتی با پیشرفت بیماری استفاده می‌شود (۵۰).Simon Fink و همکارانش از روش جدیدی برای ساختن یک سیستم سنجش سرولوژیک برای شناسایی و مشخص کردن آنتی‌بادی‌های ضد SARS-CoV-2 استفاده کردند. رویکرد مورد استفاده بر اساس روش وسترن بلات کلاسیک است که برای اجرا به عنوان یک سیستم سنجش با توان بالا اصلاح شده است. (۵۱).

درمان

اگرچه داروهای ضد ویروسی خاصی برای COVID-19 توسط FDA کشف یا تأیید نشده است، استفاده از برخی از داروهای ضد ویروسی موجود که مراحل خاصی را در چرخه زندگی SARS-CoV-2 هدف قرار می‌دهند، می‌تواند یک استراتژی درمانی جایگزین برای مقابله با این بیماری باشد. به غیر از داروهای ضد ویروسی، چندین رویکرد امیدوارکننده نیز برای درمان کووید-۱۹ مانند

[96]Immunodominant

پلاسمای بیماران بهبود یافته، مورد استفاده قرار می‌گیرد که استفاده از آنها کاهش بار ویروسی و عوارض بیماران را نشان داده است. IFN-α/β ، و مهارکننده IL-6R ، همچنین اثرات امیدوارکننده‌ای نشان داده‌اند و در حال حاضر در چندین آزمایش بالینی در حال ارزیابی هستند (۵۲).

ضد ویروس‌ها برای عفونت SARS-CoV-2 به چندین گروه تقسیم می‌شوند:

۱- مهارکننده‌های فیوژن: مهارکننده فیوژن گروهی از ضد ویروس‌ها هستند که فرآیند همجوشی را در طول ورود ویروس به سلول های میزبان مهار می‌کنند(شکل۳). چندین دارو مانند umifenovir و camostat mesylate و باریسیتینیب[97] موجود است که فعالیت ضد ویروسی را علیه SARS-CoV-2 نشان می‌دهد (۵۳).

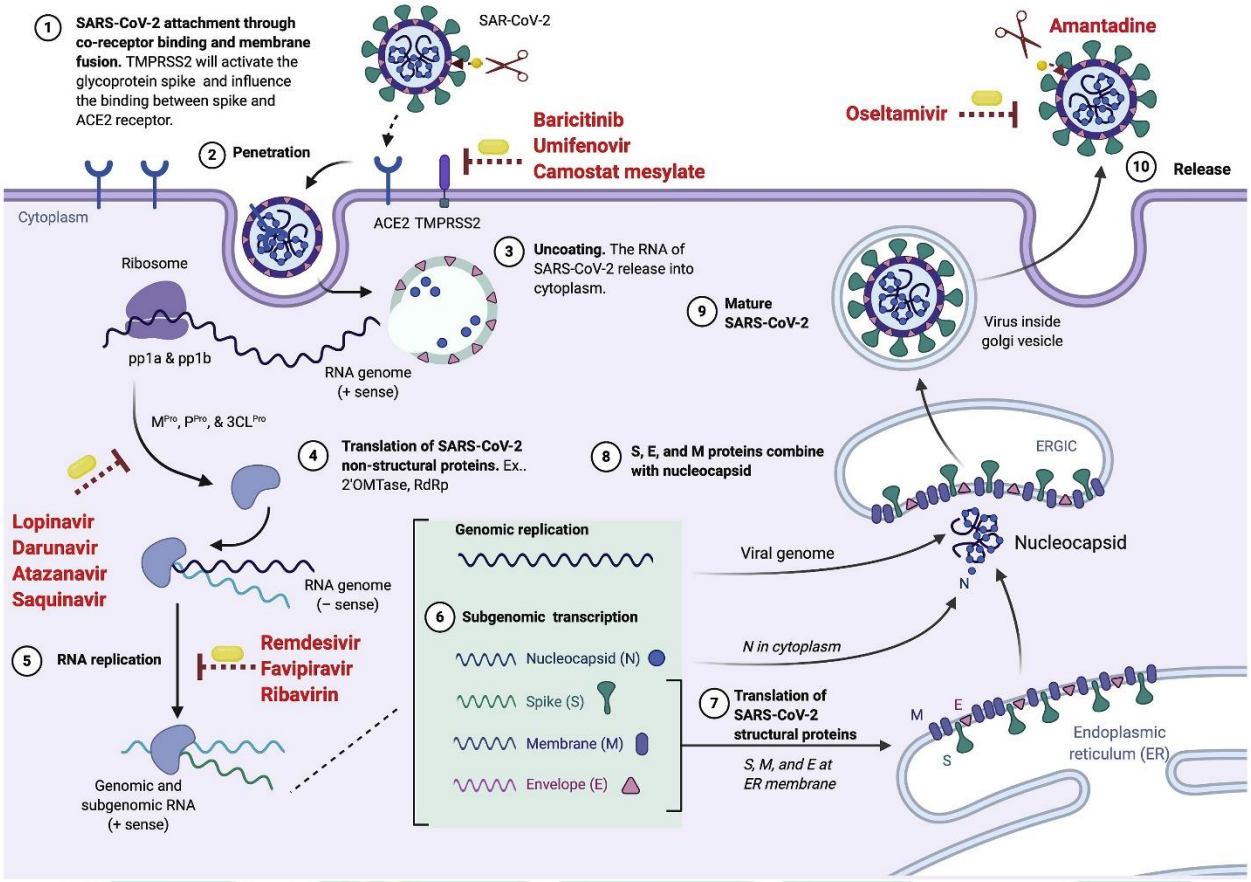
۲- مهارکننده‌های پروتئاز: برخی از مهارکننده‌های پروتئاز مانند لوپیناویر، داروناویر و آتازاناویر پتانسیل استفاده در برابر کووید-۱۹را دارند. تکنیک‌های طراحی دارو به کمک رایانه را می‌توان برای شناسایی نامزدهای بالقوه استفاده مجدد دارو در برابر پروتئازهای ویروسی مورد استفاده قرار داد. در یک مطالعه استفاده مجدد از دارو محاسباتی، داروهایی مانند کارفیلزومیب، والروبیسین، ارواسایکلین، لوپیناویر و الباسویر مشخص شد که پروتئاز اصلی را در SARS-CoV-2 مهار می‌کنند (۵۴).

۳- مهارکننده های رونویسی معکوس: استراتژی دیگر برای مبارزه با عفونت SARS-CoV-2 شامل هدف قرار دادن مرحله رونویسی معکوس با مسدود کردن RdRp و در نتیجه جلوگیری از تکثیر ویروسی است. چند داروی مهارکننده بالقوه عبارتند از: رمدسیویر، فاویپیراویر (آویگان)، ریباویرین (۵۵،۵۶).

۴- مهارکننده‌های نورآمینیداز: Oseltamivir که یک مهارکننده نورآمینیداز است در پیشگیری از آنفولانزا موثر است .داروهای مهارکننده نورآمینیداز مانند اسلتامیویر، زانامیویر و پرامیویر می‌باشند و انتظار نمی‌رود که در درمان کووید-۱۹ موثر باشد. با این حال، مطالعات استفاده از ترکیبی از اسلتامیویر با گانسیکلوویر و لوپیناویر، ریتوناویر را برای درمان بیماران کووید-۱۹ در ووهان گزارش کرده‌اند. Oseltamivir در حال حاضر به عنوان یک گزینه توصیه شده برای درمان کووید-۱۹ در اندونزی و سنگاپور استفاده می‌شود (۵۷).

۵- مسدودکننده‌های پروتئین کانال یونی M2: پروتئین کانال M2 روی پوشش ویروسی برای حفظ pH در سراسر پوشش ویروسی ضروری است که در طول ورود سلول و حرکت در غشای ترانس گلژی سلول‌های میزبان در طول بلوغ ویروسی حیاتی است. پروتئین کانال یونی M2 یکی از اهداف مبارزه با ویروس‌های آنفولانزا است. آمانتادین قادر است فعالیت کانال غشایی پروتئین SARS-CoV را مسدود کند ولی نیاز به مطالعات بیشتر برای توانایی ضد ویروسی مناسب برای درمان کووید-۱۹ دارد (۵۸).

[97] Baricitinib



شکل۲: چرخه زندگی SARS-CoV-2 و اهداف مهاری احتمالی داروهای ضد ویروسی. مهارکننده‌های فیوژن فرآیند همجوشی ورود ویروس را مهار می‌کنند، در حالی که مهارکننده‌های پروتئاز برخی از پروتئازها را هدف قرار می‌دهند. مهارکننده‌های رونویسی با مسدود کردن RNA پلیمراز وابسته به RNA، مرحله رونویسی معکوس را هدف قرار می‌دهند و بنابراین از تکثیر ویروسی جلوگیری می‌کنند. برخی از مهارکننده‌های ترانس کریپتاز، نوکلئوزیدی رونوشت معکوس هستند. برخی از آنتی ویروس ها پروتئین کانال M2 را هدف قرار می دهند.

دسته دیگر داروهای مورد استفاده، داروهای غیر ضد ویروسی هستند که شامل گروه‌های زیر می‌باشد.

۱- **بازدارنده‌های هسته‌ای با حدواسط α/β1 [98]:** یک داروی ضد انگلی با طیف وسیع تایید شده توسط FDA به نام ivermectin اخیراً فعالیت ضد ویروسی قوی در شرایط آزمایشگاهی علیه SARS-CoV-2 از خود نشان داده است. یک دوز واحد از دارو باعث کاهش ۵۰۰۰ برابری محتوای RNA ویروسی شد (۵۹).

[98] Importin α/β1-mediated nuclear import inhibitors

۲- **کلروکین و هیدروکسی کلروکین:** کلروکین (۹-آمینوکوئینولین) داروی مورد تایید FDA، یک داروی ضد مالاریا اثبات شده و قابل اعتماد است که در برابر عفونت های SARS-CoV-2 مفید است و از این رو اکنون برای درمان بیماران COVID-19 توسط پزشکان پیشنهاد و تایید شده است. با تغییر پیکربندی ساختاری گیرنده های سلولی یا با اتصال رقابتی به گیرنده‌های سلولی، ورود ویروس را مسدود می‌کند و می‌تواند گلیکوزیلاسیون گیرنده‌های سلولی ACE-2 مورد نیاز برای ورود SARS-CoV-2 را اصلاح کند. از سوی دیگر، این دارو همچنین می‌تواند سنتز گیرنده‌های اسید سیالیک را کاهش دهد تا از اتصال SARS-CoV-2 به سلول‌های میزبان جلوگیری کند. کلروکین و هیدروکسی کلروکین در مقایسه با پروتئین اسپایک SARS-CoV-2، میل پیوندی بهتری با گیرنده های سلول میزبان دارند و بنابراین به دلیل اتصال رقابتی به اسید سیالیک و گانگلیوزیدهای موجود در سطح سلول هدف، از اتصال و ورود سلول های هدف جلوگیری می‌کند.علاوه بر فعالیت ضد ویروسی، کلروکین دارای فعالیت ضد التهابی است که ممکن است به اثربخشی آن در درمان بیماران COVID-19 کمک کند (۴۷)

سلول درمانی و ایمونوتراپی(پلاسما درمانی دوره نقاهت)

سلول‌های بنیادی مزانشیمی(MSC) دارای عملکردهای ضد التهابی و تعدیل کننده ایمنی قوی است که می‌تواند نفوذ سلول‌های ایمنی به بافت‌های ریه و ترشح سیتوکین‌های پیش التهابی را برای بهبود آسیب ریه و ARDS سرکوب کند. علاوه بر این، ترمیم بافت و فیبروز ریه را کاهش می‌دهد. همچنین سلول درمانی می‌توانند طوفان سیتوکین در بیماران بدحال را کنترل و باعث کاهش مرگ و میر در آنان شود (۶۰).پلاسمای نقاهت (CP)[۹۹] جمع آوری شده از بیماران بهبودیافته حاوی چندین آنتی‌بادی ضد ویروسی است. درمان CP یک ایمونوتراپی غیرفعال است که حاوی آنتی‌بادی خنثی کننده است. آنتی بادی‌های مشتق شده از CP می‌توانند به فعال‌سازی کمپلمان و فرآیند فاگوسیتوز برای جلوگیری از تکثیر ویروس کمک کنند (۳۹).

۲.نتیجه گیری

تا کنون حدود ۸.۵ میلیارد دوز واکسن کرونا در جهان تزریق شده است و حدود ۴۶.۶٪ افراد در جهان به صورت کامل واکسینه شده اند. با این وجود بعد از گذشت حدود دو سال از همه‌گیری COVID-19، و با گذشت حدود ۱ سال از واکسیناسیون عمومی در بعضی از کشورها تعداد موارد مبتلا ،میزان بستری و میزان مرگ و میر رو به افزایش است و از بین نرفته است.تداوم انتقال همه‌گیری COVID-19 به موارد زیادی بستگی دارد، از جمله جهش های جدید کرونا ویروس ،شیوع بالای بیماری،ابتلای مجدد افراد به ویروس کرونا،ابتلای افراد واکسینه شده و کاهش تیتر آنتی بادی بعد از گذشت چند ماه پس از تزریق واکسن . اخیرا محققان تزریق دوز سوم واکسن یا دوز بوستر را پیشنهاد داده اند که اکثر جمعیت ها در حال دریافت دوز سوم واکسن می باشند. علیرغم مطالعات فزاینده، هیچ داروی اثرگذار یا درمان موثر برای بیماری همه‌گیر COVID-19 مشخص نشده است و بیماران با درمان‌های حمایتی یا غیر اختصاصی بهبود می‌یابند.در کنار واکسیناسیون عمومی که در اکثر کشورها در حال انجام است ، تقویت سیستم ایمنی بدن، سیستم تغذیه مناسب، مصرف ویتامینها و ریزمغذی‌ها می‌تواند به ما در محافظت از خود در برابر عفونت SARS-CoV-2 کمک کند.

[۹۹] Convalescent Plasma

واریانت جدید وشاید نگران کننده SARS-CoV-2 به نام "Omicron" اخیراً (۲۴ نوامبر ۲۰۲۱) در آفریقای جنوبی مشاهده شد و به دلیل قابلیت شیوع افزایش یافته در حال حاضر در سراسر جهان گسترش یافته است. این نوع جدید ویروس به دلیل داشتن بیش از ۳۰ جهش در پروتئین اسپایک و با ۱۵ جهش تنها در ناحیه RBD آشکار شد که به طور بالقوه قدرت آنتی‌بادی‌های درمانی را کاهش می‌دهد و اتصال ACE2 را تقویت می‌کند (۶۱). البته دربررسی‌های انجام شده، افراد بیمار شدت بیماری خفیف را تجربه کرده‌اند و تا به حال مرگ برای مبتلایان واریانت omicron گزارش نشده است. امید است واریانت جدید، شدت بیماری بسیار خفیف با وجود شیوع بالایش داشته باشد. در این صورت سویه غالب در جمعیت‌ها می‌شود و مانند سایر پاندمی‌های ویروسی در تاریخ، به پایان پاندمی نزدیک خواهیم شد.

منابع

- Mathieu, E., Ritchie, H., Ortiz-Ospina, E., Roser, M., Hasell, J., Appel, C., Giattino, C. and Rodés-Guirao, L., 2021. A global database of COVID-19 vaccinations. *Nature human behaviour*, pp.1-7.
- De Wit, E., Van Doremalen, N., Falzarano, D. and Munster, V.J., 2016. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(8), pp.523-534.
- Paraskevis, D., Kostaki, E.G., Magiorkinis, G., Panayiotakopoulos, G., Sourvinos, G. and Tsiodras, S., 2020. Full-genome evolutionary analysis of the novel corona virus (2019-nCoV) rejects the hypothesis of emergence as a result of a recent recombination event. *Infection, Genetics and Evolution*, *79*, p.104212.
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P. and Shi, Z.L., 2020. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, pp.1-14.
- Jiang, S., Du, L. and Shi, Z., 2020. An emerging coronavirus causing pneumonia outbreak in Wuhan, China: calling for developing therapeutic and prophylactic strategies. *Emerging microbes & infections*, *9*(1), pp.275-277.
- Li, Q., Guan, X., Wu, P., Wang, X., Zhou, L., Tong, Y., Ren, R., Leung, K.S., Lau, E.H., Wong, J.Y. and Xing, X., 2020. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus–infected pneumonia. *New England journal of medicine*.
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N. and Bi, Y., 2020. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The lancet*, *395*(10224), pp.565-574.
- Mahmoud, I.S., Jarrar, Y.B., Alshaer, W. and Ismail, S., 2020. SARS-CoV-2 entry in host cells-multiple targets for treatment and prevention. *Biochimie*, *175*, pp.93-98.
- Wollina, U., Karadağ, A.S., Rowland-Payne, C., Chiriac, A. and Lotti, T., 2020. Cutaneous signs in COVID-19 patients: a review. *Dermatologic therapy*, *33*(5), p.e13549.
- Proal, A.D. and VanElzakker, M.B., 2021. Long COVID or post-acute sequelae of COVID-19 (PASC): An overview of biological factors that may contribute to persistent symptoms. *Frontiers in microbiology*, *12*, p.1494.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T.S., Herrler, G., Wu, N.H., Nitsche, A. and Müller, M.A., 2020. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *cell*, *181*(2), pp.271-280.
- Yuki, K., Fujiogi, M. and Koutsogiannaki, S., 2020. COVID-19 pathophysiology: A review. *Clinical immunology*, *215*, p.108427.
- Yao, H., Song, Y., Chen, Y., Wu, N., Xu, J., Sun, C., Zhang, J., Weng, T., Zhang, Z., Wu, Z. and Cheng, L., 2020. Molecular architecture of the SARS-CoV-2 virus. *Cell*, *183*(3), pp.730-738.
- Petrosillo, N., Viceconte, G., Ergonul, O., Ippolito, G. and Petersen, E., 2020. COVID-19, SARS and MERS: are they closely related?. *Clinical Microbiology and Infection*, *26*(6), pp.729-734.

- Chan, J.F.W., Kok, K.H., Zhu, Z., Chu, H., To, K.K.W., Yuan, S. and Yuen, K.Y., 2020. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging microbes & infections*, *9*(1), pp.221-236.
- Ou, X., Liu, Y., Lei, X., Li, P., Mi, D., Ren, L., Guo, L., Guo, R., Chen, T., Hu, J. and Xiang, Z., 2020. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature communications*, *11*(1), pp.1-12.
- Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A. and Li, F., 2020. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(21), pp.11727-11734.
- Snijder, E.J., Bredenbeek, P.J., Dobbe, J.C., Thiel, V., Ziebuhr, J., Poon, L.L., Guan, Y., Rozanov, M., Spaan, W.J. and Gorbalenya, A.E., 2003. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *Journal of molecular biology*, *331*(5), pp.991-1004.
- Ferron, F., Decroly, E., Selisko, B. and Canard, B., 2012. The viral RNA capping machinery as a target for antiviral drugs. *Antiviral research*, *96*(1), pp.21-31.
- Shannon A, Le NT, Selisko B, et al. Remdesivir and SARS-CoV-2: Structural requirements at both nsp12 RdRp and nsp14 Exonuclease active-sites. *Antiviral Res*. 2020; 178:104793. doi:10.1016/j.antiviral.2020.104793
- Forster, P., Forster, L., Renfrew, C. and Forster, M., 2020. Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(17), pp.9241-9243.
- Ceraolo, C. and Giorgi, F.M., 2020. Genomic variance of the 2019-nCoV coronavirus. *Journal of medical virology*, *92*(5), pp.522-528.
- Laha, S., Chakraborty, J., Das, S., Manna, S.K., Biswas, S. and Chatterjee, R., 2020. Characterizations of SARS-CoV-2 mutational profile, spike protein stability and viral transmission. *Infection, Genetics and Evolution*, *85*, p.104445.
- Zhao, W.M., Song, S.H., Chen, M.L., Zou, D., Ma, L.N., Ma, Y.K., Li, R.J., Hao, L.L., Li, C.P., Tian, D.M. and Tang, B.X., 2020. The 2019 novel coronavirus resource. *Yi chuan= Hereditas*, *42*(2), pp.212-221.
- Korber, B., Fischer, W.M., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., Abfalterer, W., Hengartner, N., Giorgi, E.E., Bhattacharya, T., Foley, B. and Hastie, K.M., 2020. Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. *Cell*, *182*(4), pp.812-827.
- Fehr, A.R. and Perlman, S., 2015. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Coronaviruses*, pp.1-23.
- Wang, R., Chen, J., Hozumi, Y., Yin, C. and Wei, G.W., 2020. Decoding asymptomatic COVID-19 infection and transmission. *The journal of physical chemistry letters*, *11*(23), pp.10007-10015.
- Chan, J.F.W., Kok, K.H., Zhu, Z., Chu, H., To, K.K.W., Yuan, S. and Yuen, K.Y., 2020. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging microbes & infections*, *9*(1), pp.221-236.
- Fuentes-Prior, P., 2021. Priming of SARS-CoV-2 S protein by several membrane-bound serine proteinases could explain enhanced viral infectivity and systemic COVID-19 infection. *Journal of Biological Chemistry*, *296*.
- Ding, N., Zhao, K., Lan, Y., Li, Z., Lv, X., Su, J., Lu, H., Gao, F. and He, W., 2017. Induction of atypical autophagy by porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus contributes to viral replication. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *7*, p.56.
- Segars, J., Katler, Q., McQueen, D.B., Kotlyar, A., Glenn, T., Knight, Z., Feinberg, E.C., Taylor, H.S., Toner, J.P. and Kawwass, J.F., 2020. Prior and novel coronaviruses, Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), and human reproduction: what is known?. *Fertility and sterility*, *113*(6), pp.1140-1149.
- Sungnak, W., Huang, N., Bécavin, C., Berg, M., Queen, R., Litvinukova, M., Talavera-López, C., Maatz, H., Reichart, D. and Sampaziotis, F., 2020. HCA Lung Biological Network. *SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. Nat. Med*, *26*, pp.681-687.
- Heurich, A., Hofmann-Winkler, H., Gierer, S., Liepold, T., Jahn, O. and Pöhlmann, S., 2014. TMPRSS2 and ADAM17 cleave ACE2 differentially and only proteolysis by TMPRSS2 augments entry driven by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *Journal of virology*, *88*(2), pp.1293-1307.

- Zumla, A., Chan, J.F., Azhar, E.I., Hui, D.S. and Yuen, K.Y., 2016. Coronaviruses—drug discovery and therapeutic options. *Nature reviews Drug discovery*, *15*(5), pp.327-347.
- Eckerle, L.D., Becker, M.M., Halpin, R.A., Li, K., Venter, E., Lu, X., Scherbakova, S., Graham, R.L., Baric, R.S., Stockwell, T.B. and Spiro, D.J., 2010. Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS pathogens*, *6*(5), p.e1000896.
- Li, X., Geng, M., Peng, Y., Meng, L. and Lu, S., 2020. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *Journal of pharmaceutical analysis*, *10*(2), pp.102-108.
- Diagnosis and treatment plan of Corona Virus Disease 2019 (tentative sixth edition). *Glob Health J*. 2020; 4(1):1-5. doi:10.1016/j.glohj.2020.03.001.
- Chen W. H.; Strych U.; Hotez P. J.; Bottazzi M. E. The SARS-CoV-2 Vaccine Pipeline: an Overview. Curr. Trop Med. Rep. 2020, 7, 61–64. 10.1007/s40475-020-00201-6.
- Pan, L., Mu, M., Yang, P., Sun, Y., Wang, R., Yan, J., Li, P., Hu, B., Wang, J., Hu, C. and Jin, Y., 2020. Clinical characteristics of COVID-19 patients with digestive symptoms in Hubei, China: a descriptive, cross-sectional, multicenter study. *The American journal of gastroenterology*, *115*.
- Brian DA, Baric RS. Coronavirus genome structure and replication. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005; 287:1-30.
- Lee, C. and Choi, W.J., 2021. Overview of COVID-19 inflammatory pathogenesis from the therapeutic perspective. *Archives of pharmacal research*, pp.1-18.
- Yang, L., Liu, S., Liu, J., Zhang, Z., Wan, X., Huang, B., Chen, Y. and Zhang, Y., 2020. COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. *Signal transduction and targeted therapy*, *5*(1), pp.1-8.
- Lu X, Zhang L, Du H, et al. SARS-CoV-2 Infection in Children. *N Engl J Med*. 2020; 382(17):1663-1665.
- Centers for Disease Control and Prevention, 2020. Interim guidelines for collecting, handling, and testing clinical specimens for COVID-19.
- Zhang, W., Du, R.H., Li, B., Zheng, X.S., Yang, X.L., Hu, B., Wang, Y.Y., Xiao, G.F., Yan, B., Shi, Z.L. and Zhou, P., 2020. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerging microbes & infections*, *9*(1), pp.386-389.
- To, K.K.W., Tsang, O.T.Y., Leung, W.S., Tam, A.R., Wu, T.C., Lung, D.C., Yip, C.C.Y., Cai, J.P., Chan, J.M.C., Chik, T.S.H. and Lau, D.P.L., 2020. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, *20*(5), pp.565-574.
- Frediansyah, A., Tiwari, R., Sharun, K., Dhama, K. and Harapan, H., 2021. Antivirals for COVID-19: A critical review. *Clinical Epidemiology and global health*, *9*, pp.90-98.
- Field, E., Dyda, A. and Lau, C.L., 2021. COVID-19 Real-time Information System for Preparedness and Epidemic Response (CRISPER). *The Medical Journal of Australia*, *214*(8), pp.386-386.
- Konrad, R., Eberle, U., Dangel, A., Treis, B., Berger, A., Bengs, K., Fingerle, V., Liebl, B., Ackermann, N. and Sing, A., 2020. Rapid establishment of laboratory diagnostics for the novel coronavirus SARS-CoV-2 in Bavaria, Germany, February 2020. *Eurosurveillance*, *25*(9), p.2000173.
- Zhang, W., Du, R.H., Li, B., Zheng, X.S., Yang, X.L., Hu, B., Wang, Y.Y., Xiao, G.F., Yan, B., Shi, Z.L. and Zhou, P., 2020. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerging microbes & infections*, *9*(1), pp.386-389.
- Fink, S., Ruoff, F., Stahl, A., Becker, M., Kaiser, P., Traenkle, B., Junker, D., Weise, F., Ruetalo, N., Hörber, S. and Peter, A., 2021. Multiplexed serum antibody screening platform using virus extracts from endemic coronaviridae and SARS-CoV-2. *ACS infectious diseases*, *7*(6), pp.1596-1606.
- Kim, J.S., Lee, J.Y., Yang, J.W., Lee, K.H., Effenberger, M., Szpirt, W., Kronbichler, A. and Shin, J.I., 2021. Immunopathogenesis and treatment of cytokine storm in COVID-19. *Theranostics*, *11*(1), p.316.
- Zhu, Z., Lu, Z., Xu, T., Chen, C., Yang, G., Zha, T., Lu, J. and Xue, Y., 2020. Arbidol monotherapy is superior to lopinavir/ritonavir in treating COVID-19. *Journal of Infection*, *81*(1), pp.e21-e23.
- De Wilde, A.H., Jochmans, D., Posthuma, C.C., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Van Nieuwkoop, S., Bestebroer, T.M., Van Den Hoogen, B.G., Neyts, J. and Snijder, E.J., 2014. Screening of an FDA-approved compound library identifies four small-molecule inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in cell culture. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *58*(8), pp.4875-4884.

- Wang, M., Cao, R., Zhang, L., Yang, X., Liu, J., Xu, M., Shi, Z., Hu, Z., Zhong, W. and Xiao, G., 2020. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell research*, *30*(3), pp.269-271.
- ul Qamar, M.T., Alqahtani, S.M., Alamri, M.A. and Chen, L.L., 2020. Structural basis of SARS-CoV-2 3CLpro and anti-COVID-19 drug discovery from medicinal plants. *Journal of pharmaceutical analysis*, *10*(4), pp.313-319.
- Wu, R., Wang, L., Kuo, H.C.D., Shannar, A., Peter, R., Chou, P.J., Li, S., Hudlikar, R., Liu, X., Liu, Z. and Poiani, G.J., 2020. An update on current therapeutic drugs treating COVID-19. *Current pharmacology reports*, *6*(3), pp.56-70.
- Dey, D., Borkotoky, S. and Banerjee, M., 2020. In silico identification of Tretinoin as a SARS-CoV-2 envelope (E) protein ion channel inhibitor. *Computers in biology and medicine*, *127*, p.104063.
- Patrì, A. and Fabbrocini, G., 2020. Hydroxychloroquine and ivermectin: A synergistic combination for COVID-19 chemoprophylaxis and treatment?. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *82*(6), p.e221.
- Li, Z., Niu, S., Guo, B., Gao, T., Wang, L., Wang, Y., Wang, L., Tan, Y., Wu, J. and Hao, J., 2020. Stem cell therapy for COVID-19, ARDS and pulmonary fibrosis. *Cell proliferation*, *53*(12), p.e12939.
- Woo, H.G. and Shah, M., 2021. Omicron: A heavily mutated SARS-CoV-2 variant exhibits stronger binding to ACE2 and potently escape approved COVID-19 therapeutic antibodies. *bioRxiv*.

Relationship between traits in recombinant Iranian rice lines under salinity stress

Mohammad Javad Behrozbeh[1]; Mahjoubeh Akbari[2*]; Hossein Sabouri[3]

1. Former graduate student of crop biotechnology, Department of Plant Production, Collage of Agriculture science and Natural Resource, Gonbad Kavous University
2. M.Sc. student of crop biotechnology, Department of Plant Production, Collage of Agriculture science and Natural Resource, Gonbad Kavous University
3. Associate Professor, Department of Plant Production, Collage of Agriculture science and Natural Resource, Gonbad Kavous University

**Corresponding Author Email address: mahjoob.htr@gmail.com*

Abstract

Soil salinity is one of the most important limitations of crop growth due to the toxicity and prevention of water absorption. In order to evaluate the traits related to salinity tolerance in rice vegetative stage, an experiment was conducted in greenhouse of Gonbad Kavous University as a randomized complete block design with three replications and a salinity treatment on the RIL population obtained from the crossing of Ahlami Tarom cultivar and Neda variety. The data measured in the experiment showed high variation and the presence of relative resistance to salinity in the vegetative stage in the population under study. The highest correlation was found between leaf number per plant and stem dry weight of 0.734. Regression results also indicated that salinity resistant lines have higher stems and leaves and higher altitudes. The results of this research can be used for selection projects for breeding programs.

Key words: Regression, Genotype code, correlation, Rice, Salinity

رابطه بین صفات در لاین های نوترکیب برنج ایرانی تحت تنش شوری

محمدجواد به روزبه[۱]؛ محجوبه اکبری[2*]؛ حسین صبوری[3]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس
۲. دانشجو کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس
۳. دانشیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: mahjoob.htr@gmail.com

چکیده

شوری خاک به دلیل ایجاد سمیت و جلوگیری از جذب آب و عناصر یکی از مهم‌ترین محدودیت های رشد گیاهان زراعی محسوب می شود. به منظور ارزیابی صفت های مرتبط با تحمل شوری در مرحله گیاهچه‌ای برنج آزمایشی در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه گنبدکاووس به صورت طرح بلوک های کامل تصادفی با سه تکرار در دو سطح شاهد بدون تنش و شوری ۸ دسی‌زمینس بر متر بر روی ۹۶ ژنوتیپ جمعیت لاین‌های نوترکیب حاصل از تلاقی رقم های اهلمی طارم و ندا انجام گرفت. بررسی اطلاعات حاصل از داده‌های صفات اندازه‌گیری شده در آزمایش نشان دهنده تنوع بالا و وجود مقاومت نسبی به شوری در مرحله رویشی در جمعیت مورد بررسی بود. همچنین بیشترین همبستگی مربوط به تعداد برگ در بوته و وزن خشک ساقه به میزان 0.734 بود. نتایج رگرسیون نیز حاکی از آن بود که لاین های مقاوم به شوری دارای ساقه و برگ بیشتر و ارتفاع بلندتر هستند. از نتایج این تحقیق می‌توان برای برنامه‌های انتخاب پروژه های اصلاحی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: برنج ، رگرسیون ، شوری ، کد ژنوتیپی ، همبستگی

۱. مقدمه

برنج (*Oryza sativa L.*) از مهمترین و قدیمی ترین محصولات زراعی و غذای اصلی بیش از نیمی از مردم جهان می باشد (Ghosh and Chakma, 2015 ; Park et al., 2015) . براساس گزارش سازمان خواروبار جهانی (فائو) تولید برنج در سال ۲۰۱۸ برابر ۵۱۰ میلیون تن بوده است (FAO, 2019). کشت برنج همواره توسط تنش های زیستی و غیرزیستی تهدید می‌شود و در میان تنش‌های غیرزیستی، شوری خاک از عوامل اصلی موثر بر رشد و عملکرد آن در سراسر جهان است (Wang et al., 2012; Ganie, 2019). تنش شوری یکی از مهمترین تنش های غیر زیستی است که تولید برنج در سراسر جهان را محدود می کند (Jahan et al., 2019). کشت برنج در ایران حائز اهمیت است و شوری روزافزون خاک های زراعی تولید این محصول را با مشکل مواجه نموده (Nabiollahi et

al., 2017) و با توجه به این موضوع تولید ارقام متحمل به تنش شوری از برنامه های مهم به نژادی محسوب می شود (Kordrostami et al., 2017). تنش شوری برنج را در مراحل مختلف ، از جوانه زنی تا بلوغ تحت تاثیر قرار می دهد (Choudar et al., 2016; Krishnamurthy et al., 2015; Tiwari et al., 2015) . در اواخر مرحله رشد برنج توانایی تحمل برخی تنش شوری را دارد اما در مرحله ی گیاهچه نسبت به شوری حساس تر است شوری منجر به کاهش جوانه زنی و عملکرد و رشد گیاه می شود (Tack et al., 2015 ; Zhang et al., 2018) . بهبود برای تحمل به تنش های غیر زیستی در برنج، می تواند تولید را در مناطق تحت تاثیر تنش که هم اکنون از آن ها استفاده نمی شود، گسترش دهد. بر همین مبنا، نیاز بیشتر به فهم چگونگی پاسخ گیاهان در شرایط مختلف با امید به توسعه مقاومت نباتات به تنش‌های محیطی جلوه‌گر می‌شود (ربیعی و همکاران ۱۳۹۲). با روند رو به رشد جمعیت جهان و افزایش زمین های شور، درک سازوکارهای گیاهان در پاسخ به تنش شوری در جهت تأمین امنیت غذایی و افزایش کارایی تولید محصولات زراعی حائز اهمیت می باشد (Mirdarmansuri 2017., al et) .

گیاهچه های برنج در مرحله یک تا دو برگی حساسیت بالایی به شوری دارند (Isfahani, Flowers and Yeo, 1988; Moradi, 2002 ;1999). بررسی عکس العمل گیاهچه های ۱۰ تا ۱۴ روزه در برابر شوری ۵۰ تا ۷۰ میلی مولار مشخص کرده است که دلیل مرگ اکثر ارقام برنج در مرحله گیاهچه به علت تجمع زیاد نمک در برگ هاست (Flowers et al., 1977).

Kumar و همکاران (2007) و Kibria و همکاران (۲۰۱۷) با مطالعه عکس‌العمل ارقام برنج ایندیکا نشان دادند که در تنش شوری درصد جوانه زنی، رشد گیاه و مقدار رنگیزه کلروفیل کاهش پیدا می کند در حالی که سطوح پرولین و پراکسیداسیون چربی ها افزایش می یابد. آن ها اختلاف معنی‌داری را بین ارقام ایندیکا برای صفات مذکور مشاهده نمودند. Shiro و همکاران (2002)، ارتباط بین توزیع و تجمع سدیم و آسیب وارد شده ناشی از شوری را در برگ های گیاهچه های برنج بررسی نمودند. آن‌ها نشان دادند که تجمع سدیم در برگ های مسن تر بیشتر است. در مطالعه ای با اعمال تنش شوری ۸ دسی زیمنس در مرحله گیاهچه تحت شرایط هیدروپونیک صفاتی چون طول اندام هوایی، وزن خشک ریشه، وزن خشک اندام هوایی، سطح برگ، محتوای کلروفیل کاهش پیدا کرد اما نسبت سدیم به پتاسیم افزایش پیدا کرد (Gholizade, 2013) . مقدار کلروفیل در چهارمین برگ نسبت به برگ های دیگر کمتر بود. در پژوهشی نشان داده شد که شوری موجب کاهش فتوسنتز، محتوای کلروفیل و فعالیت آنزیم روبیسکو می گردد (Singh et al., 2007) . یکی از اثرات شوری بر گیاه کاهش مساحت برگ بوده که باعث مختل شدن فتوسنتز و کاهش آن می شود (میرعرب رضی و همکاران، ۱۳۹۸). این مطالعه نشان داد که ارتباط بین آسیب ناشی از شوری و سن برگ قوی تر از ارتباط آن با غلظت سدیم در برگ‌هاست. در تحقیق دیگری صبوری و همکاران (۱۳۸۷) ژنوتیپ های متحمل را دارای میانگین کم برای صفت های کد ژنوتیپی، درصد سدیم و نسبت سدیم به پتاسیم و میانگین بالا برای صفت های وزن خشک ریشه، ساقه، زیست توده، طول ساقه و ریشه گزارش نمودند. هدف این پژوهش بررسی صفت های تاثیرگذار بر مقاومت برنج به شوری در مرحله گیاهچه ای بود.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱- ارزیابی فنوتیپی صفات

ارزیابی واکنش لاین های مورد بررسی به تنش شوری در مرحله رویشی به وسیله آزمایشی به صورت طرح بلوک های کامل تصادفی با سه تکرار در دو سطح شاهد بدون تنش و شوری ۸ دسی‌زمینس بر متر در گلخانه دانشگاه گنبدکاووس اجرا شد. برای هر لاین ابتدا درون پتری دیش جوانه زنی انجام گرفت و سپس در هر گلدان یک گیاهچه نشاء گردید. گلدان‌های تیمار شاهد با آب معمولی (EC برابر با ۰/۸۵۰ دسی‌زیمنس بر متر) و تیمار شوری با آب شور (EC هشت دسی‌زیمنس بر متر) آبیاری شدند. محلول آب شور به وسیله نمک (NaCl) تهیه شده و تنظیم میزان شوری محلول توسط دستگاه EC متر (مدل ۸۶۵۰۳، شرکت AZ، تایوان) انجام شد. هر گلدان دو مرتبه، یک بار در طول مرحله شروع رشد و بار دیگر سه هفته پس از نشاء کاری، توسط یک گرم کود کامل مخصوص گیاه برنج شامل N:15% - P_2O_5 15% - K_2O 30% - Mg 1% - Fe 1mg که در آن آهن به صورت کلاته شده است تغذیه شد. همچنین برای کنترل آفات از سم دیازنون گرانول به میزان یک گرم در هر گلدان ۱۰ کیلوگرمی استفاده شد. صفات مورفولوژیکی گیاهان در زمان شروع دوره زایشی یادداشت برداری شدند که این صفات شامل تعداد پنجه، ارتفاع بوته، وزن خشک ساقه، تعداد برگ، وزن خشک ریشه، کد ژنوتیپی، کلروفیل برگ و حجم ریشه اندازه‌گیری شدند. کلروفیل برگ گیاه توسط دستگاه کلروفیل متر(مدل CL-01، شرکت Hansatech، انگلستان) اندازه‌گیری شد. کد ژنوتیپی تحمل به شوری گیاهان هر لاین طبق جدول یک به آن ها داده شد.

جدول ۱: کددهی ژنوتیپی به لاین‌های مورد آزمایش در مرحله رویشی

میزان تحمل	علائم	کد ژنوتیپی
بسیار متحمل	رشد نرمال فاقد علائم برگی	۱
متحمل	رشد تقریبا نرمال، نوک برگ‌ها سفید یا تعدادی از برگ‌ها سفید و لوله‌ای	۳
نسبتا متحمل	تاخیر شدید رشد، اغلب برگ‌ها لوله‌ای، تعدادی از برگ‌ها بلند	۵
حساس	توقف کامل رشد، اغلب برگ‌ها خشک، تعدادی از گیاهان مرده	۷
بسیار حساس	تقریبا همه گیاهان مرده یا خشک	۹

۲-۲- تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های حاصل از بررسی ارقام با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند. نظر به اینکه ازمایش در دو زمان مجزا به دلیل کوچک بودن فضا انجام شد، داده ها به صورت مرکب تجزیه شد. تجزیه واریانس مرکب و ساده با استفاده از نرم‌افزار SAS در قالب طرح تجزیه مرکب انجام شد.

۳. نتایج و بحث

۳-۱- تجزیه واریانس صفت‌ها

نظر به معنی دار شدن اثر متقابل شرایط کشت و لاین، تجزیه واریانس برای هر محیط جداگانه انجام شد. نتایج تجزیه واریانس در شرایط شوری در جدول ۲ آمده است و طبق اطلاعات به دست آمده اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد بین لاین ها مشاهده گردید که این اختلاف از تنوع موجود در میان لاین‌ها حاصل می‌شود. در پژوهشی دیگر تمام صفات مورد آزمایش شامل تعداد پنجه، ارتفاع گیاه، طول ساقه، طول ریشه، وزن خشک ریشه، وزن خشک برگ، وزن خشک ساقه و زیست توده کاهش بسیار معنی داری یافتند (میردارمنصوری و همکاران، ۱۳۸۸).

جدول ۲:تجزیه واریانس صفت¬های مورد ارزیابی تحت تنش هشت دسی زیمنس

	میانگین مربعات								
منابع تغییر	درجه آزادی	تعداد پنجه	ارتفاع بوته	وزن خشک ساقه	تعداد برگ در بوته	وزن خشک ریشه	کددهی فنوتیپی	کلروفیل برگ	حجم ریشه
تکرار	۲	2/۸۰۴	۲۹/۹۳۱	۰/۱۰۹	۴/۶۳۴	۱/۳۰۵	1/۶۸۴	۶/۸۱۴	۵۰/۷۷۰
لاین	۹۵	۵/۸۹۷**	۲۶۴/۳۳۱**	۱/۴۹۹**	۲۴/۲۸۷**	۱۵/۹۷۱**	5/۸۳۵**	۵/۴۲۵**	۱۰۳۵/۹۸**
خطای	۱۹۰	۱/۰۳۳	۳۴/۶۲	۰/۱۴	۵/۱۳	۰/۱۸	۰/۳۵	۰/۱۵	۱۱/۸۶
ضریب تغییرات		۱۵/۵۱۵	۸/۶۶۷	۱۶/۱۲۷	۲۶/۶۰۳	۴/۳۸۸	9/۶۷۰	۷/۱۶۴	۳/۸۸۳

*معنی دار در سطح ۵ درصد، ** معنی دار در سطح ۱ درصد و ns عدم معنی داری را نشان می‌دهد.

۳-۲- همبستگی صفت‌ها

در بررسی همبستگی بین صفت‌ها بیشترین همبستگی مربوط به تعداد برگ در بوته و وزن خشک ساقه، به میزان 0/734 بود. همبستگی دیگر بین صفت‌های وزن خشک ریشه و حجم ریشه به میزان 0/679 مشاهده شد. برای دو صفت وزن خشک ساقه و ارتفاع بوته نیز به میزان ۰/۵۶۷درصد همبستگی وجود داشت (جدول ۳). تعیین همبستگی بین صفات مختلف به ویژه عملکرد دانه و اجزای آن و تعیین روابط علت و معلول آنها، به به نژادگران این فرصت را میدهد که مناسب ترین ترکیب اجزاء را که منجر به عملکرد بهتر و بیشتری شود را انتخاب کنند (بلوچزهی و کیانی، ۱۳۹۲) .

جدول ۳: همبستگی صفت‌های مورد ارزیابی تحت تنش شوری هشت دسی‌زیمنس

شماره صفت	صفت	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸

۱	تعداد پنجه	۱							
۲	ارتفاع بوته	-۰/۱۵۱	۱						
۳	وزن خشک ساقه	-۰/۲۷۹**	۰/۵۶۷**	۱					
٤	تعداد برگ در بوته	-0/۲۹۰**	۰/۳۰۷**	۰/۷۳٤**	۱				
٥	وزن خشک ریشه	۰/۰۸۳	۰/۲۰۹*	۰/۰۹۱	-۰/۰٤۲	۱			
٦	کد دهی ژنوتیپی	۰/۰۰٥	-۰/۳۷۳**	-۰/۳۲۲**	-۰/۲٦۲**	-۰/۱۹۹	۱		
۷	کلروفیل برگ	-۰/۲۲۳*	۰/۱٤۸	۰/۱٦٤	۰/۰۷۸	۰/۱۹۰	-۰/۰۲٤	۱	
۸	حجم ریشه	۰/۱٤۳	۰/۰۷۱	۰/۰۸۹	-۰/۰٦۹	۰/٦۷۹**	-۰/۰٥٥	۰/۰٤۸	۱

*معنی دار در سطح ۵ درصد، ** معنی دار در سطح ۱ درصد و ns عدم معنی داری را نشان می‌دهد.

۳-۳- رگرسیون صفت‌ها

در بررسی رگرسیون مرحله‌ای، صفت کددهی ژنوتیپی به عنوان متغیر وابسته و دیگر صفات به عنوان متغیر مستقل در نظر گرفته شدند، نتایج نشان داد صفت ارتفاع گیاه حدود ۰/۱۳۹ درصد از تغییرات کددهی ژنوتیپی گیاه را توجیه می‌نماید (جدول ۴). پس می‌توان گفت احتمالاً لاین‌های مقاوم به شوری دارای ساقه و برگ بیشتر و ارتفاع بلندتر هستند.

صبوری (۱۳۸٦) در مطالعه ای برای تنش شوری هشت دسی زیمنس بر متر در مرحله رشد رویشی ارقام برنج نشان داد که ارقام متحملی که از زیست توده بالایی برخوردار هستند، نسبت سدیم به پتاسیم کمتری نیز دارند و از این سازوکار برای مقابله با تنش شوری استفاده می‌کنند. در مطالعه صبوری (۱۳۸٦) صفت امتیاز ارقام به عنوان متغیر وابسته و سایر صفات به عنوان متغیر مستقل در نظر گرفته شد که صفت طول اندام هوایی 0/506 درصد از تغییرات توجیه نمود و همبستگی بین صفت امتیاز ارقام و طول اندام هوایی گیاه برابر با 0/415- گزارش شد (رابطه همبستگی منفی به علت کسب امتیاز پایین‌تر برای ارقام متحمل تر می باشد). در مطالعه اخیر نیز همبستگی بین صفت کددهی ژنوتیپی و ارتفاع بوته برابر با 0/373- مشاهده شد.

در تحقیقی Ismail و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که وزن خشک و تر ساقه و درصد سبز بودن گیاه برنج می‌تواند معیار مناسبی جهت ارزیابی تحمل گیاه به شوری باشد. در مطالعه ای نشان داده شد که با افزایش شوری ارتفاع بوته، وزن خشک ریشه و اندام هوایی و عملکرد ارقام مورد آزمایش به طور معنی داری کاهش یافت (Puvanitha and Mahendran, 2017) . در پژوهش دیگری رحیمی و همکاران (۱۳۸۹) عنوان کردند که عملکرد دانه در برنج با مساحت برگ پرچم، تعداد خوشه در بوته و طول دوره رویشی همبستگی مثبت و معنیداری داشت. با این وجود، در رگرسیون به روش گام به گام برای گزینش صفات توجیه کننده عملکرد دانه،

صفات ارتفاع بوته، تعداد دانه پوک در خوشه، طول دوره رویشی، طول خوشه، وزن هزار دانه و مساحت برگ پرچم، وارد مدل شدند که با توجه به میزان درجه تبیین، ۷۶/۵ درصد از کل تغییرات عملکرد دانه توسط این صفات توجیه شد (رحیمی و همکاران، ۱۳۸۹). در پاسخ به شوری نسبت بخش هوایی به ریشه کاهش می یابد. در تحقیقی دیگر محمدزاده و همکاران(۱۳۸۹) نشان دادند که در برنج صفات بیوماس کل، تعداد دانه پر و پوک، وزن کاه و کلش اثر معنی‌داری در تنش شوری دارد و صفات ارتفاع گیاه ، تعداد پنجه موثر اثر معنی‌داری نداشت. ایزددوست و همکاران (۱۳۹۲) در تحقیقات خود عنوان کردند که تنش شوری در مراحل ابتدایی رشد بر روی ویژگی های مورفولوژیک شامل طول شاخساره و ریشه، وزن خشک شاخساره و ریشه، نسبت طول ریشه به طول شاخساره و بیوماس رویشی اثر دارد و طول ریشه و شاخساره ها با افزایش شوری کاهش می یابد.

جدول شماره ۴: رگرسیون مرحله ای برای صفت کددهی ژنوتیپی به عنوان وابسته و سایر صفات به عنوان متغیر مستقل

متغیر وارد شده به مدل	ضریب رگرسیون	خطای استاندارد	F	R^2
ارتفاع گیاه	۰/۳۷۳	۰/۰۱٤	۱٥/۲۲٦	۰/۱۳۹**

*معنی دار در سطح ۵درصد، ** معنی دار در سطح ۱ درصد و ns عدم معنی داری را نشان می‌دهد.

۴.نتیجه گیری

لاین های اصلاحی از نظر کد ژنوتیپی بر اساس جدول (۱) در چهار گروه کدبندی شدند که این موضوع نتایج تجزیه واریانس مبنی بر وجود اختلاف بین لاین‌ها را تایید می‌کند.

همچنین هیچ‌کدام از لاین ها، کد یک که نشان‌دهنده لاین بسیار متحمل به شوری است را دریافت ننمودند و همه لاین ها اثر تیمار شوری را نشان دادند. اکثر لاین ها دارای کد ژنوتیپی پنج (نسبتا متحمل به شوری) بودند و می توان گفت نتایج لاین های حاصل از تلاقی رقم های اهلمی طارم و ندا در مرحله رویشی نسبتا به شوری مقاوم می باشند. نتایج حاصل از خوشه بندی لاین‌ها نیز این نتیجه را تایید نمودند. نتایج حاصل از رگرسیون نیز نشان دهنده این موضوع بود که لاین های مقاوم به شوری دارای ساقه و برگ بیشتر و ارتفاع بلندتر هستند. جدول همبستگی صفات هم مشخص نمود که تعداد پنجه با وزن خشک ساقه نسبت عکس دارد. از نتایج این تحقیق می توان برای برنامه‌های انتخاب پروژه های اصلاحی استفاده نمود.

منابع

۱- اصفهانی م. ۱۳۷۷. بررسی واکنش های فیزیولوژیکی و مولکولی ارقام مختلف برنج به شوری و پساب. پایان نامه دکترا، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۲- ایزددوست ه.، سمیع زاده ح.، ربیع ب و عبدالهی ش. ۱۳۹۲. ارزیابی تحمل به شوری در ارقام و لاین های برنج (*Oryza sativa L.*) با تاکید بر شاخص های تحمل به تنش. فصلنامه تحقیقات غلات، دوره ۳، شماره ۳، ص: ۱۶۷-۱۸۰.

۳- بلوچزهی ا و کیانی غ. ۱۳۹۲. تعیین شاخص انتخاب برای بهبود عملکرد در برنج از طریق تجزیه علیت. پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی، دوره 5، شماره ۱۲، ص: ۷۵-۸۴.

٤- ربیعی ب.، مردانی ز.، صبوری ح و صبوری ع. ۱۳۹۲. مکانیابی QTLهای کنترلکننده ی تحمل به تنش های خشکی و شوری در مرحله جوانه زنی برنج. نشریه علوم گیاهان زراعی ایران، دوره۴۴، شماره ۴، ص: ۵۸۵-۵۹۶.

٥- رحیمی م.، ربیعی ب.، رمضانی م و موافق ص. ۱۳۸۹. ارزیابی صفات زراعی و تعیین متغیرها برای بهبود عملکرددر برنج. نشریه پژوهشهای زراعی ایران، دوره ۸، شماره ۱، ص: ۱۱۱-۱۱۹.

٦- میرعرب رضی م.، شیرزادیان خرم آباد ر.، صبوری ح.، ربیعی ب و حسینی مقدم ح. ۱۳۹۸. پاسخ لاین های نوترکیب برنج ایرانی (*Oryza sativa* L.) به تنش شوری در مرحله گیاهچه. پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی، دوره ۱۱، شماره ۲۹، ص: ۶۵ – ۸۴ .

۷- محمدزاده م.، پیغمبری س.ع.، نبی پوری ع و نوروزی م. ۱۳۸۹. ارزیابی عملکرد و صفات مورفولوژیکی در ژنوتیپهای متحمل و حساس به شوری در برنج. زراعت و اصلاح نباتات ایران، دوره ۶، شماره ۴، ص: ۶۱-۷۱.

۸- میردارمنصوری ش.، بابائیان جلودار ن و باقری ن. ۱۳۸۸. ارزیابی مقاومت ژنوتیپ های مختلف برنج ایرانی (*Oryza sativa L.*) تحت تنش شوری (NaCl). دانشور علوم زراعی، دوره ۲، شماره ۳، ص: ۵۸-۴۹ .

۹- صبوری ح. ۱۳۸۶. ارزیابی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم برنج ایرانی برای تحمل به شوری و مکان یابی QTL های مرتبط با آن. پایان نامه دکترا، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

۱۰- صبوری ح.، رضایی ع و مومنی ع. ۱۳۸۷. ارزیابی تحمل به شوری در ارقام بومی و اصلاح شده برنج ایرانی. نشریه علوم آب و خاک(علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی)، دوره ۱۲، شماره ۴۵ (الف)، ص: ۴۷-۶۳.

11- Choudary AD., Haritha G., Sunita T., Krishanmurthy SL., Divya B., Padmavathi G., Ram T and Sarla N. 2016. Haplotyping of rice genotypes using SSRs associated with salt tolerance. Rice Sci, 23, 317–325 .

12- FAO. 2019.

13- Flowers T.J., Troke, P.F. and Yeo A.R. 1977. The mechanisms of salt tolerance in halophytes. Annual review of plant physiology, 28, 183-221.

14- Flowers T.J. and Yeo A.R. 1988. Salinity and rice: A Physiological approach to breeding for resistance. Proceedings International Congress Plant Physiology, New Delhi, India. 2, 953-959.

15- Ganie S.A, Molla K.A, Henry R.J, Bhat K.V and Mondal T.K. 2019. Advances in understanding salt tolerance in rice. Ther Appl Genet, 132,851–870 .

16- Gholizade M. 2013. Study effect salt stress genotypes rice in germination stage. Journal Biotechnology Cells-Molecular, 2(6), 75-81.

17- Ghosh B and Chakma N. 2015. Impacts of rice intensification system on two C. D. blocks of Barddhaman district. West Bengal of Current Science, 109(2), 342-346.

18- Ismail A.M., Heuer S., Thomson M.J and Wissuwa M. 2007. Genetic and genomic approaches to develop rice germplasm for problem soils. Plant Molecular Biology, 65, 547–570.

19- Jahan N., Zhang Y., Lv Y., Song M., Zhao C.H., Hu H., Cui Y., Wang Z.H., Yang S.H., Hu J., Ye G., Qian Q., Gao Z.H and Guo.L. 2019. QTL analysis for rice salinity tolerance and fine mapping of a candidate locus *qSL7* for shoot length under salt stress. Plant Growth Regulation, 90, 307–319.

20- Kibria M.G., Hossain M., Murata Y and Hoque M.A. 2017. Antioxidant defense mechanisms of salinity tolerance in rice genotypes. Rice Science, 24, 155-162.

21- Kordrostami M., Rabiei B and Kumleh H.H. 2017. Different physiobiochemical and transcriptomic reactions of rice (*Oryza sativa L.*) cultivars differing in terms of salt sensitivity under salinity stress. Environmental Science and Pollution Research, 24, 7184.

22- Krishnamurthy SL., Sharma SK., Kumar V., Tiwari S and Singh NK. 2015. Analysis of genomic region spanning Saltol using SSR markers in rice genotypes showing differential seedlings stage salt tolerance. J Plant Biochem Biot, 25, 331–336.
23- Kumar V., Shiram V., Jawali N and Shitole M.G. 2007. Differential response of indica rice genotypes to NaCl stress in relation to physiological and biochemical parameters. Archives of Agronomy and Soil Science, 53(2), 581-592.
24- Mirdarmansuri S.H. 2017. Introducing the promising salt tolerance involved genes in rice based on the microarray data analysis. Science and Agricultural Industries, 18, 65-76.
25- Moradi F. 2002. Physiological characterization of rice cultivars for salinity tolerance during vegetative and reproductive stages. PhD Thesis, Los Banos, Philipines.
26- Nabiollahi K., Taghizadeh-Mehrjardi R., Kerry R and Moradian S. 2017. Assessment of soil quality indices for salt-affected agricultural land in Kurdistan Province, Iran. Ecological Indicators, 83, 482-494.
27- Park G.H., Kim J.H and Kim K.M. 2014. QTL analysis of yield components in rice using a cheongcheong/nagdong doubled haploid genetic map. American Journal of Plant Sciences, 5, 1174-1180
28- Puvanitha S and Mahendran S. 2017. Effect of Salinity on Plant Height, Shoot and Root Dry Weight of Selected Rice Cultivars. Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences , 4(4), 126-131.
29- Shiro M., Katsuya Y., Michio K., Mitsutaka T and Hiroshi M. 2002. Relationship between the distribution of Na and the damages caused by salinity in the leaves of rice seedling grown under a saline condition. Plant Production Science, 5, 269-274.
30- Singh M.P., Singh D.K and Rai M. 2007. Assessment of growth, physiological and biochemical parameters and activities of antioxidant enzymes in salinity tolerant and sensitive basmati rice varieties. Journal of Agronomy and Crop Science, 193, 398-412.
31- Tack J., Singh R.K., Nalley L.L., Viraktamath B.C., Krishnamurthy S.L., Lyman N and Jagdish K.S. 2015. High vapor pressure deficit drives salt-stress induced rice yield losses in India. Glob Change Biol, 21,1668–1678 .
32- Tiwari S., Krishnamurthy S.L., Kumar V., Singh B., Rao A.R., Mithra S.V A., K. Singh A and K. Singh N. 2016. Mapping QTLs for salt tolerance in rice (*Oryzasativa* L.) by bulked segregant analysis of recombinant inbred lines using 50K SNP chip. PLoS ONE, 11, e0153610.
33- Wang Z., Cheng J., Chen Z.H., Huang J., Bao Y., Wang J and Zhang H. 2012. Identification of QTLs with main, epistatic and QTL x environment interaction effects for salt tolerance in rice seedlings under different salinity conditions. Theor Appl Genet, 125, 807–815.
Zhang Y., Lv Y., Jahan N., Chen G., Ren D and Guo L. 2018. Sensing of abiotic stress and ionic stress responses in plants. International Journal of Molecular Sciences, 19, 3298.

Application of nanocarriers for herbal drug delivery

Athar Sadat Javanmard[1*]

1- Department of Biology, Faculty of Sciences, Yasouj University

**Corresponding Author Email: a.javanmard@yu.ac.ir*

Abstract

Herbal medicine is a therapeutic activity in which plants, plant ingredients, herbal formulations, and herbal extracts are involved. Synthetic plant extracts mainly contain therapeutically active plant components that are isolated from different parts of the plant or plant extracts or both of them. Several studies have confirmed the effectiveness of natural plant metabolites for human consumption in cell culture media and preclinical animal model systems. However, these effects of plant metabolites, which have been investigated *in vitro* and *in vivo*, may not be clinically applicable to humans. Reasons for this problem include poor solubility and bioavailability, poor absorption and stability, lack of binding to membrane lipids, and low kinetics of herbal medicines. Nanoparticles are a class of materials that are limited in size to 100 nanometers. Nanoparticles cause important advances in biotechnology because their physicochemical and biological functions are adjustable. During the past decades, significant advances have occurred in the successful development of novel drug delivery systems to encapsulate active plant metabolites, including organic, inorganic, and hybrid nanoparticles. Advanced formulas have shown many advantages over earlier conventional systems. These advantages include improved solubility, bioavailability, drug activity, stability, distribution, stable delivery, physical and chemical degradation, and reduced drug toxicity. This paper reviews the organic nanocarriers designed for delivering herbal drugs, including lipid-based nanocarriers and polymer-based nanocarriers, their structural and functional characteristics, and their advantages and disadvantages.

Keywords: Bioavailability, Herbal metabolites, Nanoparticles, Targeted drug delivery

کاربرد نانوحامل‌ها برای تحویل داروهای گیاهی

اطهر السادات جوانمرد[1*]

۱-استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه یاسوج

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: a.javanmard@yu.ac.ir

چکیده

گیاه‌درمانی به عنوان فعالیت درمانی در نظر گرفته می شود که گیاهان، مواد تشکیل‌دهنده گیاهان، فرمولاسیون گیاهی و عصاره‌های گیاهی ساختنی در آن دخالت دارند. عصاره‌های گیاهی ساختنی عمدتا شامل اجزای فعال گیاهی از نظر درمانی هستند که از بخش‌های مختلف گیاه یا عصاره‌های گیاهی جداسازی می‌شوند و یا مخلوطی از مواد دارای این دو منشأ هستند. بسیاری از پژوهش-های انجام شده در این زمینه، کارآیی متابولیت‌های طبیعی گیاهی برای مصرف انسانی در محیط کشت سلول و همچنین سیستم‌های مدل جانوری پیش‌بالینی را تأئید کرده اند. با این حال، این اثرات مشاهده شده از متابولیت‌های گیاهی در محیط آزمایشگاهی و در بدن موجود زنده، ممکن است قابلیت استفاده بالینی برای انسان را نداشته باشند. از جمله دلایل این مسئله می‌توان به حلالیت و دسترسی زیستی ضعیف ، جذب و پایداری ضعیف، عدم اتصال به لیپیدهای غشایی و کینتیک پایین داروهای گیاهی اشاره کرد. نانوذرات کلاس خاصی از مواد هستند که اندازه آنها به ۱۰۰ نانومتر محدود می¬گردد. نانوذرات عامل پیشرفت‌های مهمی در نانوفناوری زیستی هستند، به دلیل اینکه عملکرد فیزیکوشیمیایی و زیستی آنها قابل تنظیم است. طی دهه‌های گذشته، پیشرفت‌های چشمگیری در ایجاد موفق سیستم‌های تحویل داروی جدید برای کپسوله کردن متابولیت‌های فعال گیاهی، شامل نانوذرات آلی، معدنی و هیبرید، رخ داده است. تأیید شده است که فرمول‌های پیشرفته دارای مزایای بسیاری نسبت به سیستم‌های معمول مورد استفاده قبلی هستند. این مزیت‌ها شامل بهبود حلالیت، دسترسی‌زیستی، فعالیت دارویی، پایداری، توزیع، تحویل پایدار، تجزیه فیزیکی و شیمیایی و کاهش سمیت دارو می‌باشد. در این مقاله مروری به نانوحامل‌های آلی طراحی شده برای تحویل داروهای گیاهی شامل نانوحامل‌های مبتنی بر لیپیدها و نانوحامل‌های مبتنی بر پلیمرها، ویژگی های ساختاری و عملکردی، مزایا و معایب آنها پرداخته می‌شود.

واژگان کلیدی: نانوذرات، متابولیت‌های گیاهی، دسترسی‌زیستی، تحویل هدفمند دارو

۱. مقدمه

بر اساس اطلاعات سازمان بهداشت جهانی (WHO)، در کشورهای درحال‌توسعه حدود ۸۰ درصد جمعیت از داروهای گیاهی برای حفظ سلامتی عمومی خود استفاده می‌کنند. بر اساس تعریف این سازمان، می‌توان گیاه درمانی را به عنوان فعالیت درمانی در نظر گرفت که گیاهان، مواد تشکیل‌دهنده گیاهان، فرمولاسیون گیاهی و عصاره‌های گیاهی ساختنی در آن دخالت دارند. عصاره‌های گیاهی ساختنی عمدتا شامل اجزای فعال گیاهی از نظر درمانی هستند که از بخش‌های مختلف گیاه یا عصاره‌های گیاهی جداسازی شده‌اند و یا مخلوطی از مواد دارای این دو منشأ هستند (WHO, 2000). این مواد معمولا از بخش‌های مختلف گیاه مانند ریشه،

ساقه، برگ، گل، بذر یا محصولات جانبی گیاهی مانند صمغ و رزین جداسازی می‌شوند (Bent, 2008). درمان مبتنی بر گیاه‌درمانی می‌تواند به صورت کارآمد برای پیشگیری و درمان بدخیمی‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرد، به دلیل اینکه عمدتا بر بخش‌های شیمیایی موجود در قسمت‌های مختلف گیاه تمرکز می‌کند. این مواد طبیعی، در مقایسه با شیمی‌درمانی به صورت معنی‌داری سلامت بیمار را بهبود بخشیده و اثرات مضر را کاهش می‌دهند (Riyaz et al., 2018).

تمایل به تولید مولکول‌های سنتزی تجاری روز به روز کمتر می‌شود و پژوهش‌ها برای ساخت ترکیبات فعال مبتنی بر طبیعت، علی‌رغم موانعی که بر سر راه آن وجود دارد، توجه بیشتری را به خود جلب می‌کند (Kinghorn et al., 2011). در حال حاضر، چندین دارو که حاوی عوامل درمانی طبیعی در ترکیب خود هستند، به صورت تجاری در دسترس است، به عنوان مثال، داروی درمان مالاریا (آرتموتیل) از یک گیاه دارویی چینی به نام Artemisia annua مشتق شده است، برای درمان سرطان از پاکلیتاکسل و آنالوگ‌های آن استفاده می‌شود که از گیاه Taxus brevifolia مشتق شده است و همچنین وین‌بلاستین و وین‌کریستین برای درمان سرطان از Catharantous roseus استخراج می‌شوند. در درمان بیماری کبد، سیلیمارین به کار می‌رود که از *Silybum marianum* به دست می‌آید (Habtemariam, 2020).

ذرات نانواندازه یا نانوذرات کلاس خاصی از مواد هستند که اندازه آنها به ۱۰۰ نانومتر محدود می‌گردد (Yadav et al., 2011). نانوذرات زمینه مهمی از پژوهش‌ها در قرن حاضر هستند و تحولات زیادی در زمینه نانوفناوری مانند درمان، پایش، تشخیص و کنترل سیستم‌های زیستی ایجاد کرده‌اند. نانوذرات یا نانومواد باعث پیشرفت‌های مهمی در نانوفناوری زیستی شده‌اند، به دلیل اینکه عملکرد فیزیکوشیمیایی و زیستی آنها در برابر مواد همکارشان قابل تنظیم است (Elzoghby et al., 2012). مشکلات اصلی داروهای رایج، غیراختصاصی بودن، عدم حلالیت یا حلالیت اندک و عدم توانایی در ورود به داخل سلول‌هاست که فرصت بسیار خوبی را برای ایفای نقش نانوذرات فراهم می‌کند (Sandhiya and Ubaidulla, 2020).

داروهای گیاهی جایگاه خوبی را در صنایع دارویی به خود اختصاص داده‌اند، زیرا اثرات مفید آنها شناخته شده است و اثرات مضر جانبی آنها بسیار کم و قابل چشم‌پوشی است (Kumar and Rai, 2012). با وجود اینکه داروهای گیاهی دارای عملکردهای درمانی زیادی بر علیه بسیاری از بیماری‌ها هستند ولی اثر آن بر سیستم زیستی انسان محدود است. بر اساس گزارش‌ها، بیش از ۷۰ درصد داروهای فرموله شده گیاهی دارای حلالیت ضعیف در آب هستند که یک عامل محدودکننده در جذب دارو پس از مصرف خوراکی آن است (Krishnaiah, 2010). محدودیت در دسترسی زیستی ترکیبات فعال طبیعی شامل حلالیت ضعیف، پایداری ضعیف در برابر اسید معده، متابولیسم ضعیف در اثر حضور میکروفلورای دستگاه گوارش، جذب ضعیف از عرض دیواره روده، عدم توانایی در اتصال به لیپیدهای غشایی، اندازه مولکولی و وزن مولکولی بالا و کینتیک پایین، عواملی هستند که آزمون‌های بالینی را با شکست مواجه کرده‌اند (Teeranachaideekul et al., 2007; Amol and Pratibha, 2014; Siddiqui and Sanna, 2016).

در این رابطه، سیستم‌های تحویل داروی جدید و نانوحامل‌های ایجاد شده برای داروهای گیاهی باید برخی پیش‌نیازها را برآورده کنند، مانند تحویل مناسب دارو با نرخ متناسب با نیاز بدن در طول دوره درمان وتحویل بخش فعال داروی گیاهی به جایگاه عملرد آن (Aqil et al., 2013). روش‌های زیادی برای افزایش حلالیت، پایداری، دسترسی زیستی و نفوذپذیری دارو به معده و روده ایجاد شده‌اند (Adhami et al., 2013). یک راهکار برای خنثی کردن این مشکلات، کپسوله کردن متابولیت‌های طبیعی گیاهی در نانوذرات قابل هضم و سازگار با محیط زیستی است (Bharali et al., 2011). در این مسیر، ویژگی‌های اصلی نانوحامل‌ها مانند اجزای تشکیل دهنده (آلی، معدنی یا هیبرید)، اندازه (کوچک، متوسط یا بزرگ)، شکل (کروی، میله ای یا مکعبی) و ویژگی‌های سطحی به عنوان عامل هدایت‌کننده برای تنظیم ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آنها در نظر گرفته می‌شوند. هدف کلی به کارگیری نانوحامل‌ها در تحویل دارو، درمان یک بیماری به صورت کارآمد و با کمترین اثرات جانبی و پیامدهای بالقوه است (ud Dinet al.,

2017). به کارگیری نانوحامل‌ها برای درمان‌های گیاهی، مساحت سطح بیشتری را فراهم می‌کند، حلالیت و دسترسی زیستی را افزایش می‌دهد و هدفمندی دقیق دارو را تسهیل می‌کند. هدفمندسازی دارو تلاشی برای رهاسازی مولکول دارو در سطح خاصی از سیستم برای دوره طولانی است تا پاسخ را در بافت های بیمار تحریک کند. نانوحامل‌ها برای تحویل یک داروی قوی به منطقه مورد نیاز در بدن و برای تحریک یک واکنش دارویی قوی مهم هستند. نانوحامل‌ها بر اساس مواد حامل مورد استفاده به حامل‌های آلی و غیرآلی دسته‌بندی می‌شوند (Kozlova and Epple, 2013).

۱-۱- مکانیسم سلولی جذب نانوذرات و تأثیر آن بر تحویل دارو

نانوذرات خلاقیت مهمی در زمینه تشخیص و درمان در پزشکی معاصر هستند. آنها سیستم‌های تحویل دارو در مقیاس نانومتر هستند و مکانیسم‌های جذب و روش‌های ورود آنها به سلول‌ها از یکدیگر متفاوت و وابسته به ویژگی‌های آنها می‌باشد. برای درمان موفق، درک اثر متقابل مکانیسم‌های جذب و ویژگی‌های نانوذرات از اهمیت حیاتی برخوردار است (Teskac, 2009). نانوذرات می‌توانند از طریق مسیرهای فاگوزیستوزی و غیرفاگوسیتوزی (مانند اندوسیتوز به واسطه کلاترین، اندوسیتوز بواسطه کاوئول و ماکروپینوسیتوز) به سلول‌ها وارد شوند. روش وارد شدن نانوذره به سلول، محل رها شدن دارو در سلول را مشخص می‌کند که می‌تواند محیط اسیدی و سرشار از آنزیم لیزوزوم باشد یا در سیتوزول یا اندامک هایی به غیر از لیزوزوم رها شود. این پروسه می‌تواند با انتخاب دقیق اجزای تشکیل دهنده نانوذره و طراحی دقیق ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آنها (اندازه، شکل، ویژگی‌های سطحی) کنترل شود. روش فاگوسیتوز اغلب نامطلوب است، زیرا هدف اصلی آن حذف مواد بیگانه از بدن می‌باشد و بنابراین جذب دارو از این مسیر، اغلب منجر به از دست رفتن آن می‌شود. برای پرهیز از این مکانیسم ورود، ذرات باید کوچک بوده و سطح آبدوست داشته باشند (Zhao and Martina, 2018). با این حال، موفق‌ترین روش، اتصال لیگاند به سطح نانوذره می‌باشد که منجر به جذب غیرفاگوسیتوزی آن می‌شود. دانش در مورد مکانیسم‌های جذب سلولی برای پیش‌بینی تحویل دارو به جایگاه هدف در سلول بسیار مهم است و می‌تواند منجر به پایداری بهتر نانوذره و حفظ فعالیت زیستی داروهای ناپایدار گردد. نانوذرات اغلب از طریق مسیر اندوسیتوز وابسته به کلاترین و کاوئول یا مستقل از آنها به سلول وارد می‌شوند (Foroozandeh, 2018).

۱-۲- نانوحامل‌ها

نانوحامل ها به صورت امیدوارکننده‌ای برای غلبه بر مشکلات و مسائل مربوط به سیستم‌های تحویل داروی معمولی مانند غیراختصاصی بودن، اثرات جانبی، رها شدن انفجاری و تخریب زیانبار جمعیت بزرگی از سلول‌های نرمال مورد استفاده قرار گرفته‌اند. نانوحامل‌ها، دسترسی زیستی و کارایی درمانی داروها را بهبود بخشیده و همچنین تجمع ترجیحی در جایگاه هدف را فراهم می‌کنند (Ni, 2017). در حال حاضر، تعداد زیادی از نانوحامل‌ها تولید شده‌اند، ولی تنها برخی از آنها به صورت بالینی برای تحویل مواد مورد تائید قرار گرفته‌اند، دلیل این تائید، به ویژه در مورد عوامل ضدسرطان، عملکرد آنها در جایگاههای هدف بوده است (Nagalingam, 2017).

ذرات نانوحامل دارای اندازه متنوع هستند و محدوده آنها از ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر، مورد قبول‌ترین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی را ارائه می‌کند. مزیت اصلی کاهش لندازه حامل‌ها در حد نانومتر، بهبود حلالیت، کاهش دوز دارو و اثرات جانبی آن و همچنین افزایش جذب داروهای گیاهی در مقایسه با آماده‌سازی عصاره خام گیاه می‌باشد (Liu and Feng, 2015).

لیپیدها یک عامل مناسب برای افزایش نفوذ داروها در دستگاه گوارش هستند. آنها حلالیت دارو را در محیط معده افزایش داده و در نتیجه متابولیسم گذر اول[100] را کاهش می‌دهند، زیرا انتشار دارو می‌تواند از طریق لنف به سیستم گردش خون انجام شود

[100] First Pass Metabolism

(Ni, 2017). بنابراین تعدادی از نانوحامل‌ها مبتنی بر لیپیدها طراحی و ساخته شده‌اند. در اینجا، چند نوع نانوحامل آلی به کار رفته برای حمل داروهای گیاهی مورد بحث قرار می‌گیرد.

۱-۳- نانوحامل‌های مبتنی بر لیپید

۱- نانوحامل‌های جامد لیپیدی[۱۰۱]: نانوحامل جامد لیپیدی (SLN) یک حامل داروی کلوئیدی است که در اوایل دهه ۱۹۹۰ با محدوده اندازه ۵۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر ایجاد شد. مزیت اصلی SLN این است که یک ماتریکس لیپیدی به شدت آبگریز برای داروهایی فراهم می‌کند که به درون آن منتشر می‌شوند (Luo et al., 2011)، امکان کپسوله شدن محدوده وسیعی از مولکول‌ها (مانند داروها، آنتی‌ژن‌ها، پروتئین‌ها و نوکلئوتیدها) را فراهم کرده و همچنین تحویل داروی بارگذاری شده را به بافت‌ها و سلول های اختصاصی افزایش می‌دهد. بهبود پایداری دارو در شرایط آزمایشگاهی و در شرایط بدن و کاهش اثرات مضر آن نیز از ویژگی‌های قابل قبول SLN می‌باشد (Rostami et al., 2014). SLN به نانوامولسیون‌ها بسیار شبیه است، به استثنای اینکه لیپیدهای مایع و جامد برای فرمولاسیون SLN مورد استفاده قرار می‌گیرند، در حالیکه تنها لیپیدهای مایع در نانوامولسیون‌ها استفاده می‌شوند. پرکاربردترین نوع این نانوحامل، SLN بارگذاری شده توسط پورآرین در موش‌های صحرایی است که با جذب سریع، دسترسی زیستی نسبتا بهبودیافته و افزایش غلظت بافتی در اندام‌های هدف (قلب و مغز) شناخته می‌شود (Luo et al., 2011; 2013). گروه پژوهشی دیگر، SLN بارگذاری شده توسط تریپتولید زا به عنوان یک محصول آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی تهیه کردند که کاهش معنی‌دار در فعالیت گلوتاتیون و میلوپراکسیداز را نشان داد. هدف از ایجاد این نوع SLN، بهبود حلالیت، کاهش سمیت، پرخونی و خارش در دستگاه گوارش از طریق به حداقل رساندن تماس مستقیم دارو با سطح موکوسی و رها شدن تدریجی آن دارو بود (ud Din et al., 2017).

۲- نانوامولسیون: نانوامولسیون به معنای سیستم کلوئیدی ناهمگون شفاف پایدار و اندازه قطره آن کمتر از ۱۰۰ نانومتر است. به صورت عمومی، نانوامولسیون از روغن (لیپید مایع) پایدار و آب با کمک سورفاکتانت و کوسورفاکتانت تشکیل می‌شود (Saraf, 2018). این سیستم با ویژگی‌های رهاسازی هدفمند پایدار، پایداری اجزای حل‌شونده، افزایش نفوذپذیری مواد به موکوس و پوست، خاصیت آبگریزی متنوع مواد حل‌شونده، بهبود جذب دارو، کاهش ویسکوزیته، القای درد یا واکنش‌های آلرژیک کمتر و همچنین تولید ساده شناخته می‌شود (Mahato, 2017). علاوه بر این، جذب روده‌ای نانوامولسیون به فرایندهای حمل لنفی نسبت داده می‌شود که دسترسی زیستی خوراکی مواد کپسوله شده را افزایش می‌دهد (Chhabra et al., 2011; Lovelyn and Attama, 2011). نانوامولسیون به عنوان یک حامل جذاب برای تحویل داروها و اسانس عمل می‌کند (Topuz et al. 2016; Zhang et al., 2017). داروهای گیاهی شامل کامپتوتسین، روتین، جنیستئین و رزوراتول و همچنین روغن‌های گیاه *Brucea javanica*، کوایزنوئید و جدوار در نانوامولسیون برای کاربردهای مختلف بارگذاری شده است (Wang et al., 2009; Patel and Joshi, 2012).

۳- نانوکپسول: نانوکپسول یک سیستم کلوئیدی نانووزیکولی است که ساختار هسته-پوسته را نشان می‌دهد. در نانوکپسول، دارو در یک مخزن یا در یک حفره‌ی احاطه شده با پوشش یا غشای پلیمری محبوس می‌شود (Bonifácio et al., 2014). حفره می‌تواند حاوی ماده فعال در شکل مایع (یک هسته روغنی یا آبی) یا به شکل جامد باشد. ساختار هسته-پوسته، ویژگی‌های اصلی نانوامولسیون‌ها، به خصوص رها شدن دارو را کنترل می‌کند (Chen et al., 2009). از دیگر مزیت‌های نانوامولسیون‌ها به عنوان یک سیستم حامل می‌توان به کارایی بالا در کپسوله کردن دارو به دلیل بهینه‌سازی حلالیت دارو در هسته، محتوای پایین پلیمر در مقایسه با دیگر سیستم‌ها، حفاظت دارو در برابر عوامل تجزیه‌کننده مانند pH و نور توسط پوسته پلیمری و کاهش خارش بافتی به دلیل پوسته پلیمری اشاره کرد (Abellan-Pose et al., 2016). به عنوان نمونه، کریستال محصول طبیعی گیاهی مشهور،

[101] Solid Lipid Nanoparticles

آرتمیسینین از *Artemisia annua* به منظور رها شدن کنترل شده در پلی‌الکترولیت‌ها (کیتوسان، ژلاتین و آلژینات) کپسوله شده است (Chen et al., 2009).

۴- ترانسفروزوم: لیپوزوم‌های معمولی به صورت عمیق در پوست نفوذ نمی‌کنند و به لایه بیرونی پوست محدود می‌شوند. بنابراین، کلاس‌های جدید وزیکول‌های لیپیدی مانند ترانسفروزوم به عنوان نوع پیشرفته‌تر لیپوزوم‌ها ایجاد شده‌اند (Nagalingam, 2017)، که یک حامل الاستیک مبتنی بر لیپید، بسیار انعطاف پذیر و دارای غشاهای با قدرت بالای تغییر شکل می‌باشد. ترانسفروزوم ارسال مواد به بافت‌های عمقی‌تر پوست را از طریق روش غیرخوراکی افزایش می‌دهد (Prabhu et al., 2015). ترانسفروزوم از فسفولیپید و یک سورفاکتانت تک زنجیر تشکیل شده است که الاستیسیته و توانایی تغییر شکل وزیکول را تأمین می‌کند (Chauhan and Tyagi, 2018). این ساختار منحصر به فرد، انتقال برخی داروهای آبدوست، آبگریز یا دوگانه‌دوست را ممکن می‌کند و بنابراین می‌تواند به عنوان حامل دارو برای مولکول‌های کوچک، پپتیدها، پروتئین‌ها و ترکیبات گیاهی مورد استفاده قرار گیرد و همچنین می‌تولند مولکول‌های دارو با محدوده وسیعی از حلالیت را همراهی کند (Saraf, 2010). از طرف دیگر، ترانسفروزوم‌ها از نظر شیمیایی، به دلیل گرایش به تجزیه اکسیداتیو پایدار نیستند (Rai et al., 2017) ترانسفروزوم ginsenoside Rh1 از جینسنگ قرمز (ریشه *Panax ginseng* C. A. Mayer) برای نگهداری پوست ایجاد شده است که با استفاده از پوست پشتی رت در شرایط آزمایشگاهی، به صورت معنی‌داری، نفوذ بیشتر به پوست و جذب موضعی بالاتری را در مقایسه با اتوزوم و لیپوزوم معمول فراهم می‌کند (Choi et al., 2015).

۵- نیوزوم: نیوزوم یک وزیکول نانوکروی غیریونی با قطر ۱۰۰ نانومتر تا ۲ میکرومتر می‌باشد که مرکز آن آبکی است و با لایه‌هایی از لیپیدهای دوگانه‌دوست غیریونی احاطه شده است (Nagalakshmi et al., 2016). نیوزوم‌ها از نظر ساختاری شبیه به لیپوزوم هستند ولی دارای ظرفیت نفوذ بیشتر، شاخص پایداری و درمانی بیشتر برای دارو و سمیت کمتری هستند، بنابراین می‌توانند مزیت‌های بیشتری نسبت به لیپوزوم ارائه کنند (Rohilla et al., 2016). مزیت‌های نیوزوم شامل مقرون به صرفه بودن از نظر اقتصادی، حلالیت و انعطاف پذیری بالا و رهاسازی کنترل شده محتوای خود می‌باشد. بنابراین، آنها به طور وسیعی به عنوان یک حامل هدفمند برای نئوپلازیا، به عنوان حامل پپتید و هموگلوبین و برای تحویل ترانس‌درمال مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Thakkar and Brijesh, 2017). نیوزوم بارگذاری شده با رزورارتول یک کاندید بالقوه برای درمان موضعی سرطان‌های پوست است (Pando et al., 2015; Rameshk et al., 2018). به صورت مشابه، ژل موضعی عصاره *Zingiber cassumunar* Roxb. بارگذاری شده در نیوزوم دارای فعالیت ضدالتهابی بوده و نفوذ پوستی و پایداری مناسبی را در موش نشان داده است (Priprem et al., 2016).

۶- اتوزوم: اتوزوم یک لیپوزوم جدید است که به عنوان وزیکول الاستیک نرم و غیرتهاجمی مبتنی بر لیپید تعریف می‌شود و برای استفاده‌های موضعی، ترانس‌درمال و سیستمیک با توانایی بازدهی بالا برای تحویل داروهای آبگریز، آبدوست و اجزای فعال به لایه‌های عمقی‌تر پوست و همچنین گردش خون ایجاد شده است (ud Din et al., 2017; Ni, 2017). اتوزوم از آب، برخی فسفولیپیدها (فسفاتیدیل کولین، فسفاتیدیل سرین، فسفاتیدیل اتانول آمین و فسفاتیدیل گلیسرول) و غلظت نسبتا بالای الکل (۳۰ تا ۴۵ درصد، اتانول و ایزوپروپیل الکل) تشکیل می‌شود (Zhao et al., 2013; Abdulbaqi et al., 2018). این ترکیب توانایی بالاتری در تغییر شکل و همچنین بازدهی بیشتر به دام افتادن را برای اتوزوم فراهم می‌کند و در مقایسه با لیپوزوم، تحویل موضعی داروی فعال غلیظ و بازدهی انتقال ترانس‌درمال را افزایش داده و مدت زمان پایداری فیزیکی اتوزوم‌ها را از طریق انعطاف پذیری دولایه لسیتین افزایش می‌دهد (Abdulbaqi et al., 2018). از معایب اتوزوم می‌توان به افزایش سایز از چند ده نانومتر به میکرومتر و پایداری ضعیف آن به دلیل تبخیر الکل و سپس نشت ترکیبات بارگذاری شده به خارج از اتوزوم پس از گذشت مدتی زمان اشاره

کرد. برای کنترل کردن این مشکلات، الکل می‌تواند به همراه یک ترکیب تره‌هالوز و پروپیلن‌گلیکول مورد استفاده قرار گیرد (Liu and Feng, 2015).

۱-۴- نانوحامل‌های مبتنی بر پلیمر

۱- دندریمر: یک دندریمر، پلیمر سنتزی شبیه درخت است. این ساختار با داشتن یک تک هسته مرکزی شناخته می‌شود که دارای شاخه‌های فراوان از بازوهای متنوع ماکرومولکول‌هاست، تا بهتر برای جایگاه‌های ویژه هدفمند گردد. به صورت عمومی، دندریمرها از ترکیبات طبیعی یا سنتزی مانند قندها، نوکلئوتیدها و اسیدهای آمینه ساخته می‌شوند (Tolia and Choi, 2008; Liu et al., 2016). ویژگی منحصر به فرد این پلیمر این است که در طول تشکیل، ساختار و خاصیت آبگریزی آن به راحتی قابل کنترل است تا حلالیت، نفوذپذیری، سازگاری زیستی و توزیع زیستی و کلیرانس بیشتری به دست آید و در نتیجه اثرات جانبی کاهش پیدا کند (Estanqueiro et al., 2015). دندریمرهای پلی‌آمیدوآمین (PAMAM) به عنوان حامل‌هایی که می‌توانند در شکل، اندازه و سطوح، تنوع داشته و دارای مقیاس نانو و در عین حال دارای عملکرد باشند، مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Iacobazzi et al., 2017). بنابراین، می توان این دندیمرها را برای هدفمند کردن لیگاند برای اتصال به گیرنده‌های سلولی پیشنهاد کرد (Chittasupho et al., 2017). اندازه کوچک این دندریمرها، امکان حذف سریع آنها از بدن از طریق کلیه را فراهم می‌کند (Luong et al., 2016). علاوه بر این، حفره‌های وسیع داخلی این دندریمرها اجازه می‌دهد این ساختار با داروهای آبگریز از طریق پیوند کووالانسی یا غیرکووالانسی کانجوگه شود (Abderrezak et al., 2012; Ertürk et al., 2017).

۲- مسیل: میسل یک نانوذره پلیمری (۱۰-۱۰۰ نانومتر) است که از یک هسته-پوسته تشکیل شده است و در آن پلیمرهای دوگانه‌دوست با توانایی خودتجمعی به کار رفته‌اند (Biswas et al., 2016). افزایش حلالیت، تجمع درون سلولی دارو و محافظت در برابر تخریب توسط هسته درونی آبگریز و بهبود سازگاری زیستی، هدفمندی فعال برای جایگاه ویژه سلول و همچنین ویژگی‌های دمایی، pH و حساسیت نوری توسط لایه آبدوست فراهم می‌شود (Zou et al., 2016). استفاده از پلیمرهای همراه بلوک پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG)-پلی۳-کاپرولاکتون (PCL)، بلوک PEG-پلی لاکتید-کوگلیکولید و بلوک PEG-پلی c-بنزیل L-گلوتامات برای ساخت میسل به خوبی مطالعه شده‌اند. در بین آنها، PCL بر دیگر پلیمرها ترجیح دارد، به دلیل اینکه دارای ویژگی‌های قابل‌قبول مانند تجزیه‌پذیری زیستی، ایمنی، و ظرفیت بارگذاری بالا برای مواد زیستی محلول در لیپید است (Han et al., 2017). در این مورد، آرتمیسینین کپسوله شده در میسل PEG-PCL کانجوگه با LyP-1 (سیکلیزین-آمینواسید پپتید) ارائه شده است. نانوذره توسط گیرنده‌های p32/gC1qR شناسایی شده و به آنها متصل می‌گردد و در نتیجه دارو به سلول‌های سرطانی ویژه از بافت‌ها و رگ‌های لنفی تحویل داده می‌شود. این تغییر در میسل، تحویل آرتمیسینین به سلول‌های متاستازی آدنوکارسینومای سینه و بافت لنفی اطراف آن را در شرایط آزمایشگاهی و در شرایط بدن موجود زنده به شدت افزایش می‌دهد (Wang et al., 2012).

۳- نانوسفر: نانوسفر یک محلول کلوئیدی آبی دارای ماهیت بدون شکل یا کریستالی با محدوده اندازه ۱۰ تا ۲۰۰ نانومتر است که از یک هسته پلیمری کپسوله‌کننده اجزای فعال تشکیل شده است (Baldissera et al., 2017). مزیت اصلی این سیستم شامل رهاسازی تأخیری دارو، غلظت‌های منظم دارو در پلاسما، پایداری بیشتر در مایعات زیستی، محافظت بالا در برابر تجزیه آنزیمی و شیمیایی، بهبود در دسترسی زیستی، کارآیی ضدتوموری بالقوه، افزایش به دام انداختن کامل دارو و سمیت کمتر است (Wang et al., 2018). مهم‌ترین ویژگی نانوسفرها، سطح آبگریز این ذرات است که به شدت مستعد اپسونیزاسیون (اپسونین‌ها پروتئین‌هایی هستند که با اتصال به یک ماده یا سلول، فاگوسیتوز آنها توسط فاگوسیت‌ها را القا می‌کنند) و حذف توسط سیستم رتیکولواندوتلیال

هستند (Liu and Feng, 2015). نانوسفرهای با قابلیت تجزیه‌پذیری زیستی شامل نانوسفر آلبومین، نانوسفر نشاسته تغییر یافته، نانوسفر ژلاتین و نانوسفر پلی‌لاکتیک‌اسید می‌باشند (Pirouzmand et al., 2017).

۲.نتیجه گیری

حلالیت و دسترسی زیستی ضعیف داروهای گیاهی از موانع اصلی بر سر راه استفاده از این داروها برای درمان بیماری‌های انسانی است. سیستم‌های تحویل داروی مبتنی بر نانوذرات چشم‌انداز امیدوارکننده‌ای برای حل این مشکلات ایجاد کرده‌اند و پژوهش‌ها در زمینه کپسوله کردن داروهای گیاهی در نانوحامل‌ها در حال افزایش است و بسیاری از آنها در مرحله آزمون‌های پیش‌بالینی یا بالینی قرار دارند. نانوفناوری زیستی پتانسیل ایجاد تحول در تحویل کارآمد و هدفمند داروهای گیاهی را داراست.

منابع

1. Abderrezak A., Bourassa P., Mandeville J.S., Sedaghat-Herati R. and Tajmir-Riahi H.A. 2012. Dendrimers bind antioxidant polyphenols and cisplatin drug. PloS One, 7(3): e33102.
2. Abellan-Pose R., Teijeiro-Valiño C., Santander-Ortega M.J., Borrajo E., Vidal A., Garcia-Fuentes M., Csaba N. and Alonso, M.J. 2016. Polyaminoacid nanocapsules for drug delivery to the lymphatic system: Effect of the particle size. International Journal of Pharmaceutics, 509(1-2): 107-117.
3. Abdulbaqi I.M., Darwis Y., Abou Assi R. and Khan N.A.K. 2018. Transethosomal gels as carriers for the transdermal delivery of colchicine: statistical optimization, characterization, and ex vivo evaluation. Drug Design, Development and Therapy, 12: 795-813.
4. Adhami V.M. and Mukhtar H. 2013. Human cancer chemoprevention: hurdles and challenges. Natural Products in Cancer Prevention and Therapy, 329: 203-220.
5. Amol, K. and Pratibha P. 2014. Novel drug delivery system in herbal's. International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences 4(4): 910–930
6. Aqil F., Munagala R., Jeyabalan J. and Vadhanam M.V. 2013. Bioavailability of phytochemicals and its enhancement by drug delivery systems. Cancer Letters, 334(1): 133-141.
7. Baldissera M.D., Souza C.F., Boligon A.A., Grando T.H., De Sa M.F., Da Silva A.S., Stefani L.M., Baldisserotto B. and Monteiro S.G. 2017. Solving the challenge of the blood–brain barrier to treat infections caused by *Trypanosoma evansi*: evaluation of nerolidol-loaded nanospheres in mice. Parasitology, 144(11): 1543-1550.
8. Bent S. 2008. Herbal medicine in the United States: review of efficacy, safety, and regulation. Journal of General Internal Medicine, 23(6): 854-859.
9. Bharali D.J., Siddiqui I.A., Adhami V.M., Chamcheu J. C., Aldahmash A.M., Mukhtar H. and Mousa S.A. 2011. Nanoparticle delivery of natural products in the prevention and treatment of cancers: current status and future prospects. Cancers, 3(4): 4024-4045.
10. Biswas S., Kumari P., Lakhani P.M. and Ghosh B. 2016. Recent advances in polymeric micelles for anti-cancer drug delivery. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 83: 184-202.
11. Bonifácio B.V., da Silva P.B., dos Santos Ramos M.A., Negri K.M.S., Bauab T.M. and Chorilli M. 2014. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. International Journal of Nanomedicine, 9: 1-15.
12. Chauhan P. Tyagi B.K. 2018. Herbal novel drug delivery systems and transfersomes. Journal of Drug Delivery and Therapeutics, 8(3): 162-168.
13. Chen Y., Lin X., Park H. and Greever R. 2009. Study of artemisinin nanocapsules as anticancer drug delivery systems. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 5(3): 316-322.
14. Chhabra G., Chuttani K., Mishra A. K. and Pathak K. 2011. Design and development of nanoemulsion drug delivery system of amlodipine besilate for improvement of oral bioavailability. Drug Development and Industrial Pharmacy, 37(8): 907-916.

15. Chittasupho C., Anuchapreeda S. and Sarisuta, N. 2017. CXCR4 targeted dendrimer for anti-cancer drug delivery and breast cancer cell migration inhibition. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 119: 310-321.
16. Choi J.H., Cho S.H., Yun J.J., Yu Y.B. and Cho C.W. 2015. Ethosomes and transfersomes for topical delivery of ginsenoside Rh1 from red ginseng: characterization and in vitro evaluation. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 15(8): 5660-5662.
17. ud Din F., Aman W., Ullah I., Qureshi O.S., Mustapha O., Shafique S. and Zeb A. 2017. Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. International Journal of Nanomedicine, 12: 7291–7309.
18. Elzoghby A.O., Samy W.M. and Elgindy N.A. 2012. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. Journal of Controlled Release, 161(1): 38-49.
19. Ertürk A.S., Gürbüz M.U. and Tülü M. 2017. The effect of PAMAM dendrimer concentration, generation size and surface functional group on the aqueous solubility of candesartan cilexetil. Pharmaceutical Development and Technology, 22(1): 111-121.
20. Estanqueiro M., Amaral M.H., Conceição J. and Lobo J.M.S. 2015. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: the state of the art. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 126: 631-648.
21. Foroozandeh, P. Aziz A.A. 2018. Insight into cellular uptake and intracellular trafficking of nanoparticles. Nanoscale Research Letters, 13(1): 1-12.
22. Habtemariam S. 2020. Recent advances in berberine inspired anticancer approaches: from drug combination to novel formulation technology and derivatization. Molecules, 25(6): 1426.
23. Han R., Sun Y., Kang C., Sun H. and Wei W. 2017. Amphiphilic dendritic nanomicelle-mediated co-delivery of 5-fluorouracil and doxorubicin for enhanced therapeutic efficacy. Journal of Drug Targeting, 25(2): 140-148.
24. Iacobazzi R.M., Porcelli L., Lopedota A.A., Laquintana V., Lopalco A., Cutrignelli A., Altamura E., Di Fonte R., Azzariti A., Franco M. and Denora N. 2017. Targeting human liver cancer cells with lactobionic acid-G (4)-PAMAM-FITC sorafenib loaded dendrimers. International journal of pharmaceutics, 528(1-2): 485-497.
25. Kinghorn A.D., Pan L., Fletcher J.N. and Chai H. 2011. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. Journal of Natural Products, 74(6): 1539-1555.
26. Kozlova, D. and Epple M. 2013. Biological targeting with nanoparticles: state of the art. BioNanoMaterials, 14(3-4): 161-170.
27. Krishnaiah Y.S. 2010. Pharmaceutical technologies for enhancing oral bioavailability of poorly soluble drugs. Journal of Bioequivalence and Bioavailability, 2(2): 28-36.
28. Kumar K. and Rai A.K. 2012. Miraculous therapeutic effects of herbal drugs using novel drug delivery systems. International Research Journal of Pharmacy, 3(2): 27-30.
29. Liu F., Sun Y., Kang C. and Zhu H. 2016. Pegylated drug delivery systems: from design to biomedical applications. Nano Life, 6: 1642002.
30. Liu Y. and Feng N. 2015. Nanocarriers for the delivery of active ingredients and fractions extracted from natural products used in traditional Chinese medicine (TCM). Advances in Colloid and Interface Science, 221: 60-76.
31. Lovelyn C. and Attama A.A. 2011. Current state of nanoemulsions in drug delivery. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 2(05): 626-639.
32. Luo C.F., Hou N., Tian J., Yuan M., Liu S.M., Xiong L.G., Luo J.D. and Chen M.S. 2013. Metabolic profile of puerarin in rats after intragastric administration of puerarin solid lipid nanoparticles. International Journal of Nanomedicine, 8: 933-940.
33. Luo C.F., Yuan M., Chen M.S., Liu S.M., Zhu L., Huang, B.Y., Liu X.W. and Xiong W. 2011. Pharmacokinetics, tissue distribution and relative bioavailability of puerarin solid lipid nanoparticles following oral administration. International Journal of Pharmaceutics, 410(1-2): 138-144.
34. Luong D., Kesharwani P., Deshmukh R., Amin M.C.I.M., Gupta U., Greish K. and Iyer A.K. 2016. PEGylated PAMAM dendrimers: enhancing efficacy and mitigating toxicity for effective anticancer drug and gene delivery. Acta Biomaterialia, 43: 14-29.

35. Mahato R. 2017. Nanoemulsion as targeted drug delivery system for cancer therapeutics. Journal of Pharmaceutical Sciences and Pharmacology, 3(2): 83-97.
36. Nagalakshmi S., Krishnaraj K., Jothy A.M., Chaudhari P.S., Pushpalatha H.B. and Shanmuganthan S. 2016. Fabrication and characterization of herbal drug-loaded nonionic surfactant based niosomal topical gel. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 8(11): 1271-1278.
37. Nagalingam A. 2017. Drug delivery aspects of herbal medicines. Japanese Kampo Medicines for the Treatment of Common Diseases: Focus on Inflammation, 17: 143-164.
38. Ni S. 2017. Nanoparticles carrying natural product for drug delivery. Journal of Drug Delivery and Therapeutics, 7(3): 73-75.
39. Pando D., Matos M., Gutiérrez G. and Pazos C. 2015. Formulation of resveratrol entrapped niosomes for topical use. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 128: 398-404.
40. Patel R.P. and Joshi J.R. 2012. An overview on nanoemulsion: a novel approach. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 3(12): 4640-4650.
41. Pirouzmand H., Khameneh B. and Tafaghodi M. 2017. Immunoadjuvant potential of cross-linked dextran microspheres mixed with chitosan nanospheres encapsulated with tetanus toxoid. Pharmaceutical Biology, 55(1): 212-217.
42. Prabhu R.H., Patravale V.B. and Joshi M.D. 2015. Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights. International Journal of Nanomedicine, 10: 1001-1018.
43. Priprem A., Janpim K., Nualkaew S. and Mahakunakorn P. 2016. Topical niosome gel of Zingiber cassumunar Roxb. extract for anti-inflammatory activity enhanced skin permeation and stability of compound D. AAPS Pharmscitech, 17(3): 631-639.
44. Rai S., Pandey V. Rai G. 2017. Transfersomes as versatile and flexible nano-vesicular carriers in skin cancer therapy: the state of the art. Nano Reviews and Experiments, 8(1):1325708.
45. Rameshk M., Sharififar F., Mehrabani M., Pardakhty A., Farsinejad A. and Mehrabani M. 2018. Proliferation and in vitro wound healing effects of the Microniosomes containing Narcissus tazetta L. bulb extract on primary human fibroblasts (HDFs). DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 26(1): 31-42.
46. Riyaz B., Bose S., Sharma S. and Khatik G.L. 2018. Nanotechnology-based phytopharmaceuticals in disease management: An update. Drug Invention Today, 10(8): 1450-1454.
47. Rohilla R., Garg T., Goyal A.K. and Rath G. 2016. Herbal and polymeric approaches for liver-targeting drug delivery: novel strategies and their significance. Drug Delivery, 23(5): 1645-1661.
48. Rostami E., Kashanian S., Azandaryani A.H., Faramarzi H., Dolatabadi J.E.N. and Omidfar K. 2014. Drug targeting using solid lipid nanoparticles. Chemistry and Ohysics of Lipids, 181: 56-61.
49. Sandhiya, V. and Ubaidulla U. 2020. A review on herbal drug loaded into pharmaceutical carrier techniques and its evaluation process. Future Journal of Pharmaceutical Sciences, 6(1): 1-16.
50. Saraf S. 2010. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. Fitoterapia, 81(7): 680-689.
51. Siddiqui I.A. and Sanna V. 2016. Impact of nanotechnology on the delivery of natural products for cancer prevention and therapy. Molecular Nutrition and Food Research, 60(6): 1330-1341.
52. Teeranachaideekul V., Müller R.H. and Junyaprasert V.B. 2007. Encapsulation of ascorbyl palmitate in nanostructured lipid carriers (NLC)—effects of formulation parameters on physicochemical stability. International Journal of Pharmaceutics, 340(1-2): 198-206.
53. Teskač, K. and Kristl J. 2010. The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. International Journal of Pharmaceutics, 390(1): 61-69.
54. Thakkar M. and Brijesh S. 2018. Physicochemical investigation and in vivo activity of anti-malarial drugs co-loaded in Tween 80 niosomes. Journal of Liposome Research, 28(4): 315-321.
55. Tolia G.T. and Choi H.H. 2008. The role of dendrimers in topical drug delivery. Pharmaceutical Technology, 32(11): 88-98.
56. Topuz O.K., Özvural E.B., Zhao Q., Huang Q., Chikindas M. and Gölükçü M. 2016. Physical and antimicrobial properties of anise oil loaded nanoemulsions on the survival of foodborne pathogens. Food Chemistry, 203: 117-123.

57. Wang T., Wu C., Fan G., Li T., Gong H. and Cao F. 2018. Ginkgo biloba extracts-loaded starch nano-spheres: preparation, characterization, and in vitro release kinetics. International Journal of Biological Macromolecules, 106: 148-157.
58. Wang X., Wang Y.W. and Huang Q. 2009. Enhancing stability and oral bioavailability of polyphenols using nanoemulsions. ACS National Meeting Book of Abstracts, 1007:198–212.
59. Wang Z., Yu Y., Ma J., Zhang H., Zhang H., Wang X., Wang J., Zhang X. and Zhang Q. 2012. LyP-1 modification to enhance delivery of artemisinin or fluorescent probe loaded polymeric micelles to highly metastatic tumor and its lymphatics. Molecular Pharmaceutics, 9(9): 2646-2657.
60. World Health Organization. 2000. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine (No. WHO/EDM/TRM/2000.1). World Health Organization.
61. Yadav D., Suri S., Choudhary A.A., Sikender M., Hemant B. N. and Beg N.M. 2011. Novel approach: Herbal remedies and natural products in pharmaceutical science as nano drug delivery systems. International Journal of PharmTech Research, 3(3): 3092-116.
62. Zhang S., Zhang M., Fang Z. and Liu Y. 2017. Preparation and characterization of blended cloves/cinnamon essential oil nanoemulsions. LWT Food Science and Technology, 75: 316-322.
63. Zhao, J. and Stenzel M.H. 2018. Entry of nanoparticles into cells: The importance of nanoparticle properties. Polymer Chemistry, 9(3): 259-272.
64. Zhao Y.Z., Lu C.T., Zhang Y., Xiao J., Zhao Y.P., Tian J.L., Xu Y.Y., Feng Z.G. and Xu, C.Y. 2013. Selection of high efficient transdermal lipid vesicle for curcumin skin delivery. International Journal of Pharmaceutics, 454(1): 302-309.
65. Zou F., Wei K. and Peng X. 2016. Thermodynamics of micellization and sustained release of folate targeted capecitabine loaded nanomicelles. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 16(8): 8519-8527.

A review of biological methods for the removal of oil contaminants and the importance of bioremediation based on oil-eating bacteria

Sara Shokranian[1*]; Morteza Yousefzadi[2]

1- Student, Department of Marine Science Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran
2- Professor of Plant Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Qom, Qom, Iran

Shokranian1234@gmail.com

Abstract

Oil pollution from natural resources and human activities has led to one of the global problems. The entry of large amounts of crude oil into the soil of groundwater, seas and other environments causes irreparable damages to the environment and living organisms. Due to the high export of oil and petrochemical products through the waters of the Persian Gulf, this sea has the largest part of pollution. In addition, these contaminants in the soil have caused problems such as reduction of oxygen received by plant habitats from the soil, which eventually causes plenty of damages to plants. Oil is made up of hundreds or thousands of aliphatic and aromatic hydrocarbons, which, if released into the environment, can have a long-term impact on the environment and the health of creatures. There are three methods to eliminate these contaminants; physical, chemical, and biological. According to studies, the use of physical and chemical methods to eliminate these pollutants is not much effective and is not economically viable, whereas biological methods are effective, affordable, clean, and environmentally friendly. Bioremediation is one of the biological methods that is generally divided into three methods: phytoremediation, mycoremediation and microbial remediation, which the latter is the best option for removing oil contaminants. The types of microorganisms that degrade hydrocarbon pollutants include bacteria, cyanobacteria, fungi, and algae. Microbial remediation is cost-effective and environmentally friendly and has a high efficiency. Bacteria have an important and valuable position in this field and the rate of degradation of petroleum pollutants depends on factors ranging from temperature, pH, indigenous or non-indigenous bacteria, the ability to produce biosurfactant to type and amount of enzymes secreted from it. In this article, we introduce the structure of oil and some different species of bacteria isolated from the aquatic and terrestrial environments of our country, as well as their operating conditions.

Keywords: Hydrocarbon Contaminants, Oil Degrading Bacteria, Crude Oil Biodegradation, Alkane Hydroxylase, Oil Pollution

مروری بر روش‌های زیستی حذف آلاینده‌های نفتی و اهمیت زیست پالایی مبتنی بر باکتری‌های نفت‌خوار

سارا شکرانیان[۱*]؛ مرتضی یوسف زادی [۲]

۱-دانشجو، گروه زیست دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان

۲-استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: shokranian1234@gmail.com

چکیده

آلودگی‌های نفتی ناشی از منابع طبیعی و فعالیت‌های انسانی، منجر به یکی از معضلات جهانی شده است. ورود مقادیر زیادی نفت خام به خاک آب‌های زیرزمینی، دریاها و سایر محیط‌ها، خسارات جبران ناپذیری را به محیط‌زیست و موجودات زنده وارد می‌سازد. به دلیل صادرات بالای نفت و محصولات پتروشیمی از طریق آب‌های خلیج فارس، این دریا بیشترین سهم آلودگی را به خود اختصاص داده است. همچنین این آلودگی‌ها در خاک نیز مشکلاتی اعم از کاهش اکسیژن دریافتی توسط زیشه‌ی گیاهان از خاک شده که به مرور موجب بروز آسیب‌های فراوانی به گیاهان می‌شود. نفت از صدها یا هزاران هیدروکربن آلیفاتیک و آروماتیک تشکیل شده است که این ترکیبات در صورت ورود به محیط زیست می‌توانند در دراز مدت بر محیط زیست و سلامت جانداران تاثیر بگذارند. جهت رفع این آلودگی‌ها سه روش فیزیکی، شیمیایی و زیستی وجود دارد. طبق بررسی‌های انجام شده، استفاده از روش‌های فیزیکی و شیمیایی برای رفع این آلودگی‌ها چندان موثر نبوده و از جنبه‌ی اقتصادی مقرون بصرفه نیست؛ اما روش‌های زیستی، موثر، مقرون بصرفه، پاک و سازگار با محیط زیست است. از روش‌های زیستی می‌توان به زیست‌پالایی (Bioremediation) اشاره کرد. زیست پالایی بطور کلی به سه روش گیاه پالایی، قارچ پالایی و اصلاح میکروبی تقسیم بندی می‌شود که مورد آخر بهترین گزینه جهت رفع آلاینده‌های نفتی است. انواع میکروارگانیسم‌هایی که تجزیه‌ی آلاینده‌های هیدروکربنی را انجام می‌دهند، شامل باکتری‌ها، سیانوباکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌ها می‌شوند. این روش مقرون بصرفه و سازگار با محیط‌زیست بوده و بازدهی بالایی دارد. باکتری‌ها جایگاه مهم و ارزشمندی در این حیطه دارند که میزان تجزیه‌ی آلاینده‌های نفتی توسط آن‌ها به عواملی چون دما، PH، بومی یا غیربومی بودن باکتری، توانایی تولید بیوسورفاکتانت، نوع و مقدار آنزیم‌های مترشحه از آن و عواملی از این قبیل بستگی دارد. در این مقاله ساختار نفت را معرفی کرده و به معرفی برخی گونه‌های مختلف باکتری‌های جداسازی شده از محیط‌های آبی و خاکی کشورمان و همچنین شرایط عمل آن‌ها می‌پردازیم.

واژگان کلیدی: آلاینده‌های هیدروکربنی، باکتری‌های تجزیه کننده‌ی نفت، تجزیه‌ی زیستی نفت خام، آلکان هیدروکسیلاز، آلودگی نفتی

۱.مقدمه

نفت و مشتقات آن از مهم‌ترین منابع انرژی بوده که بشر توسط آن خدمات زیادی را به دنیا ارائه داده است. در عین حال این ماده‌ی ارزشمند از عمده ترین علت های آلودگی دریاها و خاک اطراف پالایشگاه‌ها به شمار می‌آید. سالانه حدود ۰.۰۸ تا ۰.۴ از نفت تولید شده به اکوسیستم دریایی وارد می شود. آلودگی‌های نفتی می‌توانند از طرق مختلف همچون نشت از خطوط لوله، تصادف نفت‌کش‌ها، نشت از مخازن قدیمی، تجهیزات تصفیه نفتی و حتی در حین استخراج نفت رخ دهد. این آلودگی‌ها گاهی مقطعی بوده و به سرعت رفع می‌شوند اما گاهی می‌توانند سالیان طولانی در محیط باقی بمانند و عواقب زیادی برای محیط زیست به دنبال داشته باشند (Rahman et al., 2002, Patowary et al., 2018). نشت نفت، اکوسیستم منطقه‌ی وسیعی از دریا را آلوده می‌کند؛ به گونه‌ای که گیاهان و جانداران آن منطقه از بین رفته و احیای منطقهٔ آسیب دیده، اغلب سالیان درازی به طول می‌انجامد و مناطقی که ممکن است به دولت خاصی تعلق داشته‌باشد و یا بخشی از دریای آزاد و مشترکات جهانی باشد، خسارت های تبعی بسیاری را متوجه افراد حقیقی و حقوقی و دولت‌ها می‌کند و اقدامات پاکسازی و جبرانی آن، هزینهٔ هنگفتی دارد (سازمان برنامه و بودجه کشور، ۱۳۹۹, Ahmadi et al., 2021).

آلودگی هیدروکربن در خاک نیز مشکلات زیادی ایجاد می‌کند. این آلودگی می تواند توسط ریشه‌های گیاه از خاک جذب شده و متعاقباً وارد چرخه غذایی موجودات زنده از جمله انسان شود. علاوه بر این، آلودگی هیدروکربن حاصل از نفت خام می‌تواند میزان جذب اکسیژن توسط گیاه را کاهش داده و به ریشه گیاه آسیب برساند (Ghoreishi et al., 2017, Patowary et al., 2018). چنین آلودگی‌هایی همچنین می‌توانند ظرفیت نفوذ پذیری خاک را تغییر داده و حتی کیفیت منابع آب زیرزمینی و آب‌های سطحی را تغییر دهند (Ostovar et al., 2021). در سال‌های اخیر، استفاده از باکتری‌های نفت خوار یکی از بهترین روش‌های زیستی برای حذف این آلاینده‌ها معرفی شده‌است. این باکتری‌ها با مصرف آلودگی‌های نفتی بعنوان منبع کربن، کمک شایانی به رفع این آلاینده‌ها می‌کنند. بر اساس گزارشات مرکز مطالعاتی ریستاد انرژی[۱۰۲]، کشور ایران در سال ۲۰۱۹، برای تولید هر بشکه نفت، ۲۱ کیلوگرم کربن تولید کرده است که یکی از علل ایجاد آلودگی‌های هیدروکربنی مشتقات نفتی است. در نتیجه آلودگی‌های نفتی یک دغدغه‌ی زیست محیطی برای کشورمان، ایران محسوب می‌شود. از این رو، مطالعه و جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده‌ی نفت در کشورمان بسیار مورد توجه قرار گرفته که به بررسی نمونه‌هایی از آن‌ها در ادامه می‌پردازیم.

۱-۱-ساختار و ترکیبات نفت خام

نفت خام[۱۰۳] ترکیبی از هیدروکربن‌های مایع نسبتا فرار است که درصد بیشتر آن از هیدروژن و کربن تشکیل شده است. همچنین درصد کمتری نیتروژن، گوگرد و اکسیژن نیز دارد. بین ۸۲ تا ۸۷٪ وزن آن را کربن و ۱۲ تا ۱۵٪ آن را هیدروژن تشکیل داده است (Britannica, 2020). هیدروکربن های نفتی را می توان به چهار دسته تقسیم کرد:

[102] Rystad Energy
[103] Crude Oil

هیدروکربن‌های آلیفاتیک[۱۰۴]، هیدروکربن‌های آروماتیک[۱۰۵] (چند حلقه‌ای)، آسفالتین[۱۰۶]ها (فنل‌ها، اسیدهای چرب، کتون‌ها، استرها و پورفیرین‌ها) و رزین[۱۰۷]ها (پیریدین‌ها، کینولین‌ها، کاربازول‌ها، سولفوکسیدها و آمیدها) (Yuniati, 2018).

براساس ATSDR[۱۰۸] (آژانس ثبت مواد سمی و بیماری‌ها)، هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای (PAH)[۱۰۹] نهمین ماده سمی هستند. این ترکیبات به عنوان سمی‌ترین ترکیبات نفت خام، سرطان‌زا و تراتوژنیک شناخته شده‌اند که در جهش‌زایی حیوانات آبزی و انسان دخیل‌اند. آلودگی PAHها تبدیل به یک نگرانی عمده برای محیط زیست و همچنین سلامت جانداران شده است. این ترکیبات در همه جا حضور داشته و از طریق فعالیت‌های طبیعی و همچنین انسانی وارد محیط می‌شوند. PAHها آبگریز بوده و به دلیل ماهیتی که دارند، می‌توانند برای مدت طولانی در محیط باقی بمانند و مشکلات زیادی ایجاد کنند (Hassanzadeh et al., 2018, Khanpour-Alikelayeh et al., 2020).

خواص فیزیکی نفت خام نیز بسیار متفاوت است. از لحاظ شکل ظاهری، در رنگ‌های متفاوتی از بی‌رنگ تا سیاه یافت می‌شوند. همچنین نفت خام از لحاظ میزان گوگرد موجود در آن، به دو دسته‌ی شیرین و ترش تقسیم‌بندی می‌شوند. نفت خام شیرین، دارای ۰.۵٪ وزن کل یا کمتر، گوگرد بوده و این میزان در نفت خام ترش ۱٪ وزن کل یا بیشتر، است (Britannica, 2020).

۱-۲-روش های زیست پالایی جهت رفع آلودگی های نفتی

نگرانی‌های زیست محیطی، به ویژه پس از نشت خطرناک نفت در چند دهه‌ی اخیر، از عواملی است که موجب شده تا پاکسازی این آلاینده‌ها اهمیت زیادی پیدا کند. برخی روش‌هایی که برای پاکسازی آلودگی‌های نفتی در محیط زیست انجام می‌گیرد، شامل سوزاندن[۱۱۰]، استفاده از اسکیمرها[۱۱۱]، استفاده از بوم‌های شناور[۱۱۲]، پخش زیستی[۱۱۳] و زیست پالایی[۱۱۴] است که به طور کلی به سه روش فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی تقسیم می‌شوند. در این میان، روش‌های فیزیکی و شیمیایی به دلایل مختلفی از جمله پرهزینه بودن و ایجاد آلودگی‌های ثانویه _منظور، آلاینده‌هایی که بر اثر بر هم‌کنش عوامل محیطی روی آلاینده‌های اولیه تولید می‌شود_ کمتر مورد توجه قرار گرفتند (Kalhor et al., 2017). این در حالی است که امروزه روش زیستی به عنوان یک روش سازگار با محیط زیست، ارزان و با بازدهی بالا جهت جمع‌آوری لکه‌های نفتی در نظر گرفته می‌شود و همچنین داشتن توانایی در تبدیل آلاینده‌ها به محصولات بی‌ضرر یا کم ضرر آن را از دو روش فیزیکی و شیمیایی متمایز کرده و می‌تواند جایگزین آن‌ها شود (Rahman et al., 2002, Zhang et al., 2018). زیست پالایی روشی است که ترکیبات شیمیایی مضر توسط موجودات زنده بخصوص میکروارگانیسم‌ها به ترکیبات غیر مضر همچون انرژی، توده سلولی و مواد زائد زیستی تبدیل می‌شود (Rahman et al., 2002). زیست پالایی بطور کلی به دو دسته‌ی در محل آلوده (in situ) در مکان دیگری غیر از مکان آلوده (ex situ) تقسیم می‌شود که از موجودات زنده جهت پاکسازی آلودگی‌ها کمک می‌گیرد (Kalhor et al., 2017). سه روش عمده‌ی زیست پالایی جهت رفع

[104] Aliphatic
[105] Aromatic
[106] Asphaltene
[107] Resin
[108] Agency for Toxic Substances and Disease Registry
[109] Polycyclic aromatic hydrocarbon
[110] Combustion
[111] Skimming
[112] Booms
[113] Biosparging
[114] Bioremediation

آلودگی‌های نفتی شامل اصلاح میکروبی[۱۱۵]، گیاه‌پالایی[۱۱۶] و قارچ پالایی[۱۱۷] است. گیاه پالایی یک فناوری مبتنی بر تلفیق فعالیت گیاهان و میکروارگانیسم‌های همزیست با آن است که موجب تجزیه، انتقال، غیر فعال سازی، ساکن سازی ترکیبات آلاینده خاک و آب‌های زیرزمینی است. اما وجود مشکلاتی همچون انتخاب نوع گیاه جهت گیاه‌پالایی و همچنین وجود چالش چگونگی دفع گیاهان جاذب آلاینده، موجب شده تا این روش کمتر مورد استقبال واقع گردد (عسکری مهرآبادی و همکاران، ۱۳۹۰، ایرجی آسیابادی و همکاران، ۱۳۹۵). قارچ پالایی نیز روشی مبتنی بر استفاده از قارچ‌ها جهت از بین بردن آلاینده‌های خاک و آب است. قارچ‌ها با تولید آنزیم‌های تجزیه کننده‌ی خارج سلولی و همچنین توانایی جذب زیستی آن، توانایی حذف آن را دارند (Al-Dhabaan, 2021). یکی از عوامل محدود کننده‌ی قارچ‌پالایی در ترکیبات PAH، کاهش فراهمی زیستی PAHها به دلیل ماهیت آبگریز و انتقال آهسته‌ی آن در غشای سلولی است که برخی از قارچ‌ها با انتقال آن به باکتری‌های مجاور موجود در خاک، بر این مشکل غلبه می‌کنند (Akhtar and Mannan, 2020). واژه‌ی اصلاح میکروبی که بیشتر به باکتری‌ها اطلاق می‌شود یک روش زیستی کارآمد در پالایش زیستی آلاینده‌های نفتی است. تحقیقات نشان داده است که میکروارگانیسم‌های بومی[۱۱۸] تجزیه‌کننده‌ی نفت یک منطقه حتی در شرایط نامساعد محیطی نیز می‌توانند عملکرد مناسبی از خود نشان دهند، پس رفع آلودگی نفتی در محل آلوده (in situ) را می‌توان روشی مناسب جهت زیست پالایی در سطوح و اعماق دریا و خشکی در نظر گرفت (Gao et al., 2015). در سال‌های اخیر، استفاده از باکتری‌های نفت‌خوار برای پاکسازی محیط‌های آلوده به نفت به روشی رایج، کارآمد و اقتصادی تبدیل شده است که ضایعات سمی را به محصولات نهایی غیر سمی تبدیل می‌کند. در این روش، علاوه بر تغذیه‌ی باکتری‌ها از طریق مصرف ضایعات نفتی، ترکیبات سمی نیز از محیط حذف می‌شوند (Chikere et al., 2012). استفاده از این موجودات به عوامل محیطی همچون دما، PH، بومی یا غیربومی بودن باکتری، میزان بیوسورفاکتانت موجود در محیط، میزان متابولیسم باکتری نفت‌خوار، میزان نیتروژن و فسفر موجود در محیط و دیگر عوامل بستگی دارد. بعنوان مثال سطح پایین فسفر و نیتروژن در خاک می‌تواند رشد میکروارگانیسم‌های نفت‌خوار و در نتیجه تجزیه‌ی نفت را کاهش دهد. همچنین تولید بیوسورفاکتانت توسط برخی میکروارگانیسم‌ها، موجب افزایش سطح نفت شده و درنتیجه دسترسی میکروارگانیسم‌ها به ضایعات نفتی را بیشتر می‌کند که خود عاملی جهت بالا رفتن سرعت پاکسازی است (Brooijmans et al., 2009)، بعلاوه استفاده از میکروارگانیسم‌ها جهت تجزیه‌ی PAH یک روش سازگار با محیط زیست و مقرون بصرفه است. (Kumari et al., 2018).

۱-۳-باکتری¬های تجزیه کننده¬ی هیدروکربن، آنزیم¬های دخیل و شرایط عمل آن¬ها

انواع میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده‌ی هیدروکربن را می‌توان به ۴ دسته‌ی باکتری‌ها، سیانوباکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌ها تقسیم بندی کرد. اولین باکتری‌های تجزیه کننده‌ی هیدروکربن حدود ۱ قرن پیش جداسازی شدند، و تا کنون تعداد ۷۹ گونه باکتری شناسایی شده‌اند که می‌توانند از هیدروکربن بعنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده کنند. از انواع این گونه‌ها می‌توان به Alcanivorax, Cycloclasticus, Oleiphilus, Oleispira, Thalassolituus و برخی از گونه‌های Planomicrobium اشاره کرد که منبع کربن خود را منحصرا از هیدروکربن‌ها دریافت می‌کنند. به همین ترتیب تعداد ۹ گونه سیانوباکتری، ۱۰۳ گونه قارچ و ۱۴ گونه‌ی جلبکی که توانایی تجزیه یا تبدیل هیدروکربن را دارند، گزارش شده است (Hassanshahian et al., 2012, Tremblay et al., 2017).

[115] Microbial remediation
[116] Phytoremediation
[117] Mycoremediation
[118] Indigenous microorganisms

استفاده از باکتری‌ها در زیست‌پالاییِ آلودگی‌هایِ هیدروکربنی، پرکاربردتر از مابقی است، زیرا هیدروکربن در آب غیر قابل امتزاج است، اما اغلب باکتری‌ها با تولید ماده‌ای به نام بیوسورفاکتانت، این مشکل را حل کرده‌اند. این ماده، یک ترکیب آمفی‌پاتیک میکروبی بوده که باعث کاهش کشش سطحی و کشش بین دو سطح می‌شود. درواقع بیوسورفکتانت‌ها با ساختار دوگانه‌ی آبگریز-آبدوستی که دارند، بین ترکیبات قطبی و غیرقطبی پلی تشکیل می‌دهند که در نتیجه‌ی آن موجب کاهش کشش سطحی و کشش بین دو سطح می‌شوند. به این ترتیب، سطح تماس باکتری‌ها با ترکیبات نفتی بیشتر شده و با تشکیل میکروامولسیون ، هیدروکربن های نامحلول را در خود حل کنند و موجب افزایش تجزیه‌ی زیستی ترکیبات نفتی توسط باکتری‌ها می‌گردند (Hassanshahian et al., 2012, Tanzadeh et al., 2018, سلیمانی و همکاران، ۱۳۹۹).

علاوه بر این، عواملی چون دما، pH، غلظت آلودگی نفتی موجود در محیط، بر سرعت و کیفیت تجزیه‌ی زیستی نفت تاثیرگذار است که مختصر درمورد آن توضیح می‌دهیم.

دما، با تاثیر بر ماهیت فیزیکی و شیمیایی نفت، سرعت متابولیسم هیدروکربن توسط باکتری‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در مطالعات مختلف، دمای بهینه برای رشد باکتری‌های نفت‌خوار و همچنین شروع تجزیه‌ی زیستی نفت، ۴۰ °C تا ۳۰ گزارش **شده** است، در این دما، فعالیت باکتری برای تخریب هیدروکربن و همچنین جمعیت میکروبی، به حد مطلوب خود نزدیک می‌شود. در دماهای بالاتر، سمیت غشایی بعنوان یک عامل بازدارنده جلوی فعالیت باکتری‌ها را می‌گیرد. از طرفی با کاهش دما، سرعت تخریب زیستی آلاینده-های هیدروکربنی کاهش می‌یابد، زیرا ویسکوزیته‌ی آلاینده‌های نفتی افزایش یافته و به طبع بر میزان حلالیت و تبخیر آن تاثیر می‌گذارد (Rahman et al., 2002, Parach et al., 2017). هرچند دمای مطلوب برای فعالیت باکتری‌های گرمادوست[۱۱۹]، تا ۵۰ °C نیز گزارش شده است. از باکتری‌های نفت‌خوار گرمادوست می‌توان به گونه‌هایی همچون Bacillus, Thermus, Thermococcus, Thermotoga, Mycobacterium و Geobacillus اشاره کرد (Elumalai et al., 2019).

میزان pH نیز از دیگر عواملی است که بر سرعت تخریب زیستی و میزان رشد باکتری‌ها بطور مستقیم تاثیرگذار است. pH بهینه برای فعالیت باکتری‌های نفت‌خوار، بین ۷ تا ۸.۵ گزارش شده است. درواقع توانایی باکتری‌ها در مصرف مواد غذایی، قابلیت تولید آنزیم‌های کلیدی جهت تخریب هیدروکربن‌ها و همچنین برهمکنش آن‌ها با آلاینده‌های آلی، تحت تاثیر pH است. در pHهای بالاتر یا پایین‌تر از این محدوده، به سرعت جمعیت باکتری کاهش می‌یابد (Rahman et al., 2002, Parach et al., 2017).

عامل دخیل بعدی، غلظت آلودگی نفتی موجود در محیط است. در بررسی‌های آزمایشگاهی، میزان نفت خام از (V/V) ٪۱۰-۱ محیط کشت مورد بررسی قرار گرفته است. بهترین عملکرد باکتری‌ها در غلظت ۲.۵-۱٪ نفت خام مشاهده شده است. در غلظت‌های پایین‌تر از این مقدار، بیومس باکتریایی به دلیل کمبود منبع کربن، به سرعت کاهش می‌یابد؛ از طرفی در غلظت‌های بالاتر، به دلیل قرار گرفتن حجم زیادی از نفت خام بر روی سطح ارلن و نرسیدن اکسیژن کافی و همچنین افزایش سمیت محیط، جمعیت باکتری کاهش می‌یابد (Rahman et al., 2002, Parach et al., 2017, Fakhrzadegan et al., 2019).

همانطور که پیش‌تر بیان شد، باکتری‌های نفت‌خوار، منبع کربن مورد نیاز خود را از تجزیه‌ی ترکیبات نفت خام بدست می‌آوند. در این مسیر، آلکان هیدروکسیلازها (AHs)، آنزیم‌های کلیدی در تجزیه‌ی هوازی آلکان‌ها توسط باکتری‌ها هستند که اولین مرحله‌ی آن، توسط اکسیژنازها کاتالیز می‌شود. این آنزیم ها، آلکان‌ها را به الکل‌ها هیدروکسیله می‌کنند، _که بیشتر به اسیدهای چرب اکسید می شوند_ و از طریق مسیر اکسیداسیون β باکتریایی کاتابولیز می شوند. شناخته شده‌ترین آلکان هیدروکسیلازها، آلکان مونواکسیژناز و خانواده‌ی سیتوکروم P450 CYP153 هستند.

[119] Thermophile

AHهای درون غشایی آلکان مونو اکسیژناز[120] (AlkB) تا کنون از رایج‌ترین AHهای یافت شده در باکتری‌های گرم مثبت و منفی هستند. سوبستراهای این ژن عموما n-آلکان‌هایی هستند که از C10 تا C16 متغیر هستند.
خانواده سیتوکروم P450 CYP153 همچنین نوع دیگری از AHهاست که توانایی تجزیه‌ی آلکان‌هایی با طول زنجیره‌ی کوتاه و متوسط را دارند و معمولا در باکتری‌هایی یافت می‌شوند که فاقد ژن AlkB هستند (Hassanshahian et al., 2012, Nie et al., 2014, Tanzadeh et al., 2018).

۱-۳- مطالعات داخلی و خارجی بر روی باکتری های تجزیه کننده ی نفت خام

از آنجا که بیش از ۵۰٪ از نفت جهان، از کشورهای حوزه‌ی خلیج فارس و دریای تامین می‌شوند، و سپس از طریق دریا به سایر کشورها صادر می‌شود، آب‌های خلیج فارس و عمان بیشترین سهم آلودگی نفتی را به خود اختصاص داده‌اند. (Ali et al., 2020).
در سال ۲۰۱۰، میزان خاک آلوده به نفت در ایران حدود یک میلیون و پانصد هزار متر مکعب گزارش شده است که رقم چشم‌گیریست. از این جهت، اهمیت زیست پالایی نفت به کمک باکتری‌های نفت‌خوار در کشورهایی که از آلودگی نفتی رنج می‌برند، حائز اهمیت است (اسدی راد و همکاران، ۱۳۹۵). تا کنون مطالعات گسترده‌ای بر روی باکتری‌های نفت‌خوار انجام گردیده که در جدول زیر، به اختصار به بررسی چند مورد مطالعات موجود در داخل و خارج کشور، پرداخته‌ایم:

جدول ۱: نمونه هایی از باکتری‌های نفت‌خوار جداسازی شده در تحقیقات داخل و خارج کشور و میزان نفت‌خواری آن‌ها

ردیف	نام باکتری	محل نمونه‌برداری	میزان نفت‌خواری در شرایط بهینه	منبع
۱	Planococcus	خاک‌های آلوده به لکه‌های نفتی میدان نفتی آبتیمور در اهواز	۱۰۰٪ طی ۱۲ روز در شرایط بهینه	(ابراهیمی پور و همکاران، ۱۳۹۱)
۲	Pseudomonas	نمونه خاک آلوده به ترکیبات نفتی در پالایشگاه اصفهان	۶۱.۵٪ طی ۷ روز در شرایط بهینه	(برین و همکاران، ۱۳۹۱)
۳	Vibrio alginolyticus Halomonas sp	شکم‌پایان و آب‌های خلیج فارس	به ترتیب ۵۸.۴٪ و ۶۷.۵۸٪ طی ۳۰ روز در شرایط بهینه	(بیات و همکاران، ۱۳۹۵
۴	Bacillus licheniformis	خاک آلوده به نفت منطقه کارون اهواز	۸۴٪ طی ۳۰ روز در شرایط بهینه	(اسدی راد و همکاران، ۱۳۹۵)
۵	Pseudomonace aeruginosa Achromobacter spanius	خاکهای آلوده به مواد نفتی پالایشگاه تبریز	۶۷٪ دیزل سبک طی ۹ روز در شرایط بهینه	(علی پوراسدآبادی و همکاران، ۱۳۹۶)
۶	Bacillus cereus Staphylococcus haemolyticus pseudomonas aeruginosa	نمونه‌برداری از رسوبات و لکه-های نفتی سواحل بندرانزلی و کیاشهر	۹۴.۶٪ طی ۷ روز در شرایط بهینه	(تن زاده و همکاران، ۱۳۹۷)

[120] Integral-membrane alkane monooxygenase

۷	Dietzia maris DSM 43672	رسوبات اعماق دریای اقیانوس اطلس جنوبی ریج (MAR)	حدود ۹۰٪ طی ۲۰ روز در شرایط بهینه	(Gao et al., 2015)
۸	Dietzia maris DSM 43672	رسوبات اعماق دریای اقیانوس اطلس جنوبی ریج (MAR)	۸۰٪ طی ۲۰ روز در شرایط بهینه	(Gao et al., 2015)
۹	O. intermedium	مناطق آلوده به نفت خام در پوزا ریکا، وراکروز، مکزیک	۶۹.۹٪ طی ۸۰ روز در شرایط بهینه	(Tirado-Torres et al., 2017)

۲. نتیجه‌گیری

همانطور که بیان شد، زیست پالایی یک روش زیستی مقرون بصرفه، سازگار با محیط زیست و ساده است که می‌توان با بهره‌گیری از موجودات زنده، آلاینده‌های نفتی را از محیط پاکسازی کرد. باکتری‌ها به دلیل سهل الوصول بودن و تا حدودی تحمل شرایط نا متعادل محیطی می‌توانند بهترین گزینه در زیست پالایی باشند. همچنین می‌توان نتیجه گرفت باکتری‌هایی که میزان تولید بیوسورفکتانت در آن‌ها زیاد بوده و یا میزان بیان ژن AlkB و سیتوکروم P۴۵۰ CYP۱۵۳ در آن‌ها بالا باشد، توانایی بیشتری در تجزیه‌ی آلاینده‌های نفتی بخصوص هیدروکربنی دارند. امید است با بهره گیری از این دانش بتوان گامی مهم در رفع آلودگی‌های نفتی با روشی سازگار با محیط زیست و همچنین مقرون بصرفه برداشت.

منابع

۱. ابراهیمی¬پور غ.، مرزبان ع.، کارخانه م. و فخاری ج. ۱۳۹۱. بررسی حذف زیستی آلاینده¬های هیدروکربی نفتی توسط باکتری جداشده از خاک¬های آلوده به نفت، زیست¬فناوری میکروبی، دوره ۴، شماره ۱۳، ص: ۲۰-۱۳.

۲. آرش اسدی راد م ح.، مظاهری اسدی م.، راشدی ح. و نژاد ستاری ط. ۱۳۹۵. جداسازی و شناسایی فیلوژنتیکی باکتری-های بومی نفت¬خوار از خاک منطقه کارون اهواز، دنیای میکروب¬ها، دوره ۹، شماره ۳، ص: ۲۴۶-۲۳۶

۳. ایرجی آسیابادی ف.، میر باقری س ا. و سلیمانی م. ۱۳۹۵. گیاه پالایی خاک های آلوده به هیدروکربن¬های نفتی در اطراف پالایشگاه اصفهان، آب و فاضلاب، دوره ۲۷، شماره ۳، ص: ۴۷-۳۸

٤. برین ر.، و طالبی م.، و بی¬ریا د. و بهشتی م. ۱۳۹۱. زیست پالایی آلودگی¬های نفتی به کمک سویه سودوموناس جداشده ازخاک¬های آلوده به نفت خام، اولین کنفرانس بین المللی نفت، گاز، پتروشیمی و نیروگاهی، تهران، https://civilica.com/doc/158624.

٥. بیات ز.، حسن شاهیان م. و عسکری حصنی م. ۱۳۹۵. جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه کننده نفت خام از شکم پا Haustrum scobina جمع آوری شده از خلیج فارس (ناحیه ساحلی بندرعباس)، زیست شناسی میکروارگانیسم¬ها، دوره ۵، شماره ۱۷، ص: ۷۲-۶۱.

٦. تن زاده ج.، فائزی قاسمی م.، انوری م. و عیسی زاده خ. ۱۳۹۷. تولید بیوسورفکتانت و حذف زیستی لکه های نفتی با استفاده از جدایه های بومی باکتری های سواحل جنوبی دریای خزر. زیست شناسی میکروارگانیسم¬ها، دوره ۷، شماره ۲۷، ص: ۱۲۸-۱۱۳.

۷. سازمان برنامه و بودجه کشور. ۱۳۹۹. راهنمای برآورد خسارات آلودگی محیط زیست دریایی ناشی از انتشار مواد نفتی و دیگر مواد زیان آور، جلد دوم، دستورالعمل برآورد خسارات، ضابطه شماره ۲-۷۶۵ .

۸. سلیمانی س.، لکزیان ا.، فتوت ا. و رمضان پور م ر. ۱۳۹۹. بررسی تولید بیوسورفاکتانت توسط کنسرسیوم باکتریایی جدا شده از خاک آلوده به مواد نفتی، زیست شناسی خاک، دوره ۸، شماره ۱، ص: ۷۲-۵۵.

۹. علی پور اسدآبادی ز.، ملکیان م.، سلیمانی م. و میردامادیان ح. ۱۳۹۶. جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری های تجزیه کننده هیدروکربن های نفتی از خاک پالایشگاه تبریز، علوم محیطی، دوره ۱۵، شماره ۲، ص: ۱۴۰-۱۲۹ .

۱۰. عسکری مهرآبادی م.، نوری م.، بیگی ف. و امینی ف. ۱۳۹۰. ارزیابی گیاه پالایی اقاقیا در خاک های آلوده به نفت خام با تاکید بر برخی فلزات سنگین، سلول و بافت، دوره ۲، شماره ۴، ص: ۴۴۲-۴۳۵ .

11. Ahmadi M., Ebadi T. and Maknoon R. 2021. Effects of crude oil contamination on geotechnical properties of sand-kaolinite mixtures. Engineering Geology, 283: 106021.

12. Akhtar N. and Mannan M. A.-u. 2020. Mycoremediation: Expunging environmental pollutants. Biotechnology Reports, 26: e00452.

13. Al-Dhabaan F.A. 2021. Mycoremediation of crude oil contaminated soil by specific fungi isolated from Dhahran in Saudi Arabia. Saudi Journal of Biological Sciences, 28(1): 73-77.

14. Ali N., Dashti N., Khanafer M., Al-Awadhi H. and Radwan S. 2020. Bioremediation of soils saturated with spilled crude oil. Scientific reports, 10(1): 1-9.

15. Britannica. 2020. crude oil. from https://www.britannica.com/science/crude-oil.

16. Brooijmans R. J., Pastink M. I. and Siezen R.J. 2009. Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew. Microbial biotechnology, 2(6): 587-594.

17. Chikere C.B., Chikere B.O. and Okpokwasili G.C. 2012. Bioreactor-based bioremediation of hydrocarbon-polluted Niger Delta marine sediment, Nigeria. 3 Biotech, 2(1): 53-66.

18. Elumalai, P., Parthipan P., Narenkumar J., Anandakumar B., Madhavan J., Oh B. T. and Rajasekar A. (2019). Role of thermophilic bacteria (Bacillus and Geobacillus) on crude oil degradation and biocorrosion in oil reservoir environment." 3 Biotech 9(3): 79.

19. Fakhrzadegan, I., Hassanshahian M., Askari Hesni M. and Saadatfar A. (2019). A study of crude oil-degrading bacteria from mangrove forests in the Persian Gulf." Marine Ecology 40(2).

20. Gao X., Gao W., Cui Z., Han B., Yang P., Sun C. and Zheng L. 2015. Biodiversity and degradation potential of oil-degrading bacteria isolated from deep-sea sediments of South Mid-Atlantic Ridge. Marine pollution bulletin, 97(1-2): 373-380.

21. Ghoreishi G., Alemzadeh A., Mojarrad M. and Djavaheri M. 2017. Bioremediation capability and characterization of bacteria isolated from petroleum contaminated soils in Iran. Sustainable Environment Research, 27(4): 195-202.

22. Hassanshahian M., Emtiazi G. and Cappello S. 2012. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. Marine pollution bulletin, 64(1): 7-12.

23. Hassanzadeh M., Tayebi L. and Dezfouli H. 2018. Investigation of factors affecting on viscosity reduction of sludge from Iranian crude oil storage tanks. Petroleum Science, 15(3): 634-643.

24. Kalhor A.X., Movafeghi A., Mohammadi-Nassab A.D., Abedi E. and Bahrami A. (2017). Potential of the green alga Chlorella vulgaris for biodegradation of crude oil hydrocarbons. Marine pollution bulletin, 123(1-2): 286-290.

25. Khanpour-Alikelayeh E., Partovinia A., Talebi A. and Kermanian H. 2020. Investigation of Bacillus licheniformis in the biodegradation of Iranian heavy crude oil: A two-stage sequential approach containing factor-screening and optimization. Ecotoxicology and Environmental Safety, 205: 103-111.

26. Kumari S., Regar R.K. and Manickam N. 2018. Improved polycyclic aromatic hydrocarbon de

Neurofibromatosis type1

Maryam Molaiei jahromi[1*]; Ali Barzegar[1]

1-Student, Department of Basic Sciences, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources
2-Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources

**maryammolaieejahromi@yahoo.com*

Abstract
Neurofibromatosis (NF) is one of the genetic diseases whose inheritance is autosomal dominant. DNA mthalation is one of the most important epigenetic changes in which a methyl group is covalently added to the 5´ base cytosine atom by DNA methyltransferase enzymes (DNMTs) to form 5-methyl cytosine. The prevalence of neurofibromatosis type 1 (NF1), also known as Recklinghausen, is 1 in 3,500 people and its diagnostic symptoms are a variety of skin and neuro-environmental disorders. This disease causes a variety of cancers such as skin cancer and learning difficulties, especially in primary school age. Alterations in the DNA methylation pattern of the NF1 gene promoter, which may result from defects in the repair system, can also lead to cessation of transcription and alteration of the expression of this gene. It is also involved in cell adhesion as well as modulating cell motility.

Keywords: Neurofibromatosis, mthalation, NF geen

نوروفیبروماتوز نوع۱

مریم مولائی جهرمی[1*]؛ علی برزگر[1]

۱-دانشجو, گروه علوم پایه, دانشکده علوم دامی و شیلات, دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲-دانشیار, گروه علوم پایه, دانشکده علوم دامی و شیلات, دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

maryammolaieejahromi@yahoo.com

چکیده

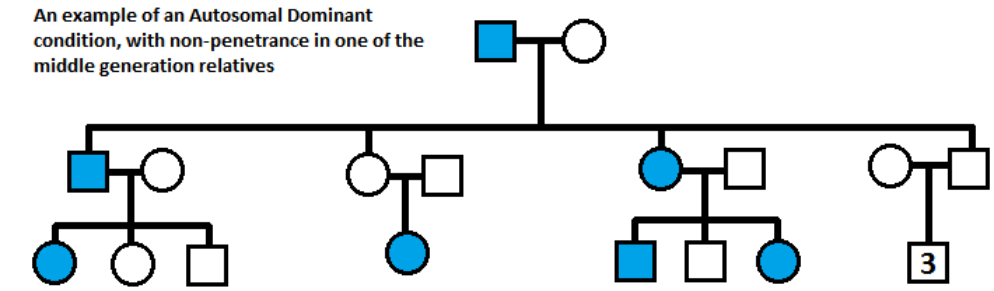
بیماری نوروفیبروماتوز (Neurofibromatosis, NF) یکی از بیماری‌های ژنتیکی است که وراثت آن به‌صورت آتوزومال غالب می‌باشد.. متیلاسیون DNA یکی از مهمترین تغییرات اپی ژنتیکی است که در طی آن یک گروه متیل توسط آنزیم‌های DNA متیل ترانسفرازی (DNMTs)بصورت کووالانسی به اتم ۵ ´ باز سیتوزین اضافه شده و ۵ متیل سیتوزین بوجود می‌آید.شیوع نوروفیبروماتوز نوع ۱ (NF1)که بنام رکلینگهاوزن نیز خوانده می‌شود ۱ در هر ۳۵۰۰ نفر بوده و علائم تشخیصی آن وجود انواع اختلالات پوستی و عصبی- محیطی است. این بیماری باعث بروز انواع سرطان ها مانند سرطان پوست و مشکل در یادگیری به ویژه در سنین دبستان می‌شود.تغییر الگوی متیلاسیون DNA پروموتر ژن NF1 که ممکن است در نتیجه‌ی نقص در سیستم ترمیمی بوجود آید نیز منجر به توقف رونویسی و تغییر بیان این ژن گردد.نوروفیبرومین علاوه بر اینکه با مهار مسیر Ras/Raf/MAP kinase باعث جلوگیری از فعالیت فاکتور های رشد می شود، در چسبندگی سلول و همچنین تعدیل تحرک سلولی نیز نقش دارد.

واژگان کلیدی: نوروفیبروماتوز ، متیلاسیون ، ژنNF1

۱.مقدمه

نوروفیبروماتوز نوعی بیماری آتوزومال غالب می‌باشد که در زنان و مردان به نسبت برابر بروز می‌کند؛ الگوی این بیماری در شجره نامه معمولا به صورت عمودی بوده (یعنی در تمام نسل ها این بیماری به چشم می‌خورد)(شکل۱). اما این بیماری می‌تواند در اثر رخ دادن جهش جدید [121]نیر ایجاد شود بدین صورت که پدر و مادر سالم هستند اما فرزند بیمار است ؛لازم به ذکر است که این جهش در هنگام لقاح در تخمک یا اسپرم به وجود می‌آید.(۱)

[121] denovo mutation



شکل۱:شجره نامه بیماری های آتوزمی غالب

ازبین هر ۳۵۰۰ نفریک نفر به این بیماری مبتلا ست. احتمال انتقال این بیماری به نسل های بعدی در یک خانواده ۵۰٪می‌باشد. ۵۰٪ افراد مبتلا بدون سابقه خانوادگی بوده که این بیماری از طریق جهش جدید در این دسته از بیماران رخ می‌دهد. امید به زندگی در بین افراد ۸ تا ۱۵ ساله به علت شدت گرفتن این بیماری در این بازه به شدت کاهش میابد.(۲).نوروفیبروماتوز برای اولین بار در سال ۱۸۸۲توسط یک پاتولوژیست آلمانی بنام VonReklinghausen شناسایی شد بنابراین, این بیماری رکلینگهاوزن [۱۲۲]نیز نامیده می شود. با این حال، به طور دقیق‌تر اولین توصیف این اختلال در اوایل سال ۱۸۴۹ توسط رابرت ویلیام اسمیت انجام شد، اما اسمیت بر این عقیده این بود که منشا این بیماری اعصاب نیست بلکه بافت همبند است.(۳).

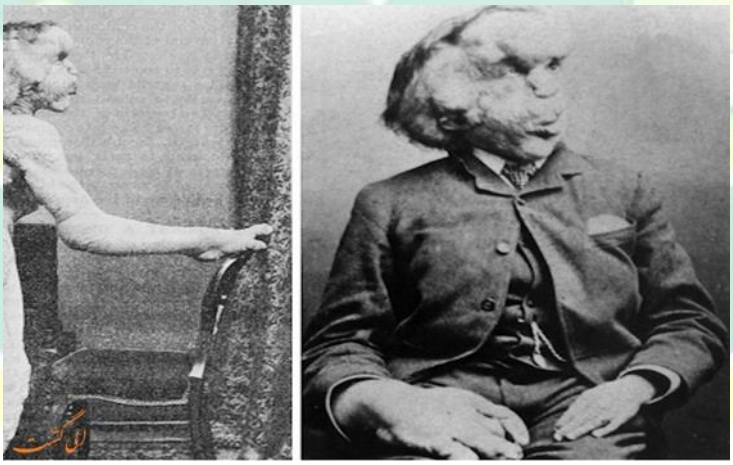
۱-۱-مرد فیلی:

فردی بنام ژوزف مریک [123] در سال 1862 در خانواده ای فقیر در حومه ی یکی از شهر های انگلستان بدنیا آمد.او تا سن ۱۰ سالگی و تا قبل از فوت مادر زندگی شادی را سپری میکرد پس از آن ناتوانی و بد شکلی پیشرونده در او منجر به انزوای اجتماعی,بیکاری و خانخه نشینی اش شد.تا اینکه در اواخر دوران نوجوانیش خانه ی فقرا سرپرستی او را بر عهده گرفت. وی در سن ۲۷ سالگی در اثر خفگی و در رفتگی خود به خودی گردن در گذشت. بیماری ژوزف در زمان حیاتش تشخیص داده نشد اما طبق گفته های نامبرده در زمان حیاتش مبنی بر اینکه هیچ فردی در خانواده اش چنین بیماری نداشته اما مادرش در سنین

[122]VonReklinghausen
[123] Joseph Merric

کودکی فلج شده بود که احتمالا به دلیل بیماری فلج اطفال یا جراحت درمان نشده بود و زمانیکه مادرش اورا بادارر بود بعلت ترس از فیل نام اورا مرد فیلی گذاشـــتند ولی چون هیچ واقعه ی ناخواســـته ی دیگری نیز در طول حاملگی مادرش ویا در ایوایل دوران کودکی ژوزف در پرونده ی پزشکی او ثبت نشده است او دچار ضخیم شدگی بافت های زیر پوستی ,همراه با چین های ضخیم پوستی ,وجود چندین زائده ی شبه زیگیل یا پاپیلوما[۱۲۴]در بازوی راست و هر دو پا و ضخیم شدگی استخوان جمجمه شده بود . جمجمه ی ژوزف بسیار غیر طبیعی بوده و طول دور جمجمه ی وی۹۱cm بود در حالی که این اندازه در افراد عادی ۵۴ تا ۵۹cm می‌باشد.بر روی جمجمه ی او بر جستگی های استخوانی بزرگ وگرد وجود داشت.(شکل۲) بررسی اسکلتی ژوزف به خوبی حفظ و نگهداری شده است,نشان دندهده ی این است که این برجستگی ها تومورهای خوش خیم معروف استئوما [۱۲۵]می‌باشد.بر اساس علائم بالینی ذکر شده حدس اول در مورد بیماری او نوروفیبروماتوز تیپ۱ بود که در این بیماری لکه های شیر قهوه ای [۱۲۶]موجود بر روی پوست و چندین تومور نرم با منشاء عصبی موسوم به نوروفیبروما دیده می‌شد ؛اما ویژگی های بالینی ژوزف شدید تر از این حالت بود.تشخیص های دیگر درمورد بیماری او شامل ناهنجاری های اسکلتی هچون بیماری پگت[۱۲۷],دیسپلازی فیبری و سندرم مافوچی [۱۲۸]میباشند که هیچ کدام از این موارد با علائم بالینی ذکر شده مطابقت نداشتند.در حال حاضر تشخیص احتمالی سندرم پروتئوس است در این سندرم رشد بیش از حد نا متقارن,لیپوماها,خال ها,اگزوتوزها[۱۲۹]متعدد در افراد مبتلا دیده میشود در ابتدا تصور میشد که عامل ایجاد این سندرم مادر زادی جهس در PTEN است امادر DNA استخراج شده از اسکلت ژوزف هیچ نوع جهشی را نشان نداد.(۲۳)

شکل۲:مرد فیلی

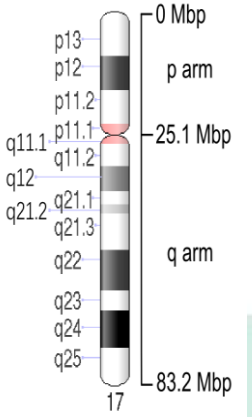


۱-۲ –نوروفیبروماتوز نوع۱

[124] Papiluma
[125] Osteoma
[126] Café-ou-lait
[127] Paget
[128] Muffuci
[129] Exotoses

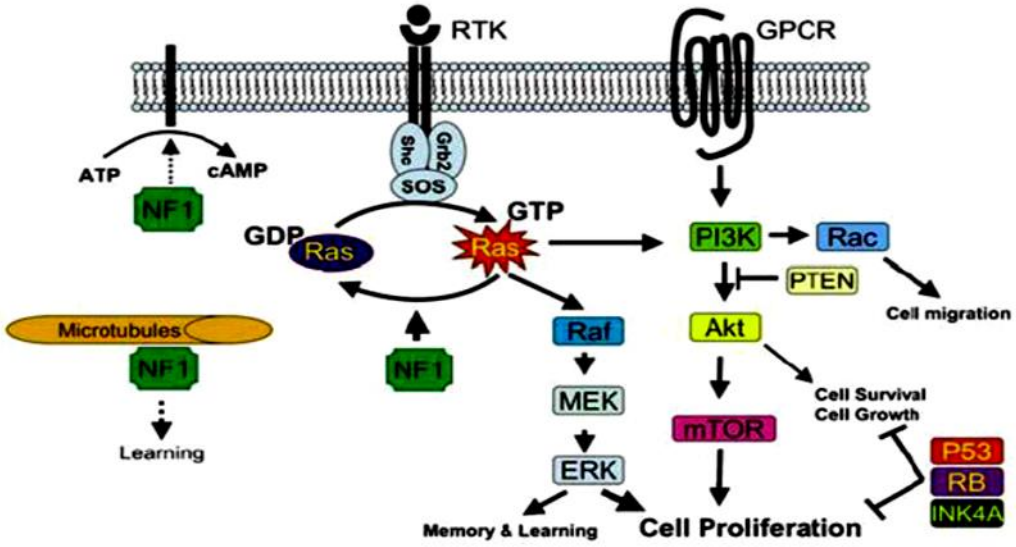
نوروفیبروماتوز نوع ۱ حاصل جهش درژن نوروفیبرومین ۱ که نوعی سر کوبگر تومو[۱۳۰]رمی‌باشد است که این ژن روی بازوی بلند کروموزوم ۱۷ باند۱۱ و زیر باند ۱۱ قرار دارد.(شکل۳)(۴-۵)

شکل۳:کروموزوم شماره۱۷ و جایگاه ژنی NF1



پروتئین کد شده توسط ژن |NF1, نوروفیبرومین است این پروتئین یک پروتئین چند دامنه‌ای بزرگ است(۲۸۳۹ اسید آمینه؛ ۳۱۹ کیلو دالتون)؛کهRAS-GTPase را فعال کرده.و به عنوان تنظیم کننده منفی پروتئین های RAS فعالیت می‌کند. با از دست رفتن عملکرد NF1 ژن RAS بصورت غیر قابل کنترلی فعال می‌شود که درنتیجه آبشارهای سیگنال دهی مرتبط آن نیز رشد بی روبه پیدا کرده و بنابر این باعث رشد و تکثیر سلولی خواهد شد (RAS میتوژن باعث فعال شدن پرونئین کیناز خارج سلولی و فسفاتیدیل اینوزیتول ۳- کیناز در ژن های انسانی نورفیبرومین و سل لاین MPNTS می‌شود.)(شکل۴)

130 tumor Suppressor



شکل۴ :از دست دادن بیان NF1 باعث فعال شدن RAS، اختلال در رشد سلولی ودر نتیجه تومورزایی می شود.

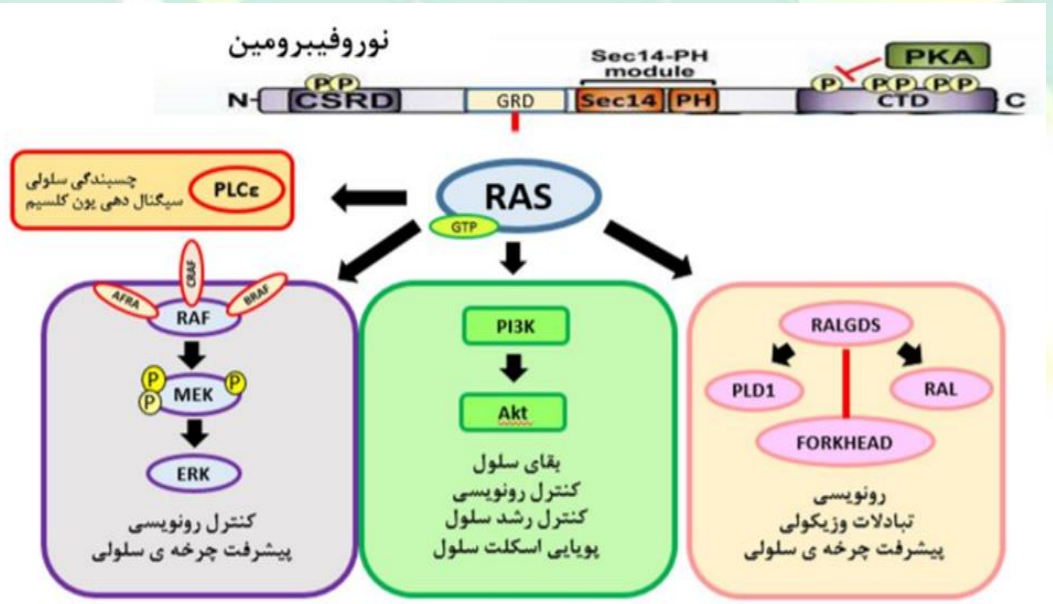
مشخصات کلی

ژن NF1 یکی از بزرگ‌ترین ژن‌های انسانی است و حدود ۳۵۰ کیلوباز است که حاوی ۶۰ اگزون می‌باشد از این تعداد ۳ تای آن‌ها به صورت متناوب به هم متصل می‌شوند، و یک رونوشت mRNA ۱۲ کیلوبازی را کد می‌کند.پروتئین کد شده توسط ژن |NF1, نوروفیبرومین است این پروتئین یک پروتئین چند دامنه‌ای بزرگ است(۲۸۳۹ اسید آمینه؛ ۳۱۹ کیلو دالتون)؛کهRAS-GTPase را فعال کرده.و به عنوان تنظیم کننده منفی پروتئین های RAS فعالیت می‌کند.با از دست رفتن عملکرد NF1 ژن RAS بصورت غیر قابل کنترلی فعال می‌شود که درنتیجه آبشارهای سیگنال دهی مرتبط آن نیز رشد بی روبه پیدا کرده و بنابر این باعث رشد و تکثیر سلولی خواهد شد (RAS میتوژن باعث فعال شدن پرونئین کیناز خارج سلولی و فسفاتیدیل اینوزیتول ۳- کیناز در ژن های انسانی نورفیبرومین و سل لاین MPNTS می‌شود. (۶) تغییر الگوی متیلاسیون DNA در پروموتر ژن NF1 که در نتیجه‌ی نقص در سیستم ترمیمی بوجود می‌آید، منجر به توقف رونویسی می‌شود؛ در نتیجه بیماری نورفیبروماتوز نوع ۱ همراه با افزایش تو مور و نوروفیبروم های پوستی ایجاد می‌شود.وقوع بیماری نوروفیبروماتوز نوع ۱ ناشی از جهش از دست دادن عملکرد (LOS) ژن نوروفیبرومین ۱ می‌باشد.(۷)(شکل۵)

شکل۵: این قلمروها در NF1 شامل GRD میباد که GTPase RAS را از طریق تبدیل آنها به وضعیت غیر فعال bound-GDP مهار میکند. و در نتیجه از دست رفتن کارکرد NF1 موجب فعال سازی RAS به سمت افکتورهای پایین دست شامل PAF، PI3K، RALGDS و PLCε می‌شود. SEC14PHرابطی بین اسکلت سلولی و ساختار غشایی می‌باشد که برای ژن NF1 ضروری است و به عنوان یک GAP-RAS و مهار کننده فعالیت می‌کند NF1که بعنوان سوبسترای PKA عمل میکند که باعث مهار شدن NF1 از طریق فسفریالسیون CTD می‌شود. همچنین

انتهای آمینی CSRD نیز به شدت فسفریله می‌باشد. توسعه شبکه عصبی از طریق چسبندگی سلولی و اسکلت سلولی تحت تاثیر میانکنش FAKو CRMP ۲-با CTD می‌باشد.(۷).

بیماری نوروفیبروماتوز (NF) یکی از شایع‌ترین بیماری‌های ژنتیکی می‌باشد، این بیماری نوعی فاکوماتوزیس (بیماری پوستی-عصبی)[۱۳۱] بوده که بر اساس تظاهرات پوستی و تومور های سیستم عصبی–محیطی به دو نوع نورو فیبروماتوز نوع ۱ و نروفیبروماتوز نوع ۲ دسته بندی می‌شود. البته دسته سومی هم بنام شوآنوما[۱۳۲]وجود دارد که بدلیل شبیه بودن علائم به نوع دوم و همچنین نادر بودن افراد بیمار, جز نوع دوم دسته بندی می‌شود.(۸)با وجود اینکه نوروفیبروماتوز نوع ۱ یکی از شایع ترین بیماری های ژنتیکی می‌باشد، اما در میان مبتلایانی که ژنوتیپ مشابه دارند از لحاظ فنوتیپی تنوع بسیار زیادی وجود دارد؛ بنابراین در برررسی های کلینیکی انجام شده یافتن ارتباط بین ژنوتیپ و فنوتیپ در این بیماری به دلیل پیچیدگی‌های فنوتیپی از لحاظ بالینی برای تشخیص جهش بسیار سخت می‌باشد. چون در بعضی افراد دارای جهش علائم بسیار شدیدی وجود دارد در حالیکه در بعضی دیگر علائم بسیار خفیف تری دیده می‌شود. این گستردگی فنوتیپی می‌تواند تحت تاثیر ژن‌های اصلاح گر و عوامل محیطی بوجود آیند(۸). همچنین تشخیص مولکولی نوروفیبروماتوز نوع ۱ با توجه به اندازه‌ی بزرگ ژن‌های سرکوبگر تومور و همچنین مشخص نبودن نقاط حساس جهش (hot spot) بسیار مشکل می‌باشد۷). در ۱۰ تا ۱۳ درصد از بیماران مبتلا به نوروفیبروماتوز نوع ۱ تومور های بدخیم غلاف عصبی محیطی (MPNST) مشاهده می‌شود که عمدتا از نوروفیبروم پلکسی فرم ناشی میشود(۹). در سال۲۰۱۰Titze و همکاران ۷۹ DNA لوکوسیتی به‌عنوان کنترل(شاهد) و ۷۹ بیمار NF1 برای بررسی اثر متلاسیون در ایجاد نقص در ژن هایی مانند MLH1,MLH2,MSH6,PMS2که در سیستم ترمیم نقش دارند . توسط روش‌هایی مانند PCR مخصوص متیلاسیون (MS) و توالی یابی مورد بررسی قرار دادند؛ در این آزمایش دریافتند که پروموتر ژن‌های MLH1,MSH6 و PMS2 متیله نشده بودند. اما برخلاف این سه، پروموتر ژن MSH2 در مقایسه با نمونه شاهد هایپر متیله



شکل ۵

[131] phacomatosis
[132] Schwannomatosis

می‌باشد. علاوه بر این، بیمارانی که دارای تومورهای پوستی کمتری هستند. در مقایسه با افرادی که دارای تومورهای جلدی بیشتری می‌باشند،متیلاسیون پروموتر ژن MSH2 تفاوت چشمگیری دارند. MAGEA3 آنتی ژن کد کننده‌ی سرطان بیضه می‌باشد که علاوه بر سرطان بیضه در برخی دیگر از سرطان‌های بدخیم مانند بدخیمی تومورهای غلاف عصبی(MPNSTs)نیز نقش دارد. بیان این ژن معمولا با متلاسیون DNA تنظیم می‌شود. Nobeyam و همکاران در سال ۲۰۱۶ اثر متلاسیون CG در ناحیه ´5 ژن MAGEA3 در بیماران نوروفیبروماتوز ۱ و MPNST بررسی کردند. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که بروز جهش در ژن NF1 بعد از جهش در ژن‌های BRAF وNRAS سومین عامل ایجاد کننده‌ی ملانوماست. جهش‌های غیرفعال کننده‌ی ژن NF1 در ۴۶٪ افرادی که دارای الل‌های سالم ژن‌های BRAFوNRAS بودند گزارش شده‌است. مطالعات عملکردی انجام شده توسط Krauthammer و همکاران در سال ۲۰۱۵ ثابت می‌کند که سرکوب ژن NF1 باعث افزایش عملکرد Ras شده که این امر در اکثر ملانوما هایی که در اثر جهش این ژن بوجود می‌آیند نیز دیده می‌شود. علاوه بر موارد گفته شده به این نتیجه رسیدند که از دست دادن فعالیت این ژن باعث کاهش حساسیت مهارکننده‌ها مثل MEK و ERK می‌شود. بنابراین به این نتیجه رسیدند که از دست رفتن فعالیت این ژن ، علاوه بر بروز بیماری نوروفیبروماتوز نقش کلیدی در بروز انواع سرطان‌ها ازجمله ملانوما دارد. Nobeyama و همکاران در سال ۲۰۱۶ با انجام آزمایشاتی از قبیل RT-MSP و RT-PCR بر روی رده‌های سلولی(MPNSTs) و همچنین نمونه (MPNSTs) بیماران مبتلا به نوروفیبرروماتوز نوع ۱به‌منظور بررسی متیلاسیون و میزان بیان mRNA و ایمونوهیستو شیمی برای ارزیابی بیان MAGEB2 استفاده کردند. داده‌های بدست آمده از RT-MSP و RT-PCR نشان دادند که میزان متیلاسیون ژن MAGEB2 و بیان mRNA در نمونه های بیمار به نسبت نمونه های سالم به طرز قابل توجهی افزایش یافته است. با توجه به اطلاعات به‌دست آمده از RT-PCR از ۱۸ نمونه‌ی مورد آزمایش در سه تا از آن‌ها میزان متلاسیون کاهش چشمگیری داشت اما بر خلاف نمونه های سالم نمونه‌های بیمار دارای متیلاسیون بالایی بودند، همچنین با روش ایمونو هیستوشیمی به این نتیجه رسیدند که افزایش متیلاسیون باعث کاهش بیان MAGEB2 می‌شود.درMPNSTs ، MAGEB2 می‌تواند به‌صورت مداوم متیله و دمتیله شود این در حالی است که این ژن در انواع نوروفیبروما فقط متیله شده و از دمتیله شدن آن جلوگیری می‌شود. طبق تحقیقاتی که در سال ۲۰۱۶ Blakeley و همکاران بر روی بیماران نوروفیبروماتوز نوع ۱ پلکسی‌فرم انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که ۵۰٪ از مبتلایان نوروفیبروماتوز نوع ۱ به پلکسی‌فرم مبتلا می‌شوند که با پیشرفت بیماری، اعصاب دیاستال و ستون فقرات نیز درگیر می‌شوند. همچنین به این نتیجه رسیدند که میزان بروز این بیماری بسیار متغییر است و در اندام های مختلف بدن نمایان می‌شوند. ستون فقرات و اعصاب دیاستال بیشترین درگیری دا دارند و ۳۱٪ را شامل می‌شوند، و بعد از آن سر و گردن با ۲۵٪ بیشترین درصد را به خود اختصاص داده‌اند. در سال ۲۰۱۱ Zenker با بررسی نمونه های افراد مبتلا به نوروفیبروماتوز نوع ۱ به این نتیجه رسید که مسیر RAS / MAP کیناز دچار مشکل شده‌است بنابراین این بیماری نوعی RASopathies می‌باشد.

در سال ۲۰۱۱ با تعیین توالی کل اگزوم[۱۳۳]افراد مبتلا مشخص شد که در ۲۶ فرد از ۲۹ فرد مبتلاجهش کسب عملکرد C.49G A (P.Glu 7Lys)در آنکوژن AKT1 وجود دارد.ATK1 کد کننده یATK1 کیناز است.این آنزیم در فعال سازی مسیر سیگنال دهی PI3K-ATK باعث افزایش تکثیر سلول مقاومت به آپوپتوز [۱۳۴]میشود.(۱۲)نوروفیبرومین نوعی ژن سرکوبگر بالادست است که باعث تنظیم شدن Gپروتئین های کوچک Rasمی‌شود.پروتئین های Rasنوعی GTPase مونومر هستند که نقش مولکول

[133] Exome sequencing
[134] Apoptosis

های متصل شونده را ایفا می‌کنند و باعث تنظیم فعالیت های سلولی می‌شوند.GEF[۱۳۵] و RAS توسط GAP[۱۳۶] تنظیم می‌شوند و باعث تنظیم سطح فعالیتRas بدون اعمال تغییرات کووالانسی می‌شود.بطوریکه آن‌ها را بصورت مستقیم به سلول متصل می‌کند که این امر موجب تنظیم تغییرات پس از ترجمه مانند: بازسازی ساختاری و غیر قابل برگشت در قسمتC ترمینال بوسیله متیلاسیون, پروتئولیز,فسفریلاسیون,یوبی کوئیته شدن ,گلیکولیزاسیون و نیترولیزاسیون می‌شود.(۱۳)وقوع بیماری نوروفیبروماتوز نوع ۱ به دلیل جهش از دست دادن عملکرد (LOS) [۱۳۷] ژن نوروفیبرومین ۱ می‌باشد. در حال حاضر روش‌های درمانی نوروفیبروماتوز به‌خصوص جراحی، بدلیل احتمال عود مجدد و حتی بدخیم شدن تومورها بسیار محدود است. نوروفیبرومین علاوه بر اینکه با مهار مسیر Ras باعث جلوگیری از فعالیت فاکتور های رشد می‌شود، باعث چسبندگی سلول و همچنین تعدیل تحرک سلولی هم می‌شود.به علاوه نوروفیبرومین با اتصال به اسکلت سلولی وساختارهای غشایی، به‌عنوان یک تنظیم کننده‌ی منفی مسیر سیگنالینگ RHO/ROCK عمل کرده، که باعث رشد مناسب عصب و پویایی اسکلت سلولی می‌شود. در نتیجه میتوان گفت که جهش LOS باعث ازبین رفتن عملکرد طبیعی نوروفیبرومین شده که این امر سبب افزایش تکثیر سلول و مهاجرت سلولی می‌شود بنابراین شانس ابتلا به انواع مختلف سرطان‌ها افزایش میابد.(۱۴)متیلاسیون DNA تغییری است که بصورت اتصال کولانسی یک گروه متیل به DNA ؛ به‌خصوص در نواحی CpG DNA های دی نوکلوئوتیدی رخ می‌دهد(در این نواحی سیتوزین بعد از گوانین دیده می‌شود). متقوف شدن رونویسی از ژن زمانی رخ می‌دهد که جزایر CpG [۱۳۸](منطق ژنومی غنی از CpG) در ناحیه ´5 ژنی متیله شود.(۱۵)

۲-۲-علائم بیماری نوروفیبروماتوز نوع۱:

۱)مشاهده حداقل ۶عدد لکه های شیرقهوه[۱۳۹] با قطر بیش تر از۵ میلیمتر قبل از بلوغ و بیشتر از ۱۵میلیمتر بعد از سن بلوغ

۲) نوروفیبروم پوستی و یا حداقل وجود یک پلکسی فرم

[135] guanine nucleotide exchange factors
[136]proteins activating GTPase
[137] Loss of fnction

[139] cafe´-au-lait

۳)داشتن لک های پوستی (کک ومک) در ناحیه‌ی زیر بغل و کشاله‌ی ران

۴)ایجاد تومور در چشم و از دست دادن بینایی

۵مشاهده حداقل دو عدد هامارتوما

۶)یک ضایعه استخوانی مشخص مانند کجی ستون فقرات

۷)یکی از اعضای خانواده درجه ۱ نوروفیبروماتوز داشته باشند

*علاوه بر علائم عمومی فوق افراد مبتلا به نوروفیبروماتوز نوع ۱ مستعد ابتلا به تنگی نفس و مشکلات ریوی، درگیری غدد فوق کلیوی و درنتیجه افزایش فشار خون، ناتوانی های ذهنی و مشکل در یادگیری به‌خصوص در سنین مدرسه، افسردگی و مشکلات روحی، اسکولیوز، تشنج (صرع)، گرفتگی عروق و همچنین انواع گوناگونی از سرطان‌ها بخصوص سرطان سینه و تومورهای بدخیم مغزی هستند.(۱۶)ریسک ابتلا به سرطان در افراد مبتلا به نوروفیبروماتوز نوع ۱ نسبت به جمعیت عمومی ۲.۷ درصد بیشتر است که این نسبت از سن ۵۰ سالگی به بعد به ۲۰٪ افزایش میابد.(۱۶)ایجاد تومورهای پانکراسی در افراد مبتلا به نوروفیبروماتوز بسیار نادر است با این حال حدود ۲٪ از بیماران نوروفیبروماتوز به این نوع سرطان مبتلا می‌شوند؛ که ۴۸٪ از آنها خوش خیم بوده و در صورت تشخیص بموقع درمان پذیر هستنددر این افراد تومورهای ایجاد شده در پانکراس معمولا به صورت جامد می‌باشد و حالت پنبه ای شکل دارند که ندرت ظاهری کیستیک پیدا کرده و دچار خونریزی می‌شوند.(۱۷)قرار گرفتن در زیر تشعشع باعث افزایش تومورهای غلاف عصبی و توده های نوروفیبروما در بیماران مبتلا به نورو فیبروماتوز نوع ۱ می‌شود(۱۸)

حدود ۴ تا ۷٪ افراد مبتلا به نوروفیبروماتوز به بیماری صرع مبتلا می‌شوند که معمولا به علت ایجاد حالتی شبیه لخته خون در نیمکره سمت راست مغزشان است که معمولا با وارد شدن ضربه به سر فعال شده و باعث بروز صرع می‌شود.(۱ ۲)

کوتاهی قد در حدود ۱۳ تا ۳۳ درصد کودکان مبتلا به نوروفیبروماتوز نوع یک مشاهده شده است که می‌تواند به دلیل اختلال در عملکرد غدد درون ریز و مورمون رشد باشد. در افرادی که مبتلا به تومور مغزی می‌باشند هورمون رشد [۱۴۰]دچار کمبود شده که این امر باعث.کوتاهی قد می‌شود؛این تومور درقسمت سوپراسلا[۱۴۱]می‌باشد که در آن غده ی هیپوفیز قرار دارد. همچنین وجود گلیکوما در مغز می‌تواند باعث بلوغ زودرس در استخوان ها و در نتیجه کوتاهی قد در اثر بسته شدن زودرس اپی فزیال شود.(۲۲)

[140] GHD

۳. نتیجه گیری :

تنوع بسیار زیادی در میزان بیان این ژن در بین افراد وجود داره که احتمالا بخاطر خصوصیات اپی ژنتیکی متفاوت بیماران تحت تاثیر عوامل زنوبیوتیک می باشد.همچنین با توجه به اینکه نوعی سرطان می‌باشد؛لذا اگر بیماران از رژیم غذایی سالمی استفاده کنند(به ویژه گیاهخواری) شانس زندگی طولانتی تری خواهند داشت همچنین پیشنهاد می‌شود که خصوصیات ژنتیکی (جهش های موجود در این ژن در بیماران ایرانی) و خصوصیات اپی ژنتیکی (متیلاسیون) نیز بررسی گردد. بدلیل اینکه افراد بیمار تحت تاثیر عوامل زنوبیوتیکی متعدد از قبیل سموم کشاورزی قرار دارند که بشدت الگوی متیلاسیون ژنها رو تغییر می‌دهد و عامل تنوع در میزان بیان این ژن در بین افراد با ژنوتیپ یکسان است.

منابع

1. A.D. Goldberg, C.D. Allis, E. Bernstein, Epigenetics: a landscape takes shape, Cell 128 (2007) 635–638.

2. Anderson, J. L., & Gutmann, D. H. (2015). Neurofibromatosis type 1. In *Handbook of clinical neurology* (Vol. 132, pp. 75-86). Elsevier.

3. Blakeley, J. O., & Plotkin, S. R. (2016). Therapeutic advances for the tumors associated with neurofibromatosis type 1, type 2, and schwannomatosis. *Neuro-oncology*, *18*(5), 624-638.

4. Ferner, R. E. (2007). Neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2: a twenty first century perspective. *The Lancet Neurology*, *6*(4), 340-351

5. Gerber, P. A., Antal, A. S., Neumann, N. J., Homey, B., Matuschek, C., Peiper, M., ... & Bölke, E. (2009). Neurofibromatosis. *European journal of medical research*, *14*(3), 102

6. Husan MS, Korf BR. The Phakomatoses. In: Rimon DL, Connor JM, Pyeritz RE, Korf RB, editors. Emery and Rimon's principle and practice of medical genetics. New York, NY: Churchill Livingstone, 2002; pp. 3162–203

7.] E.M. Jouhilahti, S. Peltonen, A.M. Heape, J. Peltonen, The pathoetiology of neurofibromatosis 1, Am. J. Pathol. 178 (2011) 1932–1939.

8. Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, *13*(7), 484

9. Krauthammer, M., Kong, Y., Bacchiocchi, A., Evans, P., Pornputtapong, N., Wu, C., ... & Serin, M. (2015). Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. *Nature genetics*, *47*(9), 996

10. Maertens, O., Brems, H., Vandesompele, J., De Raedt, T., Heyns, I., Rosenbaum, T., ... & Speleman, F. (2006). Comprehensive NF1 screening on cultured Schwann cells from neurofibromas. *Human mutation*, *27*(10), 1030-1040.

11. McClatchey, A. I. (2007). Neurofibromatosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, *2*, 191-216.

12. Nobeyama, Y., & Nakagawa, H. (2016). MAGEA3 methylation status is associated with prognosis of malignant peripheral nerve sheath tumor and with neurofibroma type in neurofibromatosis type 1. *Journal of dermatological science*, *84*(1), 101-104.

13. Pasmant, E., Sabbagh, A., Spurlock, G., Laurendeau, I., Grillo, E., Hamel, M. J., ... & Lacombe, D. (2010). NF1 microdeletions in neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype. *Human mutation*, *31*(6), E1506-E1518.

14. Pasmant, E., Parfait, B., Luscan, A., Goussard, P., Briand-Suleau, A., Laurendeau, I., ... & Vidaud, M. (2015). Neurofibromatosis type 1 molecular diagnosis: what can NGS do for you when you have a large gene with loss of function mutations?. *European Journal of Human Genetics*, *23*(5), 596.

15. Rad, E., & Tee, A. R. (2016, April). Neurofibromatosis type 1: Fundamental insights into cell signalling and cancer. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 52, pp. 39-46). Academic Press.

16. Reddington, J. P., Perricone, S. M., Nestor, C. E., Reichmann, J., Youngson, N. A., Suzuki, M., ... & Ramsahoye, B. H. (2013). Redistribution of H3K27me3 upon DNA hypomethylation results in de-repression of Polycomb target genes. *Genome biology*, *14*(3), R25.

17. Titze, S., Peters, H., Währisch, S., Harder, T., Guse, K., Buske, A., ... & Harder, A. (2010). Differential MSH2 promoter methylation in blood cells of Neurofibromatosis type 1 (NF1) patients. *European journal of human genetics*, *18*(1), 81

18. Valero MC, Martı´n Y, Herna´ndez-Imaz E et al. (2011). A highly sensitive genetic protocol to detect NF1 mutations. J Mol Diagn 13: 113–122

19. Xu, G., O'Connell, P., Viskochil, D., Cawthon, R., Robertson, M., Culver, M., ... & Weiss, R. (1990). The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell*, *62*(3), 599-608.

20. Zaleta-Pinet DA, Holland IP, Mun˜oz-Ochoa M, Murillo-Alvarez JI, Sakoff JA, Altena IA, Mc Cluskey A (2014) Cytotoxic from Laurencia pacifica. Org Med Chem Lett 4:8. compounds

21. Bernardo, P., Cinalli, G., & Santoro, C. (2020). Epilepsy in NF1: a systematic review of the literature. Child's Nervous System, 36(10), 2333-2350

22. Soucy, E. A., Van Oppen, D., Nejedly, N. L., Gao, F., Gutmann, D. H., & Hollander, A. S. (2013). Height assessments in children with neurofibromatosis type 1. Journal of child neurology, 28(3), 303-307.

23. Peter turnpenny. Sain ellard, 2020, Emerry's element of medical genetic, 16th, 715

The association between vaspin rs2236242 polymorphism with susceptibility to type 2 – diabetes and obesity in the population of the east of Golestan province

Maede Fekri Abras[1*]; Sohrab Boozarpour[2]; Alireza Khanahmadi[3]; Shaaban Ghalandarayeshi[4]

1- Student, Biology, Basic Sciences & Engineering, Gonbad Kavous University
2- Assistant Professor, Biology, Basic Sciences & Engineering, Gonbad Kavous University
3- Assistant Professor, Animal Science, Agriculture & Natural Resources, Gonbad Kavous University
4- Assistant Professor, Statistics, Basic Sciences & Engineering, Gonbad Kavous University

**Corresponding Author Email address: Maede.fekri@gmail.com*

Abstract

Obesity is associated with a range of health problems in the adult and pediatric population. Understanding the pathogenesis of obesity and its metabolic consequences has advanced rapidly in recent decades. Adipose tissue represents an active endocrine organ that, in addition to regulating fat mass and nutrient homeostasis, releases a large number of bioactives (adipokines) into important metabolic organs including the brain, liver, and skeletal muscle, and signal the immune system, thereby modulating blood pressure homeostasis, lipid and glucose metabolism. In the present study, we summarize current data on the effect of vaspin-derived adipose tissue hormones on insulin resistance.

This study was performed on obesity-specific adipokine and its role in type 2 diabetes and insulin resistance in the population of the east of Golestan province. In this study, 200 diabetics and 200 normal individuals ranging in age from 30 to 60 years with equal numbers of men and women were studied.

First of all, DNA extraction was performed by manually salting out method and using a DNA extraction kit. After designing the primers, adipokine vaspin rs2236242 T/A polymorphism was detected by polymerase chain reaction (T-ARMS-PCR) and the allele bond was examined by agarose gel electrophoresis. The results were analyzed by SPSS software.

The results showed that, the frequency of AA genotype in normal and patient groups was 13% and 5%, respectively. In addition, TA genotype was seen in about 42% and 46% of diabetics and normal individuals, respectively. Finally, the TT mutant genotype was observed in about 53% of diabetic individuals. Also, about 41% of the normal group had the TT genotype.

In this study, carriers of the AT /TT genotype of the vaspin gene showed an increased incidence of type 2 diabetes compared to the AA genotype. The results showed that the T allele of vaspin rs2236242 increases the risk of diabetes in the population of the east of Golestan province compared to the A allele.

Keywords: Diabetes, Fasting blood sugar, Tetra-arms-PCR, polymorphism, Vaspin

ارتباط پلی‌مورفیسم rs2236242 ژن واسپین با استعداد ابتلا به دیابت نوع ۲ و چاقی در جمعیت شرق استان گلستان

مائده فکری آبرس[۱*]؛ سهراب بوذرپور[۲]؛ علیرضا خان احمدی[۳] ؛ شعبان قلندرآیشی [۴]

۱- دانشجو، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، دانشگاه گنبدکاووس

۲- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، دانشگاه گنبدکاووس

۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس

۴- استادیار، گروه آمار، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، دانشگاه گنبدکاووس

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: *Maede.fekri@gmail.com*

چکیده

چاقی با مجموعه ای از مشکلات سلامتی در جمعیت بزرگسال و کودکان مرتبط است. درک پاتوژنز چاقی و عواقب متابولیکی آن در دهه های گذشته به سرعت پیشرفت کرده است. بافت چربی نشان دهنده یک اندام غدد درون ریز فعال است که علاوه بر تنظیم توده چربی و هموستاز مواد مغذی، تعداد زیادی واسطه بزیستس فعال (آدیپوکین‌ها) را آزاد می‌کند که به اندام های دارای اهمیت متابولیک از جمله مغز، کبد، ماهیچه های اسکلتی و سیستم ایمنی سیگنال می‌دهند و در نتیجه هموستاز فشار خون، متابولیسم لیپید و گلوکز را تعدیل می‌کنند. در بررسی حاضر، ما داده‌های فعلی را در مورد تأثیر هورمون‌های مشتق از بافت چربی واسپین بر مقاومت به انسولین خلاصه می‌کنیم. .

این بررسی بر روی آدیپوکین خاص چاقی و نقش آن در دیابت نوع ۲ و مقاومت به انسولین در جمعیت شرق استان گلستان انجام شد. در این مطالعه بر روی ۲۰۰ فرد دیابتی و ۲۰۰ فرد نرمال در رده سنی ۳۰ تا۶۰ سال با تعداد برابر زن و مرد در هر دو گروه تحقیق و بررسی صورت گرفت.

در ابتدا استخراج DNA به روش دستی رسوب نمکی و استفاده از کیت آماده استخراج DNA انجام شد. پس از طراحی پرایمرها، پلی‌مورفیسم rs2236242 T/A آدیپوکاین واسپین توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز (T-ARMS-PCR) گسترش پیدا کرده و باند الل‌ها توسط الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. نتایج مشاهده شده توسط نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

بررسی ها نشان داد که در این پژوهش فراوانی ژنوتیپ AA در گروه بیمار۵ درصد و نرمال ۱۳ درصد می باشد. ژنوتیپ TA ۴۲ درصد در افراد دیابتی و نرمال ۴۶ درصد این افراد را شامل شد. و درنهایت ژنوتیپ جهش یافته TT در بین افراد دیابتی نزدیک به ۵۳ درصد افراد مشاهده شد همچنین از گروه نرمال حدود ۴۱ درصد افراد دارای ژنوتیپ TT بودند.

در این پژوهش ناقلین ژنوتیپ AT/TT ژن واسپین نسبت به ژنوتیپ AA افزایش ابتلا به دیابت نوع ۲ را نشان دادند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان دادند که آلل T واسپین rs2236242 در مقایسه با آلل A خطر ابتلا به دیابت را در جمعیت شرق استان گلستان افزایش می دهد.

واژگان کلیدی: دیابت، قند خون ناشتا ، Tetra-arms-PCR، پلی‌مورفیسم، واسپین

۱. مقدمه

۱-۱- شاخص توده بدنی (BMI)

شاخص توده بدنی معیاری است که در حال حاضر برای تعریف ویژگی‌های تن سنجی قد/ وزن در بزرگسالان و برای طبقه بندی آنها به گروه‌ها استفاده می‌شود و شاخصی از چاق بودن یک فرد را نشان می‌دهد. همچنین به طور گسترده به عنوان یک عامل خطر برای ایجاد یا شیوع چندین مشکل بهداشتی استفاده می‌شود . در سال ۱۹۹۳، WHO یک گروه مشاوره متخصص را با مسئولیت دسته بندی BMI تشکیل داد. نتایجی که به‌عنوان گزارش در سال ۱۹۹۵ منتشر گردید، طبقه بندی در چهار دسته کمبود وزن، وزن طبیعی، اضافه وزن و چاق تعیین شد. اگر BMI فرد، بین ۱۵ تا ۱۹/۹ باشد کمبود وزن، اگر BMI بین ۲۰ تا ۲۴/۹ باشد وزن طبیعی ، اگر ۳۰ تا ۳۵ یا ۳۰ باشد، دچار اضافه وزن و چاقی می باشد (Garrow and Webster, 1985).

همچنین در مطالعه ای که توسط بایز و همکاران صورت گرفت نشان دادند با افزایش سطح BMI، شیوع دیابت شیرین و فشار خون بالا به صورت خطی و قابل مشاهده افزایش یافته است (Bays et al., 2007).

۱-۲- نقش آدیپوکاین ها در چاقی و دیابت

چاقی شرایطی پاتولوژیک است که با رسوب بیش از حد چربی همراه است و امروزه یک مشکل بزرگ بهداشت عمومی محسوب می‌شود و ریسک فاکتور انواع مهم بیماریها در سراسر جهان است. چاقی با فعالسازی مزمن سیستم ایمنی ذاتی، مقاومت انسولینی، عدم تحمل گلوکز و دیابت همراه است (Watson, Zibadi, and Preedy, 2010).

بسیاری از تداخلات بین سیستم‌های متابولیکی و ایمنی به وسیله شبکه پیچیده‌ای از میانجی های محلول سیستم ایمنی و آدیپوسیت ها با هم هماهنگ می‌شود. چاقی نه تنها با توسعه بافت آدیپوز همراه است بلکه با نقصان عملکردهای مختلف این بافت مثل التهاب مزمن با درجه پایین و هایپوکسی نیز ارتباط دارد. امروزه میدانیم ماکروفاژها در بافت چربی گسترده، تجمع می‌یابند؛ جایی که منبع عمده‌ای از سیتوکینهای پیش التهابی مثل TNF-α و IL-6 نیز حضور دارند (Sell and Eckel, 2010).

افزایش توده بافت چربی می‌تواند منجر به آزاد شدن آدیپوکین‌ها شود. مقاومت به انسولین نشانه چاقی است و عموماً در اوایل سندرم متابولیک ظاهر می‌شود. ارتباط نزدیکی با افزایش توده بافت چربی احشایی دارد بروز دیابت نوع ۲ (T2DM) عمدتاً به دلیل افزایش توده بدن و مقاومت به انسولین است (KNOEFEL et al., 2013).

گزارش شده است که التهاب ناشی از چاقی نقش تعیین کننده ای در ترشح بسیاری از آدیپوکین ها از جمله کمرین و لپتین، انواع سیتوکین‌ها مانند فاکتور نکروز تومور (TNF) و اینترلوکین (IL) و اسیدهای چرب آزاد (FFA) دارد (Jung and Choi, 2014). این مولکول‌ها ممکن است مقاومت به انسولین را از طریق مسیرهای متعدد ارتقا دهند و در نهایت منجر به هیپرگلیسمی و دیابت

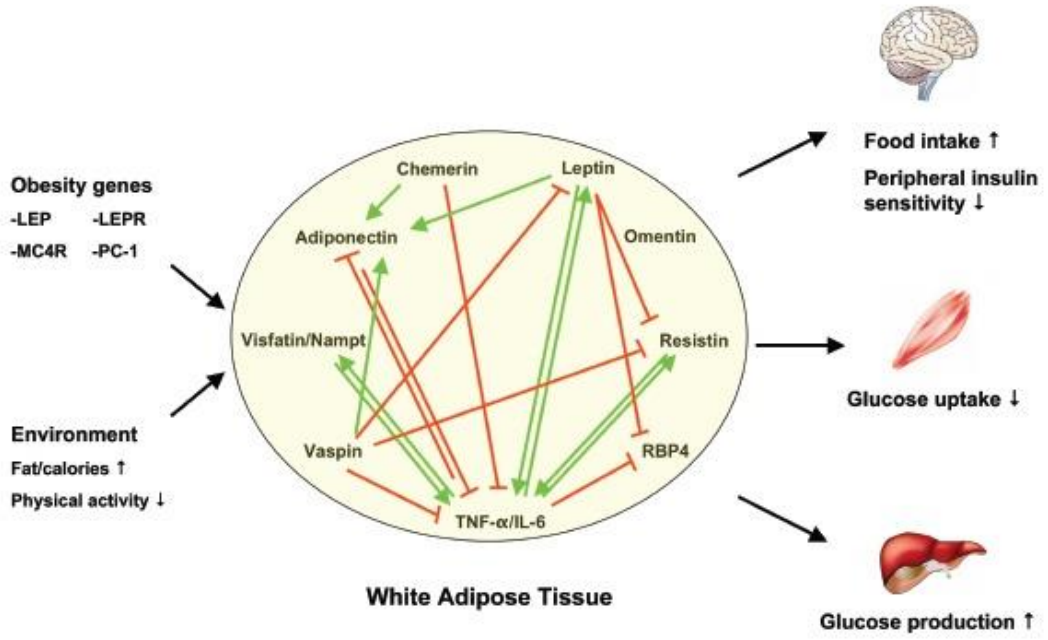
T2 شوند. هم‌چنین با پیشرفت هیپرگلیسمی، استرس اکسیداتیو افزایش می یابد و منجر به آسیب DNA می‌شود (Huang and Xie, 2015).

آدیپوسیتها منبع سیتوکینهای متنوعی هستند شامل آدیپونکتین، واسپسن، کمرین، لپتین، رزیستین، ویسفاتین؛ که به نظر می رسد ارتباط مهمی بین چاقی و اختلالات مختلف ایجاد کنند. واسپین اخیراً به عنوان آدیپوکین های جدید با بیان بالا در بافت چربی افراد چاق و T2DM و دارای ویژگی‌های بالقوه حساس به انسولین شناخته شده‌اند (Jaso-Friedmann et al., 2008).

۱-۳- واسپین

ژن واسپین در کروموزوم ۳۲، q14 واقع شده و از ۶ اگزون و ۵ اینترون تشکیل شده است. مطالعات انجام شده در رابطه با واسپین، بیان بالای آن در بافت چربی بیماران چاق و T2DM و حساسیت به انسولین را نشان می دهد (Yang et al., 2017). واسپین عضوی از خانواده بازدارنده های سرپین پروتئاز است و عنوان مهارکننده پپتیداز سرپین، عضو ۱۲ خانواده سرپین A (SERPINA12) شناخته می‌شود (Silverman et al., 2001).

همچنین واسپین پروتئازهایی را که مولکول‌ها را با اثرات کاهش گلوکز تجزیه می‌کنند و همچنین فاکتورهای ضد التهابی را مهار می‌کند.در حقیقت واسپین بر روی سایر آدیپوکاین ها موجب سرکوب بیان لپتین، رزیستین TNF-α می شود (Blüher, 2012). واسپین باعث مهار پروتئازهاییمی شود که مولکولهای آنتی هیپرگلیسمیک و بی اشتهایی را تجزیه می کنند .مکانیسم دقیق وازپین در بدن به خوبی شناخته نشده است (Moradi et al., 2016).



شکل ۱: چاقی، آدیپوکاین و مقاومت به انسولین (Rabe et al., ۲۰۰۸)

بیان mRNA واسپین با درجه ی چاقی و مقاومت به انسولین متناظر می‌باشد، وارد کردن واسپین نوترکیب انسانی به موش‌های چاق القا شده با رژیم غذایی باعث بهبود بخشیدن به مقاوت انسولین شد که نشان دهنده این است که واسپین یک عامل جبرانی در وضعیت چاقی می تواند باشد (Teshigawara et al., 2012; Koiou et al., 2011). همچنین در مطالعه ای دیگر توسط هیدا و همکاران (Hida et al., 2005) نشان دادند تجویز واسپین به موشهای چاق موجب بهبود تحمل گلوکز، افزایش حساسیت انسولین و بیان ژنهای تغییر یافته مربوط به مقاومت به انسولین گردید.

در رابطه با شاخص توده بدنی (BMI) مطالعات نشان دادند که بیان واسپین احشایی با شاخص توده ی بدنی و درصد چربی بدن رابطه مثبت دارد، اما با تست تحمل گلوکز خوراکی ۲ ساعته (OGTT) گلوکز پلاسما رابطه منفی دارد ، در حالی که بیان mRNA واسپین در در بافت چربی احشایی و زیر جلدی با نشانگرهای چاقی مانند BMI ، میزان چربی بدن و نسبت دور کمر به باسن ارتباط داشت و درنتیجه با چاقی و پارامترهای مقاومت به انسولین مرتبط است. بیان واسپین با بدتر شدن دیابت و کاهش وزن کاهش می یابد. که نشان می دهد واسپین ممکن است یک آدیپوکین حساس کننده به انسولین باشد (Klöting et al., 2006).

درمقابل مطالعه‌ای که کمپف و همکاران در جمعیت کره انجام دادند هیچ ارتباط آماری معنی داری از SNPهای واسپین با نشانگرهای چاقی را قابل اثبات ندانستند. علاوه بر این، گنجاندن BMI یا دور کمر در مدل رگرسیون لجستیک به طور قابل توجهی بر ارتباط بین ژنوتیپ ها و T2DM تأثیر نداشته که این نشان می دهد ارتباط بین پلی مورفیسم واسپین و افزایش شیوع T2DM ناشی از چاقی نیست (Kempf et al., 2010).

۱-۴-اهمیت بررسی پلی مورفیسم ها

مشخص‌شده است که ژنوم موجودات به طور طبیعی دارای تفاوت‌هایی در ردیف بازهای خطی می‌باشند، این تغییرات طبیعی که سبب گوناگونی در افراد یک جمعیت می‌شود چند شکلی ژنتیکی (پلی مورفیسم یا جهش) نام دارد. جهش‌ها از طرق مختلفی می‌توانند سبب تغییر در فنوتیپ اصلی و بروز صفات جدید مانند بیماری یا سرطان گردند.

افرادی که داری یک سری جهش‌های خاصی می‌باشند دارای ریسک بالاتری برای ابتلا به یک فنوتیپ مانند سرطان ها، دیابت وسایر بیماری های دیگر می‌باشند. یافتن این جهش‌ها از طریق تکنیک Tetra-ARMs PCR و تعیین سطح خطر افراد دارای این جهش‌ها، موضوع بسیاری از پایان‌نامه‌ها و طرح‌های پژوهشی در کشورمان می‌باشد. بررسی ها در رابطه با نقش پلی مورفیسم rs2236242 واسپین در دیابت و چاقی در جمعیت های مختلف با نژاد های گوناگون نتایجی گاه متناقض داشته که این امر اهمیت نقش ژنتیک و پلی مورفیسم ها در نژاد های مختلف را نشان می‌دهد.

۲.مواد و روش‌ها

در این پژوهش پس از اخذ کد اخلاق از دانشکده علوم پزشکی گرگان، جمع آوری نمونه ها از ۲۰۰ فرد دیابتی و ۲۰۰ فرد نرمال با تعداد برابر زن و مرد در رده سنی ۳۰ تا ۶۰ سال انجام گرفت. بر این اساس ۱/۵ سی‌سی نمونه خونی از افراد یاد شده در آزمایشگاه تخصصی مهرگان شهرستان گنبدکاووس جمع‌آوری گردید و سایر مراحل پژوهش در آزمایشگاه مرکزی و دام دانشگاه گنبدکاووس انجام شد.

برای اطمینان از دیابتی بودن نمونه ها صرفا از افرادی که اذعان به ابتلا به دیابت داشتند و قند خون ناشتای آنها بیشتر از mg/dl ۱۴۰ بود برای ادامه تحقیقات استفاده شد. همچنین با اندازه گیری قد و وزن شرکت کنندگان در این پژوهش، شاخص توده بدنی این افراد نیز محاسبه گردید.

۲-۱- استخراج DNA

به منظور استخراج DNA به روش رسوب نمکی در ابتدا ۱/۵ میلی لیتر خون تازه حاوی ۵۰ میکرولیتر EDTA نیم مولار در لوله فالکون ریخته شد. سپس ۲ برابر حجم خون یعنی ۳ میلی لیتر از بافر جدا کننده به آن اضافه شد و چندین مرتبه به آرامی لوله سر ته نموده شد تا به رنگ قرمز روشن درآمد. در مرحله بعد ۱۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید.

مایع رویی دور ریخته شد و مرحله دوم تا پیدایش رسوب تکرار شد. ۱/۵ میلی لیتر بافر لیزکننده به رسوب سفید رنگ گلبول های سفید افزوده شد. سپس با ورتکس کاملا مخلوط گردید. ۷۰ میکرولیتر SDS 10 درصد اضافه شد که پس از مخلوط کردن، به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. در مرحله بعد ۳۵۰ میکرولیتر NaCl اشباع (۶ مولار) افزوده گردید سپس کاملا به وسیله ورتکس با دور بالا مخلوط گردید و به مدت ۱۵ دقیقه با rpm ۲۵۰۰ سانتریفوژ شد. به اندازه حجم مساوی محلول به آن کلروفورم اضافه کرده و ۱۰ دقیقه با rpm ۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ محلول رویی با سمپلر به فالکون

استریل دیگری منتقل شد. به میزان ۰/۱ حجم محلول، استات سدیم ۳مولار و ۲برابر حجم محلول به آن اتانول مطلق سرد اضافه گردید. در این مرحله فالکون به آرامی سرته گردید و کلاف DNA مشاهده شد.

کلاف DNA با پیپت برداشته و به میکروتیوپ ۱/۵ منتقل شد. میکروتیوپ حاوی DNA در سانتریفوژ یخچال دار با دور g ۱۲۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. محلول رویی به وسیله سمپلر دور ریخته شد و سپس ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد به رسوب DNA اضافه گردید. سپس در دمای ۴درجه با دور g ۸۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. در مرحله اخر اتانول خارج گردید و بعد از گذشت ۱۰ دقیقه برای خشک شدن میکروتیوپ، ۵۰ میکرولیتر آب ۶۵ درجه سانتی گراد که به مدت ۱۵ دقیقه در هیتر بوده اضافه گرید.

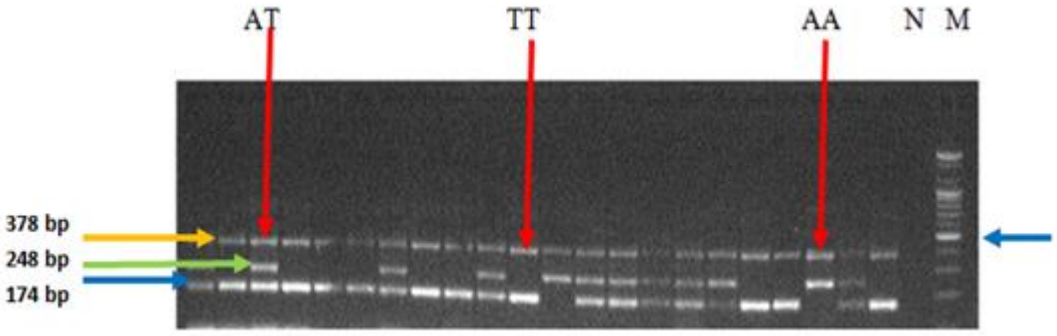
۲-۲- تکثیر ژن در ناحیه پلی‌مورفیسم

پس از استخراج DNA به روش دستی رسوب نمکی برای تکثیر ژن در ناحیه پلی‌مورفیسم مربوطه پس از طراحی پرایمرها (Abdelhamid and Zaafan, 2019) از روش Tetra_arms PCR استفاده شد. در روش Tetra-arms از دو پرایمر مخصوص الل جهش یافته و دو پرایمر مخصوص الل وحشی استفاده شد. به همین جهت تکثیر یک قطعه توسط پرایمر مخصوص الل جهش یافته وجود جهش در الل را اثبات می کند، همچنین تکثیر شدن یک قطعه توسط پرایمر مخصوص الل وحشی به معنای عدم وجود جهش در آن توالی می‌باشد. لذا می‌توان گفت که از نکات مهم در این روش طراحی پرایمر است که باید با دقت طراحی شود. (Medrano and de Oliveira, 2014)

جدول ۲: پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش

توالی	پرایمر
5’-AAGACGCCGCTTCTGTGCACT-3’	پرایمر رفت داخلی (الل T)
5’-CACAGGGACCCAGGATAACTTGCT-3’	پرایمر برگشت داخلی (الل A)
5’-GGAGGCAGACCAGGCACTAGAAA-3’	پرایمر رفت خارجی
5’-ACCATCTCTCTGGCTTCAGGCTTC-3’	پرایمر برگشت خارجی

بعد از انجام واکنش PCR به منظور مشاهده باندهای تکثیر شده از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد.



شکل ۲: باندهای مشاهده شده در ژل آگارز ۱/۵ درصد

۳. نتایج و بحث

بر اساس نتایج مشاهده شده در الکتروفورز ژل آگارز ژنوتیپ نمونه ها در اکسل یاداشت شد و برای بررسی‌های آماری توسط نرم‌افزار SPSS و تست مربع کای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تا مشخص شود در کدام موارد اختلاف معنادار وجود دارد. از دیدگاه آماری داده‌هایی که اختلاف معناداری دارند، P-value آنها کمتر از ۰/۰۵ است.

فرض

H0= جهش ژنوتیپ بر بروز بیماری تاثیری ندارد.

H1= جهش ژنوتیپ بر بروز بیماری تاثیری دارد.

نتایج انالیز به شرح زیر می‌باشد:

جدول ۲: فراوانی ژنوتیپ ها

		genotype			
		AA	AT	TT	Total
افراد دیابتی	Count	10	85	105	200
	% within groupe	5.0%	42.5%	52.5%	100.0%
افراد نرمال	Count	25	89	79	193
	% within groupe	13.0%	46.1%	40.9%	100.0%
کل جمعیت	Count	35	174	184	393
	% within groupe	8.9%	44.3%	46.8%	100.0%

نتایج آنالیز های آماری نشان می دهد که بیشترین فراوانی ژنوتیپ ها در افراد دیابتی مربوط به ژنوتیپ جهش یافته TT بوده با ۵۲ درصد، پس از آن ژنوتیپ هتروزیگوت AT با ۴۲درصد و ژنوتیپ AA با ۵ درصد مربوط به افراد دیابتی می باشد. بر اساس آمار فراوانی الل جهش یافته T بیشتر از الل وحشی A می باشد.

جدول ۳: نتایج تست کای

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	10.073[a]	2	***.006***
Likelihood Ratio	10.295	2	.006
Linear-by-Linear Association	9.028	1	.003
N of Valid Cases	393		

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 17.19.

با توجه به نتایج جدول فوق و مقدار p-value که کمتراز ۰/۰۵است پس ژنوتیپ ۱ در بروز بیماری موثراست و فرض H0 رد می‌شود.

در ارتباط با شاخص توده بدنی و دیابت، محاسبات نشان دادند که در میان دو گروه شرکت کننده میانگین شاخص توده بدنی در افراد دیابتی نزدیک به ۳۰ می باشد که نشان می دهد در بیشتر این افراد چاقی و اضافه وزن دید می شود. همچنین میانگین شاخص توده بدنی در افراد نرمال بدون سابقه دیابت ۲۴/۴ بوده که از نظر شاخص توده بدنی وزن مناسب را دارند. به طور کل چاقی نقش مهمی در پیشرفت و گسترش دیابت نوع ۲ دارند. با این حال، می‌توان با مداخلات ساده مانند رژیم غذایی سالم و ورزش از آنها پیشگیری کرد.

منابع

1. Abdelhamid, Amr M, and Mai A Zaafan. 2019. "Association of chemerin rs17173608 and vaspin rs2236242 polymorphisms with type two diabetes mellitus and its impact on their corresponding serum levels in Egyptian population." In.: ideas.
2. Bays, Harold E, RH Chapman, S Grandy, and SHIELD Investigators' Group. 2007. The relationship of body mass index to diabetes mellitus, hypertension and dyslipidaemia: comparison of data from two national surveys, International journal of clinical practice, 61: 737-47.
3. Blüher ,Matthias. 2012. Vaspin in obesity and diabetes: pathophysiological and clinical significance, Endocrine, 41: 176-82.
4. Garrow, John S, and Joan Webster. 1985. Quetelet's index (W/H2) as a measure of fatness, International journal of obesity, 9: 147-53.
5. Hida, Kazuyuki, Jun Wada, Jun Eguchi, Hong Zhang, Masako Baba, Aya Seida, Izumi Hashimoto, Tatsuo Okada, Akihiro Yasuhara, and Atsuko Nakatsuka. 2005. Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity, Proceedings of the National academy of sciences, 102: 10610-15.
6. Huang, Zefeng, and Xin Xie. 2015. Chemerin induces insulin resistance in C2C12 cells through nuclear factor-κB pathway-mediated inflammatory reaction, Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi= Chinese journal of cellular and molecular immunology, 31: 725-29.
7. Jaso-Friedmann, Liliana, John H Leary III, Kesavannair Praveen, Mark Waldron, and Margarethe Hoenig. 2008. The effects of obesity and fatty acids on the feline immune system, Veterinary immunology and immunopathology, 122: 146-52.
8. Jung, Un Ju, and Myung-Sook Choi. 2014. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease, International journal of molecular sciences, 15: 6184-223.
9. Kempf, K, B Rose, T Illig, Wolfgang Rathmann, K Strassburger, B Thorand, Christa Meisinger, H-E Wichmann, C Herder, and C Vollmert. 2010. Vaspin (SERPINA12) genotypes and risk of type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA studies, Experimental and clinical endocrinology & diabetes, 118: 184-89.
10. Klöting, Nora, Janin Berndt, Susan Kralisch, Peter Kovacs, Mathias Fasshauer, Michael R Schön, Michael Stumvoll, and Matthias Blüher .۲۰۰٦ .Vaspin gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes, Biochemical and biophysical research communications, 339: 430-36.
11. KNOEFEL, WOLFRAM TRUDO, ARNE DIETRICH, BARBARA A FIELDING, PETER ARNER, KEITH N FRAYN, and Jurgen ECKEL. 2013. Adipose Dipeptidyl Peptidase-4 and Obesity, Diabetes care, 36: 4083-90.
12. Koiou, Ekaterini, Emmanouil Kalaitzakis, Konstantinos Tziomalos, Stylianos Mavridis, Konstantinos Dinas, Theoharis Tantanasis, Ilias Katsikis, Aristotelis Loufopoulos, and Dimitrios Panidis. 2011. Vaspin: a novel adipokine, member of the family of serine protease inhibitors, Aristotle University Medical Journal, 38: 7-18.
13. Medrano, Ruan Felipe Vieira, and Camila Andréa de Oliveira. 2014. Guidelines for the Tetra-Primer ARMS–PCR Technique Development, Molecular Biotechnology, 56: 599-608.
14. Moradi, Sajjad, Khadijeh Mirzaei, Ahmed Abdulahi Abdurahman, Seyed Ali Keshavarz, and Arash Hossein-Nezhad. 2016. Mediatory effect of circulating vaspin on resting metabolic rate in obese individuals, European journal of nutrition, 55: 1297-305.
15. Rabe, Katja, Michael Lehrke, Klaus G. Parhofer, and Uli C. Broedl. 2008. Adipokines and Insulin Resistance, Molecular medicine, 14: 741-51.
16. Sell, Henrike, and Jürgen Eckel. 2010. Adipose tissue inflammation: novel insight into the role of macrophages and lymphocytes, Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 13: 366-70.
17. Silverman, Gary A, Phillip I Bird, Robin W Carrell, Frank C Church, Paul B Coughlin, Peter GW Gettins, James A Irving, David A Lomas, Cliff J Luke, and Richard W Moyer. 2001. The serpins are an expanding

superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins, Journal of Biological Chemistry, 276: 33293-96.
18. Teshigawara, Sanae, Jun Wada, Kazuyuki Hida, Atsuko Nakatsuka, Jun Eguchi, Kazutoshi Murakami, Motoko Kanzaki, Kentaro Inoue, Takahiro Terami, and Akihiro Katayama. 2012. Serum vaspin concentrations are closely related to insulin resistance, and rs77060950 at SERPINA12 genetically defines distinct group with higher serum levels in Japanese population, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 97: E1202-E07.
19. Watson, Ronald Ross, Sherma Zibadi, and Victor R Preedy. 2010. *Dietary components and immune function* (Springer Science & Business Media.(
20. Yang, Wei, Yun Li, Tian Tian, and Li Wang. 2017. Serum vaspin concentration in elderly type 2 diabetes mellitus patients with differing body mass index: a cross-sectional study, BioMed research international, 2017.

An overview on silymarin effect on osteogenesis in vivo

Tayebeh Mohammadi[1]; Leila Soltani[2*]

1- Asisstant professor, Basic Sciences department, Veterinary medicine Faculty, Razi University
2- Asisstant professor, Animal Sciences department, Agriculture Faculty, Razi University

Corresponding Author Email address (Leilasoltani7@yahoo.com)

Abstract

Bone lesions are an important health problem that imposes a great deal of social and economic burden. In most cases, bone fractures are caused by trauma or certain bone diseases. Bone regeneration is a complex sequence of cellular events including the stages of inflammation, cell proliferation, and bone regeneration that are controlled by osteogenesis and angiogenesis. Clinical and preclinical studies have attempted to show the positive effects of plant compounds on bone matrix formation and cellular activity. Silymarin has several therapeutic properties and is used in the treatment of osteoporosis. The aim of this study was to investigate the effect of silymarin on bone repair in animal models in both experimental bone fracture and experimental osteoporosis. According to the results of studies reviewed in this paper, it can be concluded that silymarin has an effective role in the process of bone formation by acting on bone formation pathways and therefore can be a significant supplement in the repair of bone fractures, Prevention or treatment of osteoporosis. However, this requires further studies to elucidate the molecular mechanisms involved in silymarin fracture healing, and on the other hand, it is necessary to perform studies on human specimens before silymarin is used as an anti-osteoporotic agent in postmenopausal osteoporosis.

Keywords: Bone fracture, osteoporosis, Silymarin, experimental model

مروری اجمالی بر تاثیر سیلیمارین بر استخوانسازی در شرایط درون تنی

طیبه محمدی[۱]؛ لیلا سلطانی[۲*]

۱-استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی

۲-استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: leilasoltaniv@yahoo.com

چکیده

ضایعات استخوانی مشکل بهداشتی مهمی هستند که باعث تحمیل بار اجتماعی و اقتصادی زیادی می‌شوند. در اکثر موارد شکستگی استخوان در اثر ضربه یا بیماری‌های خاص استخوان ایجاد می‌شود. بازسازی استخوان توالی پیچیده‌ای از رویدادهای سلولی است که شامل مراحل التهاب، تکثیر سلولی و بازسازی استخوان است که توسط استخوان‌زایی و رگ‌زایی کنترل می‌شود. مطالعات بالینی و پیش بالینی تلاش کرده‌اند تا اثرات مثبت ترکیبات گیاهی را بر تشکیل ماتریکس استخوان و فعالیت سلولی نشان دهند. سیلیمارین دارای خواص درمانی متعددی است و در درمان پوکی استخوان کاربرد دارد. هدف از این مطالعه، بررسی مطالعاتی است که اثر سیلیمارین بر ترمیم استخوان در مدل های حیوانی در دو بخش شکستگی تجربی استخوان و پوکی استخوان تجربی را بررسی کرده‌اند. با توجه به نتایج مطالعات بررسی شده در این نوشتار، در مجموع می‌توان چنین نتیجه گیری کرد که سیلیمارین با اثر بر مسیرهای استخوانسازی در فرایند ساخت استخوان نقش مؤثری دارد و از این رو می‌تواند به عنوان مکملی قابل توجه در ترمیم شکستگی استخوان، پیشگیری یا درمان پوکی استخوان مورد توجه قرار گیرد. هر چند این مهم نیازمند مطالعات بیشتری در رابطه با روشن شدن مکانیسم‌های مولکولی درگیر در التیام شکستگی توسط سیلیمارین می باشد و از سوی دیگر، لازم است قبل از آنکه سیلیمارین به عنوان یک عامل ضد پوکی استخوان در پوکی استخوان متعاقب یائسگی استفاده شود، مطالعاتی روی نمونه‌های انسانی هم صورت گیرد.

واژگان کلیدی: شکستگی استخوان، پوکی استخوان، سیلیمارین، مدل تجربی

۱.مقدمه

استخوان بافتی فعال از نظر متابولیکی است و توانایی باز سازی خود را دارد. در واقع این توانایی مجموعه‌ای از اتفاقات بیولوژیکی منظم القاء و هدایت استخوانی همراه با انواع متعددی از سلول‌ها و مسیرهای سیگنالینگ مولکولی داخل و خارج سلولی با ترتیب زمانی مشخص است که هدفش به حداکثر رساندن بازسازی استخوان و بازتوانی عملکردی آن است(Schroeder & Mosheiff, 2011). آسیب‌های کوچک بافت استخوان توسط این بازسازی طبیعی ترمیم می شوند اما برای رفع آسیب های وسیع استخوانی، نقص های مادرزادی، تومورها و شکستگی های جوش نخورده محدودیت دارد به طوری که این ضایعات استخوانی امروزه موجب

بروز مشکلات پزشکی، اجتماعی و اقتصادی زیادی شده‌اند (Cavalcanti et al., 2008). بعلاوه، بیماری پوکی استخوان به عنوان یکی از معضلات شایع در زنان یائسه و مردان سالمند مطرح است که باعث شکستگی استخوان و کاهش طول عمر می گردد (Rodríguez-Carballo et al., 2016). استخوانسازی فرایندی تکوینی است که تعداد زیادی از عوامل بیرونی مثل هورمون‌ها، فاکتورهای رشد، مسیرهای پیام‌رسان و فاکتورهای رونویسی در آن دخالت دارند. (Tarfiei G, Mahmoodinia Maymand M, 2010). طی سالیان اخیر، استفاده از گیاهان دارویی و طب سنتی در جهان و از جمله ایران رو به گسترش است. سیلیمارین[۱۴۲] به عنوان مهمترین ماده مؤثر گیاه ماریتیغال یا خارمریم با نام علمی *Marianum silybum* می باشد که از گروهی از مواد شیمیایی به نام فلاوونولیگنان‌ها[۱۴۳] تشکیل شده است. سیلیمارین دارای خاصیت آنتی اکسیدانی قابل توجه بوده و سبب کاهش رادیکال‌های آزاد و مهار پراکسیداسیون لیپیدها و افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز می‌شود. به علاوه دارای اثرات ضد التهابی، کاهش دهندگی کلسترول و قندخون، ضد سرطان‌زایی و تعدیل کنندگی ایمنی می‌باشد. همچنین، تاکسی فولین[۱۴۴] موجود در سیلیمارین خواص استروژنی قابل ملاحظه‌ای دارد (Fallah hosseini et al 2004) و در درمان پوکی استخوان کاربرد دارد (Fallah hosseini et al 2004و Mohd fozi et al 2013). در این مطالعه تلاش شده است مطالعاتی که اثر سیلیمارین بر ترمیم استخوان در مدل های حیوانی را بررسی کرده‌اند، در قالب دو بخش شکستگی تجربی استخوان و پوکی استخوان تجربی مورد بحث و بررسی قرار گیرد و مکانیسم‌های احتمالی پیشنهاد شده برای آن ذکر گردد.

۱-۱- تاثیر سیلیمارین بر ترمیم شکستگی‌های تجربی استخوان

ضایعات استخوانی مشکل بهداشتی مهمی هستند که باعث تحمیل بار اجتماعی و اقتصادی زیادی می‌شوند(Loi et al., 2016). تخمین زده می‌شود که با افزایش جمعیت سالمندان در جهان، میزان بروز شکستگی‌ها طی سال‌های آینده حتی بیشتر شود(Rosberg and Dahlin, 2018). بازسازی استخوان توالی پیچیده‌ای از رویدادهای سلولی است که شامل مراحل التهاب، تکثیر سلولی و بازسازی استخوان است که توسط استخوان‌زایی و رگ‌زایی کنترل می‌شود(Langdahl et al., 2016). در اکثر موارد شکستگی استخوان در اثر ضربه یا بیماری‌های خاص استخوان ایجاد می‌شود(Oryan et al., 2015). داروهای مشتق شده از گیاهان دارویی توسط حدود ۷۵ درصد از جمعیت جهان مصرف می‌شود و بخش اصلی طب سنتی در اکثر کشورهای در حال توسعه است(Kasote et al., 2017). بر اساس مطالعات صورت گرفته مشخص شده است که برخی از مولکول‌های استخراج شده از ترکیبات طبیعی دارای اثرات ضد التهابی، آنتی اکسیدانی و بازسازی کننده بالایی هستند که استفاده موفق از این محصولات را در بیماری‌های مختلف توجیه می‌کند. مطالعات بالینی و پیش بالینی تلاش کرده‌اند تا اثرات مثبت ترکیبات گیاهی را بر تشکیل ماتریکس استخوان و فعالیت سلولی نشان دهند(Miranda et al., 2019). در رابطه با اثر سیلیمارین در ترمیم شکستگی استخوان مطالعات چندی انجام شده است که در ادامه ذکر می‌شوند.

در مطالعه‌ای که توسط Kim و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام شد، نتایج نشان داد که سیلیمارین از طریق تسریع مسیرهای سیگنالینگ BMP / SMAD / Runx2 و بهبود ترمیم شکستگی و استحکام استخوان در استخوان درشت نی موش، توانایی افزایش و تقویت استئوبلاستوژنز را دارد.(Kim et al., 2012). تصور می شود که سیلیمارین ممکن است تنظیم کننده مستقیم تمایز استئوبلاست و تشکیل آنابولیک استخوان باشد. سیلیمارین هم در فاز اولیه تشکیل استخوان و هم در فاز آخر بلوغ / معدنی شدن

[142] silymarin
[143] Flavonolignans
[144] Taxifolin

ماتریکس دخیل است. همچنین آنها نشان دادند که رونویسی Runx2 در فاز اولیه تکثیر و تمایز استئوبلاست رخ داده است. بنابراین، پیشنهاد کردند که سیلیمارین با افزایش سطح پروتئین های مارکر استخوان و افزایش رسوب کلسیم در ECM برای معدنی شدن ماتریکس از طریق مسیرهای مرتبط با Runx2 ، فعالیت استئوژنیک را تحریک می کند. در مدل ترمیم شکستگی در موش، مکمل سیلیمارین با BMD و سطح سرمی ALP و استئوکلسین افزایش یافته ، ترمیم درشت نی را بهبود بخشید. این نتایج برای اولین بار نشان داد که سیلیمارین توانایی افزایش استئوبلاستوژنز و بهترکردن التیام شکستگی و استحکام استخوان در استخوان درشت نی موش را دارد که به احتمال زیاد از طریق مسیرهای سیگنال BMP / SMAD / Runx2 است. عصاره غنی از سیلیمارین خارمریم و سیلیبینین موجود در آن فعالیت آلکالین فسفاتاز استئوبلاست ها را افزایش می دهد اما فعالیت اسید فسفاتاز مقاوم به تارتارات (TRAP) استئوکلاست ها را کاهش می دهد. می‌توان اثرات عصاره غنی از سیلیمارین خارمریم در محافظت از استخوان را با ایزوفلاون استروژنی[۱۴۵] مقایسه کرد. ترکیبی از دوز کم عصاره غنی از سیلیمارین خارمریم و ایزوفلاون اثر همدیگر را تقویت می‌کنند که می تواند در استخوانسازی اثر مفیدی داشته باشد(Kim et al., 2012). همچنین، سیلیمارین اثرات تقویت کنندگی روی تمایز و معدنی شدن سلولهای استئوبلاستی موش MC3T3-E1 و تراکم مواد معدنی استخوان (BMD)[۱۴۶] در شکستگی‌های تجربی استخوان را نشان داده است. سیلیمارین باعث تحریک فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) و تشکیل ندول کلسیم[۱۴۷] به روشی وابسته به دوز[۱۴۸] می‌شود و باعث تکثیر استئوبلاست‌ها می شود. همچنین، سیلیمارین باعث افزایش ترشح کلاژن، رونویسی استئوکلسین و بیان پروتئین مورفوژنتیک استخوان (BMP)[۱۴۹] می شود. Noggin که مهارکننده ی BMP است فعالیت ALP افزایش یافته توسط سیلیمارین را در استئوبلاست های تمایز یافته سرکوب می کند، که نشان می دهد اعمال استئوبلاستوژنیک سیلیمارین مستلزم مسیر BMP است، با افزایش فسفوریلاسیون SMAD1/5/8 و بیان فاکتور رونویسی مرتبط با runt ۲ (Runx2) در حضور سیلیمارین ثابت شده است. مکمل سیلیمارین با افزایش دادن BMD و سطح سرمی ALP و استئوکلسین استئوژنیک، استحکام استخوان را بهبود می بخشد(kim et al., 2012). در مطالعه خوبی و همکاران، توانایی سیلیمارین در بهبود نقیصه بحرانی استخوان جمجمه موش صحرایی با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از ژله وارتون انسانی[۱۵۰] که روی داربست الکتروریسی پلی اسید لاکتیک / نانولوله کربن[۱۵۱] (PLA / CNT) کشت شده داده شده بودند، بررسی شد. در این مطالعه ، ۲۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار[۱۵۲] تحت بیهوشی عمومی قرار گرفتند ونقص های ۸ میلی متری در استخوان جمجمه موش‌ها ایجاد شد. سپس، گروه‌های مورد مطالعه به ترتیب گروه بدون تیمار، داربست به تنهایی، داربست و HWJMSC، داربست حامل سلول‌ها همراه با دریافت سیلیمارین خوراکی تعریف شدند. مطالعه هیستومورفومتری با استفاده از رنگ آمیزی H&E و Goldner's Masson trichrom صورت گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که داربست الکتروریسی PLA / CNT یک داربست زیست سازگار است و HWJMSC می تواند به طور قابل توجهی روی این داربست چسبیده و تکثیر شود و داربست نیز گزینه مناسبی برای بهبود روند ترمیم استخوان است. مهمتر اینکه، نتایج آنالیز هیستومورفومتریک نشان داد که در گروه دریافت کننده سیلیمارین به علاوه داربست حامل سلول ها مقادیر قابل توجهی استخوان تازه در مقایسه با گروه داربست و سلول به تنهایی تشکیل شد. از این رو اعلام نمودند که استفاده از سیلیمارین بعلاوه HWJMSC

[145] Estrogenic isoflavone
[146] Bone mineral density
[147] Calcium nodule
[148] Dose-dependent manner
[149] Bone morphogenetic protein
[150] Human Wharton's jelly
[151] Electrospun scaffold of poly (lactic acid)/carbon nanotube (PLA/CNT)
[152] Wistar rats

های کشت شده روی داربست PLA / CNT می تواند به عنوان یک روش مناسب برای پروسه ی استخوانسازی و ترمیم استخوان استفاده شود(Khoobi et al., 2020).

۱-۲- تاثیر سیلیمارین بر پوکی استخوان تجربی

استئوپروز یا پوکی استخوان تغییری آسیب شناختی دراستخوان‌های بدن است که با کاهش توده استخوانی، تخریب فراساختار بافت استخوان و درهم ریختن اجزا تشکیل دهنده آن مشخص می‌شود. پوکی استخوان شایع‌ترین بیماری استخوانی در انسان به ویژه در سنین پیری است. مهمترین وجه تشخیص پوکی استخوان این است که ماده معدنی و ماتریکس استخوان همزمان کاهش می‌یابد، به‌طوری‌که توده استخوانی کم می‌شود ولی ترکیب استخوان طبیعی است. پوکی استخوان عامل خطر برای شکستگی‌های استخوانی به شمار می‌رود و به‌عنوان یک مسئله بهداشت عمومی سالانه باعث تحمیل خسارت اقتصادی و اجتماعی زیادی در جهان می‌شود. اگر چه استئوپروز بعد از وقوع به طور قطعی قابل درمان نیست، اما با روش‌های موجود می‌توان از ایجاد و گسترش آن جلوگیری نمود و خطر شکستگی‌های ناشی از آن‌را کاهش داد(Tu et al., 2018).

امروزه علاوه بر درمان‌های دارویی، استفاده از مکمل‌های غذایی و درمان‌های جایگزین در درمان شکستگی کمک کننده می‌باشند(Oztürk et al., 2008). در سال‌های اخیر مطالعات وسیعی در زمینه تأثیر فیتواستروژن‌ها بر حفظ سلامت استخوان انجام گرفته است. فیتواستروژنها ترکیبات مشتق از گیاهان می‌باشند که در ۳ گروه فلاونوئیدها، کومستانها و لیگنانها طبقه‌بندی می‌شوند. این ترکیبات، ساختار و عملکرد شبیه استرادیول دارند اما اثر آنها نسبت به استروژن ضعیف‌تر است(Park et al., 2008). در این میان سیلیمارین به واسطه تاکسی فولین موجود در آن به عنوان یک فیتواستروژن مورد توجه است و مطالعات متعددی در خصوص اثر آن روی پوکی استخوان تجربی انجام شده است که در ادامه مورد بررسی قرار می‌گیرند. El-Shitany و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که سیلیمارین در برابرتحلیل استخوان ناشی از اواریکتومی اثر محافظتی داشته باشد که ممکن است به خاطر افزایش سطح هورمون پاراتیروئید سرم باشد. نتیجه مطالعه‌ی داکینگ مولکولی[۱۵۳] نشان داد که سیلیمارین منحصرا به جایگاه فعال پروتئینی گیرنده ی ERβ (1 - 7R) متصل می شود اما به جایگاه فعال پروتئینی گیرنده ی ERα (1 – 76) متصل نمی شود. یافته‌های به دست آمده در مطالعه مذکور، نشان‌دهنده بسیاری از اثرات استروژنی استرادیول در رت‌های اواریکتومی شده بود به طوری که اعلام کردند سیلیمارین به طور قابل توجهی مانع از تحلیل استخوان ناشی از اواریکتومی می‌شود و همزمان باعث تکثیر خفیف سلولی در رحم رت ها می‌شود(El-Shitany et al., 2010). تیمار رت‌های اواریکتومی شده با اتینیل استرادیول و سیلیمارین روی ضخامت تیغه‌های[۱۵۴] استخوان ران اثر محافظتی داشته، باعث کاهش سطح سرمی ALP و افزایش سطح سرمی کلسیم و فسفر شد. بر عکس اتینیل استرادیول، سیلیمارین استئوکلسین سرم ناشی از اورایکتومی را کاهش نمی دهد. اتینیل استرادیول ونه سیلیمارین باعث کاهش کلسترول سرم ، چربی تام[۱۵۵] ، LH[156] و FSH[157] و افزایش استرادیول سرم[158] می شود. اتینیل استرادیول و سیلیمارین، هورمون پاراتیروئید سرم را افزایش دادند. اثرات مشاهده شده در مطالعه مذکور، می‌تواند حاصل اثر سودمند اضافه شده ی سیلیمارین بر استخوان باشد یا به دلیل تعامل مستقیم با ERβ یا افزایش پارامترهای تشکیل استخوان از جمله ALP ، استئوکلسین و PTH باشد. (El-Shitany et al., 2010).

[153] Docking (molecular)
[154] Trabecula Thickness
[155] Total lipids
[156] Luteinizing hormone
[157] Follicle-stimulating hormone (FSH)
[158] Estradiol (E2)

Kim و همکاران تلاش کردند تا در مطالعه‌ای اثر مهارکنندگی عصاره خارمریم غنی از سیلیمارین روی تحلیل استخوانی را نشان دهند. درمان موش‌های اواریکتومی شده با عصاره خار مریم غنی از سیلیمارین و سیلیبینین باعث بهبود تراکم مواد معدنی استخوان ران و نسبت لیگاند فعال کننده ی گیرنده ی هسته ای فاکتور کاپا بتا سرمی/ استئوپروتگرین[۱۵۹]، که شاخص محرک استئوکلاستوژنی است، شد. علاوه بر این، تجویز عصاره خار مریم غنی از سیلیمارین یا سیلیبینین باعث مهار تحلیل استخوان ران ناشی از اواریکتومی و سرکوب فعالیت TRAP در استخوان ران و القای کاتپسین K که مسئول استئوکلاستوژنز و تحلیل استخوان است، می شود. در مجموع، دوز خوراکی عصاره خار مریم غنی از سیلیمارین حاوی سیلیبینین در شرایط پیش بالینی از تحلیل رفتن استخوان ناشی از کمبود استروژن جلوگیری می‌کند. گزارش حاصل ازمطالعه Kim و همکاران نشان داد که عصاره خار مریم غنی از سیلیمارین حاوی سیلیبینین با القای بیومارکر استئوبلاستوژنیک ALP استئوبلاستی و از بین بردن بیومارکر فعالیت استئوکلاستوژنیک TRAP استئوکلاستی القاء شده توسط RANKL، استئوژنز را افزایش می دهد. عصاره خار مریم غنی از سیلیمارین کاهش تراکم استخوان ناشی از اورایکتومی را مهار کرده و فعالیت TRAP کاهش یافته‌ی استخوان ران در موش های اواریکتومی می شود. بر این اساس، عصاره خار مریم غنی از سیلیمارین به عنوان یک عامل محافظت کننده از پوکی استخوان مانع از تحلیل استخوانی ناشی از کمبود استروژن می شود و ممکن است به عنوان تعدیل کننده در پوکی استخوان و پوکی استخوان بعد از یائسگی عمل کند(Kim et al., 2013).

تیمار موش های صحرایی اواریکتومی شده با سیلیمارین یا استرادیول (E2) ممکن است اجازه دهد که اثرات بیولوژیکی تمایز با واسطه ERα یا ERβ ایجاد شود. E2 باعث مهار تجمع LH، کلسترول ، LDL و HDL در خون و افزایش بیان ژن IGF1, HbEGF و C3 در رحم می شود، در حالی که سیلیمارین در تغییر این پارامترها کاملاً بی اثر یا آنتاگونیست بود. استرادیول و سیلیمارین هر دو بیان ژن ERβ رحم را مهار می کنند. از این رو، در هیپوفیز ، کبد (جایی که لیپوپروتئین ها سنتز می شوند) و رحم E2 از طریق ERα عمل می کند. اثرات استروژنیک انحصاری سیلیمارین در متافیز استخوان ران، بر روی پارامترهای استئوبلاست (بیان ژن IGF1 ، TGFβ1 ، استئوپروتگرین ، کلاژن-α۱۱ ، استئوکلسین) و بیان ژن اسید فسفاتاز مقاوم در برابر تارتارات مارکرفعالیت استئوکلاستی (TRAP) موشهای صحرایی بالغ اواریکتومی شده مشاهده شد. با کمک روش RT-PCR بیان ژن ERβ در تمام اندام ها از جمله استخوان های در حال رشد بجز متافیز ران موشهای صحرایی بالغ اواریکتمی شده مشخص شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اثرات سیلیمارین در این قسمت از استخوان را نمی توان از طریق ERα اعمال کرد زیرا به این گیرنده متصل نمی شود. با وجود عدم شناسایی mRNA گیرنده استروژنی بتا در متافیز استخوان ران حیوانات این احتمال وجود دارد که پروتئین ERβ وجود داشته باشد و ممکن است اثرات سیلیمارین را واسطه قرار دهد. درمان با استرادیول به مدت یک هفته روی تری گلیسرید سرمی در حیوانات تحت درمان اثر نداشت در حالی که این لیپیدها به میزان قابل توجهی توسط سیلیمارین کاهش یافتند، از این رو به نظر می رسد این اثرات با واسطه ERβ انجام می شود(Seidlová-Wuttke et al., 2003). Seidlová-Wuttke و همکاران نشان دادند که در متافیز استخوان ران موش های صحرایی اواریکتومی شده ژن Erβ بیان نمی شود. از این رو آنها انتظار نداشتند که هیچ اثری بواسطه ی سیلیمارین در استخوان مشاهده کنند و از مشاهده اثرات ضد پوکی استخوان استروژنی[۱۶۰] واضح در این ساختار استخوانی متعجب شدند. مشخص شده است که بسیاری از اثرات E2 در استخوان بواسطه ی IGF1 و TGFβ1 است. احتمال دیگر ممکن است این باشد که اثر سیلیمارین و بنابراین احتمالاً E2 در متافیزاستخوان ران از طریق گیرنده هایی است که احتمالاً هنوز مشخص نشده یا

[159] Serum receptor activator of nuclear factor-κB ligand/osteoprotegerin ratio
[160] Estrogenic antiosteoporotic effects

از طریق یک نوع اتصال ERβ که با روش PCR تشخیص داده نمی شود. سیلیمارین ویژگی‌های یک تعدیل کننده ی انتخابی گیرنده ی استروژن[161] (SERM) با خواص مشابه رالوکسیفن[162] را دارد. (Seidlová-Wuttke et al., 2003).

۲. نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج مطالعات بررسی شده در این نوشتار، در مجموع می‌توان چنین نتیجه گیری کرد که سیلیمارین با اثر بر مسیرهای استخوانسازی در فرایند ساخت استخوان نقش مؤثری دارد و از این رو می‌تواند به عنوان مکملی قابل توجه در ترمیم شکستگی استخوان، پیشگیری یا درمان پوکی استخوان مورد توجه قرار گیرد. هر چند این مهم نیازمند مطالعات بیشتری در رابطه با روشن شدن مکانیسم‌های مولکولی درگیر در التیام شکستگی توسط سیلیمارین می باشد و از سوی دیگر، لازم است قبل از آنکه سیلیمارین به عنوان یک عامل ضد پوکی استخوان در پوکی استخوان متعاقب یائسگی استفاده شود، مطالعاتی روی نمونه‌های انسانی هم صورت گیرد.

منابع

1. **El-Shitany, N.A., Hegazy S. and El-Desoky K. 2010.** Evidences for antiosteoporotic and selective estrogen receptor modulator activity of silymarin compared with ethinylestradiol in ovariectomized rats. Phytomedicine, 17 (2): 116-125.
2. **Fallah Hoseini H., Hemmati- Moqaddam A.R., and Alavian S.M. 2004.** A review on milk thistle medicinal herb. Medicinal herbs Journal, 11: 14-24.
3. **Kasote D.M., Jagtap S.D., Thapa D., Khyade M.S. and Russell W.R. 2017.** Herbal remedies for urinary stones used in India and China: a review. Journal of Ethnopharmacology. 203: 55–68, 2017.
4. **Khoobi M.M., Naddaf H., Hoveizi E. and Mohammadi T. 2020.** Silymarin effect on experimental bone defect repair in rat following implantation of the electrospun PLA/carbon nanotubes scaffold associated with Wharton's jelly mesenchymal stem cells." Journal of Biomedical Materials Research Part A 108(9):1944-1954.
5. **Kim J.L., Kim Y.H., Kang M.K., Gong J.H., Han S.J. and Kang Y.H. 2013.** Antiosteoclastic activity of milk thistle extract after ovariectomy to suppress estrogen deficiency-induced osteoporosis. BioMed Research International 2013.
6. **Kim J.L., Park S.H., Jeong D., Nam J.S. and Kang Y.H. 2012.** Osteogenic activity of silymarin through enhancement of alkaline phosphatase and osteocalcin in osteoblasts and tibia-fractured mice. Experimental Biology and Medicine 237(4): 417-428.
7. **Langdahl B., Ferrari S. and Dempster D.W. 2016.** Bone modeling and remodeling: potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis. Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease, 8(6): 225–235.
8. **Loi F., Córdova L.A., Pajarinen J., Lin T.H., Yao, Z., and Goodman, S.B. 2016.** Inflammation, fracture and bone repair. Bone, 86:119–130.
9. **Mohd Fozi N.F., Mazlan M., Shuid A.N., and Isa Naina M. 2013.** Milk thistle: a future potential anti-osteoporotic and fracture healing agent. Curr Drug Targets 14:1659–66.
10. **Oryan A., Monazzah S. and Bigham-Sadegh A. 2015.** Bone injury and fracture healing biology," Biomedical and Environmental Sciences, 28(1): 57–71.
11. **Oztürk A., Ilman A.A., Sağlam H., Yalçinkaya U., Aykut S., Akgöz S., Ozkan Y., Yanik K., Kivçak B., Yalçin N., and Ozdemir R.M. 2008.** The effects of phytoestrogens on fracture healing: experimental research in New Zealand white rabbits. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg. 14(1):21-7.
12. **Park J.A., Ha S.K., Kang T.H., Oh M.S., Cho M.H., Lee S.Y., Park J.H., and Kim S.Y. 2008.** Protective effect of apigenin on ovariectomy-induced bone loss in rats. Life Sci. 2008;82(25-26):1217-23.

[161] Selective estrogen receptor modulator (SERM)
[162] Raloxifene

13. **Rodríguez-Carballo E., Lopez-Delisle L., Yakushiji-Kaminatsui N. Ullate-Agote A., ad Duboule D. 2019.** Impact of genome architecture on the functional activation and repression of Hox regulatory landscapes. BMC Biol 17: 55.
14. **Rosberg H.E. and Dahlin L.B. 2018.** An increasing number of hand injuries in an elderly population - a retrospective study over a 30-year period. BMC Geriatrics, 18(1): 68.
15. **Seidlova-Wuttke D., Becker T, Christoffel V, Jarry H, and Wuttke W. 2003.** Silymarin is a selective estrogen receptor β (ERβ) agonist and has estrogenic effects in the metaphysis of the femur but no or antiestrogenic effects in the uterus of ovariectomized (ovx) rats. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology 86: 179-188.
16. **Schroeder JE and Mosheiff R. 2011.** Tissue engineering approaches for bone repair: concepts and evidence. Injury. 42(6):609-13.
17. **Tarfiei G., Noruzinia M., Soleimani M., Kaviani S., Mahmoodinia Maymand M., Farshdousti Hagh M., and Pujol, P. 2011.** ROR2 Promoter Methylation Change in Osteoblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. Cell journal, 13(1): 11–15.
18. **Tu K.N., Lie J.D., Wan, C., Cameron, M., Austel, A.G., Nguyen, J. K., Van, K., and Hyun, D. 2018.** Osteoporosis: A Review of Treatment Options. P & T : a peer-reviewed journal for formulary management, 43(2): 92–104.

An overview on role of micro-RNAs in ovary

Leila Soltani[1*] , Tayebeh Mohammadi[2]
1- Assistant Professor, Department of Animal Sciences, College of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran

1- Assistant Professor, Basic Sciences and Pathobiology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran

**Corresponding Author Email address (Leilasoltani7@yahoo.com)*

Abstract

MicroRNAs are small, single-stranded, non-coding RNAs that are about 19 to 22 nucleotides in length and are involved in many cellular physiological and pathological processes including proliferation, differentiation, apoptosis, and the synthesis and secretion of hormones. The ovarian follicles are among the main constituents of the female reproductive system and follicle development is a complex and precise process associating with the proliferation and differentiation of granulosa cells as the egg matures. Various miRNAs in the ovary control follicular growth, follicular atresia, ovulation, and steroid production. This review article examines the activity of some of them in the ovaries.

Key words: Ovary, miRNA, Oocyte, Steroidogenesis

مروری بر نقش Micro-RNAها در تخمدان

لیلا سلطانی[1*]، طیبه محمدی[2]

۱-استادیار، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۲-استادیار، گروه علوم پایه و پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: (leilasoltaniv@yahoo.com)

چکیده

MicroRNAها نوعی از RNAهای غیر کدکننده‌ی تک رشته‌ای و کوچک هستند که طولی حدود ۱۹ تا ۲۲ نوکلئوتید داشته و در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی سلولی مانند تکثیر، تمایز، آپوپتوز و سنتز و ترشح هورمون‌ها دخالت دارند. فولیکولهای تخمدان از اعضای اصلی دستگاه تناسلی ماده است و نمو فولیکول فرآیندی پیچیده و دقیق است که با بلوغ تخمک به همان اندازه با تکثیر سلولهای گرانولوزا و تمایز همراه است. miRNAهای متعددی در تخمدان رشد فولیکولی، آترزی فولیکولی، تخمک گذاری و استروئیدسازی را کنترل می‌کنند. در این مقاله مروری به بررسی فعالیت تعدادی از آنها در تخمدان پرداخته می‌شود.

واژگان کلیدی: تخمدان، miRNA، تخمک، هورمون‌سازی

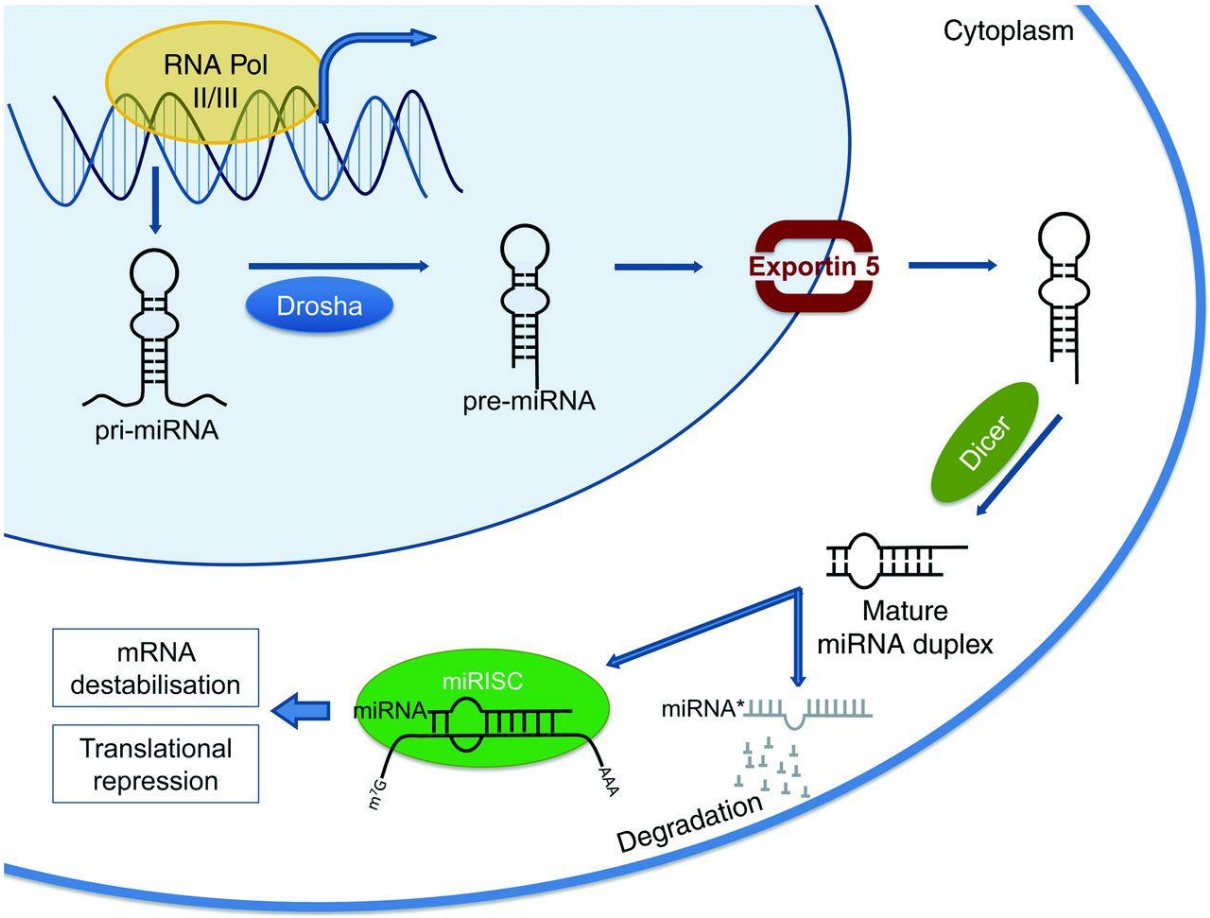
۱.مقدمه

miRNAها با داشتن طولی حدود ۱۹ تا ۲۵ نوکلئوتید، با هدف قرار دادن توالی‌های تکمیلی جزئی در mRNAها عمل می‌کنند، معمولاً در ناحیه‌ی 3´-UTR منجر به سرکوب عملکردی رونوشت‌های هدف می‌شوند (Huntzinger and Izaurralde, 2011). حدود ۲۰۰۰ miRNA مختلف در انسان شناسایی شده‌است. یک miRNA ممکن است صدها ژن را مورد هدف قرار داده و هر کدام از این ژن‌ها احتمالاً به نوبه‌ی خود توسط چندین miRNA مختلف تنظیم می‌شوند. به این ترتیب، احتمالاً miRNAها فعالیت اکثر ژن‌های کدکننده پروتئین را در پستانداران تنظیم می‌کنند (Friedmab et al., 2009). بسیاری از miRNAها در راستای نقش خود به عنوان تنظیم‌کننده‌ی اصلی فرآیندهای تمایزسلولی، به شدت محافظت شده‌اند و بیان آنها در طول نمو به شدت تنظیم می‌شود (Berezikov, 2011). miRNAها غالبا بوسیله‌ی RNAپلی‌مراز II بعنوان ژن مستقل (اینترژنیک) یا از اینترون‌های ژن‌های کد کننده‌ی پروتئین رونویسی می‌شوند، و توالی‌های کد کنندی miRNA ممکن است در مناطق ژنومی خاص دسته‌بندی شوند(Berezikov, 2011). نسخه‌های اولیه miRNA توسط مجموعه ریزپردازنده به پیش‌سازهای stem-loop (pre-miRNA) پردازش می‌شوند که حاوی RNAse III اندونوکلئاز، DROSHA و منطقه‌ی ۸ بحرانی ژن DiGeorge، یک پروتئین اتصال‌دهنده به RNA است که شکست

بوسیله‌ی DROSHA را تسهیل می‌کند. نوعی از miRNAهای اینترونیک به نام میرتون‌ها از این الگو پیروی نمی‌کنند اما با اتصال اینترون معمولی تولید می‌شوند بنابراین نیازی به DROSHA ندارند (Ruby et al., 2007). miRNAهای پیش‌ساز توسط Exportin 5 (XPO5) به سیتوپلاسم سلولی منتقل شده جاییکه دومین اندونوکلئاز، DICER، در ارتباط با TAR پروتئین اتصال دهنده RNA (TRBP)، Pre-miRNA را به شکل دو رشته‌ی بالغ برش می‌دهد. سپس یکی از رشته‌های miRNA بالغ ترجیحاً بر روی کمپلکس‌های ریبونوکلئوپروتئین (RISC) بارگذاری می‌شود، جاییکه پروتئین‌های خانواده AGO و GW182 به طور مشترک سرکوب mRNAهای هدف را میانجی می‌کنند. اگرچه هنوز در مورد مکانیسم‌های دقیق miRNAها که با آنها اثرات خود را بر بیان ژن اعمال می‌کنند بحث‌هایی وجود دارد، شواهد اخیر نشان می‌دهد که به طور کلی، بی ثباتی mRNA به دنبال سرکوب ترجمه‌ای یا پیش از آن، بیشتر اثرات مشاهده شده miRNAها را بر سطوح ژنهای هدف نشان می‌دهند (Huntzinger and Izaurralde, 2011).

miRNAها در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی متعدد از قبیل تکثیر سلول، تمایز، آپوپتوز و بیوسنتز و ترشح هورمون‌ها دخالت دارند (Mitchell et al., 2008). تخمدان انسان در هنگام تولد حاوی تقریباً حدود ۱۰۰۰۰ فولیکول آغازین است که برای یک دوره‌ی طولانی باروری را ایجاد می‌کنند. فولیکولوژنز و استروئیدسازی فرآیندهایی پیچیده‌اند که در بیان ژن‌های داخل تخمدانی، چرخه‌های سیگنالی، و فاکتورهای اندوکرین و پاراکرین نقش دارند(Baley and Li, 2012). miRNAها در تکثیر، آپوپتوز سلولهای گرانولوزا و تنظیم نمو فولیکولهای تخمدانی دخالت دارند (Yang et al., 2012).

در این مقاله به بررسی برخی از یافته‌ها راجع به بیان miRNA ها در تخمدان و عملکرد آنها پرداخته می‌شود.



شکل ۱: نمایش شماتیک بیوژنزmiRNA در سلول‌های حیوانی که سنتز (معمولاً توسط RNA Pol II) رونوشت miRNA اولیه (pri-miRNA) را نشان می‌دهد و به دنبال پردازش هسته‌ای متوالی توسط مجموعه‌ی ریزپردازه حاوی Drosha، پیش‌ساز miRNA به سیتوپلاسم توسط Exportin5 منتقل شده و حذف منطقه‌ی حلقه در miRNA پیش ساز بوسیله‌ی کمپلکس اندونوکلئاز حاوی Dicer برای تولید دوبلکس miRNA/miRNA* بالغ روی می‌دهد. رشته miRNA بالغ سپس بطور انتخابی روی کمپلکس‌های miRISC بارگذاری شده که در آن هدف‌گیری mRNAها روی داده جاییکه رشته miRNA* ترجیحاً تخریب می‌شود (Donadeu et al., 2012).

۱-۲-نقش miRNAها در تخمدان

miRNAها در تخمدان بیان شده و در تنظیم عملکرد تخمدان نقش دارند. آنها در تخمدان گونه‌های مختلف از قبیل: انسان، موش، گاو، جوجه، گوسفند، ماهی، خوک و اسب شناسایی شده‌اند (Kang et al., 2013). miRNAها بر فرآیندهای مختلف تخمدانی از قبیل نمو فولیکول (رشد، آترزی و تخمک‌گذاری) دخالت دارند. McBride و همکاران (۲۰۱۲) پروفایل بیان miRNAها را در مراحل متفاوت نمو از قبیل فولیکول‌های کوچک (۳/۵-۱/۵ میلی‌متر)، فولیکول‌های متوسط (۵/۵-۴ میلی‌متر)، پیش از تخمک‌گذاری، جسم زرد آغازین و جسم زرد مراحل پایانی مورد بررسی قرار دادند. غالب‌ترین آنها miR-21، miR125b، let-7 و let-7b بودند که در

مراحل متفاوت نمو بیان می‌شدند. miR-199a-3p، miR-145 و miR-31 در مرحله‌ی فولیکولی افزایش بیان داشتند و در مرحله‌ی انتقال از فاز فولیکولی به لوتئال کاهش بیان نشان می‌دادند. در مقابل، miR-503، miR-21 و miR-142-3p در مراحل فولیکولی بیان کمتری داشته و در فاز لوتئال افزایش بیان نشان می‌دادند (McBride et al., 2012). Zhang و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که miR-181a در موش، در مقایسه با فولیکولهای اولیه در مرحله‌ی پیش آنترال و آنترال کاهش بیان نشان می‌دهد.

فولیکولوژنز با شکسته شدن خوشه‌های سلول‌های زایا و تشکیل فولیکول‌های آغازین آغاز می‌شود. Zhang و همکاران بیان miR-143 در سلولهای پیش گرانولوزا را شناسایی کردند که سبب مهار تشکیل فولیکول‌های اولیه با سرکوب تکثیر سلول‌های پیش گرانولوزا و کاهش بیان ژن‌های مرتبط با سیکل سلولی، از قبیل سیکلین D2، CDK4 و CDK6 می‌شود (Zhang et al., 2013). miRNA-378 نقش مهمی در تخمدان و تنظیم بیان آروماتاز در سلول‌های گرانولوزا بازی می‌کند. Xu و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که miR-378 سبب کاهش بیان آروماتاز در سلولهای گرانولوزآ و در نهایت کاهش تولید استرادیول می‌شود. همچنین آنها نشان داده‌اند که این miRNA با هدف قرار دادن جایگاه‌های ویژه در ناحیه‌ی 3´-UTR آروماتاز، آنرا سرکوب می‌کند. همچنین آنها دریافتند که این اثر مهاری miR-378 با استفاده از مهارکننده‌ی آن معکوس می‌شود (Xu et al., 2011). افزایش بیان mir-143 سبب کاهش تولید استرادیول می‌شود در حالی‌که مهار بیان آن سبب آزادسازی استرادیول تا میزان ۳۰٪ می‌شود. همچنین مشخص شده که بیان mir-143 با تیمار توسط هورمون FSH تحت تاثیر قرار می‌گیرد، به طوری که درمان سلول‌های گرانولوزا موشی با FSH در غلظت‌های مختلف سبب کاهش بیان miR-143 شده است. Mir-143 در تکثیر سلولهای گرانولوزا دخالت دارد که منجر به افزایش تکثیر این سلول‌ها می‌شود (Zhang et al., 2017).

Mir-133b، miRNA دیگری است که در فرایند استروئیدسازی دخالت دارد. بیان miR-133b برای بیان StAR و CYP19A1، دو ژن کلیدی مهم در چرخه‌ی استروئیدسازی در سلولهای گرانولوزا موثر است. بعلاوه، miR-133b سنتز استروژن را از طریق مهار بیان Foxl2 تنظیم می‌کند (Dai et al., 2013). Schauer و همکاران ۲۰۱۳ نشان دادند که miR-21، miR-145، miR-224، miR-378، miR-132 و miR-212 در تنظیم زنده‌مانی سلول، استروئیدسازی و تمایز در طول دوره‌ی انتخاب فولیکول و تخمک‌گذاری در تخمدان دخالت دارد. Yin و همکاران ۲۰۱۲، مشاهده کردند که miR-383 ممکن است در فرآیند تکثیر سلولهای گرانولوزا، فعالیت سلولهای گرانولوزا مانند ترشح استرادیول، نمو تخمک و بلوغ آن در طول نمو فولیکول دخالت داشته باشد. بعلاوه، SF-1 قادر به فعال‌سازی پروموتر miR-383 ژن میزبان SGCZ بوده و اثرات استروئیدسازی miR-383/RBMS1/c-myc در سلول‌های گرانولوزا را میانجیگری می‌کند (Yin et al., 2012).

Sang و همکاران وجود miRNAها را در مایع فولیکولی انسانی بدون سلول را مورد بررسی قرار دادند، و همچنین نقش آنها را در شرایط آزمایشگاهی و سندروم تخمدان پلی‌کیستیک مورد ارزیابی قرار دادند. آنها مشاهده کردند که miR-132، miR-320، miR-520c، miR-24 و miR-222 در تنظیم غلظت استرادیول دخالت دارد، درحالیکه miR-24، miR-193b و Mir-483-5p در تنظیم غلظت پروژسترون دخالت دارد. همچنین آنها مشاهده کردند که miR-132 و miR-320 در مایع فولیکولی افراد مبتلا به سندروم تخمدان پلی‌کیستیک مشاهده می‌شود (Sang et al., 2013).

آترزی فولیکولی بوسیله‌ی آپوپتوز سلول‌های گرانولوزا ایجاد می‌شود. miRNAها در فرآیند آپوپتوز سلولهای گرانولوزا دخالت دارند. miR-34s سبب القای آپوپتوز سلولی و توقف رشد از طریق فعالسازی P53 و مهارکننده‌ی p21 کیناز وابسته به سیکلین می‌شود (Bommer et al., 2007). Tu و همکاران گزارش کردند که mir-34a سبب افزایش آپوپتوز سلول‌های گرانولوزا در فولیکول‌های تخمدان خوک با هدف قرار دادن اینهیبین بتا می‌شود(Tu et al., 2014). Carletti و همکاران گزارش کردند که miR-21 سبب القای

هومورن LH در سلولهای گرانولوزای موشی شده که فعالیت miR-21 در شرایط آزمایشگاهی که باعث القای آپوپتوز سلولی می‌شود را سرکوب می‌کند (Carletti and Fiedler, 2010).

بیان ۳۱ miRNA در طول فرآیند ترشح پروژسترون بوسله‌ی FSH در سلول‌های گرانولوزآی کشت شده بوسیله‌ی Yao و همکاران مشاهده شده است. ۱۲ ساعت بعد از کشت، آنها مشاهده کردند که بیان miR-29f و miR-30d کاهش یافت و بیانشان بعد از ۴۸ ساعت افزایش یافت(Yao et al., 2010).

گزارشات پیشرفته نشان می‌دهد که miRNA با بلوغ تخمک در ارتباط است. تخمک میوز را با سنتز DNA آغاز می‌کند و در فاز پروفاز میوز I تا از سرگیری میوز باقی می‌ماند. قبل از تخمک‌گذاری، تخمک تقسیم را از سرگرفته و در مرحله‌ی متافاز میوز II تا زمان لقاح باقی می‌ماند. الگوی نسبی بیان انواعی از miRNAها در تخمک و سلولهای کومولوس احاطه‌کننده‌ی آن در شرایط بلوغ آزمایشگاهی تخمک گاوی بوسیله‌ی Abd EL Naby و همکاران در سال ۲۰۱۱ مورد بررسی قرار گرفته است. آنالیز آنها نشان داد که در ساعت صفر تا ۲۲، بیان miRNAها (miR-205، miR-150، miR-122، mi-R-96، miR-146b-5p) کاهش یافت. در دوره‌ی پیش از لانه‌گزینی رویان مشخص شد که در مراحل آغازین نمو،بیان همین miRNA مقدار زیادی افزایش یافت و بعد از مرحله‌ی ۸ سلولی تا مرحله بلاستوسیست کاهش یافت(Abd El Naby et al., 2011).

Miles و همکاران ۲۰۱۱ نشان دادند که بیان let-7b و let-7i بین جمعیت‌های سلولی فولیکولی با اندازه‌های مختلف تفاوتی ندارد. با این‌حال، بیان miR-106a در تخمک‌ها در مقایسه با مجموعه‌ی تخمک-سلولهای گرانولوزا بیشتر بود. بیان mRNAهای هدف برای let-7b و let-7i (یعنی، MYC)، و miR-106a (یعنی WEE1A) در تخمک‌ها در مقایسه با مجموعه کومولوس تخمک و سلول‌های گرانولوزآ کاهش نشان داد(Miles et al., 2011). Lin و همکاران (۲۰۱۲) پروفایل بیان miRNA را در طول دوره‌ی تحلیل فولیکول خوک بررسی کردند و miRNAهای کاندید تنظیم کننده آترزی فولیکولی را انتخاب کردند. miR-26b میزان شکستگی DNA را با هدف قرار دادن ATM افزایش داده و آپوپتوز سلولهای گرانولوزآ را در شرایط آزمایشگاهی افزایش می‌دهند (Lin et al., 2012). در سلولهای تخمک در مرحله‌ی متافاز ۲ نسبت به مرحله‌ی وزیکول زایا بیان miR-21 افزایش یافته است. همچنین، مهار بیان miR-21 در طول دوره‌ی بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های خوکی سبب کاهش نرخ بلوغ شده است. بعلاوه، در پی لقاح آزمایشگاهی، miR-21 در رویانهای مرحله‌ی ۴ سلولی کمتر است (Wright, 2012).

۲.نتیجه‌گیری

اگرچه میزان دقیق دخیل بودن miRNA ها بر عملکرد تخمدان پستانداران ناشناخته باقی مانده است، اما گام های مهمی برای درک چگونگی تنظیم miRNA ها در رشد فولیکولی و لوتئال در حال انجام است. مطالعات قبلاً طیف وسیعی از miRNA ژنومی را شناسایی کرده‌اند که احتمالاً در آترزی فولیکولی، تخمک‌گذاری و انتقال از مرحله فولیکولی-لوتئال دخالت دارند. علاوه بر این، با وجود چالش‌های عمومی در شناسایی نقش‌های فیزیولوژیکی مرتبط با miRNAها در بافت‌های حیوانی، تنظیم miRNA در بیان آروماتاز قبلاً با جزئیات شرح داده شده است، و پیشرفت در سایر جنبه‌های رشد فولیکول/لوتئال نیز در حال انجام است. حجم زیادی از داده های تولید شده از طریق تجزیه و تحلیل های گسترده ژنومی بافت های تخمدان، زمینه مناسبی را برای شناسایی و خصوصیات عملکردی miRNA های مرتبط با اعمال بیولوژیکی فراهم می کند و این امر به طور قابل پیش بینی منجر به درک بسیار بیشتری از تنظیم مولکولی عملکرد فولیکولی و لوتئال می شود. در تخمدان پیشرفت‌های اخیر در درک زیست شناسی و فیزیولوژی miRNA،

دیدگاه های جدید و هیجان انگیزی را در مورد تنظیم عملکرد تولید مثل توسط miRNA ها به ارمغان آورده است. علاوه بر این، ارتباط بالینی miRNA ها به طور پیوسته در چند سال گذشته به ویژه در رابطه با پتانسیل قابل توجه آنها به عنوان نشانگرهای زیستی عملکرد بافتی افزایش یافته است. همچنین، این احتمال که miRNA های مرتبط با بیماری های بالینی خاص، از جمله بیماری‌های تخمدان، می توانند از نظر درمانی مورد هدف قرار گیرند، توجه زیادی را در جوامع پزشکی به خود معطوف کرده است. افزایش درک miRNA های تخمدان در سال های آینده کاربرد این پتانسیل را در تولید مثل بالینی تسهیل خواهد کرد.

منابع

1. Abd El Naby W.S., Hagos T.H., Hossain M.M., Salilew-Wondim D., Gad A.Y., Rings F., Cinar M.U., Tholen E., Looft C., Schellander K., Hoelker M., and Tesfaye D. 2013. Expression analysis of regulatory microRNAs in bovine cumulus oocyte complex and preimplantation embryos. Zygote. 21(1):31-51.
2. Baley J. and Li J. 2012. MicroRNAs and ovarian function. J Ovarian Res. 5:8
3. Berezikov E. 2011. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. Nat. Rev. Genet. 12 846–860.
4. Bommer G.T., Gerin I., Feng Y., Kaczorowski A.J., Kuick R., Love R.E., Zhai Z., Giordano T.J., Qin Z.S., Moore B.B., MacDougald1 O.A., Cho KR. and Fearon E.R. 2007. p53- mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. Curr Biol. 17:1298–307
5. Carletti M.Z., Fiedler S.D. and Christenson L.K. 2010. MicroRNA 21 blocks apoptosis in mouse periovulatory granulosa cells. Biol Reprod. 83:286–95.
6. Dai A., Sun H., Fang T., Zhang Q., Wu S., Jiang Y., Ding L., Yan G. and Hu Y. 2013. MicroRNA-133b stimulates ovarian estradiol synthesis by targeting Foxl2. FEBS Lett. 587(15):2474-82.
7. Donadeu F.X., Schauer S.N. and Sontakke S.D. 2012. Involvement of miRNAs in ovarian follicular and luteal development. J Endocrinology, 215(3), 323.
8. Farazi T.A., Juranek S.A. and Tuschl T. 2008. The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. Development 135: 1201–1214.
9. Friedman R.C., Farh K.K., Burge C.B. and Bartel D.P. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome Res. 19 92–105.
10. Hahn S.A., Bartsch D., Schroers A., Galehdari H., Becker M., Ramaswamy A., Schwarte-Waldhoff I., Maschek H. and Schmiegel W. 1998. Mutations of the DPC4/ Smad4 gene in biliary tract carcinoma. Cancer Res 58:1124–1126.
11. Hale B.J., Yang C.X., and Ross J.W. 2014. Small RNA regulation of reproductive function. Mol Reprod Dev. 81(2):148-59.
12. Huntzinger E. and Izaurralde E. 2011. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. Nat. Rev. Genet. 12 99–110.
13. Kang L., Cui X., Zhang Y., Yang C. and Jiang Y. 2013. Identification of miRNAs associated with sexual maturity in chicken ovary by Illumina small RNA deep sequencing. BMC Genomics. 14:352.
14. Lin F., Li R., Pan Z.X., Zhou B., Yu D.B., Wang X.G., Ma S.X., Han J., Shen M. and Liu, H.L. 2012. miR-26b Promotes Granulosa Cell Apoptosis by Targeting ATM during Follicular Atresia in Porcine Ovary. PLoS One. 7(6): e38640.
15. Liu J., Du X., Zhou J., Pan Z., Liu H. andLi Q. 2014. MicroRNA-26b functions as a proapoptotic factor in porcine follicular Granulosa cells by targeting Sma-and Mad-related protein 4. Biol Reprod. 91(6):146.
16. Mattes J., Yang M. and Foster P.S. 2007. Regulation of microRNA by antagomirs: A new class of pharmacological antagonists for the specific regulation of gene function?American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 36: 8–12.
17. McBride D., Carre W., Sontakke S.D., Hogg C.O., Law A., Donadeu F.X. and Clinton M. 2012. Identification of miRNAs associated with the follicular-luteal transition in the ruminant ovary. Reproduction. 144:221–33.

18. Miles J.R., McDaneld T.G., Wiedmann R.T., Cushman R.A., Echternkamp S.E., Vallet J.L. and Smith T.P. 2012. MicroRNA expression profile in bovine cumulus-oocyte complexes: possible role of let-7 and miR-106a in the development of bovine oocytes. Anim Reprod Sci. 130(1-2):16-26.
19. Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M., Fritz B.R., Wyman S.K., Pogosova-Agadjanyan E.L., Peterson A., Noteboom J., O'Briant K.C., Allen A., Lin D.W., Urban N., Drescher C.W., Knudsen B.S., Stirewalt D.L., Gentleman R., Vessella R.L., Nelson P.S., Martin D.B. and Tewari M. 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. Proc Natl Acad Sci U S A. 105:10513–8
20. Ruby J.G., Jan C.H. and Bartel D.P. 2007. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. Nature 448 83–86.
21. Sang Q., Yao Z., Wang H., Feng R., Wang H., Zhao X., Xing Q., Jin L., He L., Wu L., and Wang L. 2013. Identification of microRNAs in human follicular fluid: characterization of microRNAs that govern steroidogenesis in vitro and are associated with polycystic ovary syndrome in vivo. J Clin Endocrinol Metab. 98(7):3068-79
22. Schauer S.N., Sontakke S.D., Watson E.D., Esteves C.L. and Donadeu F.X. 2013. Involvement of miRNAs in equine follicle development. Reproduction. 146(3):273-82.
23. Tu F., Pan Z.X., Yao Y., Liu H.L., Liu S.R., Xie Z. and Li Q. F. 2014. miR-34a targets the inhibin beta B gene, promoting granulosa cell apoptosis in the porcine ovary. Genet Mol Res. 13:2504–12.
24. Wright E.C. 2012. MicroRNA expression and function during porcine oocyte maturation and early embryonic development. Iowa State University.
25. Xu S., Linher-Melville K., Yang B.B., Wu D. and Li J. 2011. Micro-RNA378 (miR-378) regulates ovarian estradiol production by targeting aromatase. Endocrinology. 152(10):3941-51.
26. Yang X., Zhou Y., Peng S., Wu L., Lin H.Y., Wang S. and Wang HM. 2012. Differentially expressed plasma microRNAs in premature ovarian failure patients and the potential regulatory function of mir-23a in granulosa cell apoptosis. Reproduction. 144:235–44.
27. Yao N., Yang B.Q., Liu Y., Tan X.Y., Lu C.L., Yuan X.H. and Ma X. 2010. Follicle-stimulating hormone regulation of microRNA expression on progesterone production in cultured rat granulosa cells. Endocrine. 38(2):158-66.
28. Yin M., Lü M., Yao G., Tian H., Lian J., Liu L., Liang M., Wang Y. and Sun F. 2012. Transactivation of microRNA-383 by steroidogenic factor-1 promotes estradiol release from mouse ovarian granulosa cells by targeting RBMS1. Mol Endocrinol. 26(7):1129-43.
29. Zhang J., Ji X., Zhou D., Li Y., Lin J., Liu J., Luo H. and Cui S. 2013. miR-143 is critical for the formation of primordial follicles in mice. Front Biosci (Landmark Ed). 18:588–97.
30. Zhang L., Zhang X., Zhang X., Lu Y., Li L. and Cui S. 2017. MiRNA-143 mediates the proliferative signaling pathway of FSH and regulates estradiol production. J Endocrinol. 234(1):1-14.
31. Zhang Q., Sun H., Jiang Y., Ding L., Wu S., Fang T., Yan G. and Hu Y. 2013. MicroRNA-181a suppresses mouse granulosa cell proliferation by targeting activin receptor IIA. PLoS ONE. 8, e59667

Providing of SSR genetic map and mapping of quantitative genes controlling traits in wheat population derived from crosses of Kohdasht and Gonbad

Hossein Sabouri*, [1], Somayeh Sanchouli[2], Sharifeh Mohammad Alagh[3], Ali Tanhaei[3]

1. Associate Prof. Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University.
2. Ph.D. Students in Plant Physiology, Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University.
3. MSc in Agricultural Biotechnology, Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University

Corresponding Author Email address: hos.sabouri@gmail.com

Abstract

Wheat is the most important food of the people of the world and provides most of the human nutritional needs in different countries of the world, especially the people of third world countrie. In order to locate the genes controlling agronomic traits, 120 wheat lines derived from the cross of the Kohdasht × Gonbad were carried out as a randomized complete block design with three replications. Planting rows were 2 m long and row spacing was 20 cm. In this study, the traits of peduncle length, awn length, spike weight, number of spikes and number of tiller. 423 SSR markers were divided on 21 wheat chromosomes. A total of seven QTL loci were identified for six different traits. For the number of germinated seeds, a QTL on the A2 chromosome, for the number of tillers per plant, a QTL was identified with the effect of justifying more than 20% of the phenotypic variance of the respective trait. For peduncle length of one QTL on chromosome A2, for peduncle length, two QTL loci were detected with LOD equal to 2.44 and 2.91 on chromosomes D4 and B6, respectively. These two QTL loci explained 12.79 and 17.067% of the phenotypic variation of the pesuncle lenfgt, respectively. There was one QTL for the total weight of the spikes, and one QTL with a LOD of 4.13 on the D2 chromosome for the total number of spikes, which could explain more than 23% of the phenotypic variation of the trait. The markers associated with major QTL can be used to select the best lines. These QTLs are suitable candidates for marker-assisted selection programs in the population of recombinant Iranian wheat lines due to their high explanation percentage after determining the validity.

.Keywords: marker, QTL, Linkage map

تهیه نقشه ژنتیکی SSR و مکان‌یابی ژن‌های صفات زراعی در جمعیت گندم حاصل از تلاقی ارقام کوهدشت و گنبد

حسین صبوری*[۱]؛ سمیه سنچولی[۲]؛ شریفه محمدآلق[۳]؛ علی تنهایی[۳]

۱- دانشیار تولیدات گیاهی ، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی ، دانشگاه گنبد کاووس
۲- دانشجو دکترای فیزیولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی ، دانشگاه گنبد کاووس
۳- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی ، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی ، دانشگاه گنبد کاووس

*ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: hos.sabouri@gmail.com

چکیده

گندم مهم‌ترین ماده خوراکی مردم جهان است و تامین کننده قسمت اعظم نیاز غذایی انسان در کشورهای مختلف جهان، به خصوص مردم کشورهای جهان سوم است. به منظور مکان یابی ژن های کنترل کننده صفات زراعی، ۱۲۰ لاین گندم حاصل از تلاقی کوهدشت × گنبد آزمایشی به صورت به‌صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. ردیف های کاشت به طول ۲ متر و فاصله ردیف ها ۲۰ سانتی‌متر بود. در این تحقیق صفت‌های تعداد بذر جوانه زده، تعداد پنجه در هر بوته، طول پدانکل، طول ریشک، وزن کل سنبله ها و تعداد کل سنبل اندازه‌گیری شد. ۴۲۳ نشانگر SSR روی ۲۱ کروموزوم گندم تقسیم شدند. در مجموع هفت مکان ژنی برای شش صفت مختلف شناسایی شد. برای تعداد بذر جوانه زده یک مکان ژنی روی کروموزوم 2A، برای تعداد پنجه در بوته یک مکان ژنی با اثر توجیه بیش از ۲۰ درصد از واریانس فنوتیپی صفت مربوطه شناسایی شد. برای طول پدانکل یک مکان ژنی روی کروموزوم 2A، برای صفت طول ریشک دو مکان ژنی به ترتیب با LOD برابر با ۲/۴۴ و ۲/۹۱ روی کروموزوم‌های 4D و 6B ردیابی شد. این دو مکان ژنی به ترتیب ۱۲/۷۹ و ۱۷/۰۶۷ درصد از تنوع فنوتیپی صفت مربوطه را توجیه کردند. برای وزن کل سنبله ها یک مکان ژنی، برای تعداد کل سنبله‌ها یک مکان ژنی با LOD برابر با ۴/۱۳ روی کروموزوم 2D قرار داشت که توانست بیش از ۲۳ درصد از تنوع فنوتیپی صفت مربوطه را توجیه کند. QTLهای با تبیین درصد بالاتری از تغییرات فنوتیپی صفات مورد مطالعه به عنوان QTL بزرگ اثر شناخته شدند. بنابراین می‌توان از نشانگرهای مرتبط با آن‌ها برای انتخاب بهترین افراد برای رسیدن به لاین‌های مطلوب استفاده نمود. این QTLها به دلیل بالا بودن درصد توجیه پس از تعیین اعتبار، کاندید مناسبی برای برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر در جمعیت لاین‌های نوترکیب برنج ایرانی می‌باشند.

واژگان کلیدی: نشانگر، QTL، نقشه پیوستگی

۱.مقدمه

غلات یکی از با ارزش ترین تولیدات غذایی برای انسان می‌باشد و تقریبا ۵۵ درصد از پروتئین‌ها، ۱۵ درصد چربی‌ها، ۷۰ درصد گلوسیدها و به طور کلی ۵۵-۵۰ درصد کالری مصرف شده توسط انسان در دنیا به وسیله غلات تامین می‌گردد (نورمحمدی و

همکاران، ۱۳۷۶). در میان غلات گندم (*Triticum aesivum* L.) از مهم‌ترین گیاهان زراعی بوده که رشد فزاینده جمعیت نیز بر ضرورت افزایش تولید آن افزوده است و از این لحاظ این گیاه دارای ارزش راهبردی ویژه در دنیا می‌باشد (انت و همکاران، ۱۳۹۲). نقشه‌یابی مکان‌های ژنی کمی (QTL) یکی از روش‌هایی است که در دهه اخیر برای مطالعه ژنتیکی صفات کمی توسعه یافته است. در این روش تفرق همزمان صفت کمی و نشانگرهای مولکولی بررسی می‌شود و در نهایت تعداد ژن‌ها (عوامل موثر)، نوع عمل آن‌ها و میزان اثر هر یک برآورد شده و مکان QTLها روی ژنوم شناسایی می‌گردد. از این رو می‌توان از نتایج آن در گزینش به کمک نشانگر استفاده نمود. به علاوه اثر پلیوتروپی، اثر متقابل QTLها و نیز اثر QTL × محیط قابل بررسی است (Kato et al., ۲۰۰۰; Liu, 2017; Zhang et al., 2019). روش‌های متعددی برای مکان‌یابی صفات کمی وجود دارد. این روش ها نقش مهمی در نقشه برداری QTL داشته‌اند. با این حال، هنوز دو کمبود وجود دارد. اولاً، تشخیص QTL با اثر کوچک دشوار است. دلایل عبارتند از: تعداد محدود افراد یا خطوط در جمعیت نقشه‌برداری، خطای آزمایشی زیاد در آزمایش‌های میدانی، و قدرت کم روش‌های نقشه‌برداری QTL در تشخیص QTLهای با اثر کوچک. ثانیاً، تشخیص QTLهای نزدیک به هم مشکل است. اگر دو QTL مرتبط با اثرات در یک جهت وجود داشته باشد، ممکن است یک QTL نادرست بین دو QTL مرتبط شناسایی شود، در حالی که اگر دو QTL مرتبط با اثرات در جهت مخالف وجود داشته باشد، ممکن است هیچ QTL شناسایی نشود. برای غلبه بر دو موضوع فوق، Wang و همکاران (۲۰۱۶) و Wen و همکاران (۲۰۱۸) genome-wide composite interval mapping (GCIM) را به ترتیب در جمعیت های متقاطع و F2 پیشنهاد کردند.

محمدی و همکاران (۱۳۸۴) با بررسی QTLهای صفات مورفولوژیک گندم سه QTL بر روی کروموزوم های ۲B، ۴B و ۴D برای ارتفاع بوته و سه QTL بر روی کروموزوم های ۱B، B5، ۲D برای سطح برگ پیدا کردند. Shah و همکاران (۱۹۹۹) در نقشه‌یابی ژن های کنترل کننده صفات مهم زراعی گندم که روی کروموزوم ۳A قرار دارند، چند QTL که ارتفاع گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دادند روی این کروموزوم گزارش کرده‌اند. Keller و همکاران (۱۹۹۹) در مطالعه‌ای که به منظور شناسایی مکان‌های ژنی کنترل کننده مقاومت به ورس در گندم انجام دادند، تعداد یازده QTL برای ارتفاع گیاه شناسایی نمودند. Sourdille و همکاران (۲۰۰۳) در مطالعه مکان‌های ژنی صفات مهم زراعی گندم، چهار QTL کنترل کننده ارتفاع گیاه را مکان یابی نموده‌اند.

با توجه به اینکه بسیاری از صفات زراعی توارث کمی دارند، مکان یابی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی نقش بسیار مهمی در کاربرد اطلاعات ژنومیک در تحقیقات کشاورزی و ... دارد. بنابراین مطالعه حاضر با هدف شناسایی مکان‌های ژنی مختلف برای صفات مختلف در گندم صورت گرفت.

۲.مواد و روش‌ها

این مطالعه در مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه گنبدکاووس اجرا شد. در این پژوهش از یک جمعیت F_8 شامل ۱۲۰ لاین حاصل از تلاقی ارقام کوهدشت × گنبد استفاده شد. آزمایش به‌صورت طرح الفا لاتیس انجام شد. ردیف‌های کاشت به طول ۲ متر و فاصله ردیف ها ۲۰ سانتی‌متر بود. در این تحقیق صفت‌های تعداد بذر جوانه زده، تعداد پنجه در هر بوته، طول پدانکل، طول ریشک، وزن کل سنبله ها و تعداد کل سنبله اندازه‌گیری شد. DNA ژنومی ۱۲۰ لاین گندم و دو والد کوهدشت و گنبد طبق روش تغییریافته CTAB (ساقی معروف و همکاران، ۱۹۹۴) از برگ‌های جوان استخراج شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای پرایمرهای SSR انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر BioRad در حجم 10 µl انجام شد. مخلوط واکنش حاوی، بافر PCR یک برابر، ۰/۲۵ میکرولیتر MgCl2 ۱/۵ میلی مولار، ۱ میکرولیتر dNTPs، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۵ میلی‌مولار، تک پلیمراز یک واحد و ۵۰ نانوگرم از DNA الگو بود. به‌منظور تکثیر قطعات DNA چرخه‌های PCR به شرح زیر انجام شد: بعد از ۵ دقیقه واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ Ċ سپس ۳۵ چرخه شامل: ۱ دقیقه در دمای ۹۴،۴۵ Ċ ثانیه در دمای اتصال ۱ ،۵۵Ċ دقیقه در

دمای ۷۲Ċ و بسط نهایی ۷ دقیقه در دمای ۷۲Ċ انجام شد. محصولات PCR در ژل آگارز ۰/۸ درصد با ولتاژ ۱۰۰ در بافر TBE (1x) به مدت ۱ ساعت تفکیک شدند. تجزیه داده‌ها با استفاده از پکیج QTL.gCIMapping.GUI v2.0 در نرم افزار R انجام شد.

۳. نتایج و بحث

نقشه پیوستگی بر اساس ۴۲۳ نشانگر SSR روی ۱۲۰ فرد جمعیت F_7، نشانگرها را به ۲۱ گروه پیوستگی متعلق به ۲۱ کروموزوم گندم با طول نقشه بر اساس تابع کوزامبی (۱۹۴۴) برابر با ۲۹۷۵ سانتی‌مورگان و فاصله بین دو نشانگر مجاور برابر با ۷/۰۳۳ سانتی‌مورگان منتسب کرد. این نشانگرها تراکم متفاوتی برای کروموزوم‌های مختلف داشتند، به طوری که کروموزوم ۴B کمترین تعداد نشانگر را داشت.

برای تعداد بذر جوانه زده یک مکان ژنی روی کروموزوم ۲A با LOD برابر با ۳/۲۳ در موقعیت ۶۲/۲۳ سانتی مورگان از ابتدای کروموزوم شناسایی شد. برای تعداد پنجه در بوته یک مکان ژنی با اثر توجیه بیش از ۲۰ درصد از واریانس فنوتیپی صفت مربوطه شناسایی شد. برای طول پدانکل یک مکان ژنی با اثر افزایشی ۱/۰۳۲۶ روی کروموزوم ۲A و نزدیک به نشانگرهای BARC220 و Xgpw5177-2A ردیابی شد. در مطالعات انجام شده توسط برنر و همکاران (۲۰۰۲)، شش QTL برای این صفت شناسایی شد. محمدی و همکاران (۱۳۸۴) در نقشه یابی QTLهای صفات مورفولوژیکی گندم، برای طول پدانکل ۳ QTL شناسایی نمودند. در مطالعه محمدی و همکاران (۱۳۸۴) هر سه QTL ارتفاع و طول پدانکل در مکان ژنومی مشابهی شناسایی شدند که همبستگی بالای دو صفت را توجیه می کند. برای صفت طول ریشک دو مکان ژنی به ترتیب با LOD برابر با ۲/۴۴ و ۲/۹۱ روی کروموزوم های ۴D و ۶B ردیابی شد. این دو مکان ژنی به ترتیب ۱۲/۷۹ و ۱۷/۰۶۷ درصد از تنوع فنوتیپی صفت مربوطه را توجیه کردند.

برای وزن کل سنبله ها یک مکان ژنی با توجیه بیش از ۱۸ درصد از تنوع فنوتیپی صفت مربوطه شناسایی شد. این QTL در نزدیکی نشانگرهای Xgpw7739-6B و gwm644 و در موقعیت ۴۲/۱۶ سانتی مورگان از ابتدای کروموزوم قرار داشت.

برای تعداد کل سنبله‌ها یک مکان ژنی با LOD برابر با ۴/۱۳ در موقعیت ۴۳/۰۵ سانتی مورگان از ابتدای کروموزوم ۲D قرار داشت که توانست بیش از ۲۳ درصد از تنوع فنوتیپی صفت مربوطه را توجیه کند.

Marza و همکاران (۲۰۰۵) QTLهای عملکرد دانه و اجزا آن در این تحقیق روی کروموزوم های ۱A، ۱B، ۲B، ۳B، ۴A، ۴B، ۵A، ۵B، ۶B، ۷A و ۷D ژنوم گندم نان گزارش نمودند.

جدول ۱: QTLهای کنترل کننده برای صفات مورد بررسی

Trait	Chr	Position (cM)	Additive Effect	LOD	Left_Marker	Right_Marker	r^2 (%)
تعداد بذر جوانه زده	2A	62.23	22.2059	3.2303	BARC279	BARC279	13.6723
تعداد پنجه در هر بوته	5B	64.3067	0.413	4.0583	Xgpw3035-5B	BARC1120	21.1642
طول پدانکل	2A	28.8257	1.0326	2.4718	BARC220	Xgpw5177-2A	15.8397
طول ریشک	4D	53.65	0.3434	2.4471	Xgpw4132-4D	Xgpw7795-4D	12.79
	6B	17.6109	-0.3967	2.9144	BARC354	gwm705	17.067
وزن کل سنبله ها	6B	42.1633	-94.138	2.373	Xgpw7739-6B	gwm644	18.3504

تعداد کل سنبله	2D	43.05	77.9566	4.1341	Xgpw332-2D	cfd233	23.8715

۴. نتیجه‌گیری

در مجموع هفت مکان ژنی برای شش صفت مختلف شناسایی شد. شناسایی QTLهایی با اثرهای افزایشی مثبت و منفی، بیانگر انتقال آلل‌های مطلوب در این جایگاه‌ها از هر دو والد به نتاج بود که والدین حاضر می‌توانند در برنامه‌های اصلاح گندم استفاده شوند. یک مکان ژنی بزرگ اثر برای شاخص برداشت روی کروموزوم ۲D که توانست ۲۳/۸۷ درصد از تنوع فنوتیپی صفت تعداد کل سنبله را توجیه کند. QTLهای با تبیین درصد بالاتری از تغییرات فنوتیپی صفات مورد مطالعه به عنوان QTL بزرگ اثر شناخته شدند. بنابراین می‌توان از نشانگرهای مرتبط با آن‌ها برای انتخاب بهترین افراد برای رسیدن به لاین‌های مطلوب استفاده نمود. این QTLها به دلیل بالا بودن درصد توجیه پس از تعیین اعتبار، کاندید مناسبی برای برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر در جمعیت لاین‌های نوترکیب برنج ایرانی می‌باشند.

منابع

۱. نور محمدی ق.، سیادت ع. و کاشانی ع. ۱۳۷۶ .زراعت جلد اول غلات. انتشارات دانشگاه شهید چمران اهواز . ۴۴۶ص.

۲. آنت ز.، اسماعیل‌زاده مقدم م.، کاشانی ع. و مرادی ف. ۱۳۹۲ .روند تغییرات عملکرد دانه و برخی صفات فیزیولوژیکی در ارقام گندم نان بهاره معرفی شده در سالهای ۱۳۸۷-۱۳۳۰ در ایران. مجله به زراعی نهال و بذر. ۲(۴): ۴۸۳-۴۶۱.

۳. محمدی و .، م .ر. قنادها ع .ع. زالی ب . یزدی صمدی و بر پ. ۱۳۸۴ .نقشه یابی QTL های صفات مورفولوژیکی گندم . مجله علوم کشاورزی. ۳۶ (۱): ۱۵۷-۱۴۵.

4. Borner A., Schumann E., Furste A., Coster H., Leithold B., Roder M.S. and Weber W.E. 2002. Mapping of quantitative trait loci determining agronomic important characters in hexaploid wheat. Theor Appl Genet. 105: 921-936.
5. Kato K., Miura H., Sawada S. 2000. Mapping QTLs controlling grain yield and its components on chromosome 5A of wheat. Theor Appl Genet 101: 1114-1121.
6. Keller M., Karutz C., Shmid J., Stamp P., Wnnzeler M., Keller B., Messmer M. 1999. Quantitrative trait loci for lodging resistance in a segregating wheat × spelt population. Theor Appl Genet 98: 1171-1182.
7. Kosambi D.D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. Annuals of Eugene. 12: 172-175.
8. Liu B.H. 2017. Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis, CRC press.
9. Marza F., Bai GH., Carver B.F. and Zhou W.C. 2005. Quantitative trait loci for yield and related traits in the wheat population Ning7840 Clark. Theoretical Applied Genetics. 112: 688-698.
10. Saghai Maroof, MA, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q, Allard RW.1994. Extraordinarily polymorphic microsatillate DNA in barely species diversity,

choromosomal location, and population dynamics, Proceeding of the National Academy of Sceinces. USA. 91: 5466-5570.
11. Shah M.M., Gill K.S., Baenziger P.S., Yen Y., Kaeppler S.M., Ariyarathne H.H. 1999. Molecular mapping of loci for agronomic traits on chromosome 3A of bread wheat. Crop sci 39: 1728-1732.
12. Sourdille P., Cadalen T., Guyomarc'h H., Snape J. W., Perretant M.R., Charmet G., Boeuf C., Bernard S., Bernard M. 2003. An update of the Courtot × Chinse spring intervarietal molecular marker linkage map for QTL detection of agronomic traits in wheat. Theor. Appl. Genet. 106: 530-538.
13. Wang S.B., Wen Y.J., Ren W.L. 2016. Mapping small-effect and linked quantitative trait loci for complex traits in backcross or DH populations via a multi-locus GWAS methodology. Sci Rep.6:29951.
14. Wen Y.J., Zhang H., Zhang J. 2018. An efficient multi-locus mixed model framework for the detection of small and linked QTLs in F2. Brief Bioinform.
15. Zhang Y.W., Wen Y.J., Dunwell J.M., Zhang Y.M. 2019. QTL.gCIMapping.GUI v2.0: An R software for detecting small-effect and linked QTLs for quantitative traits in bi-parental segregation populations. Comput Struct Biotechnol J. 18: 59-65.

Determination of genetic structure of genes controlling agronomic traits in wheat population derived Zagros and Gonbad crosses

Hossein Sabouri*, [1], Somayeh Sanchouli[2], Sharifeh Mohammad Alagh[3], Behzad Naeimi[3]

1. Associate Prof. Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University.
2. Ph.D. Students in Plant Physiology, Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University.
3. MSc in Agricultural Biotechnology, Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University

**Corresponding Author Email address: hos.sabouri@gmail.com*

Abstract

Wheat is one of the most important crops in terms of cultivation and production in the world and plays an important role in providing food needs of human societies. In order to locate the genes controlling agronomic traits, 120 wheat lines derived from the cross of the Gonbad × Zagros were carried out as a randomized complete block design with three replications. Planting rows were 2 m long and row spacing was 20 cm. In this study, the traits of number of claws, number of claws per plant, grain filling length, plant height, peduncle length, spike length, beard length, spike weight, total spike weight, grain weight of a spike, peduncle diameter, flag leaf length, flag leaf weight, total spike number, number of spikes, number of grains per spike, grain length, diameter. 523 SSR markers were divided into 21 wheat chromosomes. A total of 18 gene locations were identified for 11 different traits. For the number of claws of a gene location on chromosome B2, plant height of two gene locations on A1 and A3 chromosomes and for peduncle length, two gene locations on the B1 chromosome were identified at 49.22 and 160.32 positions. . Cluster length could justify 52% of the phenotypic variance of the trait by pretending only one gene location on the B7 chromosome. The total weight of spikes has a LOD gene location equal to 4.04 which is continuous to BARC171 marker. For grain weight of a spike, a gene location was presented. For peduncle length, a gene location was detected on chromosome B7. For grain length, five gene sites were detected on D1 (2 cases), A3 (two cases) and D7 chromosome. For 1000-grain weight and harvest index, a gene location was found on D1 and D7 chromosomes, respectively. QTLs were identified as large-effect QTL by explaining a higher percentage of phenotypic variations of the studied traits. Major QTLs are suitable candidates for marker-assisted selection programs in the population of recombinant Iranian rice lines due to their high explanation percentage after determining the validity.

Keywords: marker, QTL, Linkage map

تعیین ساختار ژنتیکی صفات زراعی در جمعیت گندم حاصل از تلاقی زاگرس و گنبد

حسین صبوری*[۱]؛ سمیه سنچولی[۲]؛ شریفه محمدآلق[۳]؛ بهزاد نعیمی[۳]

۱- دانشیار تولیدات گیاهی ، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی ، دانشگاه گنبد کاووس
۲- دانشجو دکترای فیزیولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی ، دانشگاه گنبد کاووس
۳- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی ، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی ، دانشگاه گنبد کاووس

**ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: hos.sabouri@gmail.com*

چکیده

گندم به عنوان یکی از مهمترین محصولات زراعی از لحاظ سطح زیر کشت و میزان تولید در جهان بوده و نقش مهمی را در تامین نیاز غذایی جوامع بشری دارد. به منظور مکان یابی ژن های کنترل کننده صفات زراعی، ۱۲۰ لاین گندم حاصل از تلاقی گنبد × زاگرس آزمایشی به صورت به‌صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. ردیف های کاشت به طول ۲ متر و فاصله ردیف ها ۲۰ سانتی‌متر بود. در این تحقیق صفت‌های تعداد پنجه، تعداد پنجه در هر بوته، طول پر شدن دانه، ارتفاع بوته، طول پدانکل، طول سنبله، طول ریشک، وزن سنبله، وزن کل سنبله‌ها، وزن دانه‌های یک سنبله، قطر پدانکل، طول برگ پرچم، وزن برگ پرچم، تعداد کل سنبله، تعداد سنبلچه، تعداد دانه در سنبله، طول دانه، قطر دانه، وزن هزار دانه، عملکرد بیولوژیک در هکتار، عملکرد دانه در هکتار، شاخص برداشت و عملکرد کاه اندازه‌گیری شد. ۵۲۳ نشانگر SSR روی ۲۱ کروموزوم گندم تقسیم شدند. در مجموع ۱۸ مکان ژنی برای ۱۱ صفت مختلف شناسایی شد. برای تعداد پنجه یک مکان ژنی روی کروموزوم B ۲، ارتفاع بوته دو مکان ژنی روی کرموزوم های۱ A و ۳ A و برای طول پدانکل دو مکان ژنی روی کروموزم ۱B در موقعیت های ۴۹/۲۲ و ۱۶۰/۳۲ شناسایی شد. طول خوشه با تظاهر تنها یک مکان ژنی روی کروموزوم ۷B توانست ۵۲ درصد از واریانس فنوتیپی صفت را توجیه کند. وزن کل سنبله ها دارای یک مکان ژنی با LOD برابر با ۴/۰۴ که پیوسته به نشانگر BARC171 است. برای وزن دانه های یک سنبله نیز یک مکان ژنی تظاهر یافت. برای طول پدانکل یک مکان ژنی روی کروموزوم ۷B ردیابی شد. برای طول دانه پنج مکان ژنی روی کزوموزوم های ۱D (۲ مورد)، ۳A (دو مورد) و ۷D ردیابی شد. برای وزن هزار دانه و شاخص برداشت نیز یک مکان ژنی به ترتیب روی کروموزوم‌های ۱D و ۷D ردیابی شد.QTL های با تبیین درصد بالاتری از تغییرات فنوتیپی صفات مورد مطالعه به عنوان QTL بزرگ اثر شناخته شدند. بنابراین می‌توان از نشانگرهای مرتبط با آن‌ها برای انتخاب بهترین افراد برای رسیدن به لاین‌های مطلوب استفاده نمود. این QTLها به دلیل بالا بودن درصد توجیه پس از تعیین اعتبار، کاندید مناسبی برای برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر در جمعیت لاین‌های نوترکیب برنج ایرانی می‌باشند.

واژگان کلیدی: نشانگر، QTL، نقشه پیوستگی

۱.مقدمه

گندم (*Triticum aesivum* L.) یک محصول اصلی و مهم است که به‌طور گسترده در طیف وسیعی از مناطق کشت می‌شود و یکی از منابع اصلی کربوهیدارت، پروتئین، فیبر، اسید آمینه و ویتامین می‌باشد. گندم حدود ۲۰ درصد از کل پروتئین و کالری موردنیاز روزانه برای ۴/۵ میلیارد نفر در سراسر جهان را تأمین می‌کند (Gahlaut et al., 2019; Tomás et al., 2020).

مکان یابی ژن های کنترل کننده صفات کمی یکی از روش هایی است که در دهه اخیر برای مطالعه ژنتیکی صفات کمی در دهه های اخیر توسعه یافته است. در این روش تفرق همزمان صفت کمی و نشانگرهای مولکولی بررسی می شود و در نهایت تعداد ژن، نوع عمل آنها و میزان اثر هر یک برآورد شده و مکان QTLها روی ژنوم شناسایی می شود. از این رو از نتایج آن می توان در گزین به کمک نشانگر استفاده کرد (Liu, 2017). روش‌های متعددی برای مکان‌یابی صفات کمی وجود دارد. این روش ها نقش مهمی در نقشه برداری QTL داشته‌اند. با این حال، هنوز دو کمبود وجود دارد. اولاً، تشخیص QTL با اثر کوچک دشوار است. دلایل عبارتند از: تعداد محدود افراد یا خطوط در جمعیت نقشه‌برداری، خطای آزمایشی زیاد در آزمایش‌های میدانی، و قدرت کم روش‌های نقشه‌برداری QTL در تشخیص QTLهای با اثر کوچک. ثانیاً، تشخیص QTLهای نزدیک به هم مشکل است. اگر دو QTL مرتبط با اثرات در یک جهت وجود داشته باشد، ممکن است یک QTL نادرست بین دو QTL مرتبط شناسایی شود، در حالی که اگر دو QTL مرتبط با اثرات در جهت مخالف وجود داشته باشد، ممکن است هیچ QTL شناسایی نشود. برای غلبه بر دو موضوع فوق، Wang و همکاران (۲۰۱۶) و Wen و همکاران (۲۰۱۸) genome-wide composite interval mapping (GCIM) را به ترتیب در جمعیت های متقاطع و F2 پیشنهاد کردند.

در GCIM، ابتدا از یک مدل خطی مخلوط با اثر SNP تصادفی تک جایگاهی در مطالعات ارتباطی گسترده ژنوم (GWAS) برای اسکن هر QTL فرضی روی ژنوم استفاده می‌شود. در اینجا کنترل پس‌زمینه چند ژنی از طریق انتخاب نشانگرهای پس‌زمینه در CIM با تخمین واریانس چند ژنی در GWAS جایگزین می‌شود. سپس، تمام پیک‌ها در منحنی P-value لگاریتم منفی به‌عنوان موقعیت‌های QTLهای فرضی متعددی که در یک مدل چند QTL گنجانده می‌شوند، مشاهده می‌شوند. مطالعات نشان داد که GCIM در مقایسه با روش‌های پرکاربرد، قدرت بالایی در تشخیص QTL، دقت بالا در تخمین پارامترهای QTL و نرخ مثبت کاذب پایین دارد (Zhang et al., 2019).

Shariati و همکاران (۲۰۰۹) با استفادع از ۲۶۵ نشانگر SSR اقدام به شناسایی QTLهای صفات زراعی و فیزیولوژیک در شرایط تنش خشکی در یک جمعیت RIL حاصل از تلاقی دو رقم سرداری و آرهان نمودند.

Shah و همکاران (۱۹۹۱) از کروموزوم 3A یک جمعیت ۵۰ تایی لاین اینبرد نوترکیب و نشانگرهای RFLP برای شناسایی QTL های کنترل کننده صفات زراعی استفاده کردند. آنها QTLهایی برای ارتفاع گیاه، وزن هزار دانه، دانه در هر سنبله، تعداد نسبله در هر متر مربع و ارتفاع گیاه در شرایط غیر تنش پیدا کردند.

در مطالعه ای که بر روی جمعیتی شامل ۱۰۸ لاین دابل هاپلوئید انجام شد که طب آن داده‌های فنوتیپی برای صفات فیزیولوژیک وزن دانه در هر خوشه، تعداد دانه در هر خوشه، ارتفاع گیاه و وزن هزار دانه با ساتفاده از ۱۶۸ مارکر SSR و روش نقشه یابی مرکب مورد بررسی قرار گرفتند که در نتیجه این بررسی در مجموع ۳۰ مکان ژنی برای این صفات در چهار مکان شناسایی شدند QTL از مجموع QTLها بر روی کروموزوم های ۱A، ۱B، ۲B، ۲D و ۷D با اثرات پلیوتروپیک گزارش شدند (Hai et al., 2008).

با توجه به اینکه بسیاری از صفات زراعی توارث کمی دارند، مکان یابی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی نقش بسیار مهمی در کاربرد اطلاعات ژنومیک در تحقیقات کشاورزی و ... دارد. بنابراین مطالعه حاضر با هدف شناسایی مکان‌های ژنی مختلف برای صفات مختلف در گندم صورت گرفت.

۲.مواد و روش‌ها

این مطالعه در مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه گنبدکاووس با ارتفاع از سطح دریا ۴۶ متر که بر اساس تقسیم‌بندی آب و هوایی کوپن دارای اقلیم مدیترانه‌ای گرم و نیمه‌خشک است، اجرا شد. در این پژوهش از یک جمعیت F_8 شامل ۱۲۰ لاین حاصل از تلاقی ارقام زاگرس × گنبد استفاده شد. آزمایش در چند مرحله به شرح ذیل انجام شد:

آزمایش به‌صورت طرح الفا لاتیس انجام شد. ردیف های کاشت به طول ۲ متر و فاصله ردیف ها ۲۰ سانتی‌متر بود. در این تحقیق صفت‌های تعداد روز تا رسیدگی فیزیولوژیکی، تعداد روز تا خوشه دهی، تعداد بذر جوانه زده، تعداد پنجه، تعداد پنجه در هر بوته، طول پر شدن دانه، ارتفاع بوته، طول پدانکل، طول سنبله، طول ریشک، وزن سنبله، وزن کل سنبله‌ها، وزن دانه‌های یک سنبله، قطر پدانکل، طول برگ پرچم، وزن برگ پرچم، تعداد کل سنبله، تعداد سنبلچه، تعداد دانه در سنبله، طول دانه، قطر دانه، وزن هزار دانه، عملکرد بیولوژیک در هکتار، عملکرد دانه در هکتار، شاخص برداشت، عملکرد کاه و تعداد سنبله غیربارور اندازه‌گیری شد.

به‌منظور استخراج DNA، بذور ۱۲۰ رقم لاین گندم و دو والد زاگرس و گنبد در گلخانه در گلدان به مدت ۱۴ روز کشت شدند، سپس DNA ژنومی طبق روش تغییریافته CTAB (ساقی معروف و همکاران، ۱۹۹۴) از برگ‌های جوان استخراج شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای پرایمرهای SSR انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر BioRad در حجم µl 10 انجام شد. مخلوط واکنش حاوی، بافر PCR یک برابر، ۰/۲۵ میکرولیتر MgCl2 ۱/۵ میلی مولار، ۱ میکرولیتر dNTPs، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۵ میلی‌مولار، تک پلیمراز یک واحد و ۵۰ نانوگرم از DNA الگو بود. به‌منظور تکثیر قطعات DNA چرخه‌های PCR به شرح زیر انجام شد:

بعد از ۵ دقیقه واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ Ċ سپس ۳۵ چرخه شامل: ۱ دقیقه در دمای ۴۵ ،Ċ۹۴ ثانیه در دمای اتصال ۱ ،Ċ۵۵ دقیقه در دمای Ċ۷۲ و بسط نهایی ۷ دقیقه در دمای Ċ۷۲ انجام شد. محصولات PCR در ژل آگارز ۰/۸ درصد با ولتاژ ۱۰۰ در بافر TBE (1x) به مدت ۱ ساعت تفکیک شدند. تجزیه داده‌ها با استفاده از پکیج QTL.gCIMapping.GUI v2.0 در نرم افزار R انجام شد.

۳. نتایج و بحث

بعد از تعیین ژنوتیپ افراد، داده‌های حاصل وارد نرم افزار MapManager QTX 17 (مانلی و اولسن، ۱۹۹۹) گردید و نقشه پیوستگی بر اساس ۵۲۳ نشانگر SSR روی ۱۲۰ فرد جمعیت F_9، نشانگرها را به ۲۱ گروه پیوستگی متعلق به ۲۱ کروموزوم گندم با طول نقشه بر اساس تابع کوزامبی (۱۹۴۴) برابر با ۴۷۴۹/۶ سانتی‌مورگان و فاصله بین دو نشانگر مجاور برابر با ۹/۰۸۱۴ سانتی‌مورگان منتسب کرد. این نشانگرها تراکم متفاوتی برای کروموزوم‌های مختلف داشتند، به طوری که کروموزوم 7D کمترین تعداد نشانگر را داشت.

برای تعداد پنجه در بوته یک مکان ژنی با LOD برابر با ۳/۱۲۷۶ روی کروموزوم 2B با توجیه ۵۵/۲۹۷۹ درصد از واریانس فنوتیپی صفت مربوطه ردیابی شد. Marza و همکاران (۲۰۰۵) با بررسی یک جمعیت RIL گندم حاصل از تلاقی clarkxning 7840 در بیش از یک محیط و با ارزیابی هر یک از محیط به طور مجزا ۲۰۶ QTL اصلی را برای ۱۵ صفت شامل عملکرد و اجزای عملکرد و صفات زراعی مهم گندم گزارش کردند. QTLهای عملکرد دانه و اجزا آن در این تحقیق روی کروموزوم های ۱A، ۱B، ۲B، ۳B، ۴A، ۴B، ۵A، ۵B، ۶B، ۷A و ۷D ژنوم گندم نان قرار داشتند. یک مکان ژنی با LOD برابر با ۲/۸۹۶۹ و اثر افزایشی ۱/۹۶۶۱- برای طول دوره پر شدن دانه روی کروزموزم 5D ردیابی شد. برای ارتفاع بوته دو مکان ژنی به ترتیب با LOD ۲/۹۹ و ۲/۹۳ در موقعیت‌های ۸۲/۳۶ و ۵۳/۵۶ از کروموزوم های ۱A و ۳A ردیابی شد. Spielmeyer و همکاران (۲۰۰۷) یک QTL را برای صفت ارتفاع گندم بر

روی کروموزوم ۶A گزارش کردند. همچنین حیدری و همکاران (۱۳۸۷) QTLهایی را برای صفت ارتفاع بوته در جمعیتی متشکل از ۱۵۷ لاین دابل هاپلوئید شناسایی کردند. Marza(۲۰۰۵) پنج QTL بزرگ اثر برای ارتفاع گیاه در گندم بر روی کروموزوم های ۲BS، ۲BL، ۲D، ۲DL و ۶A تشخیص دادند که به ترتیب ۱۶/۷، ۱۶/۹، ۱۲/۳، ۱۴/۹ و ۱۲/۱ درصد از تغییرات فنوتیپی را در جمعیت اینبرد لاین نوترکیب به خود اختصاص می دهند. دو مکان ژنی روی کروموزوم B ۱ در موقعیت های ۴۹/۲۲ و ۱۶۰/۳۲ به ترتیب با LOD برابر با ۲/۵۹ و ۲/۶۸ و اثر افزایشی ۲/۲۹۲ و ۲/۱۸۰- برای طول پدانکل ردیابی شد. Borner و همکاران (۲۰۰۲) برای طول پدانکل یم مکان ژنی روی کرموزوم ۶A گزارش کردند. طول خوشه با تظاهر تنها یک مکان ژنی روی کروموزوم B۷ با LOD برابر با ۲/۹۲ و اثر افزایشی ۰/۷۷۷ توانست ۵۲ درصد از واریانس فنوتیپی صفت را توجیه کند. Borner و همکاران (۲۰۰۲) روی کروموزوم های ۲D و ۶B مکان هایی را برای طول خوشه شناسایی کردند. برای وزن سنبله دو مکان ژنی روی کروموزوم های ۲B و ۳A در موقعیت های ۷۳/۲۵ و ۱۵/۶۵ و به ترتیب با LOD ۳/۴۵ و ۳/۹۴ شناسایی شد.

وزن کل سنبله ها دارای یک مکان ژنی با LOD برابر با ۴/۰۴ که پیوسته به نشانگر BARC171 است که با توجیه بیش از ۶۰ درصد از تغییرات فنوتیپی صفت مربوطه به عنوان یک مکان ژنی بزرگ اثر شناخته می شود. برای وزن دانه های یک سنبله نیز یک مکان ژنی تظاهر یافت که دارای LOD برابر با ۲/۵۴ و اثر افزایشی ۰/۱۹۵- و توجیه ۴۲ درصد از واریانس فنوتیپی صفت بود.

جدول ۱: QTLهای کنترل کننده برای صفات مورد بررسی

Trait	Chr	Position (cM)	Additive Effect	LOD	Left_Marker	Right_Marker	r^2 (%)
تعداد پنجه	2B	37.23	104.097	3.12	BARC00	gwm429	55.29
ارتفاع بوته	1A	82.36	-6.064	2.99	Xwmc93-1A	Xwmc93-1A	33.27
	3A	53.56	-4.763	2.93	BARC57	cfa2262	20.53
طول پدانکل	1B	49.22	2.292	2.59	Xwmc85-1B	Xwmc85-1B	33.88
	1B	160.32	-2.180	2.68	Xgpw3190-1B	BARC302	30.65
طول خوشه	7B	127.75	0.777	2.92	Xwmc335-7B	gwm302	52.12
وزن سنبله	2B	73.25	0.224	3.45	gwm630	gwm630	39.1705
	3A	15.65	-0.202	3.94	Xgpw4221-3A	Xgpw2266-3A	31.85
وزن کل سنبله‌ها	6A	12.36	200.093	4.04	BARC171	BARC171	62.73
وزن دانه‌های یک سنبله	7A	121.47	-0.195	2.54	cfa2257	cfa2257	42.72
قطر پدانکل	7B	209.45	0.216	2.12	gwm611	Xwmc792-7B	43.16
طول دانه	1D	67.69	-2.630	2.99	BARC169	Xwmc147-1D	13.75
	3A	76.32	-3.134	3.39	Xwmc640-3A	Xgpw7213-3A	19.53
	1D	37.23	-1.828	2.77	Xwmc489-1D	Xwmc489-1D	6.64
	3A	44.28	2.393	3.97	BARC57	BARC57	11.38
	7D	78.32	3.345	5.16	Xgpw4385-7D	gdm145	22.24
وزن هزار دانه	1D	70.51	2.041	2.59	BARC169	Xwmc147-1D	45.08
شاخص برداشت	7D	35.22	6.22	3.18	cfd41	Xgpw2160-7D	60.47

برای طول پدانکل یک مکان ژنی روی کروموزوم 7B به ترتیب با LOD و اثر افزایشی ۲/۱۲ و ۰/۲۱۶ و در موقعیت ۲۰۹/۴۵ سانتی مورگان از ابتدای کروموزوم ردیابی شد. در مطالعات انجام شده توسط برنر و همکاران (۲۰۰۲)، شش QTL برایاین صفت شناسایی شد. محمدی و همکاران (۱۳۸۴) در نقشه یابی QTLهای صفات مورفولوژیکی گندم، برای طول پدانکل ۳ QTL شناسایی نمودند. در مطالعه محمدی و همکاران (۱۳۸۴) هر سه QTL ارتفاع و طول پدانکل در مکان ژنومی مشابهی شناسایی شدند که همبستگی بالای دو صفت را توجیه می کند.

برای طول دانه پنج مکان ژنی روی کزوموزوم های 1D (۲ مورد)، 3A (دو مورد) و 7D ردیابی شد. این مکان های ژنی به ترتیب دارای LOD برابر با ۲/۷۷، ۲/۹۹، ۳/۹۷، ۳/۳۹ و ۵/۱۶ بودند که از ۶ تا ۲۲ درصد از تنوع فنوتیپی صفت مربوطه را توجیه کردند یک مکان ژنی برای وزن هزار دانه روی کروموزوم 1Dردیابی شد که دارای LOD برابر با ۲/۵۹ بود و در بین دو نشانگر BARC169 و Xwmc147-1D قرار داشت و به میزان ۴۵ درصد از تنوع فتوتیپی صفت را توجیه کرد.

یک مکان ژنی بزرگ اثر برای شاخص برداشت روی کروموزوم 7D به ترتیب با LOD و اثر افزایشی برابر با ۱۸.۳ و ۶/۲۲ ردیابی شد که توانست بیش از ۶۰ درصد از تنوع فنوتیپی صفت مربوطه را توجیه کند و تحت عنوان ژن‌های بزرگ اثر قرار گیرد. قرایی و همکاران (۲۰۰۶) با بررسی بر روی یک جمعیت هاپلوئید مضاعف Chiness Spring در SQ1 یک مکان ژنی برای شاخص برداشت بر روی کروموزوم 7A گزارش کردند که افزایش شاخص برداشت در این QTL با QTLهای کنترل کننده عملکرد دانه بالا همپوشانی داشت. قادری و همکاران (۲۰۰۸) نیز تعداد پنج QTL برای شاخص برداشت بر روی کروموزوم های 1B، 1D، 5A، 6B و 7A لینه های اینبرد حاصل از تلاقی دو والد Babax و Seri M82 در شرایط تنش شخکی شناسایی کردند. آنها عنوان کردند که آلل های افزاینده برای QTLهای شناسایی شده صفت شاخص برداشت، از هر دو والد Babax و Seri M82به ارث رسیده اند که حکایت الز داشتن الل های مفید هر دو والد برای این دو صفت دارند.

۴. نتیجه‌گیری

یک مکان ژنی بزرگ اثر برای شاخص برداشت روی کروموزوم 7D که توانست ۶۰/۴۷ درصد از تنوع فنوتیپی صفت مربوطه را توجیه کند. QTLهای با تبیین درصد بالاتری از تغییرات فنوتیپی صفات مورد مطالعه به عنوان QTL بزرگ اثر شناخته شدند. بنابراین می‌توان از نشانگرهای مرتبط با آن‌ها برای انتخاب بهترین افراد برای رسیدن به لاین‌های مطلوب استفاده نمود. این QTLها به دلیل بالا بودن درصد توجیه پس از تعیین اعتبار، کاندید مناسبی برای برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر در جمعیت لاین‌های نوترکیب برنج ایرانی می‌باشند.

منابع

۱. آرمینان، ع.، هوشمند، س.ا.، شیران، ب. ۱۳۸۹. مکانیابی برخی از جایگاههای کنترلکننده صفات تولیدی گندم نان .ویژهنامه دوازدهمین کنگره ژنتیک ایران

۲. حیدری، ب.، سید طباطبایی، ب.، سعیدی، ق. ۱۳۸۷. بررسی اثر متقابل سال و ژنوتیپ بر وراثت پذیری صفات و پیشرفت ژنتیکی ناشی از انتخاب در یک جامعه دابل هاپلوئید گندم. علوم کشاورزی ایران. ۱ (۳۹): ۵۰-۴۱.

۳. محمدی، و.، قنادها، م. ر.، زالی، ع.ع.، یزدی صمدی، ب. ۱۳۸۴. نقشه یابی QTL های صفات مورفولوژیکی گندم. مجله علوم کشاورزی ایران. ۳۶ (۱): ۱۵۷-۱۴۵.

4. Borner A., Schumann E., Furste A., Coster H., Leithold B., Roder M.S. and Weber W.E. 2002. Mapping of quantitative trait loci determining agronomic important characters in hexaploid wheat. Theor Appl Genet. 105: 921-936.

5. Gahlaut V., Jaiswal V., Singh S., Balyan H. S. and Gupta, P.K. 2019. Multi Locus genome wide association mapping for yield ans its contributing traits in hexaploid wheat under different water regimes. Scientific Reports. https://doi.org/10.1038/s41598-019-55520-0

6. Ghaderi M.Gh. 2008. Mapping of quantitative trait loci associated with drought tolerance in wheat. Dissertation. University of Tehran. Iran (In farsi).

7. Hai L., Guo H., Wagner C., Xiao S. and Friedt W. 2008. Genomic regions for yield and yield parameters in Chinese winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes tested under varying environments correspond to QTL in widely different wheat materials. Plant Science. 175:226-232.

8. Kosambi D.D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. Annuals of Eugene. 12: 172-175.

9. Liu B.H. 2017. Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis, CRC press.

10. Marza F., Bai GH., Carver B.F. and Zhou W.C. 2005. Quantitative trait loci for yield and related traits in the wheat population Ning7840 Clark. Theoretical Applied Genetics. 112: 688-698.

11. Saghai Maroof, MA, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q, Allard RW.1994. Extraordinarily polymorphic microsatillate DNA in barely species diversity, choromosomal location, and population dynamics, Proceeding of the National Academy of Sceinces. USA. 91: 5466-5570.

12. Shah M.M., Gill K.S. and Baenziger P.S. 1991. Molecular mapping of loci for agronomic traits on chromosome 3A of bread wheat. Crop Sci. 39:1728-1732 .

13. Shariati J.V. Nachit M.M., Porseddu E. 2009. QTLs for yield and Yield components in bread wheat under drought stress. Proceedings of the 53rd Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress Torino, Italy.

14. Spielmeyer W., Hyles J., Joaquim P., Azanza F., Bonnett D., Ellis M.E., Moore R.A. and Richards C. 2007. A QTL on chromosome 6A in bread wheat (Triticum aestivum) is associated with longer coleoptiles, greater seedling vigour and final plant height Theor Appl Genet. 115(1):59-66.

15. Tomás D., Rodrigues J.C., Viegas W. and Silva M. 2020. Assessment of High Temperature Effects on Grain Yield and Composition in Bread Wheat Commercial Varieties. Agronomy.10:499. DOI:10.3390/agronomy10040499.

16. Wang S.B., Wen Y.J., Ren W.L. 2016. Mapping small-effect and linked quantitative trait loci for complex traits in backcross or DH populations via a multi-locus GWAS methodology. Sci Rep.6:29951.

17. Wen Y.J., Zhang H., Zhang J. 2018. An efficient multi-locus mixed model framework for the detection of small and linked QTLs in F2. Brief Bioinform.

18. Zhang Y.W., Wen Y.J., Dunwell J.M., Zhang Y.M. 2019. QTL.gCIMapping.GUI v2.0: An R software for detecting small-effect and linked QTLs for quantitative traits in bi-parental segregation populations. Comput Struct Biotechnol J. 18: 59-65.

An insight into the application of chitosan as a biosensor

Masoomeh Ahadi[1]; Taher Rabizadeh[2*]

1- Student, Department of Materials Engineering, Faculty of Mechanical Engineering, University of Tabriz, 51666-16471 Tabriz, Iran
2- Assistant professor, Department of Materials Engineering, Faculty of Mechanical Engineering, University of Tabriz, 51666-16471 Tabriz, Iran

**Corresponding Author Email address: t.rabizadeh@tabrizu.ac.ir*

Abstract

Biopolymers are polymers derived from plants, animals, and microbes. Depending on the cost, availability, moisture absorption, thermal stability, degradability and biocompatibility, biopolymers are used in certain fields. Many of these applications can be found in medical field. Despite their widespread use, biopolymers have disadvantages such as hydrophilicity, low mechanical properties and degradability in humid environments. So an alternative way to develop quality of the products and properties; is the using of biopolymer composites. They are biodegradable composites made from various animal and plant sources by reinforcing various natural fibers. Today, these composites are used in the manufacture of electrochemical devices, especially biological sensors. In this project, the construction and mechanical properties of biopolymer composites have been studied, it also investigates the performance of chitosan composite and nanocomposite as a biological sensor.

Keywords: Biopolymer, Chitosan, Biological Sensor, nanocomposite, cholesterol

نگرشی بر کاربرد کامپوزیت های پایه کیتوسان به عنوان حسگر های بیولوژیکی

معصومه احدی[۱]؛ طاهر ربیع زاده[۲*]

۱- دانشجو، گروه مهندسی مواد، دانشکده مهندسی مکانیک، دانشگاه تبریز

۲- استادیار، گروه مهندسی مواد، دانشکده مکانیک، دانشگاه تبریز

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: t.rabizadeh@tabrizu.ac.ir

چکیده

با توجه به زیست‌سازگاری عالی کامپوزیت‌های بایوپلیمر، این مواد به طور گسترده برای طراحی دستگاه‌های الکتروشیمیایی به‌خصوص حسگرهای بیولوژیکی مورد استفاده قرارگرفتند. به همین دلیل کامپوزیت‌های بایوپلیمر مطمئناً توجه زیادی را در زمینه توسعه حسگرهای بیولوژیکی به خود جلب می‌کنند، که این توجه از افزایش علاقه علمی و تکنولوژیکی به این مواد در سال‌های اخیر کاملا معلوم است. کیتوزان به عنوان یک ماده جایگزین جدید برای طیف وسیعی از کاربردها به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است و ویژگی‌های منحصر به فردی را نشان می‌دهد که برای ساخت حسگرهای بیولوژیکی بسیار مناسب است. ساختار آن اجازه می‌دهد تا پراکندگی و اصلاح شیمیایی برای ساخت حسگرهای انتخابی ایجاد شود. علاوه‌براین ، به نظر می‌رسد که ساختار شیمیایی کیتوزان یک ماده مناسب و انتخابی برای کاربردهای حسگری باشد. با این حال ، استفاده از کیتوزان در این زمینه بسیار جدید است و در آینده نه چندان دور، با توسعه دستگاه‌های زیست تحلیلی برپایه کیتوزان و با پیشرفت در سنتز مواد برپایه کیتوزان و پیشرفت تکنولوژیکی، انواع مختلف حسگرهای بیولوژیکی ساخته خواهد شد. هدف نهایی از ساخت حسگرهای بیولوژیکی برپایه کیتوزان ، توسعه دستگاه‌های کمکی کم‌هزینه و قابل اطمینان برای تشخیص زودهنگام بیماری‌های مختلف است.

بنابراین در این مقاله ابتدا به معرفی حسگرهای بیولوژیکی برداخته شده است. سپس کیتوزان و ویژگی های آن بیان شده است. در نهایت مقالاتی که کاربرد کیتوزان در تشخیص کلسترول را بررسی کرده اند مورد مرور قرار گرفته اند.

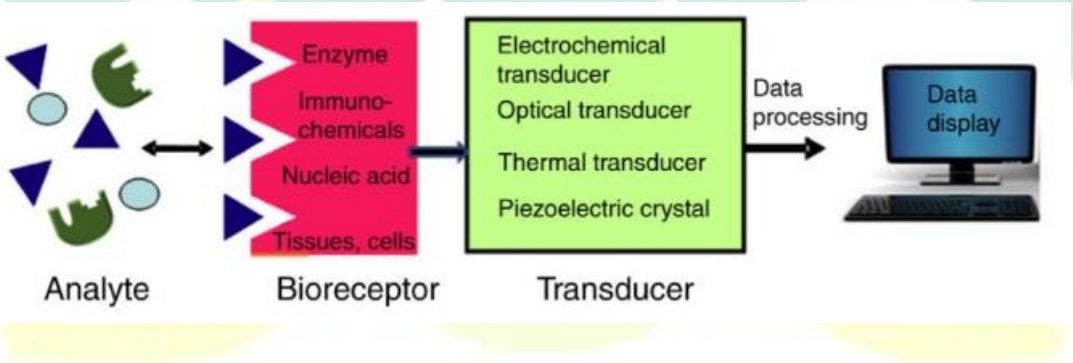
واژگان کلیدی: بایوپلیمر ، کیتوزان ، حسگر بیولوژیکی ، نانوکامپوزیت، کلسترول

۱. مقدمه

بایوپلیمرها موادی هستند که تحت شرایط طبیعی در چرخه رشد همه موجودات و در سلول‌ها توسط فرایندهای متابولیکی پیچیده تشکیل می‌شوند. پلی‌ساکاریدها ، پلی‌نوکلئوتیدها و پلی‌پپتیدها نمونه‌های مهمی از بایوپلیمرها هستند .برای بسیاری از کاربردها ، سلولز و نشاسته مورد استفاده قرار می‌گیرند. بااین‌حال ، توجه بیشتری به پلیمرهای هیدروکربنی پیچیده تولید شده توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها، به ویژه پلی‌ساکاریدها مانند کیتین و کیتوزان می‌شود (Rao et al., 2014).

در دهه های گذشته ، بایوپلیمرهای زیست سازگار و تجزیه پذیر در زمینه های مختلف از جمله در صنایع شیمیایی ، آرایشی، دارویی و پزشکی استفاده می شد (Kardas et al., 2012). اخیراً ، از بایوپلیمر ها به عنوان یک روند جدید در میکروالکترونیک ، برای کاربردهایی چون حسگرها استفاده می شود (Shukur and Kadir, 2015). از این نظر ، کیتوزان به دلیل بسیاری از خواص و ویژگی‌های خاص جایگزین مناسبی برای پلیمرهای مصنوعی در استفاده از حسگرها است.

حسگرهای بیولوژیکی دستگاه‌های تحلیلی هستند که واکنش بیولوژیکی را به سیگنال الکتریکی تبدیل می‌کنند. این حسگرها اولین‌بار در دهه ۱۹۶۰ توسط پیشتازان کلارک (Clark) و لیون (Lyons) ساخته‌شد. اصطلاح "حسگر بیولوژیکی" توسط کاممان (Cammann) ابداع شد و تعریف آن توسط اتحادیه‌ی بین‌المللی شیمی محض و کاربردی معرفی شد (Mehrotra, 2016). طبق IUPAC ، حسگر بیولوژیکی شکل ۱ یک دستگاه گیرنده - مبدل یکپارچه است که قادر به ارائه اطلاعات تحلیلی کمی یا نیمه کمی خاص با استفاده از یک عنصر تشخیص بیولوژیکی است . گیرنده بیولوژیکی می‌تواند هر عنصر بیولوژیکی مانند آنزیم ، DNA ، آنتی‌بادی ، سلول‌ها ، بافت ، اندامک و ... باشد. عنصر بیولوژیکی برای تولید یک سیگنال بیولوژیکی ، آنالیت را تشخیص و با آن اندرکنش دارد. گیرنده‌های بیولوژیکی به دلیل ماهیت انتخابی اندرکنش بیوشیمیایی ، ویژگی خاصی را برای حسگر بیولوژیکی می‌بخشد. نقش مبدل این است که سیگنال بیولوژیکی را به سیگنال الکتریکی قابل اندازه‌گیری تبدیل کند (Sawant, 2017). حسگرهای بیولوژیکی را می‌توان براساس مبدل به حسگرهای بیولوژیکی الکتروشیمیایی ، نوری ، حرارتی و پیزوالکتریک طبقه‌بندی کرد (Pejcic et al., 2006).



شکل ۱: شماتیک حسگر بیولوژیکی (Sawant, 2017)

حسگرهای بیولوژیکی در بسیاری از زمینه‌ها از جمله صنایع غذایی ، پزشکی ، دریایی و ... استفاده می‌شود و در مقایسه با روش‌های سنتی ثبات و حساسیت بهتری دارند (Mehrotra, 2016). مشکل اساسی در صنایع غذایی کیفیت و ایمنی ، نگهداری محصولات غذایی و ... است. تکنیک‌های سنتی دارای معایبی چون خستگی کارکنان ، گران و زمان بر بودن هستند ؛ بنابراین از حسگرهای بیولوژیکی به عنوان جایگزینی مناسب برای تکنیک‌های سنتی استفاده می‌کنند. به عنوان مثال امروزه از حسگرهای بیولوژیکی برای تشخیص عوامل بیماری‌زا در غذا و از نوع آنزیمی در صنایع لبنی استفاده می‌کنند (Mehrotra, 2016; Scognamiglio et al., 2014). در زمینه پزشکی ، کاربردهای حسگرهای بیولوژیکی به سرعت در حال رشد است. حسگرهای بیولوژیکی گلوکز به طور گسترده‌ای

در کاربردهای بالینی برای تشخیص دیابت استفاده می‌شود که به کنترل دقیق سطح گلوکز خون نیاز دارد. حسگرهای بیولوژیکی به طور گسترده در زمینه پزشکی برای تشخیص بیماری‌های عفونی ، نارسایی قلبی و ... استفاده می‌شوند (Mehrotra, 2016; Scognamiglio et al., 2010). حسگرهای بیولوژیکی فلورسنت عامل تصویربرداری برای استفاده در سرطان و کشف دارو هستند. آن‌ها می‌توانند یون‌ها ، متابولیت‌ها و نشانگرهای بیولوژیکی پروتئینی را با حساسیت زیادی بررسی‌کنند و همچنین می‌توانند وجود ، فعالیت یا وضعیت هدف را در محلول پیچیده گزارش‌دهند (Mehrotra, 2016; Morris, 2010). همچنین از حسگرهای بیولوژیکی می‌توان برای اهداف نظامی در زمان حملات بیولوژیکی استفاده کرد (Mehrotra, 2016).

۱-۱- بایوپلیمرها

بایوپلیمرها پلیمرهایی هستند که از گیاهان ، حیوانات و میکروب‌ها به‌دست می‌آیند. یکی از ساده‌ترین روش‌های طبقه‌بندی بایوپلیمرها براساس منشا آن‌ها ، به دو صورت بایوپلیمرهای طبیعی و مصنوعی است. پلیمرهای طبیعی از پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها و میکروب‌ها تشکیل شده‌اند، درحالی‌که پلیمرهای مصنوعی پلیمرهای تولید شده توسط تخمیر میکروبی، تولید بیوتکنولوژی و پتروشیمی هستند. با توجه به پاسخ بایوپلیمرها به شرایط حرارتی، آن‌ها را می‌توان به الاستومرها، ترموست‌ها و ترموپلاستیک‌ها تقسیم کرد (Aaliya et al., 2021).

۱-۲- کاربرد بایوپلیمرها

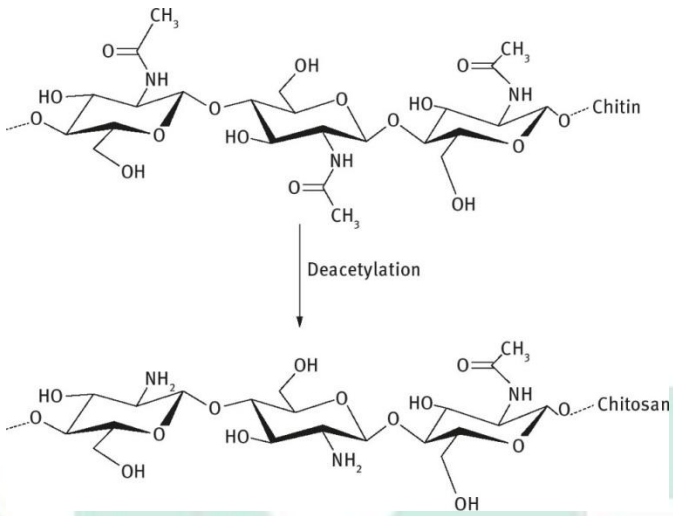
بسته به هزینه ، در دسترس بودن ، جذب رطوبت ، پایداری حرارتی ، تجزیه‌ناپذیری و زیست‌سازگاری ، بایوپلیمرها در زمینه‌های خاصی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Aaliya et al., 2021). بسیاری از این کاربردها را می‌توان در زمینه پزشکی یافت و تقریباً می‌توان آن‌ها را به سه دسته تقسیم کرد: سیستم‌های انتقال دارو ، ترمیم زخم و محصولات بهبودی و تجهیزات جراحی ایمپلنت. برخی از سایر کاربردهای بایوپلیمرها شامل ظروف ، ورقه‌های نگهداری خاک ، در زمینه کشاورزی ، کیسه‌های زباله ، مواد بسته‌بندی ، فیلتراسیون ، بهداشت و لباس‌های محافظ است (Van de Velde and Kiekens, 2002). علیرغم کاربرد وسیع ، بایوپلیمرها دارای معایبی چون آب‌دوستی ، خواص‌مکانیکی کم و تخریب‌پذیری در محیط مرطوب هستند (Aaliya et al., 2021). جهت بهبود خواص آن‌ها برای کاربردهای خاص ، می‌توان آن‌ها را با پرکننده‌هایی تقویت کرد که این خواص را به شدت بهبود می‌بخشند. بایوپلیمرهایی که از این طریق تقویت شده‌اند کامپوزیت‌های بایوپلیمر نامیده می‌شوند.

۱-۳- کیتین و کیتوزان

کیتین پلی‌ساکارید تغییریافته‌ای است که سازنده اصلی دیواره سلولی قارچ‌ها و اسکلت خارجی بندپایانی چون خرچنگ‌ها، میگوها و حشرات است. این ماده در حالت خالص نامحلول است (Rao et al., 2014). با استیل‌زدایی کیتین ؛ کیتوزان به‌دست می‌آید که این ماده به‌صورت محلول در آب است. آن‌ها به دلیل قابلیت حفظ آب و مرطوب کنندگی به طور گسترده‌ای در صنایع آرایشی استفاده می‌شوند.

کیتوزان به‌طور سنتی در جهت درمان خراشیدگی و در آمریکا برای ترمیم بریدگی‌های عمیق استفاده می‌شد. کیتوزان اولین‌بار توسط روگت(Rouget) در سال ۱۸۵۹ ، هنگامی که کیتین را در محلول غلیظ هیدروکسید پتاسیم می‌جوشاند ، کشف شد و همین امر منجر به استیل‌زدایی کیتین شد (Goosen, 1996). کیتین و کیتوزان (شکل ۲) که به عنوان حامل استفاده می‌شوند ، سنتز پیش داروهای محلول در آب را امکان‌پذیر می‌کنند. همانطور که مشاهده می‌شود ، کیتین و کیتوزان دارای ساختار شیمیایی مشابه‌ای هستند. کیتین از یک زنجیره‌خطی گروه‌های استیل گلوکوزآمین تشکیل شده‌است درحالی که کیتوزان با حذف گروه‌های استیل

(CH_3-CO)به دست می‌آید (Rao et al., 2014). با این حال ، بر خلاف فیبر گیاهی ، کیتوزان دارای بارهای یونی مثبت است ، که به آن توانایی پیوند شیمیایی با چربی‌های دارای بار منفی لیپیدها ، کلسترول ، یون‌های فلزی ، پروتئین ها و ماکرومولکول‌ها را می‌دهد.



شکل ۲: ساختار کیتین و کیتوزان (Berezina, 2016)

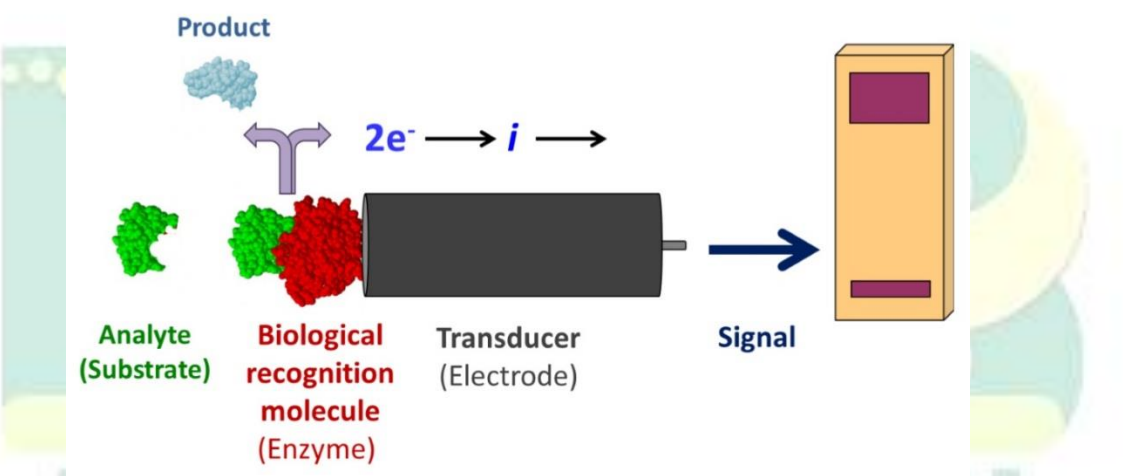
ساختار قابل توجه کیتوزان با بسیاری از گروه‌های واکنشی آمینو و هیدروکسیل در پیکربندی پلی‌ساکارید ، علاوه بر خواص کی-لیت‌سازی ، کمپلکس‌سازی ، رسانای الکتریکی ، ضدمیکروبی ، آنتی‌اکسیدانی ، ترمیم و تشکیل‌دهنده فیلم ؛ تجزیه‌پذیری و زیست سازگاری را امکان‌پذیر می‌کند (Croisier and Jérôme, 2013). با توجه به همه این ویژگی‌ها ، کیتوزان به‌شدت مورد مطالعه قرار گرفته است و در زمینه صنعتی و تکنولوژی از جمله تصفیه آب ، کشاورزی ، غذا ، داروسازی ، زیست‌پزشکی ، آرایشی ، نساجی و الکترونیکی در سال‌های اخیر توسعه یافته است (Kong et al., 2010; Luo and Wang, 2013). در میان بسیاری از خواص نشان داده‌شده توسط این پلی‌ساکارید ، فعالیت کی‌لیت‌سازی و رسانای الکتریکی از اهمیت ویژه‌ای در توسعه حسگرها و سایر دستگاه‌های الکتروشیمیایی برخوردار است (da Silva et al., 2019).

۱-۴- کاربرد کامپوزیت‌های برپایه کیتوزان به عنوان حسگر بیولوژیکی

کیتوزان برای استفاده در کاربردهای الکتروشیمیایی و حسگری پیشنهاد شده است. دانشمندان از خواص مطلوب کیتوزان برای اصلاح فیزیکی و شیمیایی ، آب دوستی بالا و خواص تشکیل فیلم استفاده می‌کنند. حسگرهای الکتروشیمیایی موادی هستند که با انتقال بار و یا برهم‌کنش میدان الکتریکی با مولکول‌ها اندرکنش دارند (شکل ۳). به طور معمول ، این مواد رسانای الکتریکی خوبی هستند و سطح آنها دارای برهم‌کنش خاص یا کاتالیزوری با مولکول (یا گروه مولکول ها) برای اندازه گیری است. رویکردهای متعددی برای حسگرهای الکتروشیمیایی و مشتقات کیتوزان وجود دارد و کامپوزیت‌ها به طرق مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند. از آنجا که کیتوزان معمولاً رسانایی الکتریکی مناسبی ندارد ، ساخت کامپوزیت‌ها با مواد رسانای بهتر برای ساخت الکترودها و حسگرها متداول است. معمولاً موادی که بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند پایه کربن هستند مانند گرافیت ، خمیر کربن ، گرافن و نانولوله های

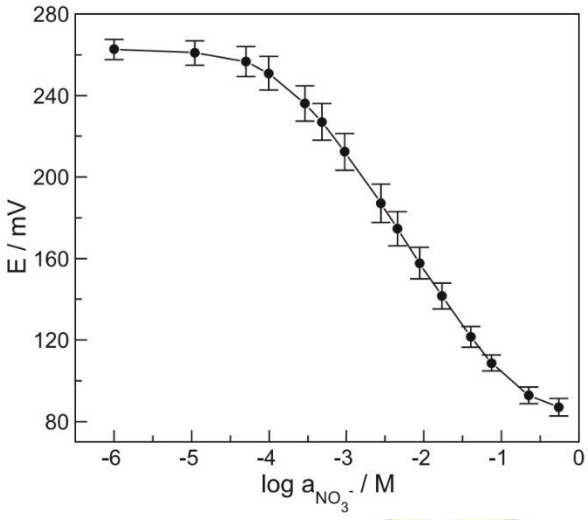
کربنی. کامپوزیت‌های کیتوزان می توانند پراکندگی های یکنواختی را ایجاد کرده و خواص رسانایی فیلرها و خواص شیمیایی و کاتالیزوری کیتوزان و سایر مواد کامپوزیت را بهبود بخشند. گروه‌های آمینو موجود در مولکول‌های کیتوزان محل اتصال برای برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک هستند. هنگامی که به شکل پروتون دار هستند ، این گروهها به خوبی با آنیون‌ها برهم‌کنش دارند و این ویژگی برای حسگرهای انتخابی پتانسیومتری یون‌های اورانیل (UO_2^{-}) و آنیون‌های تک ظرفیتی استفاده شده است (Ali et al., 2018; Darder et al., 2005). در این نوع حسگر ، پتانسیل الکتریکی غشا بسته به غلظت یون تغییر می‌کند.

اگرچه ممکن است سطح کیتوزان به عنوان یک ماده حسگر برای حسگرهای پتانسیومتری مورد استفاده قرارگیرد ، اما برای تعیین گونه‌های مختلف می توان سطح را بیشتر اصلاح کرد. اصلاح حسگر با آنزیم‌ها به طور گسترده‌ای برای ساخت سیستم‌های تحلیلی مورد استفاده قرارگرفته‌است و مواد برپایه کیتوزان برای این کار بسیار مناسب است (Krajewska, 2004). آنزیم‌ها دارای فعالیت کاتالیزوری عالی هستند و نسبت به بستر مورد نظر گزینش‌پذیری بالایی از خود نشان می‌دهند و به عنوان مولکول‌های تشخیص عالی ، در حسگرها عمل می‌کنند (Putzbach and Ronkainen, 2013).

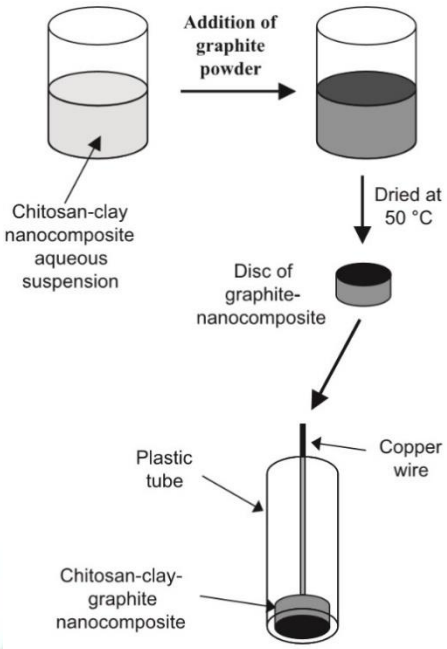


شکل ۳: شماتیک حسگر بیولوژیکی اصلاح شده توسط آنزیم (Putzbach and Ronkainen, 2013)

اصلاح مواد برپایه کیتوزان با آنزیم‌ها ممکن است به اشکال مختلف رخ دهد ، به طوری که ما می توانیم آن‌ها را به‌طور کلی به‌عنوان فیزیکی و شیمیایی طبقه بندی کنیم و بیش از یک مکانیسم می‌تواند به طور همزمان رخ دهد. اصلاح کیتوزان با مواد معدنی نیز ممکن است موادی با خواص بسیار جالب ارائه دهد. به عنوان مثال ، کامپوزیت کیتوزان با پودر گرافیت و مونت‌موری‌لونیت زمانی می‌تواند یک ماده با ساختار سه‌بعدی ایجادکند که مقدار کیتوزان کمتر از ظرفیت تبادل کاتیونی (CEC) خاک رس باشد (شکل ۴). با این حال ، هنگامی که کیتوزان در غلظت بالاتر از CEC باشد ، یک ماده نانوساختار دو بعدی را تشکیل می‌دهد که از یک لایه کیتوزان متصل به منطقه میان لایه‌ای رس تشکیل شده است و گروه‌های آمینو کیتوزان به عنوان محل تبادل یونی عمل می‌کنند. این ماده به عنوان حسگر پتانسیومتری مخصوص یون‌های تک ظرفیتی با حساسیت بیشتری برای تشخیص یون‌های نیتریت استفاده می‌شود (Darder et al., 2005).



ب



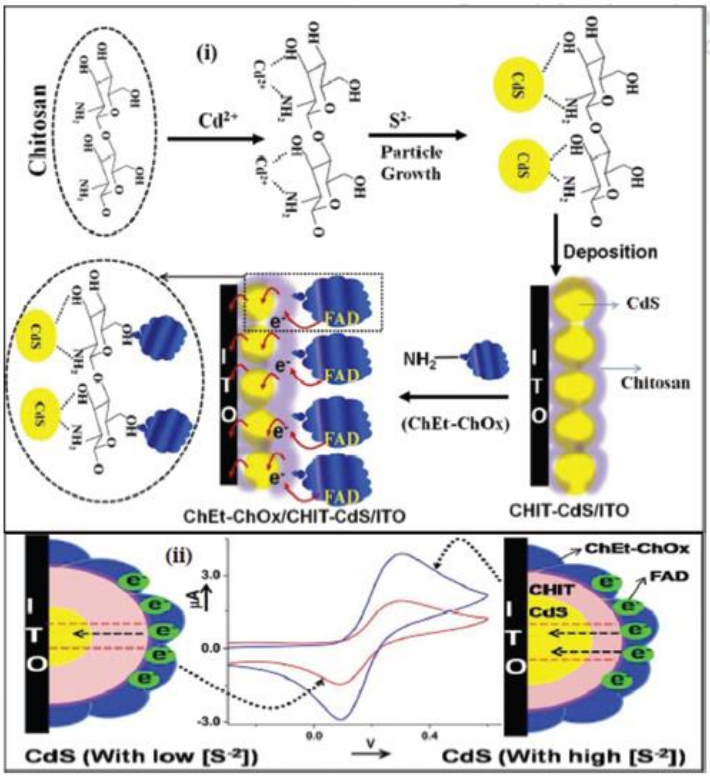
الف

شکل ۴:(الف) آماده سازی و ساخت حسگر با مواد کیتوزان - رس – گرافیت (ب) پاسخ پتانسیومتری حسگر نسبت به نیتریت در نانوکامپوزیت کیتوزان - مونت موری‌لونیت با ۱۷۳/۸ mEq / 100 g رس(Darder et al., 2005)

۱-۵- استفاده از کیتوزان به عنوان حسگر بیولوژیکی کلسترول

سریواستاوا (Srivastava) و همکاران ، نانوکامپوزیت پلی آنیلین – طلا (PAni-Au) را گزارش کرده‌اند که به صورت شیمیایی سنتز شده و در یک ماتریس کیتوزان اشباع شده است تا کلسترول اکسیداز (ChOx) روی یک صفحه شیشه‌ای با روکش اکسید قلع ایندیوم (ITO) جهت توسعه حسگرهای بیولوژیکی کلسترول ثابت بماند. الکترود بیولوژیکی (ChOx/PAni-Au-CS/ITO)برای تشخیص کلسترول با استفاده از تکنیک ولتامتری با واسطه اکسیداسیون و احیا استفاده شد. حسگر خطی را در محدوده وسیعی از $mg\ dL^{-1}$ ۵۰۰-۵۰۰ با حد تشخیص $37/89\ mg\ dL^{-1}$و حساسیت $0/86\ mg\ dL^{-1}$نشان داد. حسگر بیولوژیکی کلسترول (ChOx/CS-GR/GCE) با حساسیت افزایش یافته و حد تشخیص پایین توسط لی (Li) و همکاران مورد بررسی قرار گرفت ، الکترود ساخته شده پاسخ خطی به کلسترول در محدوده ۱mM – ۰/۰۵ با حد تشخیص۰/۷۱۵ µM نشان داد (Muthusankar and Ragupathy, 2018). چاران (Charan) و همکاران ، حسگر کلسترول برپایه نانو MnO_2/CS را توسعه و آنالیز کرده‌اند. کلسترول اکسیداز (ChOx) با استفاده از روش جذب فیزیکی روی نانو MnO_2/CS ثابت ماند. بیوالکترود ChOx / نانو - MnO_2 / CS / GCE آماده شده ؛ خطی با محدوده ۰/۰۳ – ۱۱.۶۶ mM و حد تشخیص کلسترول $2/07 \times 10^{-3}$ mM را نشان می‌دهد (Muthusankar and Ragupathy, 2018) . قلی‌وند (Gholivand) و همکاران ، تحقیقی روی حسگر بیولوژیکی کلسترول آمپرومتری بر اساس الکتروشیمی مستقیم کلسترول اکسیداز و کاتالاز بر روی GCE اصلاح شده با مایع یونی / گرافن انجام دادند. حساسیت عالی $4/163\ mA\ mM^{-1}\ cm^{-2}$ ، زمان پاسخ زیر ۶ ثانیه و محدوده خطی ۲۱۵ µM – ۰/۲۵ برای تعیین کلسترول با استفاده از حسگر بیولوژیکی پیشنهادی مشاهده شده است

(Gholivand and Khodadadian, 2014). دیانی (Dhyani) و همکاران ، یک پلتفرم حسگر بیولوژیکی بدون واسطه الکتروشیمیایی را با استفاده از نقاط کوانتومی سولفید کادمیوم سنتز شده درجا (CdS QDs) ادغام شده در کیتوزان از طریق عملکرد سطحی کلسترول استراز (ChEt) و مولکول‌های آنزیم ChOx بررسی کردند. شکل ۵ شماتیک و مکانیسم آن را نشان می‌دهد. پلتفرم حسگر بیولوژیکی برپایه CH-CdS QDs که برای تخمین کامل کلسترول بدون استفاده از واسطه استفاده می‌شود ، حساسیت بالایی حدود ۰/۳۸۴µA/mM/cm^2 در محدوده تشخیص وسیع ۱۲/۹ mM – ۰/۶۴ کلسترول را نشان می‌دهد (Muthusankar and Ragupathy, 2018).



شکل ۵: شماتیک و مکانیسم پلتفرم حسگر بیولوژیکی بدون واسطه الکتروشیمیایی با استفاده از نقاط کوانتومی سولفید کادمیوم سنتز شده در جا (CdS QDs) که از طریق عملکرد سطحی مولکول‌های کلسترول استراز (ChEt) و آنزیم ChOx در کیتوزان ادغام شده است. (Muthusankar and Ragupathy, 2018)

رسوب‌دهی الکتریکی یک مرحله‌ای نانوکامپوزیت طلا-گرافن برای ساخت حسگر بیولوژیکی کلسترول توسط ژانگ (Zhang) و همکاران مورد مطالعه قرار گرفت. آن‌ها گزارش دادند که حسگر بیولوژیکی به طور خطی در محدوده غلظت ۵/۰ mM – ۰/۲۵ با حد تشخیص ۵۰ µM به کلسترول پاسخ می‌دهد (Zhang et al., 2015). لاتا (Lata) و همکاران الکترود نقره برپایه ChEt/ChOx/HRP-AuNPs/c-MWCNTs برای تعیین کلسترول تام در سرم را نشان داد. دامنه خطی وسیعی از ۰/۵ mg/dL تا ۲۵۰ mg/dL (۰/۰۱ mM – ۵/۸۳ mM) با حداقل حد تشخیص ۰/۵ mg/dL (۰/۰۱ mM) گزارش شد (Muthusankar and

Ragupathy, 2018). یک حسگر فیبر نوری برای اندازه‌گیری کلسترول تام توسط ماتیوز (Mathews) و همکارانش طراحی و توسعه داده شد. آن‌ها یک حسگر گریتینگ طولانی مدت با روکش کیتوزان (LPG) ایجاد کردند که پاسخ خطی در حساسیت محدوده ۵/۰۲۵ × ۱۰۶ pm.mL/g را نشان داد (Muthusankar and Ragupathy, 2018).

۲.نتیجه گیری

بایوپلیمرها موادی هستند که منشا طبیعی دارند و از گیاهان ، حیوانات و میکروب‌ها به‌دست می‌آیند. بسته به هزینه ، در دسترس بودن ، جذب رطوبت ، پایداری حرارتی ، پایداری در برابر تخریب و زیست‌سازگاری ، بایوپلیمرها در زمینه‌های خاصی مورد استفاده قرار می‌گیرند. بسیاری از این کاربردها را می توان در زمینه پزشکی یافت. علیرغم کاربرد وسیع ، بایوپلیمرها دارای معایبی چون آب دوستی ، خواص‌مکانیکی کم و تخریب‌پذیر در محیط مرطوب هستند. بنابراین یک روش جایگزین برای توسعه محصولات با کیفیت و خواص خوب ؛ استفاده از کامپوزیت های بایوپلیمر است. کامپوزیت‌های بایوپلیمر ، کامپوزیت‌های زیست‌تخریب‌پذیری هستند که با تقویت الیاف طبیعی مختلف از منابع حیوانی و گیاهی ساخته شده‌اند. امروزه این کامپوزیت ها در ساخت دستگاه های الکتروشیمیایی به خصوص حسگرهای بیولوژیکی کاربرد دارند. یکی از مواد بایو پلیمر کیتوزان می باشد که کاربرد وسیعی در صنایع و علوم نوین تکنولوژیکی دارد. کیتوان به عنوان یک پلیمر قابلیت استفاده به عنوان بایو سنسور را دارد و می تواند کلسترول را نیز تشخیص دهد.

منابع

1. Aaliya, B., Sunooj, K.V., and Lackner, M. 2021. Biopolymer composites: a review. International Journal of Biobased Plastics, 3 (1): 40-84.
2. Ali, T.A., Mohamed, G.G., Aglan, R.F., and Mourad, M.A. 2018. A novel screen-printed and carbon paste electrodes for potentiometric determination of uranyl (II) ion in spiked water samples. Russian Journal of Electrochemistry, 54: 201-215.
3. Berezina, N. 2016. Production and application of chitin. Physical Sciences Reviews, 1(9): 1-8.
4. Croisier, F. and Jérôme, C. 2013. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. European polymer journal, 49(4): 780-792.
5. da Silva, S.B., Batista, G.L. and Santin, C.K. 2019. Chitosan for Sensors and Electrochemical Applications. Chitin and Chitosan: Properties and Applications, 461-476.
6. Darder, M., Colilla, M. and Ruiz-Hitzky, E. 2005. Chitosan–clay nanocomposites: application as electrochemical sensors. Applied Clay Science, 28 (1-4): 199-208.
7. Gholivand, M.B. and Khodadadian, M. 2014. Amperometric cholesterol biosensor based on the direct electrochemistry of cholesterol oxidase and catalase on a graphene/ionic liquid-modified glassy carbon electrode. Biosensors and Bioelectronics, 53: 472-478.
8. Goosen, M.F., 1996. Applications of Chitan and Chitosan. CRC Press.
9. Kardas, I., Struszczyk, M.H., Kucharska, M., van den Broek, L.A., van Dam, J.E. and Ciechańska, D., 2012. Chitin and chitosan as functional biopolymers for industrial applications, The European polysaccharide network of excellence (EPNOE), 329-373.

10. Kong, M., Chen, X.G., Xing, K. and Park, H.J. 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. International journal of food microbiology, 144 (1): 51-63.
11. Krajewska, B. 2004. Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. Enzyme and microbial technology, 35(2-3): 126-139.
12. Luo, Y. and Wang, Q. 2013. Recent advances of chitosan and its derivatives for novel applications in food science. Journal of Food Processing & Beverages, 1(1): 1-13.
13. Mehrotra, P. 2016. Biosensors and their applications–A review. Journal of oral biology and craniofacial research, 6(2): 153-159.
14. Morris, M.C., 2010. Fluorescent biosensors of intracellular targets from genetically encoded reporters to modular polypeptide probes. Cell biochemistry and biophysics, 56: 19-37.
15. Muthusankar, E. and Ragupathy ,D. 2018. Chitosan based nanocomposite biosensors: A recent review. Sensor Letters, 16(2): 81-91.
16. Pejcic, B., De Marco, R. and Parkinson, G. 2006. The role of biosensors in the detection of emerging infectious diseases. Analyst, 131: 1079-1090.
17. Putzbach, W. and Ronkainen, N.J. 2013. Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: A review. Sensors, 13(4): 4811-4840.
18. Rao, M.G., Bharathi, P. and Akila, R. 2014. A comprehensive review on biopolymers. Sci. Revs. Chem. Commun, 4(2):61-68.
19. Sawant, S. 2017. Development of biosensors from biopolymer composites, Biopolymer composites in electronics. Elsevier, 353-383.
20. Scognamiglio, V., Arduini, F., Palleschi, G. and Rea, G., 2014. Biosensing technology for sustainable food safety. TrAC Trends in Analytical Chemistry 62, 1-10.
21. Scognamiglio, V., Pezzotti, G., Pezzotti, I., Cano, J., Buonasera, K., Giannini, D. and Giardi, M.T. 2010. Biosensors for effective environmental and agrifood protection and commercialization: from research to market. Microchimica Acta, 170: 215-225.
22. Shukur, M. and Kadir, M. 2015. Hydrogen ion conducting starch-chitosan blend based electrolyte for application in electrochemical devices. Electrochimica Acta, 158: 152-165.
23. Van de Velde, K.. and Kiekens, P. 2002. Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. Polymer testing, 21(4): 433-442.
24. Zhang, H., Li, P. and Wu, M. 2015. One-step electrode position of gold-graphene nanocomposite for construction of cholesterol biosensor. Biosens, 4(2):1000128.

Comparison of *Arthrospira platensis* growth in sterile and non-sterile conditions

Tayebeh Hadi Toranposhti [1]; Fakhri Sadat Hosseini*

1- Student of Biotechnology Department, Faculty of Biological Sciences, Al-Zahra University
2 Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Al-Zahra University

** Email: F.hosseini@alzahra.ac.*

Abstract

Arthrospira platensis is a filamentous blue-green microalgae that is found in a wide variety of environments and has long had a special place in the human diet due to the lack of polysaccharides in the cell wall and high protein content. It has been used in some Asian and African countries as a dietary supplement as well as to treat various diseases. Also, due to its biologically active compounds, it produces essential amino acids, vitamins, minerals, essential fatty acids, etc. commercially for fish food, food colors, aquaculture, etc. Be. For the cultivation of this microalgae, it is important to pay attention to the physical parameters such as quantity and quality of the culture medium, temperature, exposure, etc., and due to the increasing cultivation of this microalgae and the production of different products from it, the study of culture conditions is of particular importance. Is. The aim of this study was to evaluate the sterility of culture conditions and its effect on the optimal growth of this microalgae. In this experiment, Arthrospira platensis was inoculated in Zarouk environment and exposed to ambient temperature of 26 ° C, 24-hour exposure and pH of 7 for 15 days. For this purpose, in one treatment (repeated 3 times) all equipment, tools and culture medium were autoclaved and inoculated under biological hood and completely sterile conditions were observed and in one treatment, sterilization conditions were not observed and both treatments were in the same environmental conditions. they got. During the growth process on certain days, cell density in both treatments was calculated and after the end of the growth period, the amount of wet and dry biomass was measured. By comparing the growth curve as well as the amount of wet and dry biomass, a significant difference was observed between the two treatment groups and it was found that sterility of culture conditions can have a positive effect on the growth of this microalgae and harvest biomass.

Keywords: Microalgae, Sterilization, Biomass, Growth curve

مقایسه رشد جلبک Arthrospira platensis در شرایط سترونی و غیر سترونی

طیبه هادی توران پشتی[1]؛ فخری سادات حسینی *؛

۱- دانشجوگروه زیست فناوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء

۲- استادیارگروه زیست فناوری، دانشکده علوم زیستی ، دانشگاه الزهراء

* Email: F.hosseini@alzahra.ac.

چکیده

Arthrospira platensis یک میکروجلبک سبز آبی رشته ای است که در محیط های بسیار متفاوتی یافت می شود و به علت نداشتن پلی ساکارید ها در دیواره سلولی و دارا بودن مقادیر پروتئین بالا از دیرباز در رژیم غذایی انسان جایگاه ویژه‌ای داشته است، و در برخی از کشورهای آسیایی و آفریقایی به عنوان یک مکمل غذایی و همچنین برای درمان بیماری های مختلف کاربرد داشته است. همچنین به علت دارا بودن ترکیبات فعال زیستی، اسید آمینه های ضروری ، ویتامین ها، مواد معدنی، اسید های چرب ضروری و... به صورت تجاری برای غذای ماهی، رنگ های غذایی، پرورش آبزیان و... تولید می شود. برای کشت این میکروجلبک توجه به پارامترهای فیزیکی مانند کمیت و کیفیت محیط کشت، دما، نوردهی و ... حائز اهیمت است و با توجه به کشت روز افزون این میکروجلبک و تولید محصولات مختلف از آن، بررسی شرایط کشت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. هدف از این مطالعه بررسی استریل بودن شرایط کشت وهمچنین تأثیر آن بر روی رشد بهینه این میکروجلبک است. در این آزمایش Arthrospira platensis در محیط زاروک تلقیح شد و تحت شرایط محیطی دمای ۲۶ درجه سانتی گراد، نوردهی ۲۴ ساعته و pH برابر ۷، به مدت ۱۵ روز قرار گرفت. بدین منظور در یک تیمار(۳ بار تکرار) تمام تجهیزات ، وسایل و محیط کشت اتوکلاو شده و تلقیح در زیر هود بیولوژیکی صورت گرفت و کاملا شرایط استریلی رعایت گردید و در یک تیمار شرایط استریلیزاسیون رعایت نگردید و هر دو تیمار در شرایط محیطی یکسانی قرار گرفتند. در طی فرآیند رشد در روزهای مشخصی تراکم سلول ها در هر دو تیمار محاسبه شد و بعد از پایان دوره رشد میزان زیست توده تر و خشک اندازه‌گیری شد. با مقایسه منحنی رشد و همچنین میزان زیست توده تر و خشک اختلاف معناداری بین دو گروه تیمار مشاهده شد و مشخص گردید که استریل بودن شرایط کشت می تواند تاثیر مثبتی بر رشد این میکروجلبک و میزان زیست توده برداشتی داشته باشد.

واژگان کلیدی: میکروجلبک ، استریلیزاسیون، توده زیستی ، منحنی رشد

۱.مقدمه

ریزجلبک‌ها جزء قدیمی‌ترین جانداران روی زمین محسوب می‌شوند که قدمتی بالغ بر ۳ میلیارد سال دارند. ریزجلبک‌ها به عنوان اولین تولیدکنندگان اکسیژن محسوب می‌شوند که می‌توانند انرژی خورشیدی را با تثبیت دی اکسید کربن به انرژی شیمیایی تبدیل کنند. جلبک‌ها از گذشته‌های دور در زندگی بشر نقش داشته اند که می‌توان به کاربرد آن‌ها در برخی کشورهای آسیایی و آفریقایی در رژیم غذایی، محصولات زیبایی پوست و مو و حتی در بهبود کیفیت خاک کشاورزی اشاره کرد. فقدان پلی ساکاریدها در دیواره سلولی سیانوباکترها، زیست توده آن‌ها را به ماده‌ای با هضم آسان و در نتیجه قابل قبول‌تر برای مصارف انسانی تبدیل می‌کند (Sathasivam R et al.,2019)

Arthrospira platensis (spirulina) ریزجلبکی است که در همه جا حضور دارد و در محیط های بسیار متفاوتی مانند خاک، مرداب‌ها، آب شیرین، شور و دریا و چشمه های آب گرم یافت می شود (Choonawala B.,2007). جنس*S.platensis* از خانواده *Oscillatoriaceae* شامل گروهی از سیانوباکترهای رشته ای است که با زنجیره های سلولی مارپیچی شکل محصور شده در یک غلاف نازک مشخص می شود (Ciferri and Tiboni.,1985).

S.platensis حاوی مقادیر زیادی پروتئین، تمام اسیدهای آمینه ضروری، اسیدهای چرب ضروری، مواد معدنی، ویتامین‌ها و رنگدانه های فتوسنتزی است (Kwei C.,2012). S.platensis به دلیل محتوای پروتئین بالا و ارزش غذایی عالی آن در تغذیه انسان استفاده می‌شود. در ضمن، این میکروجلبک دارای اثرات مختلفی برای ارتقای سلامت است که از جمله می‌توان به کاهش چربی خون، جلوگیری از افزایش فشار خون ، محافظت در برابر نارسایی کلیوی، بهبود رشد باکتری‌های روده‌ای، و مهار افزایش سطح گلوکز سرم اشاره کرد. بسیاری از ارزیابی های تغذیه ای و سم شناسی مناسب بودن زیست توده جلبکی را به عنوان مکمل خوراکی ثابت کرده اند. عصاره میکروجلبک‌ها را می‌توان عمدتا در محصولاتی مانند کرم ضد پیری، محصولات مراقبتی احیا کننده، نرم کننده و به عنوان یک ضد تحریک در لایه بردارها یافت. میکرو جلبک ها همچنین در محصولات ضد آفتاب و مراقبت از مو نیز وجود دارند (. Spolaore et al.,2006). کشت میکروجلبک‌ها در مقیاس وسیع و استفاده از این زیست توده به عنوان منبعی از ترکیبات غذایی خاص در اوایل دهه ۱۹۵۰ مورد توجه قرار گرفت (Choonawala B.,2007). تخمین زده می شود که در سال‌های آینده، عوامل رنگرزی همچنان پیشروترین محصول میکروجلبکی در بازار خواهند بود و پس از آن داروها، مواد شیمیایی ، مواد مغذی و در نهایت لوازم آرایشی و بهداشتی قرار دارند (Levasseur et al.,2020). بنابراین با توجه به این‌که جلبک‌ها فتوسنتزکننده هستند، نه تنها پیکره آن‌ها حاوی منبع‌های غنی از قند و پروتئین است بلکه مولکول‌های زیستی فعال هم دارند. این ارگانیسم‌ها قادرند از یک طرف مواد آلی بسازند و از سوی دیگر با سرعتی مناسب رشد و تکثیر کنند. لذا با صرف هزینه پایین و زمان کوتاه می‌توان حجم‌های بالایی از زیست توده جلبکی تولید کرد.

مهمترین پارامترهای تاثیرگذار بر رشد جلبک عبارتند از: کمیت و کیفیت مواد مغذی، نور، pH، اختلاط، شوری و دما.(Coutteau P.1996). مطالعاتی در زمینه های گوناگون و بررسی پارامترهای مختلف موثر در رشد میکروجلبک S.platensis انجام شده است. مطالعه‌ای که در سال ۱۳۹۸ بر روی منابع منیزیم و آهن صورت گرفت، نشان داد که می‌توان جهت کاهش هزینه‌ها و رشد بهینه این دو عنصر را از محیط کشت حذف کرد، همچنین در مورد اثر دما در محیط کشت زاروک در دمای ۲۴و۳۰ درجه سانتی گراد نشان داده شد که بیشترین رشد در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد صورت پذیرفت (جریان و همکاران، ۱۳۹۸). همچنین نتایج مطالعه‌ای دیگر نشان داد که کمترین غلظت نمک NaCl بدون شوک نمکی، بیشترین تأثیر را بر رشد *S.platensis* و تولید کارتنوئید و فیکوسیانین داشته است (کیخا آخر و همکاران ،۱۳۹۹). بر اساس نتایج مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که ، تنش، اثر زیادی بر رشد

و تولید زیست توده *S.platensis* دارد و با کاهش تنش، راندمان تولید صنعتی زیست توده در کشت *S.platensis* افزایش می یابد (شیخی نژاد و همکاران ،۱۳۹۴).

محیط کشت ریزجلبک‌ها صرف نظر از تنظیم عوامل فیزیکی (pH و دما و ...)، باید تا حد امکان شرایط طبیعی رشد جلبک‌ها را داشته باشد. ترکیب شیمیایی محیط و عناصر موجود در آن در رشد جلبک مؤثر است. یکی از عواملی که در پایداری ترکیب شیمیایی محیط کشت تأثیرگذار است استریلیزاسیون محیط است. ترکیب برخی از محیط‌های کشت تحت تأثیر اتوکلاو تغییر می‌کند. مطالعات کمی در این زمینه انجام شده است و البته با توجه به کاربرد ریزجلبک‌ها در تصفیه پساب‌ها از نظر اقتصادی اتوکلاو کردن مقرون به صرفه نیست. هدف از این مطالعه مقایسه رشد اسپیرولینا در شرایط سترون و غیر سترون است.

۲.مواد و روش‌ها

استوک جلبک spirulina platensis از شرکت ارگانیک آلجی تهیه شد. اجزای محیط کشت جلبکی طبق جدول ۱(Rajasekaran et al.,2015) آماده و با یک لیتر آب مقطر در ارلن آماده سازی شد. ، سپس یک گروه ارلن ها سترون نشده و گروه دیگر در اتوکلاو ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه و فشار ۱ اتمسفر سترون شدند. بعد از سترون شدن ۱۰۰ میلی لیتر استوک جلبک *S.platensis* حاوی تراکم سلولی متوسط در هر میلی لیتر ۲۴×۱۰^{۴} به محیط سترون در زیر هود تلقیح شد و به محیط غیر سترون نیز ۱۰۰ میلی لیتر استوک جلبکی (در محل غیر هود بیولوژیکی) تلقیح شد. در طول دوره رشد که ۱۵ روزه در نظر گرفته شد به منظور بررسی مورفولوژیکی، سلول‌ها با میکروسکوپ نوریOLYMPU با بزرگ نمایی x ۱۰۰ بررسی شدند. کشت در محدوده دمایی ۲۶ تا ۲۸ درجه سانتی گراد و pH برابر با ۷ انجام شد. نوردهی با ۴ لامپ فلوئورسنت به مدت ۲۴ ساعته و هوادهی با پمپ های هوادهی آکواریوم به طور مداوم انجام شد.

جدول۱: ترکیب شیمیایی محیط کشت به کار رفته برای کشت S.platensis بر حسب گرم بر لیتر

نام اجزاء	مقدار
$NaHCO_3$	16.80
K_2HPO_4	0.50
$NaNO_3$	2.50
K_2SO_4	1.00
NaCl	1.00
$MgSO_4.7H_2O$	0.20
$CaCl_2.2H_2O$	0.04
$FeSO_4.7H_2O$	0.01
NaEDTA	0.08
Micronutrient (H_3BO_3, $MnCl_2.4H_2O$, $ZnSO_4.4H_2O$, Na_2MoO_4, $CuSO_4.5H_2O$)	1ml

به منظور بررسی میزان رشد در روزهای مشخص(روز ششم، نهم، پانزدهم) از ارلن‌ها نمونه برداری شد، بدین منظور با سمپلر ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه را بر روی لام نئوبار ریخته و بعد از گذاشتن لامل با بزرگ نمایی ۱۰x زیر میکروسکوپ شمارش شدند و بعد از

میانگین گرفتن در ۱۰،۰۰۰ ضرب گردیده که تعداد سلول‌ها در هر میلی لیتر با استفاده از فرمول زیر به دست آمد (قائنی و همکاران،۱۳۸۸).

$K=Ln\ N_1-Ln\ N0/t$

N_1 = تعداد سلول‌ها در زمان t

N_0 = تعداد سلول‌ها در زمان صفر

t = زمان (روزها)

بعد از ورود به سیر نزولی کشت، بیومس نمونه‌ها با استفاده از مش ۲۵ میکرون جمع آوری شده، پس از شستشو وزن تر توده سلولی با ترازوی با دقت ۰۰۱.۰ گرم توزین گردید، سپس بیومس‌ها بر روی نایلون‌هایی پخش شدند تا سطح افزایش یابد و به مدت ۱ هفته در دمای اتاق رها شدند تا خشک گردند و پودر خشک بعد از جمع‌آوری توزین شد. تمام آزمایش‌ها با ۳ بار تکرار انجام شد.
تمام آنالیزهای آماری با نرم افزار SPSS 26 انجام شده است و نمودارها با اکسل ۲۰۱۹ رسم گردیده است.

۳. نتایج و بحث

در طول مدت رشد به منظور بررسی مورفولوژیکی، سلول‌ها با میکروسکوپ نوری بررسی شدند (شکل ۱). در روزهای اول کشت رنگ نمونه‌ها سبز کم‌رنگ بود که به علت نوردهی مداوم و ۲۴ ساعته میزان کلروفیل بیشتری تولید شد، و در نتیجه در روزهای آینده نمونه‌ها سبز پررنگ مشاهده شد. نتایج حاصل از شمارش سلول‌ها در جدول ۲و ۳ آورده شده است. در طول دوره رشد تغییرات PH محیط اندازه گیری شد که براساس نتایج به دست آمده تا پایان دوره رشد محیط قلیایی شده و pH حدود ۹ رسید.



شکل۱: تصویر جلبک S.platensis عکسبرداری با بزرگ نمایی x ۱۰ در محیط استریل

جدول ۲: میزان تراکم سلولی S.platensis در شرایط سترون در دوره رشد ۱۵ روزه

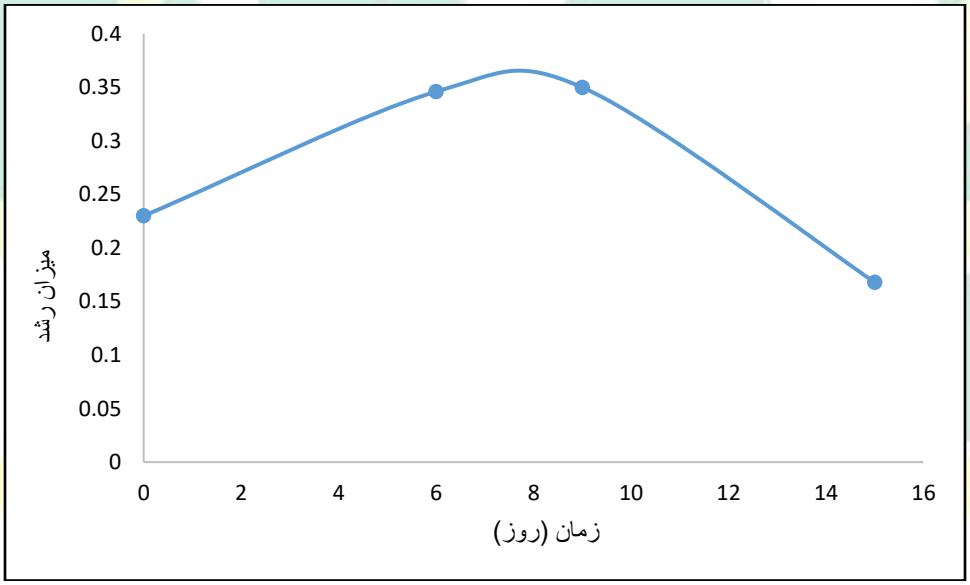
روز	میانگین تعداد سلول‌های شمارش شده	تراکم (سلول/ میلی لیتر)	میزان رشد (K)
N_0	۳±۰	۳×۱۰۴	۰.۲۳
N_6	۲۴±۳.۶۰	۲۴×۱۰۴	۰.۳۴۶

N_9	۷۰±۷.۰۷	۷۰×۱۰۴	۰.۳۵
N_{15}	۳۷±۱۰.۶۰	۳۷×۱۰۴	۰.۱۶۸

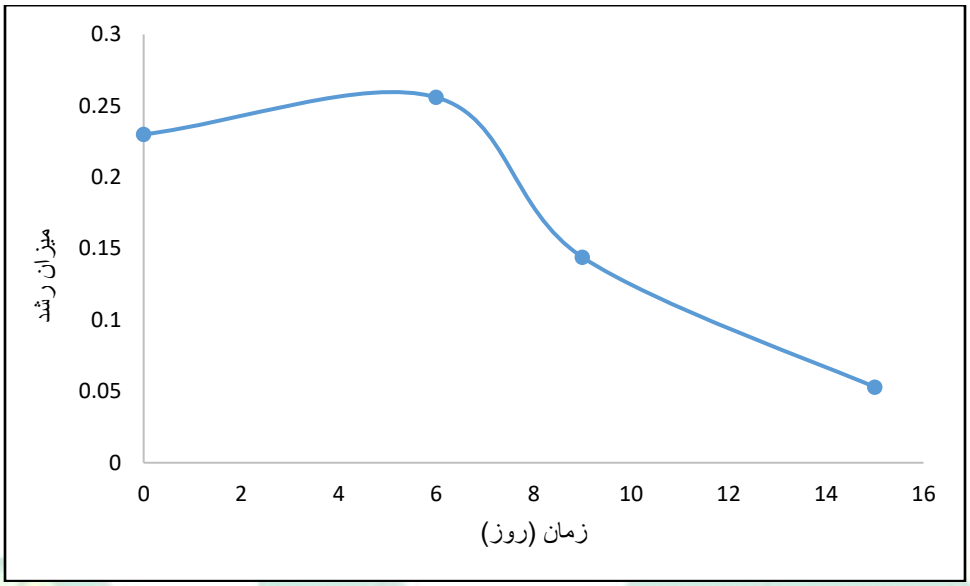
جدول۳: میزان تراکم سلولی S.platensis در شرایط غیر سترون در دوره رشد ۱۵ روزه

روز	میانگین تعداد سلول‌های شمارش شده	تراکم (سلول/ میلی لیتر)	میزان رشد (K)
N_0	۳±۰	۳×۱۰۴	۰.۲۳
N_6	۱۴±۴.۹۲	۱۴×۱۰۴	۰.۲۵۶
N_9	۱۱±۱.۷۳	۱۱×۱۰۴	۰.۱۴۴
N_{15}	۷±۲.۵۱	۷×۱۰۴	۰.۰۵۳

نمودار ۱ و نمودار ۲ منحنی رشد جلبک را در شرایط سترون و غیر سترون نشان می‌دهد.



نمودار۱:منحنی رشد S.platensisدر شرایط سترون



نمودار۲: منحنی رشد S.platensis در شرایط غیر سترون

مقادیر توده زیستی تر و خشک بعداز توزین، محاسبه گردید و نتایج آن در جداول ۵ و۴ آورده شده است.

جدول۴: میزان زیست توده تر بعد از پایان دوره کشت بر حسب گرم

شرایط سترون	شرایط غیر سترون
۵.۱۷۶±۰.۵۰۳	۱.۱۶۶±۰.۱۰۴

جدول۵:میزان زیست توده خشک بر حسب گرم

شرایط سترون	شرایط غیر سترون
۰.۴۶۶	۰.۱.۴

نمودارهای ۲و ۱ نشان دهنده این امر است که در شرایط سترون تا روز ۷ رشد به صورت صعودی بوده است و بعد از آن فاز نزولی را با شیب ملایم طی می‌کند. اما در شرایط غیر سترون رشد صعودی تا روز ۶ ادامه داشته است و بعد از گذشت ۶ روز از کشت، در ارلن‌های غیر سترون توده‌هایی مشاهده شد و بعد از نمونه برداری از تیمارها و رنگ آمیزی گرم، باکتری باسیل گرم مثبت در کشت مشاهده شد و این امر نشان دهنده این است که باکتری باسیل گرم مثبت با اسپیرولینا رقابت کرده و از رشد اسپیرولینا جلوگیری

می‌کند. همچنین جداول ۵ و۴ بیان‌گر این نکته است که در شرایط سترون بیومس بیشتری نسبت به شرایط غیر سترون قابل برداشت است. نتایج مشابهی در تحقیقات Shigeki Dan و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان داد که اتوکلاو کردن محیط کشت ریز جلبک Chlorella vulgaris در رشد باکتری‌ها تاثیرگذار است و از رشد آن‌ها جلوگیری می‌کند و همچنین بیومس برداشت شده را می‌توان به مدت طولانی تری بدون تخریب باکتریایی حفظ کرد(Dan et al., 2018). همچنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۰ توسط H. Nayebzaheh و همکاران صورت گرفت، مشخص شد که رشد ریز جلبک Chlorella vulgaris در محیط فاضلاب استریل نسبت به محیط فاضلاب غیر استریل بیشتر است و این محیط می تواند به عنوان محیطی با پتانسیل بالا و مقرون به صرفه برای کاهش هزینه فرآیند تولید بیودیزل مورد استفاده قرار گیرد (Farzandi et al.,2020).

۴. نتیجه‌گیری

در این آزمایش، در دو تیمار سترون و غیر سترون میزان رشد وتراکم سلولی ریز جلبک S.platensis و میزان زیست توده تر و خشک مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج به دست آمده نشان داد که سترون بودن محیط کشت و تمام تجهیزات مورد استفاده، می‌تواند در رشد ریزجلبک S.platensis تاثیرگذار باشد و همچنین مقدار زیست توده بیشتری قابل برداشت است. شرایط غیر سترون موجب می‌شود تا در کنار رشد ریز جلبک S.platensis ، میکروارگانیسم‌های دیگری هم بتوانند از فرصت استفاده کرده و در این محیط غنی رشد کنند و می‌توانند مانع از افزایش توده جلبکی شوند.

منابع

۱- جریان ر.، فاطمی م.، و مرادی ع. ۱۳۹۸. بررسی تاثیر دما و عناصر منیسیم و آهن بر میسان رشد و توده زنده جلبک اسپیرولینا، مجله علمی شیلات ایران، سال بیست و هشتم، شماره ششم، ص:۷۸-۶۹.

۲- شیخی نژاد ع.، لباب پور ع.، و معظمی ن. ۱۳۹۴. افزایش تولید سیانو باکتری اسپیرولینا با کنترل هم زدن و ترکیب شیمیایی محیط کشت. مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد بیست و هشتم، شماره دوم، ص:۳۵۳-۳۴۴.

۳- قائنی م.، متین فر ع.، سلطانی م.، و ربانی م. ۱۳۸۸. کشت آزمایشگاهی platensis Arthrospira در ایران، مجله بیولوژی دریا، دوره اول، شماره دوم، ص: ۴۹-۳۷.

۴- کیخا آخر ف.، عامری م.، فخرفشانی م.۱۳۹۹.اثر تنش شوری بر بیومس، کارتنوئید و فیکوسیانین در جلبک اسپیرولینا، هفتمین کنگره ملی زیست شناسی و علوم طبیعی ایران، تهران،https://civilica.com/doc/1028822

5- Ciferri O., and Tiboni O.1985. The biochemistry and industrial potential of Spirulina. Annual Review of Microbiology, 39:503-526.
6- Coutteau P.1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. Laboratory of Aquaculture & Artemia Reference Center University of Gent, Belgium. P:305.
7- Choonawala B.2007. Spirulina Production in Brine Effluent from Cooling Towers. The department of biotechnology, Durban University of technology, Durban.P:421.
8- Dan S., Ashidate M., Yamashita T and Hamasaki K.2018. Effects of thermal disinfection and autoclave sterilisation on the quality of microalgae concentrates, Aquaculture Research. 49(11):3559-3568.

9- Farzandi R., Nayebzaheh H., Hokmabadi M and Seghatoleslami N.2020. Optimization of Biodiesel Production Conditions Using Chlorella vulgaris Microalgae Cultivated in Different Culture Medium: Statistical Analysis, Iranian (Iranica) Journal of Energy and Environment. 11(3): 212-220.
10- Kwei C.2012.Eluciation and isolation of specific bioactive compound in cyanobacteria isolates, School of chemical engineering the University of Adelied.Australia P:232
11- Levasseur W., Perré P and Pozzobon V.2020. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification, Biotechnology Advances, 41(4):1-21.
12- Rajasekaran C., Ajeesh C., Balaji S., Shalini M., Siva R., Das R., Fulzele D and Kalaivani T. 2015. Effect of Modified Zarrouk's Medium on Growth of Different Spirulina Strains, Agriculture Technology and Biological Sciences, 13(1): 67-75.
13- Sathasivam R., Radhakrishnan R., Hashem A and Abd_Allah E.2019. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine, Saudi Journal of Biological Sciences, 26(4): 709-722.
14- Spolaore P., Cassan C., Duran E and Isambert A.2006. Commercial Applications of Microalgae, Journal of bioscience and bioengineering, 101(2): 87–96.

Spatial agriculture, study of AOX1 gene for cultivation of plants in vacuum conditions and lack of oxygen

Iman Yousefi Javan[1*], Ahmad Ahmadian[2]

[1*] Assistant Professor, Department of Plant Production, Faculty of Agriculture, University of Torbat Heydarieh, Torbat Heydarieh, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Plant Production, Faculty of Agriculture, University of Torbat Heydarieh, Torbat Heydarieh, Iran

Email: I.Javan@torbath.ac.ir

Abstract

Various atmospheric gases have been required for plant processes in general. Studying the growth and production of plants in non-standard conditions is one of the most important issues in extraterrestrial space. Plants can grow in a vacuum due to the presence and expression of some related genes. The air in the surface of the earth has been very important and necessary in terms of physiology and plant function. But darkness, high, low environment, properties, age of plant organs are the factors affecting the plant. By increasing and decreasing the growth expressed by AOX genes, plants can provide different levels. Transgenic plants, with the aim of further demonstrating AOX1 cultivation, induce greater capacity. Genetic study of nucleotide sequences of AOX1 gene is required for genetic modification and alteration of AOX1 expression level. One of the important functions of AOX1 has been to support its use when the cytochrome pathway is disrupted. Regulatory factors are another major factor in the expression of AOX1. The constituent of AOX1 contains 313 amino acids with an isoelectric point of 7.78 and a molecular weight of 35998.25. The three-dimensional structure of AOX indicates the presence of two hydrophobic helices, which can be used to connect products in the mitochondrial membrane of plant cells. The active breeding site is located in a hydrophobic environment in the AOX structure architect and has a dihydrogen center.

Keywords: Alternative oxidase 1, Cellular, Spatial culture, Transgenic plants

کشاورزی فضایی، بررسی ژن AOX1 جهت کشت گیاهان در شرایط خلاء و کمبود اکسیژن

ایمان یوسفی جوان [۱*]، احمد احمدیان [۲]

۱- استادیار، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربت حیدریه
۲- استادیار، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربت حیدریه

Email: I.Javan@torbath.ac.ir

چکیده

اثرات گازهای مختلف اتمسفر بر فرآیندهای گیاهی به طور کلی ضروری بوده است. بررسی رشد و تولید گیاهان، در شرایط غیر استاندارد، یکی از مسائل مهم در فضای خارج از زمین است. گیاهان به دلیل وجود و بیان برخی از ژن های مرتبط، می توانند قدرت رشد در خلاء را پیدا نمایند. اکسیژن موجود در هوای سطح زمین از نظر فیزیولوژیکی و عملکرد تنفس گیاهان بسیار مهم و ضروری بوده. ولی تاریکی، رطوبت زیاد، دمای پایین محیط، کمبود اکسیژن، سن و نوع اندام های گیاه از عوامل کاهش تنفس گیاه می باشند. که با افزایش و کاهش پروتئین های بیان شده توسط ژنهای AOX، گیاهان می توانند به سطوح متفاوت اکسیژن، پاسخ دهند. گیاهان تراریخته، با هدف تظاهر بیشتر پروتئین های AOX1، ظرفیت تنفسی بیشتری را القا می نمایند. مطالعه و بررسی ژنتیکی توالی‌های نوکلئوتیدی ژن AOX1 به منظور اصلاح ژنتیکی و تغییر سطح بیان پروتئین AOX1، ضروری می‌باشد. یکی از عملکردهای مهم AOX1، پشتیبانی از تنفس در زمانی که مسیر سیتوکروم مختل می شود، بوده است. عوامل تنظیمی نیزعامل اصلی دیگری در بیان پروتئین AOX1 می باشند. پروتئین AOX1 حاوی ۳۱۳ اسید آمینه با نقطه ایزوالکتریک ۷.۷۸ و وزن مولکولی ۳۵۹۹۸.۲۵ می باشد. ساختار سه بعدی AOX وجود دو مارپیچ آبگریز را نشان می‌دهد که می توانند جهت اتصال پروتئین‌ها در غشای میتوکندری داخلی سلول‌های گیاهی، نقش داشته باشند. محل فعال پروتئین در یک محیط آبگریز در اعماق ساختار AOX قرار دارد و حاوی یک مرکز دی هیدروژن است.

واژه های کلیدی: اکسیداز جایگزین ۱، تنفس سلولی، کشت فضایی، گیاهان تراریخته

۱.مقدمه

۱-۱- رشد گیاهان در فضا

همانطور که انسان ها فضا را کشف می کنند، ما می خواهیم گیاهان را هم به دلایل زیبایی شناختی و هم به دلایل عملی بیاوریم. فضانوردان پیشگام توانستند، گل‌ها و باغ‌های کوچک تازه در ایستگاه فضایی بین‌المللی، فضایی زیبا ایجاد کنند و به ما اجازه دهند تا در سفرهایمان قطعه‌ای از زمین را با خود حمل نماییم. گیاهان برای سلامت روانی ما در زمین و فضا مفید هستند. و همچنین برای حفظ سلامت فضانوردان در ماموریت های طولانی مدت حیاتی خواهند بود. در حال حاضر در ایستگاه فضایی، فضانوردان محموله‌های منظمی از وعده‌های غذایی منجمد شده و بسته‌بندی شده دریافت می‌کنند که می تواند با گیاهان تازه جایگزین گردند و نیازهای غذایی خود را پوشش دهند. بحث کشاورزی در فضا، موضوعی است که بشر ، در پی آن می باشد .گام اول در این راه می‌تواند کشاورزی بر روی سطح دیگر سیارات باشد. البته شاید این موضوع به خودی خود، معقول نباشد، اما از آنجا که انسان به دنبال فتح فضا و امکان گسترش حوزه دسترسی خود به منابع است، لاجرم باید در فضایی خارج از جو زمین، همچون ماه و سایر سیاره ها مستقر شده و کارهای خود را در آنجا ادامه دهد که این استقرار مستلزم تأمین آذوقه نیز است. به همین منظور ابتدا کشت در سفینه های فضایی و تامین آذوقه فضانوردان و سپس کشاورزی در فضا، اهمیت پیدا می کند. اولین مشکل پیش رو محدودیت منبع آب و اکسیژن است و گیاهان برای رشد به مقدار کافی آب احتیاج دارند، که جهت حل آن از گیاهان تراریخته یا مقاوم در برابر کاهش آب و اکسیژن استفاده می نمایند (Moore et al., 2019). مشکل بعدی نور است، برای رشد گیاهان از منبع نور مصنوعی استفاده می‌شود و از دو طیف و طول موج قرمز و آبی بیشترین استفاده را می‌کنند، زیرا فتوسنتز گیاهان در این دو طیف زیاد است. مشکل بعدی نحوه آبیاری است. برای حل این مشکل از بخار آب استفاده می شود و یا به همراه خاک و کود در بالشتک‌هایی قرار می گیرد. گفتیم که به دلیل گرانش بسیار کم خاک در فضا پراکنده می‌شود. برای این کار از بالش هایی استفاده می شود که خاک و مواد معدنی و رطوبت را در خود نگه می دارد و از پراکنده شدن خاک جلوگیری می‌کند. مسئله دیگر این است که محققان باید دائماً مراقب میزان نور و همچنین رشد ریشه گیاه به سمت پایین باشند. کشت گیاهان باید در محیط کاملا ضدعفونی شده صورت بگیرد و از رشد میکروب‌ها و باکتری‌ها ممانعت به عمل آید. زیرا برخی میکروب‌ها باعث بیمار شدن گیاهان می شوند و همچنین این میکروب‌ها می توانند به سایر مناطق ایستگاه فضایی منتقل شوند. کشورهای مختلفی در حال تحقیق و کشت گیاهان در ایستگاه فضایی هستند گیاهانی همچون تال کرس، آراپیدوپسیس، کاهو، سوئیس چارد، تربچه، کلم چینی و نخود به دلیل داشتن ژنوم سازگار با شرایط دشوار کاشته شده بودند. یکی از معروف ترین سیستم های کاشت، سیستم Veggie است. نحوه ی کاشت در Veggie به این صورت است که بذرها درون بالش هایی حاوی خاک ، کود ، مواد مغذی و آب قرار داده می شوند. این سیستم شامل چند جزء است: روشنایی، محفظه حلقوی و مخزن روشنایی برای تامین نور مورد نیاز گیاهان است که از طریق LED تامین می شود. نور Veggie آبی و قرمز و سبز است و آبی و قرمز برای فتوسنتز لازم اند. اما با نور قرمز و آبی گیاهان به رنگ خاکستری دیده می‌شوند و این رنگ مناسب روحیه افراد حاضر در ایستگاه فضایی نیست. به همین دلیل نور سبز را هم اضافه کردند. محفظه حلقوی محیط داخل را از خارج جدا می‌کند و جریان و فشار هوا را کنترل می کند و جنس آن پلیمر فلوئوره شده است. سیستم روشنایی در بالای آن و یک پایه در انتهای آن قرار دارد. دما و رطوبت محیط توسط یک ماژول کنترل می شود (Castillo et al., 2005).

۱-۲- تأثیر اکسیژن بر رشد گیاهان

برای آشنایی با خواص اکسیژن در گیاهان باید توجه داشت که اکسیژن موجود در هوا از نظر فیزیولوژیکی گیاهان بسیار مهم است. اکسیژن برای تنفس گیاهان سبز مورد نیاز است و هنگامی که گیاهان تنفس می کنند، مواد آلی تولید شده توسط گیاه برای تولید سوزانده می شوند. در واقع عمل تنفس در مقابل عمل فتوسنتز که مواد گیاهی تولید می کند، متقابل است. به طور کلی گیاه سبز با تنفس در شب، یک پنجم تا یک سوم محصولات تولید شده در روز را برای تنفس شبانه مصرف می کند. در صورت افزایش دما (مثلاً به صورت مصنوعی) از تمام مواد خام تولید شده در روز استفاده می شود و حتی ممکن است به دلیل کمبود مواد تولید گیاهی از بین برود. اصلاح گران گیاهان اکنون با کمک یافته این مطالعه، هدف جدیدی برای انتخاب واریته های جدید محصولات کشاورزی دارند و متوجه شده اند واریته هایی که از قابلیت تولید بیشتری در محیط های ضعیف بهره می‌برند، سازگاری شان با دمای بالاتر، کمبود اکسیژن هوا، تاریکی، و رطوبت زیاد بیشتر است. علاوه بر این، محققان با مقایسه سلول های بنیادی گیاهان و جانوران به اسرار حفظ سلول‌های بنیادی و تکامل اندام‌ها پی برده و خواهند برد. در مطالعه مشاهده شده که غلظت پایین اکسیژن (هیپوکسی) شرط مهمی برای رشد گیاه است. سطوح پایین اکسیژن از طریق ترغیب پایداری پروتیینی به‌نام ZPR ۲ که مسئول تکثیر و تمایز سلولی است، سرعت تولید برگ های جدید را کنترل می کند. از این رو، بیشتر بافت های گیاهی به شدت از حضور هیپوکسی (غلظت پایین اکسیژن) ناشی از رویداد رطوبت بالا دچار آسیب می‌شوند. اما این مطالعه جدید نشان می دهد که هیپوکسی لازمه حفظ سلول های بنیادی است. نتایج این مطالعه تاییدی است بر یافته هایی که در سال‌های اخیر، درباره کنترل متابولیسم گیاهی در شرایط بی اکسیژنی به‌دست آمده است. (Castillo et al 2005).

۱-۳- پروتئینهای AOX

اصطلاح اکسیداز به هر آنزیمی اطلاق می شود که واکنش اکسیداسیون- احیا را که شامل اکسیژن مولکولی به عنوان گیرنده الکترون است، کاتالیز می کند. در این واکنش ها، اکسیژن به آب یا به پراکسید هیدروژن کاهش می یابد. پروتئین جایگزین اکسیداز (AOX) در گیاهان، قارچ ها، تک یاخته ها و برخی بی مهرگان وجود دارد، اما در پستانداران یافت نشده است. در سمت ماتریکس غشای داخلی میتوکندری قرار دارد و در زنجیره تنفسی میتوکندری درگیر است و یک مسیر جایگزین برای عبور الکترون ها فراهم می کند. مسیر اصلی انتقال الکترون در یوکاریوت ها از مجتمع IV (معروف به سیتوکروم اکسیداز حساس به سیانید) زنجیره تنفسی می گذرد، اما در برخی ارگانیسم ها مسیر انتقال الکترون از طریق پروتئین AOX (معروف به غیر حساس به سیانید و حساس به اسید هیدروکسامیک) می گذرد (اکسیداز پایانی). هر دو مسیر منجر به انتقال الکترون ها و کاهش اکسیژن برای تشکیل آب می شود. با این حال، انتقال از طریق پروتئین AOX بدون پمپاژ پروتون ها به فضای بین غشایی انجام می شود و در نتیجه با سنتز ATP همراه نیست (Moore et al. 2019) . پروتئین‌های AOX ۴۰ کیلو دالتون توسط خانواده‌ای از ژن‌های هسته‌ای کدگذاری می‌شوند، و چندین مطالعه گزارش می‌دهند که در گیاهان، تغییرات عوامل محیطی مانند تنش‌های غیر زنده، عفونت پاتوژن و استرس اکسیداتیو ممکن است بر بیان ژن های AOX تأثیر بگذارد. علاوه بر این، حضور پروتئینهای AOX برای ایفای نقش در هموستاز و رشد گیاه و در حفظ انعطاف پذیری متابولیک برای سازگاری سریع با استرس پیشنهاد شده است. در گیاهان، تنها مطالعات پروتئین های AOX مربوط به تنش های غیرزیستی (مانند خشکی و کمبود اکسیژن) بوده است، در دسترس بودن داده‌های حاصل از توالی‌یابی اخیر

ژنوم برخی از گونه‌ها، امکان تجزیه و تحلیل ژنومی خانواده‌های ژنی را به عنوان پیش‌نیاز برای عملکرد و/یا پیش نیاز فراهم نمود. مطالعات مهندسی ژنتیک، تولید محصولات تراریخته و اصلاح نژادی متفاوت با هدف مشخص کردن خانواده ژن‌های AOX در گیاهان در سطوح نوکلئوتیدی و پروتئینی، از جمله تجزیه و تحلیل پروموتر و دیگر بخشهای ژن انجام گردید. این مطالعه همچنین با هدف شناخت سطح نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن AOX1 در گیاه هویج و ساخت مدل‌سازی همسانی یک ایزوفرم AOX DdAOXd به شکل بیوانفورماتیکی انجام گردید. علاوه بر این، اتصال مولکولی پروتئین CcAOXd با UQ انجام شد (Trott et al. 2020).

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱- شناسایی ژن AOX1 با استفاده از PCR

به این منظور از DNA ژنومی و cDNA گیاه هویج *Daucus carota* subsp. *sativus* استخراج شده به عنوان DNA الگو واکنش PCR استفاده شد. برای، PCR مقدار 200 نانوگرم از DNA و 1 میکرولیتر از آغازگرهای پیش برنده و برگرداننده با غلظت نهایی ۰.۵ میکرومولار ، درون لوله لیوفیلیزه PCR ریخته و با آب دوبار تقطیر استریل و استفاده از Master Mix PCR، به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده و با پیپت کردن، به طور کامل مخلوط می شود. انجام PCR توسط ترموسایکلر مدل Biorad (Personal Termal Cycler BioRad 1148MJ USA Mini), و با مرحله واسرشتگی اولیه به مدت 5 دقیقه در دمای 94 درجه سانتیگراد آغاز گردید. بهینه سازی دمای اتصال جهت تکثیر اختصاصی و تک باند شدن محصول PCR در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از (PCR Master Mix سیناژن، ایران) صورت گرفت. در ادامه، انجام 30 چرخه با دمای واسرشتگی 94 درجه سانتیگراد به مدت1 دقیقه، دمای اتصال، 53 درجه سانتیگراد به مدت 1 دقیقه و دمای طویل شدن، 72 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه صورت پذیرفت و در نهایت با مرحله طویل شدن به مدت 8 دقیقه در دمای 72 درجه سانتیگراد به اتمام رسید. پس از انجام PCR کیفیت محصول بر روی ژل آگارز ۰.۸ درصد بررسی شد ((Velada et al. .2016

۲-۲- مطالعه فیلوژنیک، انطباق و بررسی توالی پروتئینی ژن AOX1:

توالیهای بدست آمده از شرکت تکاپوزیست و پس از مقایسه با بانک ژنی (www.ncbi.nlm.nih.gov/genebank/) به دست آمده، بررسی و ترجمه هر یک از توالیهای نوکلئوتیدی کدکننده پروتئین به وسیله پایگاه داده مولکولی Expassy (www.expasy.ch)، انجام شد (Varjonen E et al. 2002). مطالعات ردیف سازی چندتایی (Multiple sequence alignments) با استفاده از BLAST موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov.blast) و CLUSTAL W موجود در پایگاه اطلاعاتی (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/Expassy) انجام شد (Ashraf et al. 2015).

۳. نتایج و بحث

۳-۱- ویژگی های ژن های AOX

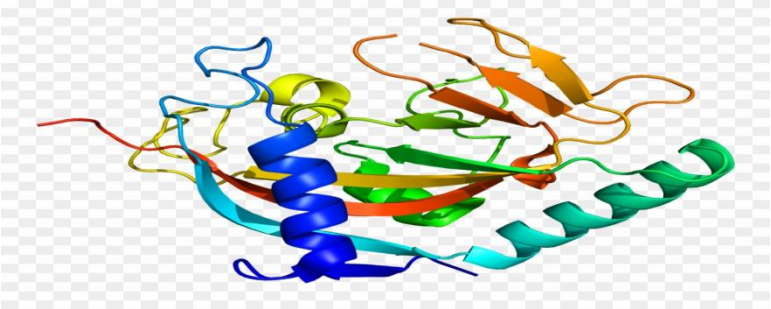
این مطالعه به توصیف خانواده ژن AOX در گیاهان می پردازد. ژن AOX در گونه های هویج شناسایی شد. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک هویج Daucus carota subsp. sativus و آراپیدوپسیس A. thaliana نشان داد که AOX حاوی ۳۱۳ اسید آمینه است. این توالی نوکلئوتیدی، با سه ناحیه اگزون و چهار ناحیه اینترون می باشد. رشته پلی پپتیدی آن دارای ساختار آلفا و پیوندهای سیستین که منجر به حضور اسیدهای آمینه سیستئین بیشتر برای ساختار سوم می شوند. و دارای یک دنباله پروموتور ویژه، با مناطق حفاظت شده (UQ) بوده.

نتیجه مقایسه در گیاه هویج و آراپیدوپسیس نشان داد که توالی ژن AOX با توالی همین ژن در گیاه آراپیدوپسیس، موجود در پایگاه اطلاعاتی (NCBI) ۹۰ درصد شباهت دارند و این اختلاف ۱۰ درصدی باعث تغییر در توالی سی و یک اسیدآمینه شده است . که این تغییرات به شرح زیر بوده است:

V12G, G15E, D16E, R17G, G22R, T23R, V34A, E35M, A62E, P68G, G69R, G70D, D71T, T72R, R75T, Y82A, G83A, M84A, S85H, H90P, P92G, M97A, S98H, R99G,

۴. نتیجه گیری

طبق آخرین اطلاعات، این اولین توصیف خانواده ژن AOX در گیاه هویج می باشد. چهار ژن AOX در این گونه مشخص شد. ژن‌های Daucus carota subsp. sativus ارتولوگ‌های ژن‌های A. taliana بودند. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی خانواده چتریان و A. thaliana نشان داد که DcAOXd و DsAOXd به دنباله AOX1 بسته شدند. با توجه به عنصر cis موجود در پروموتورهای AOX گیاه هویج، بیان ژن ممکن است توسط چندین عامل خارجی یا داخلی تنظیم شود. بیان ژن‌های AOX نشان داد که در کالوس به‌شدت بیان می‌شود در حالی که در میوه‌ها از بیان کمتری برخوردار است. سایر سطوح تنظیمی نیز مانند پیوند جایگزین و تغییرات پس از ترجمه پیش‌بینی شده بودند که در بیان این ژن بی تاثیر نیستند. خواص عملکردی پروتئین‌ها به میزان زیادی، از چگونگی ساختار سه‌بعدی آنها منشا می‌گیرد که بر اساس مدل‌سازی همولوژیکی از این پروتئین ترسیم شده است. شکل فضایی پروتئین‌ها در واقع تعیین کنندهٔ کاربرد و عملکرد ویژهٔ هر پروتئین بوده و هر نوع تغییری در این ساختار می‌تواند موجب اخلال در عملکرد آن شود. پیش‌بینی شد که پروتئین‌های مربوطه به میتوکندری پروتئین AOX تجزیه و تحلیل و ساختار سه بعدی یکی از ایزوفرم‌های AOX وجود دو مارپیچ آبگریز را نشان داد که ممکن است در لنگر انداختن پروتئین در میتوکندری داخلی نقش داشته باشند. غشاء. محل فعال پروتئین در یک محیط آبگریز در اعماق ساختار AOX قرار دارد و حاوی یک مرکز دی آهن است. اتصال مولکولی AOX با UQ نشان داد که محل اتصال یک جیب فرورفته است که توسط مارپیچ ها تشکیل شده و در غشاء غوطه ور شده است. این داده‌ها برای مطالعات عملکردی آتی ژن‌ها و/یا پروتئین‌های AOX هویج، و همچنین برای رویکردهای بیوتکنولوژیک منجر به مهار AOX با استفاده از همولوگ‌های UQ، مهم هستند. شکل این پروتئین به نمایش کشیده شده است (شکل ۱).



شکل ۱: ساختار سه بعدی پروتئین AOX1

منابع

1. www.iranagrimagazine.com, 18.8.2015.
2. Trott, O., and Olson A.J. 2020. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. Journal of Computational Chemistry. 2020;31(2):455–61.
3. Moore, A.L., Shiba T, Young L, Harada S, Kita K, and Ito K 2019. Unraveling the heater: new insights into the structure of the alternative oxidase. Annu Rev Plant Biol. 2019;64:637–63. 10.1146/annurev-arplant-042811-105432
4. Velada, I., Cardoso H.G, Ragonezi C, Nogales A, Ferreira A, and Valadas V, 2016. Alternative Oxidase Gene Family in Hypericum perforatum L.: Characterization and Expression at the Post-germinative Phase. Frontiers in Plant Science. 2016;7(1043).
5. Ashraf, N., Deepti, J., and Vishwakarma, R.A. 2015. Identification, cloning and characterization of an ultrapetala transcription factor CsULT1 from Crocus: a novel regulator of apocarotenoid. BMC Plant Biology. 15:25.
6. Castillo, R., Fernandez, J., and Gomez-Gomez, L. 2005. Implications of carotenoid biosynthetic genes in apocarotenoid formation during the stigma development of crocus sativus and its closer relatives. Plant Physiol. 139:674–89.

A review of the clinical significance of lncRNAs in the development and progression of colon cancer

Mohammad Haji alizadeh*

Undergraduate student of Cellular-Molecular Biology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Golestan, Iran.

* *mhatha2257@gmail.com*

Abstract

Colon cancer is the third most common cancer in the world, with a very high rate of metastasis and recurrence. long non-coding RNAs is one of the most important molecules regulating gene expression. The role of a number of lncRNAs in many stages of cancer including its angiogenesis and development has been identified. lncRNAs have been considered in many cancers, especially colon cancer. A proper understanding of their regulatory role and the mechanisms that lead to colon cancer can be useful in providing appropriate prevention, diagnosis and treatment of colon cancer. In the present study, various mechanisms that lncRNAs use for the development, metastasis, etc. of colon cancer have been considered.

Keywords: lncRNAs, colon cancer, regulation of gene expression, metastasis, apoptosis

بررسی مروری اهمیت بالینی lncRNAs در ایجاد و پیشرفت سرطان کولون

محمد حاجی علی زاده*

*دانشجوی کارشناسی زیست شناسی سلولی مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس، گلستان، ایران.

mhatha2257@gmail.com

چکیده

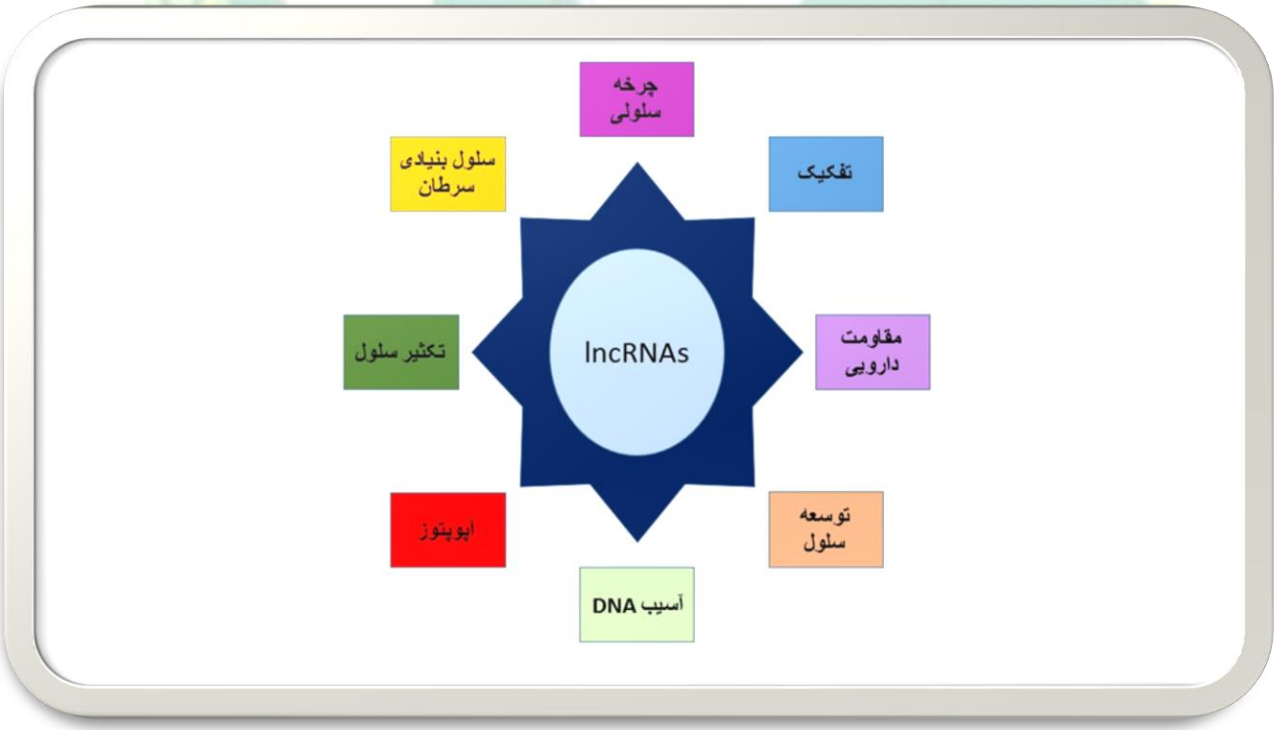
سرطان کولون به عنوان سومین سرطان شایع در جهان با قابلیت متاستاز و عود بسیار بالایی شناخته می‌شود. RNAs طویل غیر کدکننده (lncRNAs)، از جمله مهم‌ترین مولکول‌های تنظیم‌کننده بیان ژن‌ها به شمار می‌روند که نقش تعدادی از آنها در بسیاری از رویکردهای پیشرفت سرطان‌ها مانند رگ‌زایی و متاستاز مشخص شده است. بنابراین درک مناسب از lncRNAs، می‌تواند در ارائه راهکارهای پیشگیری، تشخیص و درمان مناسب، مفید باشند. در مطالعه حاضر مکانیسم‌های مختلفی که lncRNAs برای گسترش، متاستاز و .... سرطان کولون بکار می گیرند، مورد توجه قرار گرفته‌است.

واژگان کلیدی: lncRNAs، سرطان کولون، تنظیم بیان ژن ، متاستاز، آپوپتوز

۱. مقدمه

lncRNAs توالی‌های ۲۰۰ نوکلئوتیدی هستند که قابلیت کد گذاری توسط پروتئین و نیز رونویسی توسط RNA polymerase II را ندارد (Ransohoff et al., 2018). ژنوم انسان حاوی بیش از ۱۵۰۰۰ نوع lncRNA است که در حدود ۲۸۰۰۰ رونوشت lncRNAs را تولید می‌کنند و همه ساله به تعداد آنها افزوده می‌شود. lncRNAs غالبا به صورت Cis-acting بوده و احتمالا فقط چند نسخه از آنها در هسته سلولی بیان می‌شوند. با این حال همین تعداد اندک و بیان کم نیز می‌توانند اثرات قابل توجهی را ایجاد نمایند. تعداد دیگری از lncRNAs به صورت Trans-acting هستند که در محلی دور از جایگاه سنتز خود، بر کروموزوم‌های متعددی اثرگذارند. با تمام این تفاسیر همچنان بحث Localizition lncRNAs تا حدزیادی ناشناخته باقی مانده است. پیشرفت‌های گسترده‌ای که به منظور بررسی‌های ژنومی در چند دهه اخیر پدید آمده، نشان داده‌اند که جهش‌های lncRNAs می‌توانند تغییر موضع داده و باعث بیان غیر طبیعی lncRNAs در تومورها می‌شوند (Melton, Collin et al.,). lncRNAs Shen, Hui, and Peter W Laird., 2013; 2015; Yan, Xiaohui et al., 2015; Maurano, Matthew T et al., 2012 در بسیاری از اعمال سلولی مانند تکثیر، توسعه، تمایز، متاستاز، آپوپتوز، چرخه سلولی و بسیاری دیگر از عملکردها دخالت دارند (تصویر ۱). این تنظیم کننده‌های ژنی همچنین می‌توانند در تعامل نزدیکی با DNA و RNA قرار گرفته و کمپلکس‌های RNA-DNA و RNA-RNA و همچنین RNA-protein را تشکیل دهند (Bhan, Arunoday, and Subhrangsu S Mandal., 2014; Gil, Noa, and Igor Ulitsky., 2020; Yao, Run-Wen et al., 2019). علاوه بر این lncRNAs می‌توانند تحت عناوینی همچون داربست و یا مولکول گمراه کننده پروتئین برای جذب RNAs و پروتئین‌ها عمل کنند (Goodall, Gregory J, and Vihandha O Wickramasinghe., 2021). گرچه تا امروز نسبت lncRNAs دارای

عملکردهای ویژه به درستی مشخص نشده ولی اثرات بسیار مهم آنها در نقش حفاظت و تنظیم عوامل بیولوژیکی و همچنین بیماری‌های گوناگون ایجاد شده در اثر عملکردهای نادرست آنها از جمله انواع سرطان‌ها مورد بررسی و تایید قرار گرفته است (Ransohoff et al., 2018) که در این بین سرطان کولون یکی از شاخص‌ترین سرطان‌های مرتبط با lncRNAs می‌باشد. این سرطان سومین سرطان شایع در دنیای امروز به شمار می‌رود (Siegel, Rebecca L et al., 2020) و دارای قابلیت متاستاز و عود بسیار بالایی می‌باشد. با توجه به پژوهش‌های انجام شده lncRNAs به عنوان یکی از عوامل اصلی در رشد و متاستاز سرطان کولون شناخته می‌شوند (Wang, Liye et al., 2019). آزمایشات بسیاری در رابطه با سرطان کولون انجام می‌شود که در میان آنها کولونوسکوپی توانسته میزان بروز این بیماری را تا حد زیادی کاهش‌دهد. از شیوه‌های درمانی این بیماری می‌توان به ایمونوتراپی و شیمی‌درمانی اشاره کرد که میزان بقا افراد مبتلا را حدود ۶۵٪ افزایش داده‌اند (Miller, Kimberly D et al., 2019). علی‌رغم تلاش‌های گسترده در زمینه تشخیص و درمان سرطان کولون، متاسفانه درمان پولیپ‌های کوچک و نیز پیش‌آگهی این سرطان، همچنان با چالش‌ها و ضعف‌هایی مواجه بوده که استفاده از آنها را با محدودیت‌هایی روبه‌رو می‌کند. در این بین استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و فاکتور رشد اندوتیال عروقی (VEGF) موفقیت‌های اندکی در این زمینه داشته‌اند (Farooqi, Ammad Ahmad et al., 2019).



شکل۱: نقش‌های گوناگون lncRNAs در فرآیندهای سلولی سرطان کولون

۲.مواد و روش ها

۲-۱- نمونه های lncRNAs در سرطان کولون

۲-۱-۱- lncRNAs ناشی از نتایج بیمار

در پژوهشی که توسط Forrest, Megan E و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام شده نقش بیش از ۲۰۰ نوع lncRNA در ایجاد سرطان کولون گزارش شد (Forrest, Megan E et al., 2018) که تعدادی از مهم‌ترین آنها در ادامه توضیح داده می‌شوند.

FAM83H-AS1 این مورد یکی از نامنظم‌ترین lncRNAs است که در چندین سرطان به ویژه سرطان کولون حضور آن به اثبات رسیده و باعث کوتاه شدن طول زندگی فرد مبتلا به سرطان کولون می‌گردد (Yang, Lei et al., 2019). یکی دیگر از انواع lncRNAs، ENST00000455974 است که با متاستاز دوربرد در ارتباط است. این lncRNA با پیشرفت سرطان افزایش یافته و در تبدیل کولون سالم به آدنوم، کارسینوم و بافت‌هایی که دچار متاستاز شده ایفای نقش کرده و باعث کوتاه‌تر شدن طول عمر بیمار می‌شوند.ENST00000455974 در هسته سلول‌های سرطانی واقع شده و با تاثیراتی که دارد باعث رشد و نیز متاستاز برخی از سلول‌ها می‌شود (Lao, Yueqiong et al., 2019). ZEB1-AS1 یکی دیگر از انواع lncRNAs است که بیان آن در مرحله آدنوکارسینوم روده بزرگ افزایش بسیار زیادی پیدا می‌کند. اگر سلول‌های آدنوکارسینوما دچار افزایش بیان ZEB1-AS1 شوند LS174T، DLD-1 SW480، HT29 و HCT116 نیز دچار افزایش می‌شوند. همچنین افزایش بیانZEB1-AS1 با متاستاز غدد لنفاوی نیز همراه است. این lncRNA با آنکوژن‌ها در رابطه است و همچنین باعث کاهش میزان بقای فرد مبتلا می‌شود (Ni, Xin et al., 2020). یکی دیگر از lncRNAs نامنظم در رابطه با سرطان کولون FAM83H-AS است که در افراد مبتلا به این بیماری با RNAscope مشاهده می‌شود. FAM83H-AS دارای ارتباط منفی با سطوح SMAD1/5/9 است که بیانگر اثر سیگنال‌دهی TGF-β در سرطان کولون می‌باشد. در بررسی‌های صورت گرفته بر روی مخاط روده بزرگ افراد مبتلا به سرطان کولون افزایش FAM83H-AS مشاهده شده‌است. از طرف دیگر در رده‌های مختلف سلولی HCT116 و SW480، تنظیم پایین FAM83H-AS باعث بیان SMAD1 می‌شود (Yue, Ben et CYTOR al., 2018) که تنظیم کننده اسکلت سلولی است و با نام Linc00152 نیز شناخته می‌شود در سرطان کولون دچار افزایش بیان شده و در برابر آپوپتوزی که در اثر اگزالی‌پلاتین بوجود می‌آید مقاومت نشان می‌دهد. این lncRNA به محض اینکه در سرطان کولون دچار افزایش بیان شود در سرطان معده نیز اثرات خود را بر جای گذاشته و بر روی مارکرهای اپی‌تلیال-مزانشیمی فعالیت‌های گوناگونی انجام می‌دهد. اگر CYTOR به catenin-β متصل شود فسفریلاسیون catenin-β مختل شده و باعث تجمع آن در هسته می‌شود و در ادامه یکی از کمپلکس‌های catenin-β با ازدیاد فعالیت رونویسی CYTOR یک تنظیم مثبت را به همراه می‌آورد (Yue, Ben et al., 2018). دیگر مورد قابل اشاره در این بخش CCAT1 است که متشکل از بیش از ۲۶۰۰ نوکلئوتید است و در کنار فاکتور رونوسی c-MYC قرار گرفته و در سرطان معده و نیز ایجاد آدنو-کارسینومای کولون نقش ایفا می‌کند. CCAT1 در کولون سرطانی‌شده در مقایسه با کولون سالم بیشتر بیان شده که نشان دهنده ارتباط آن با مرحله ای از پیشرفت بیماری که فرد مبتلا در آن قرار دارد، متاستاز غدد لنفاوی و نیز طول عمر افراد قرار گرفته تحت جراحی می‌باشد. در نتیجه بیان بیش از حد این lncRNA باعث ایجاد، تکثیر و تهاجم سلول‌ها خواهدشد (He, Xiaolu et al., 2014).

۲-۲- آپوپتوز توسط برخی lncRNAs تنظیم می‌شود

اولین lncRNA مورد بررسی در این قسمت SNHG7 است که در سلول‌های سرطانی HT29 بیان می‌شود و بیان آن با غیرفعال کردن مسیر پیام‌رسانی K-ras/ERK/cyclin D1 همراه بوده و باعث تحریک فرآیند آپوپتوز می‌شود. همچنین این lncRNA در مراحل اولیه پیشرفت آدنوم کولون اثرات بازدارنده یا منفی از خود ایفا می‌کند (Liu, K L et al., 2019). دیگر نمونه‌ای که در این بخش از آن یاد می‌کنیم SNHG1 است. این lncRNA با بیان مسیر پیام‌رسانی Wnt/β-catenin موجب تکثیر سلول‌های سرطانی روده، مهاجرت سلول‌ها، تهاجمی شدن سلول‌ها و نیز مهار آپوپتوز سلول‌های سرطان کولون می‌گردد (Yang, Huan et al., 2018). LINC00657 یکی دیگر از lncRNAs موثر در آپوپتوز سلول‌های سرطان کولون است و بیان بیش از حد آن با از کار انداختن مسیر PI3K/Akt باعث ازدیاد آپوپتوز در این سلول‌ها می‌گردد. افزایش مقدار این lncRNA باعث ایجاد پیش‌آگهی‌های بسیار ناگواری می‌شود و از طرفی دیگر باعث می‌گردد که اندازه تومور با افزایش قابل توجهی همراه باشد. به‌علاوه این lncRNA زنده‌ماندن و تهاجم سلول‌ها را کاهش می‌دهند ولی همانطور که گفته شد باعث افزایش آپوپتوز می‌شوند (Lei, Y et al., 2018).

۲-۳- lncRNAs تنظیم کننده تکثیر سلولی

یکی از lncRNAs دخیل در تکثیر سلولی که در بخش ۲-۱ به آن اشاره شد ZEB1-AS1 است. این lncRNA هنگامی‌که دچار افزایش بیان می‌گردد اثر مستقیمی بر روی بیان PAK2 گذاشته و از این طریق رشد سلول را تسهیل می‌کند و از طرفی دیگر MiR-455-3p می‌تواند با کم کردن بیان PAK2 نقشی ضدسرطانی را از خود به نمایش گذارد (Ni, Xin et al., 2020). SNHG7 نیز یکی دیگر از lncRNAs توضیح داده شده در بخش ۲-۲ می‌باشد که در تکثیر سلولی ایفای نقش می‌کند.SNHG7 در ایجاد آدنوم‌های پیشرفته کولون و مراحل ابتدایی سرطانی شدن روده بزرگ، بیشتر از حد متوسط بیان شده و مشابه آنچه گفته شده در سلول‌های HT29 با miR-193b ارتباط برقرار کرده و باعث سرکوب مسیر پیام‌رسانی K-ras/ERK/cyclin D1 شده و در نتیجه تکثیر سلولی را دچار اختلال می‌کند (Liu, K L et al., 2019). FAL1 یکی دیگر از lncRNA هایی است که در این بخش به آن اشاره می‌شود. این lncRNA با مهار یا افزایش بیان اثرات گوناگونی را بوجود می‌آورد که به ترتیب شامل: سرکوب شدن تکثیر سلولی و افزایش تکثیر سلول‌های سرطانی کولون می‌شود.FAL1 با عملکرد STAT3 فسفریله شده و این فسفریلاسیون باعث متعادل شدن بیان Bcl-2،p65 و TGFβ-1 می‌گردد که دچار سرطان شده‌اند. در رابطه با بقای افرادی که مقادیر بالای FAL1 را بیان می‌کنند در مقایسه با افرادی که با مقادیر پایینی از آن مواجه هستند می‌توان گفت‌که: بقای آنان به میزان چمشگیری کاهش می‌یابد (Wu, Kaiming et al., 2018). آخرین موردی که در این بخش به بررسی آن می‌پردازیم HNF1A-AS1 است که با پیش‌آگهی ضعیفی همراه است و همچنان دخالت عملکردی مستقیم HNF1A-AS1 در سرطان کولون به طرز ناشناخته‌ای باقی مانده است. HNF1A-AS1 هم به عنوان انکوژن و هم تحت عنوان سرکوب کننده تومور ایفای نقش می‌کنند. این lncRNA در رشد و متاستاز تومور به روش زنوگرافت دخالت دارد. HNF1A-AS1 از طریق مسیر پیام‌رسانی miR-34a/p53 در پیشرفت متاستاز سرطان کولون اثرات خود را اعمال می‌کنند (Fang, Changyi et al., 2017).

۲-۴- lncRNAs که تهاجم و متاستاز را تنظیم می‌کنند

درصورتی‌که ENST00000455974 مهار شود بر مهاجرت سلول‌های سرطانی اثر گذاشته و این lncRNA در هسته سلول‌های سرطانی قرار می‌گیرند و رشد و متاستاز سلول‌های pMMR CC را از طریق JAG2 که یک تنظیم کننده است افزایش می‌دهند (Lao, Yueqiong et al., 2019). یکی از lncRNAs دیگر این بخش PVT1 است که این مورد از طریق مدولاسیون باعث افزایش تهاجم و همزمان متاستاز در سرطان کولون می‌شود. PVT1 از طریق miR-30d-5p اثرات خود را ایفا می‌کند. این lncRNA با گسترش متاستاز به غدد لنفاوی بر مدت زمان بقای بیماران تاثیرات عمیقی می‌گذارد (Yu, Xiuguo et al., 2018). آخرین lncRNA که در این بخش به بررسی آن می‌پردازیم RP11-619L19.2 است که چنانچه مورد شکست قرار گیرد بر تکثیر سرطان کولون، تهاجم، مهاجرت و نیز EMT (انتقال اپیتلیال به مزانشیم) اثر گذاشته و از آنها جلوگیری می‌کند (Zhang, Xin-Wu et al., 2020). همانطور که گفته شد lncRNAs متعدی وجود دارند که عملکردهای گوناگونی از خود به نمایش می‌گذارند و برخی نیز در چند حیطه اثرات‌شان دیده می‌شوند.

در این بخش به چهار نمونه از عملکردهای lnvRNAs پرداخته شد. همچنین در جدول شماره ۱ اطلاعاتی در رابطه با lncRNAs گفته شده و نیز دیگر lncRNAs موجود در رابطه با سرطان کولون لیست شده‌اند.

جدول ۱: اثرات برخی lncRNAs در عملکرد سرطان

lncRNA	عملکرد	ایجاد	رشد	بیان
ZEB1-AS1	افزایش: تهاجم و مهاجرت	↑	—	↑
SNGH7	مهار آپوپتوز و افزایش تکثیر	—	↑	↑
SNGH15	افزایش مهاجرت و اثر بر تکثیر	—	↑	↑
HOTAIR	افزایش مهاجرت و تهاجم	↑	—	↑
H19	افزایش مهاجرت، تهاجم و مقاومت دارویی	—	—	↑
XIST	افزایش تکثیر	—	↑	↑
CYTOR	ترویج مهاجرت و تهاجم	—	—	↑
PVT-1	گسترش مهاجرت و تهاجم	↑	—	↑
ZFAS1	مهار آپوپتوز و افزایش تکثیر	↑	—	↑

TUG1	مهار آپوپتوز و افزایش تکثیر	—	—	↑
MALAT1	افزایش: تهاجم و مهاجرت	—	—	↑

راهنمای جدول: (↑: افزایش)، (—: عدم مشاهده)

۲-۵-سرطان زایی

یکی از عواملی که در ایجاد سرطان کولون موثر است عادت‌های فرهنگی است، برای مثال در کشورهایی‌که در آنها سبک زندگی همراه با مصرف دخانیات، اضافه وزن و چاقی، کمبود دریافت فیبر در غذاهای مصرفی، کم تحرکی و فعالیت بندی اندک، مصرف گوشت‌های فرآوری شده و مصرف بی‌رویه الکل مشاهده می‌شود ارتباط مستقیمی در ایجاد و گسترش سرطان کولون مشاهده شده است (Torre, Lindsey A et al., 2016). علی‌رغم پیشرفت‌ها در چند دهه اخیر ولی تاکنون غربالگری اولیه و ترکیبات درمانی مختلفی که پاسخگویی کامل داشته باشد در دسترس نیست. از طرفی دیگر نباید تعدادی از روش‌های پزشکی همانند کولونوسکوپی و یا آزمایشات وجود خون مخفی در مدفوع که در تشخیص و درمان این سرطان کمک شایانی کرده و میزان مرگ و میر را به میزان قابل توجهی کاهش داده است نادیده گرفته شوند. در این رابطه موضوعی که بسیار جای تامل و پیگیری دارد گسترش این روش‌ها د رتعدادی محدود از کشور توسعه یافته می‌باشد این است. مطالعات مشخص کرده‌اند که تومورها از مجموعه هتروژنی از سلول‌ها با تمایزی قابل تشخیص تشکیل شده و شناسایی نشانگرهایی که همراه با شروع و پیشروی این تومورها هستند در پیشرفت بیماری دخیل هستند که از آنها می‌توان به جمع شدن جهش‌هایی در ژن‌های طبیعی، غیر فعال کردن ژن‌هایی که در سرکوب تومور اثرگذار هستند و فعال شدن انکوژن‌ها اشاره کرد (Fearon, E R, and B Vogelstein., 1990). پیشرفت کارسینوماهای ایجاد شده و تبدیل به حالت متهاجم و متاستاتیک بیماری ممکن است شامل برخی وقایع موضعی باشد. EMT (در رابطه با EMT می توان گفت که: در زمان رشد جنین سلول‌های اپی تلیال باید از محدودیت هایی که برایشان ایجاد شده فرار کرده و ساختاری را برای خود انتخاب کنند که با حرکت سلولی سازگاری بیشتری داشته باشد و ما این فرایند را تحت عنوان EMT می‌شناسیم) موجب می‌گردد که سلول‌های اپیتلیالی به شکل دوکی در آمده و قطبیتی که مشابه سلول‌های مزانشیمی بوده نابود شود. این تغییر در فنوتیپ در تحرک سلولی و توانایی تهاجم آن اثر کرده و این دو مورد را افزایش می‌دهد.EMT سیگنال‌های اتوکرینی VEGF را القا می‌کند که باعث خودکفایی سلول‌های مهاجم در امر بقا می‌شوند (Bates, Richard C, and Arthur M Mercurio., 2005). حال این سوال مطرح می‌شود که منشا سلول‌های تومور چیست؟ در پاسخ به این پرسش دو تئوری مختلف بیان می‌شوند که تحت عنوان مدل‌های سنتی سرطان زایی و تئوری سلسله مراتبی از آنها یاد می‌شود. در مدل‌های سنتی بر سرطان زایی مطرح می‌گردد که رخداد های ژنتیکی تصادفی و تاثیر ریزمحیط ایجادکننده این نامگونی ژنی است توضیح داد و در تئوری سلسله مراتبی گفته می‌شود که سلول‌های توموری به صورت سلسله مراتبی سازماندهی می‌شوند و فقط یک ریز جمعیتی که به صورت نادر دیده می‌شوند از سلول‌های بدون تمایز در بالاترین جایگاه قرار گرفته که دارای ویژگی‌های بیولوژیکی خاصی همچون سلول‌های بنیادی طبیعی از جمله خودنوسازی و تمایز به انواع سلول‌های اندام هدف هستند (Puglisi, Maria Ausiliatrice et al., 2013). شواهدی در مطالعات اخیر بدست آمده که نشان دهنده

این امر است که: سرطان می‌تواند تحت عنوان یک بیماری در نظر گرفته شود که سلول‌های طبیعی را به سلول‌های غیر طبیعی مبدل می‌کند. در صورتی‌که بتوان این سلول‌های تبدیل شده به حالت غیر طبیعی را تحت فرایندهایی به شکل سلول‌های بنیادی تبدیل کرد یا بتواند عملکرد های آنان را القا کند می‌توان برای نابود کردن سلول‌های بنیادی سرطانی بطور کامل از آنها بهره برد. این شیوه یکی از راهکارهای نوین در درمان سرطان به‌شمار می‌آید (Baiocchi, Marta et al., 2010).

۳.نتایج وبحث

۳-۱- lcnRNAs و اپی ژنتیک

۳-۱-۱- HOTAIR

این lncRNA که کوتاه شده HOX transcript antisense RNA است به‌طور مستقیم بر روی کروماتین‌های تومور اثر کرده و آنها را تحریک و سرطان‌زایی را کنترل می‌کنند. این lncRNA در ناحیه 12q13.13 کروموزومی واقع گردیده و بیش از ۲ کیلوبایت طول دارد. تحقیقات در مقطع بالینی نشان داده‌اند که HOTAIR در سرطان کولون دچار افزایش بیان شده و باعث تقویت پیش آگهی‌های موجود نیز گشته و علاوه بر این می‌تواند باعث ارتقا متاستاز و عود این سرطان نیز شود (Xie, Kogo, Ryunosuke et al., 2011; Xia et al., 2015; Gupta, Rajnish A et al., 2010).

۳-۵- CCAT2

CCAT2 باعث القای ناپایداری‌های کروموزومی و ایجاد آنیوپلوئیدی شده و در بیان بیش از حد ریز ماهواره‌ها، رشد و متاستاز تومور ایفای نقش می‌کند. (Li, Cheng et al., 2009).

۳-۶-H19

یکی دیگر از lncRNAs موجود در این بخش H19 می‌باشد که بر روی کروموزوم 11p15.5 و در نزدیکی IGF II واقع شدنه که توسط مکانیسم حک‌گذاری، کنترل و در ژنوم مادری بیان می‌شود. این lncRNA دارای ۵ عدد اگزون و ۴ عدد اینترون می‌باشد و مشابه **CCAT2** طولی بیش از ۲ کیلوبایت دارد. پرتوآنکوژن c-Myc مستقیما بر روی H19 اثر کرده و موجب سرطان کولون می‌شود (Ayesh, Suhail et al., 2002; Thorvaldsen, J L et al., 1998; Li, Cheng et al., 2009).

۴.نتیجه گیری

سرطان کولون یکی از شایع‌ترین سرطان‌های روز دنیا است که lncRNAs یکی از مهمترین عواملی هستند که بطور مستقیم در ایجاد، گسرش، متاستاز و .... آن اثرات خود را ایفا می‌کنند. هر کدام از lncRNAs می‌تواند از جنبه های مختلف مانند تهاجم، آپوپتوز و حتی اثرات اپی ژنتیکی بررسی و دارای عملکردهای گوناگونی باشد. ما می‌توانیم با داشتن اطلاعات بیشتر و جامع‌تر در رابطه با

lncRNAs به درک بیشتری از سرطان رسیده و حتی با کمک آنها و توسعه هرچه بیشتر فناوری‌های کاربردی در زمینه‌های تشخیص و درمان سرطان، پایه گذار نسل نوینی از روش‌های پیشگیری، تشخیص و درمان برای جامعه بشری باشیم.

منابع

1. Ayesh, S., Matouk, I., Schneider, T., Ohana, P., Laster, M., Al-Sharef, W., De-Groot, N., & Hochberg, A. 2002. Possible physiological role of H19 RNA. Molecular carcinogenesis, 35(2), 63–74.
2. Baiocchi, M., Biffoni, M., Ricci-Vitiani, L., Pilozzi, E., & De Maria, R. 2010. New models for cancer research: human cancer stem cell xenografts. Current opinion in pharmacology, 10(4), 380–384.
3. Bates, R. C., & Mercurio, A. M. 2005. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression. Cancer biology & therapy, 4(4), 365–370.
4. Bhan, A., & Mandal, S. S. 2014. Long noncoding RNAs: emerging stars in gene regulation, epigenetics and human disease. ChemMedChem, 9(9), 1932–1956.
5. Fang, C., Qiu, S., Sun, F., Li, W., Wang, Z., Yue, B., Wu, X., & Yan, D. 2017. Long non-coding RNA HNF1A-AS1 mediated repression of miR-34a/SIRT1/p53 feedback loop promotes the metastatic progression of colon cancer by functioning as a competing endogenous RNA. Cancer letters, 410, 50–62.
6. Farooqi, A. A., de la Roche, M., Djamgoz, M., & Siddik, Z. H. 2019. Overview of the oncogenic signaling pathways in colorectal cancer: Mechanistic insights. Seminars in cancer biology, 58, 65–79.
7. Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell, 61(5), 759–767.
8. Forrest, M. E., Saiakhova, A., Beard, L., Buchner, D. A., Scacheri, P. C., LaFramboise, T., Markowitz, S., & Khalil, A. M. 2018. Colon Cancer-Upregulated Long Non-Coding RNA lincDUSP Regulates Cell Cycle Genes and Potentiates Resistance to Apoptosis. Scientific reports, 8(1), 7324.
9. Gil, N., & Ulitsky, I. 2020. Regulation of gene expression by cis-acting long non-coding RNAs. Nature reviews. Genetics, 21(2), 102–117.
10. Goodall, G. J., & Wickramasinghe, V. O. 2021. RNA in cancer. Nature reviews. Cancer, 21(1), 22–36.
11. Gupta, R. A., Shah, N., Wang, K. C., Kim, J., Horlings, H. M., Wong, D. J., Tsai, M. C., Hung, T., Argani, P., Rinn, J. L., Wang, Y., Brzoska, P., Kong, B., Li, R., West, R. B., van de Vijver, M. J., Sukumar, S., & Chang, H. Y. 2010. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. Nature, 464(7291), 1071–1076.
12. He, X., Tan, X., Wang, X., Jin, H., Liu, L., Ma, L., Yu, H., & Fan, Z. 2014. C-Myc-activated long noncoding RNA CCAT1 promotes colon cancer cell proliferation and invasion. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 35(12), 12181–12188.
13. Kogo, R., Shimamura, T., Mimori, K., Kawahara, K., Imoto, S., Sudo, T., Tanaka, F., Shibata, K., Suzuki, A., Komune, S., Miyano, S., & Mori, M. 2011. Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers. Cancer research, 71(20), 6320–6326.
14. Lao, Y., Li, Q., Li, N., Liu, H., Liu, K., Jiang, G., Wei, N., Wang, C., Wang, Y., & Wu, J. 2019. Long noncoding RNA ENST00000455974 plays an oncogenic role through up-regulating JAG2 in human DNA mismatch repair-proficient colon cancer. Biochemical and biophysical research communications, 508(2), 339–347.
15. Lei, Y., Wang, Y. H., Wang, X. F., & Bai, J. 2018. LINC00657 promotes the development of colon cancer by activating PI3K/AKT pathway. European review for medical and pharmacological sciences, 22(19), 6315–6323.
16. Li, C., Kim, S. W., Rai, D., Bolla, A. R., Adhvaryu, S., Kinney, M. C., Robetorye, R. S., & Aguiar, R. C. 2009. Copy number abnormalities, MYC activity, and the genetic fingerprint of normal B cells mechanistically define the microRNA profile of diffuse large B-cell lymphoma. Blood, 113(26), 6681–6690.

17. Liu, K. L., Wu, J., Li, W. K., Li, N. S., Li, Q., & Lao, Y. Q. 2019. LncRNA SNHG7 is an Oncogenic Biomarker Interacting with MicroRNA-193b in Colon Carcinogenesis. Clinical laboratory, 65(11), 10.7754/Clin.Lab.2019.190501.
18. Maurano, M. T., Humbert, R., Rynes, E., Thurman, R. E., Haugen, E., Wang, H., Reynolds, A. P., Sandstrom, R., Qu, H., Brody, J., Shafer, A., Neri, F., Lee, K., Kutyavin, T., Stehling-Sun, S., Johnson, A. K., Canfield, T. K., Giste, E., Diegel, M., Bates, D., … Stamatoyannopoulos, J. A. 2012. Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. Science (New York, N.Y.), 337(6099), 1190–1195.
19. Melton, C., Reuter, J. A., Spacek, D. V., & Snyder, M. 2015. Recurrent somatic mutations in regulatory regions of human cancer genomes. Nature genetics, 47(7), 710–716.
20. Miller, K. D., Nogueira, L., Mariotto, A. B., Rowland, J. H., Yabroff, K. R., Alfano, C. M., Jemal, A., Kramer, J. L., & Siegel, R. L. 2019. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. CA: a cancer journal for clinicians, 69(5), 363–385.
21. Ni, X., Ding, Y., Yuan, H., Shao, J., Yan, Y., Guo, R., Luan, W., & Xu, M. 2020. Long non-coding RNA ZEB1-AS1 promotes colon adenocarcinoma malignant progression via miR-455-3p/PAK2 axis. Cell proliferation, 53(1), e12723.
22. Puglisi, M. A., Tesori, V., Lattanzi, W., Gasbarrini, G. B., & Gasbarrini, A. 2013. Colon cancer stem cells: controversies and perspectives. World journal of gastroenterology, 19(20), 2997–3006.
23. Ransohoff, J. D., Wei, Y., & Khavari, P. A. 2018. The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA. Nature reviews. Molecular cell biology, 19(3), 143–157.
24. Roadmap Epigenomics Consortium, Kundaje, A., Meuleman, W., Ernst, J., Bilenky, M., Yen, A., Heravi-Moussavi, A., Kheradpour, P., Zhang, Z., Wang, J., Ziller, M. J., Amin, V., Whitaker, J. W., Schultz, M. D., Ward, L. D., Sarkar, A., Quon, G., Sandstrom, R. S., Eaton, M. L., Wu, Y. C., … Kellis, M. 2015. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. Nature, 518(7539), 317–330.
25. Shen, H., & Laird, P. W. 2013. Interplay between the cancer genome and epigenome. Cell, 153(1), 38–55.
26. Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. 2020. Cancer statistics, 2020. CA: a cancer journal for clinicians, 70(1), 7–30.
27. Thorvaldsen, J. L., Duran, K. L., & Bartolomei, M. S. 1998. Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2. Genes & development, 12(23), 3693–3702.
28. Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. 2016. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 25(1), 16–27.
29. Wang, L., Cho, K. B., Li, Y., Tao, G., Xie, Z., & Guo, B. 2019. Long Noncoding RNA (lncRNA)-Mediated Competing Endogenous RNA Networks Provide Novel Potential Biomarkers and Therapeutic Targets for Colorectal Cancer. International journal of molecular sciences, 20(22), 5758.
30. Wu, K., Zhang, N., Ma, J., Huang, J., Chen, J., Wang, L., & Zhang, J. 2018. Long noncoding RNA FAL1 promotes proliferation and inhibits apoptosis of human colon cancer cells. IUBMB life, 70(11), 1093–1100.
31. Xie, X., Tang, B., Xiao, Y. F., Xie, R., Li, B. S., Dong, H., Zhou, J. Y., & Yang, S. M. 2016. Long non-coding RNAs in colorectal cancer. Oncotarget, 7(5), 5226–5239.
32. Yan, X., Hu, Z., Feng, Y., Hu, X., Yuan, J., Zhao, S. D., Zhang, Y., Yang, L., Shan, W., He, Q., Fan, L., Kandalaft, L. E., Tanyi, J. L., Li, C., Yuan, C. X., Zhang, D., Yuan, H., Hua, K., Lu, Y., Katsaros, D., … Zhang, L. 2015. Comprehensive Genomic Characterization of Long Non-coding RNAs across Human Cancers. Cancer cell, 28(4), 529–540.
33. Yang, H., Wang, S., Kang, Y. J., Wang, C., Xu, Y., Zhang, Y., & Jiang, Z. 2018. Long non-coding RNA SNHG1 predicts a poor prognosis and promotes colon cancer tumorigenesis. Oncology reports, 40(1), 261–271.
34. Yang, L., Cui, J., Wang, Y., & Tan, J. 2019. FAM83H-AS1 is upregulated and predicts poor prognosis in colon cancer. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie, 118, 109342.

35. Yao, R. W., Wang, Y., & Chen, L. L. 2019. Cellular functions of long noncoding RNAs. Nature cell biology, 21(5), 542–551.
36. Yu, X., Zhao, J., & He, Y. 2018. Long non-coding RNA PVT1 functions as an oncogene in human colon cancer through miR-30d-5p/RUNX2 axis. Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology, 23(1), 48–54.
37. Yue, B., Liu, C., Sun, H., Liu, M., Song, C., Cui, R., Qiu, S., & Zhong, M. 2018. A Positive Feed-Forward Loop between LncRNA-CYTOR and Wnt/β-Catenin Signaling Promotes Metastasis of Colon Cancer. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy, 26(5), 1287–1298.
38. Zhang, X. W., Li, S. L., Zhang, D., Sun, X. L., & Zhai, H. J. 2020. RP11-619L19.2 promotes colon cancer development by regulating the miR-1271-5p/CD164 axis. Oncology reports, 44(6), 2419–2428.

Study of the role of epigenetics in the differentiation of mesenchymal stem cells into adipocytes

Omid Rezaie[1*]; Ali Barzegar[2]; Mozhgan Abasi[3]; Valiollah Babaeizad[4]

1- MSc Student, Department of Basic Sciences, Sari Agriculture Science and Natural Resources University, Sari, Iran
2- Associate Professor, Department of Basic Sciences, Sari Agriculture Science and Natural Resources University, Sari, Iran
2- Assistant Professor, Department of Tissue engineering, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
3- Associate Professor, Department of Plant Protection, Sari Agriculture Science and Natural Resources University, Sari, Iran

**Corresponding Author Email Adress: omid.r.k.1991@gmail.com*

Abstract

Epigenetic changes are chemical alterations caused by different enzymes in two strands of DNA or histone octamers of nucleosomes. This article highlights the role of epigenetic factors in mesenchymal stem cells and their differentiation into adipocytes. The application of stem cells in cell therapy and tissue therapy can include organ transplants and skin, cartilage, autoimmune, neurological, cardiac, and cancers diseases. Stem cells are undifferentiated cells that can self-renew and differentiate to other cell types and act as an inner regenerate system in many tissues. Stem cells include; Embryonic stem cells (ESCs) ،Mesenchymal stem cells (MSCs), Induced pluripotent stem cells (IPSCs). Because of their application in the treatment of diseases and biological research, Mesenchymal stem cells that are isolated from different adult tissues have the most studies compared to other stem cells. Unlike ESCs and IPSCs, MSCs have advantages such as modulating the immune system, not making a tumor after transplantation, and have no ethical restrictions, and making autologous transplantation possible. MSCs are isolated from a variety of tissues, including bone marrow, dental pulp, amniotic fluid, placenta, cord blood, and adipose tissue, but are easier to extract from adipose tissue because of the large amount of this tissue in the body. Epigenetic factors, including DNA methylation, histone modifications, small regulatory RNAs, and chromatin remodeling, play a very important role during stem cell proliferation, and differentiation. Epigenetic changes are chemical alterations caused by different enzymes in two strands of DNA or histone octamers of nucleosomes. This article highlights the role of epigenetic factors in mesenchymal stem cells and their differentiation into adipocytes.

Keywords: Epigenetic, stem cells, differentiation, adipocyte

بررسی نقش اپی‌ژنتیک در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های چربی

امید رضائی*[۱]؛ علی برزگر [۲]؛ مژگان عباسی[۳]؛ ولی اله بابائی زاد[۴]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران
۲. دانشیار گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران
۳. استادیار دانشکده فناوریهای نوین دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۴. دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران

omid.r.k.1991@gmail.com

چکیده

از کاربرد سلول‌های بنیادی در سلول‌درمانی و بافت‌درمانی می‌توان به پیوند اعضاء و بیماری‌های پوستی، غضروفی، خودایمنی، عصبی، قلبی و سرطان ها اشاره کرد. سلولهای بنیادی سلول‌های تمایز نیافته‌ای می‌باشند که توانایی خودنوزایی و تبدیل شدن به سلول‌های دیگر (تمایز سلولی) را دارند و در بسیاری از بافت‌ها به عنوان نوعی سیستم ترمیم داخلی عمل می‌کنند. سلول‌های بنیادی شامل سه نوع سلول‌های بنیادی جنینی (ESCs[163])، سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs[164]) و سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (IPSCs[165]) هستند. سلولهای بنیادی مزانشیمی که از بافت‌های مختلف بزرگسالان قابل استخراج است به علت کاربرد آن‌ها در درمان بیماری‌ها و تحقیقات بیولوژیکی بیشترین مطالعات را نسبت به سایر سلول‌های بنیادی به خود اختصاص داده است. MSCs برخلاف ESCs و IPSCs دارای مزایایی از قبیل عدم تحریک سیستم ایمنی، عدم ایجاد تومور پس از انجام پیوند و فاقد محدودیت‌های اخلاقی بوده و پیوند اتولوگ را نیز امکان‌پذیر می‌سازند. MSCs از بافت‌های مختلفی از جمله مغز استخوان، پالپ دندان، مایع *آمنیوتیک* ، جفت، خون بندناف و بافت چربی استخراج می‌شوند، اما استخراج آن‌ها از بافت چربی بدلیل میزان فراوان این بافت آسان‌تر است. در طی مراحل رشد، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی فاکتورهای اپی‌ژنتیکی که شامل متیلاسیون DNA، تغییرات هیستونی، RNAهای کوچک تنظیمی و بازآرایی کروماتینی نقش بسیار مهمی ایفا می‌کنند. تغییرات اپی‌ژنتیکی تغییرات شیمیایی هستند که در دو رشته DNA و یا هستون‌های هسته‌ای نوکلئوزوم‌ها توسط آنزیم‌های مختلفی ایجاد می‌شود. این مقاله نقش بارز فاکتورهای اپی‌ژنتیکی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تمایز آن‌ها به سلول‌های چربی را بیان می‌کند.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی، اپی‌ژنتیک، تمایز سلولی

[163] Embryonic stem cells
[164] Mesenchymal stem cells
[165] Induced pluripotent stem cells

۱. مقدمه

اصطلاح اپی‌ژنتیک برای اولین بار در سال ۱۹۴۲ توسط کانارد ودینگ[۱۶۶] از ترکیب دو کلمه اپی‌ژنزیس و ژنتیک به کار برده شد. پیشوند اپی (epi) در کلمه‌ی اپی‌ژنتیک به معنای "فرا" بوده و ریشه یونانی دارد. علم اپی‌ژنتیک به تغییرات قابل توارثی اطلاق می‌شود که بدون تغییر در توالی DNA باعث تغییر بیان ژن می‌شوند (Tronick et al., 2016). ژن‌ها در سلول‌های مختلف یک موجود و همچنین در مراحل مختلف رشدی یک سلول، سطوح مختلفی از بیان را نشان می‌دهند. پس از تکمیل فرآیند تمایز و رسیدن سلول به حالت پایدارتر، الگوی ساختار ژنوم آن نیز تقریبا ثابت می‌ماند (Toutounchi et al., 2007). اگرچه تغییرات اپی‌ژنتیک در ترتیب بازهای آلی رخ نمی‌دهد اما در سراسر چرخه‌های تقسیم سلولی پایدار مانده و به ارث می‌رسد (Bird et al., 2007). همچنین تغییر اجزای تشکیل دهنده‌ی کروماتین نیز سبب تغییر بیان ژن می‌شود که این تغییرات می‌تواند قابل توارث اما برگشت‌پذیر باشد. تغییرات اپی‌ژنتیکی به صورت های مختلفی بر سلول اعمال می شوند که عبارتند از (Feinberg et al., 2004):

- متیلاسیون DNA
- تغییر هیستون‌ها
- جابه‌جایی نوکلئوزوم‌ها (Nucleosome remodeling)
- RNAهای کوچک تنظیمی (miRNA)

۱-۲- متیلاسیون DNA

متیلاسیون DNA به اضافه شدن گروه متیل ترجیحا در جزایر CpG اطلاق می‌شود که کاهش بیان ژن را در پی دارد (Beerman et al.,2015). اضافه شدن گروه متیل توسط آنزیم‌های خاصی صورت می‌گیرد که DNA متیل‌ترنسفراز(Dnmt) نامیده می‌شوند، به‌عنوان مثال Dnmt3b این آنزیم‌ها از مولکول S_آدنوزیل متیونین [S_Adenosyl methionine (SAM)] به عنوان دهنده‌ی گروه متیل استفاده کرده و بازی نامعمول به نام ۵_متیل سیتوزین [5_Methyl Cytosine (M5C)] ایجاد می‌کنند (Fasolino et al., 2017). واکنش متیلاسیون، پس از همانندسازی در موقعیت اتم شماره ۵ حلقه پیریمیدین سیتوزین اتفاق افتاده و در بیشتر موارد در طول همانندسازی ثابت باقی می‌ماند(Bird et al.,2007). اکثر نواحی که تراکم بالا CpG دارند در نزدیکی پروموتر ژن‌های انسانی قرار دارند معمولا متیلاسیون نواحی پروموتری موجب کاهش بیان ژن شده و دمتیله شدن نواحی پروموتری افزایش بیان ژن را درپی دارد اما همیشه این چنین نیست . دلیل تغییر بیان ژن در نتیجه‌ی متیلاسیون DNA این است که پروتئین‌های تنظیم‌کننده رونویسی که به DNA متیله متصل می‌شوند با فاکتورهای رونویسی که به DNA غیرمتیله متصل می‌شوند، متفاوت هستند (Teven et al.,2011).

۱-۳-تغییرات هیستون‌ها

[166] Canard wadding

تغییرات شیمیایی هیستون‌ها شامل استیلاسیون، متیلاسیون، یوبیکوییتینه شدن، فسفریلاسیون، سامولیشن در ناحیه دم N-ترمینال هیستون‌هاست (Moran Salvador et al., 2017). اضافه شدن هر گروه موجب بروز تغییرات ویژه ای در میزان رونویسی ژن ها می‌شود به عنوان مثال اضافه شدن گروه استیل به اسیدآمینه لیزین که توسط آنزیم هیستون استیل ترنسفراز صورت می‌گیرد باعث ریلکس شدن DNA شده و اجازه رونویسی را صادر می‌کند. درحالی که حذف گروه استیل به وسیله آنزیم‌های هیستون داستیلازها منجربه خاموشی ژن می‌شود (Dokmanovic et al., 2007). از سوی دیگر متیلاسیون هسیتون‌ها به عنوان مثال اضافه شدن گروه متیل به اسیدآمینه‌های لیزین و آرژنین هیستون‌ها با توجه به موقیت قرارگیری این اسیدآمینه ها ممکن است بیان ژن را کاهش یا افزایش دهد. این یافته‌ها اهمیت موقعیت اضافه شدن ترکیبات شیمیایی را در پروتئین‌های هیستونی نمایان می‌سازد (Kouzarides et al.,2007).

۱-۴-جابه‌جایی نوکلئوزوم‌ها

کروماتین یک ساختار ثابت و غیر پویا نیست و اجزای اصلی کروماتین که نقش اصلی را در تنظیم بیان ژن بازی می‌کنند تغییرات هیستون‌هاست. از زمان مطالعات اولیه Vincent Allfrey در دهه ۱۹۶۰ مشخص شد که هیستون‌ها تغییرات پس از ترجمه می شوند (Clapier et al., 2009). همچنین مشخص شده که هیستون‌ها می توانند با واریانت‌های مختلف جایگزین شوند که باعث تغییر در میزان رونویسی ژن می‌شود. بازآرایی کروماتینی یک تغییر پویا بر روی ساختار کروماتین است که به منظور دسترسی پروتئین های رونویسی به DNA ژنومی متراکم در جهت کنترل بیان ژن صورت می‌پذیرد(Vignali et al., 2000). کمپلکس های بازآرایی کروماتینی شامل تعدادی کمپلکس پروتئینی‌ست که مهمترین آنها شامل (Narlikar et al ., 2013):

۱. SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable)
۲. imitation SWI of drosophila melanogaster
۳. Mi-2/NuRD (Nucleosome Remodeling Deacetylase)
٤. INO80/SWR1

این کمپلکس‌های پروتئینی برای فعالیت خود نیاز به ATP دارند و به سه روش موجب تغییر ساختار کروماتین و درنتیجه موجب تغییر در رونویسی و بیان ژن می‌شوند (Jarillo et al., 2009 and Fry et al., 2001). در روش sliding، کمپلکس پروتئینی موجب تغییر مکان نوکلئوزوم شده و پروموتور و enhancer ژن‌های هدف در بخش لینکرDNA قرار گرفته و فاکتورهای رونویسی می‌توانند این مناطق را شناسایی و به آن متصل شده و باعث افزایش رونویسی ژن مورد نظر شوند. در روش Transfer یا انتقال، کمپلکس ها باعث انتقال نوکلئوزوم از یک DNA به DNA دیگر می‌شود درنتیجه پروموتر و enhancer در دسترس فاکتورهای رونویسی قرار می‌گیرند.

در روش تغییر حالت نوکلئوزوم، کمپلکس موجب تغییر حالت DNA اطراف هستون اکتامری می‌شود و بخش‌هایی از پروموتور و enhancer ژن که قابل شناسایی برای فاکتورهای رونویسی نبوده‌اند به صورتی قرار می‌گیرند که توسط فاکتورهای رونویسی شناسایی می‌شوند.

۱-۵-RNAهای کوچک تنظیمی (miRNA)

به RNAهای غیرکدکننده و کوچک (۲۰ نوکلئوتیدی) که در تنظیم بیان ژن پس از ترجمه دخالت دارند اطلاق می‌شود. miRNA به mRNAهای هدف که مکمل آن‌هاست اتصال یافته و موجب تخریب mRNA می‌شود. مشاهده شده که miRNA در تنظیم مکانیسم های دیگر اپی‌ژنتیکی ازجمله متیلاسیون DNA و داستیلاسیون هیستون‌ها نقش دارند (Sato et al., 2011).

۲. مواد و روش‌ها

این مقاله از نوع مروری بوده که با استفاده از کلیدواژه های مربوطه از مقالات مرتبط اطلاعات مناسب جمع آوری شده است.

۳. نتایج و بحث

۳-۱-تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های چربی

آدیپوژنز فرآیندی است که چندین فاکتور رونویسی در آن نقش دارند. تنظیم نامناسب در هر نقطه از این مراحل موجب ایجاد بیماری متابولیکی شدیدی می‌شود (Liu et al., 2008). مطالعات نشان داده متیلاسیون نابجا می‌تواند موجب چاقی شود(Stoger, 2008) . در بررسی که درمورد نقش متیلاسیون DNA در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های چربی صورت گرفت کاهش متیلاسیون DNA در پروموتر ژن‌های دخیل در آدیپوژنز را نشان داد درصورتی که در پروموتر ژن‌هایی که در آدیپوژنز نقشی ندارند افزایش متیلاسیون DNA دیده شد (Teven et al., 2011). بنابراین مشاهدات نشان داده در میان فاکتورهای مختلف اپی‌ژنتیکی، متیلاسیون DNA مسئول تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول های چربی می باشد (Lee et al., 2014). پژوهش‌های نوین همچنین نقش تغییرات هیستونی را در آدیپوژنز پیشنهاد می‌کند. EZH2 که یک هیستون متیل ترنسفراز است و KDM6 که یک هیستون‌دمتیلاز است نقش مهمی در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های چربی ایفا می‌کنند. خاموش کردن ژن EZH2 تمایز را بیشتر در جهت اوستئوژنز و خاموش کردن ژن KDM6 تمایز را در جهت آدیپوژنز پیش می‌برد (Hemming et al., 2014). علاوه بر این miRNA ها نیز در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های چربی نقش دارند. در سلول‌های چربی تمایز یافته میزان بیان miR-143 افزایش می‌یابد این درحالی‌ست که توسط الیگونوکلئوتید آنتی‌miR-143 می‌توان از تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های چربی ممانعت کرد (Saidi et al., 2017). دانشمندان گزارش داده‌اند افزایش miR-143 و miR-103 موجب افزایش انباشته شدن تری گلیسریدها در سلول شده و درنتیجه افزایش بیان ژن‌های دخیل در مراحل ابتدایی آدیپوژنز را در پی دارد(Xie et al.,2007). بیان miR-378 نیز موجب افزایش انباشته‌شدن تری گلیسرید شده و فعال شدن ژن‌های لیپوژنیک GLUT-4 و PPAR γ-2را درپی دارد. بازآرایی نوکلئوزوم‌ها و موقعیت کروموزوم‌ها نیز درطی آدیپوژنز مشاهده شده است. نشان داده شده بخش های کروماتینی و هسته ای در طی تمایز سلولی بسیار دینامیک هستند و این تغییرات ممکن است در فرآیندهای رونویسی نقش تنظیمی داشته باشند (Ortega et al., 2010) .

در اولین روز تحریک، فاکتور رونویسی C/EBPβ می‌تواند به پروموتر PPARγ اتصال یابد و بیان ژن را تحریک سازد. سپس اتصال SWI/SNF رخ می‌دهد و بازآرایی کروماتینی در ناحیه پروموتر اتفاق می‌افتد و رونویسی را در روز دوم فعال می‌کند. به علت اتصال ناپایدار SWI/SNF ، کمپلکس SWI/SNF از یکدیگر و همچنین از پروموتر جداشده و کاهش رونویسی ژن PPARγ را در روز چهارم سبب می‌شود. mRNAهای ژن PPARγ را می‌توان در روزهای ۷-۵ مشاهده نمود (Salma et al., 2004, Musri et al., 2007) .
علاوه بر این پروموتر ژن PPARγ در ناحیه T3-L13 سلول های پیش‌چربی(Preadipocytes) هایپرمتیله است و تدریجا درطی تحریک به تمایز دمتیله می‌شود(Fujiki et al., 2009) . با این وجود به مطالعات بیشتری نیاز است تا بطور دقیق بتوان نقش مکانیسم‌های اپی‌ژنتیک را در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های چربی مشخص کرد.

۴. نتیجه‌گیری

مطالعات اخیر اهمیت مکانیسم‌های اپی‌ژنتیک در فرآیندهای سلولی را برجسته تر کرده است و مشخص شده اختلال در این مکانیسم‌ها بیماری‌های بسیاری را در انسان ایجاد می‌کند. با توجه به اینکه تغییرات اپی‌ژنتیکی در تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی نقش مهمی ایفا کرده و سرنوشت سلولی را مشخص می‌کنند، بررسی مکانیسم های دقیق تغییرات اپی‌ژنتیکی نیازمند بررسی‌های بیشتری‌ست زیرا تغییر در تمایز سلولی که طی مراحل ترمیم سلول‌های از دست رفته در سلول‌های بنیادی مزانشیمی رخ می‌دهد ممکن است باعث بروز زیان‌های جبران ناپذیری شود. به نظر می‌رسد بسیاری از جنبه‌های اپی‌ژنتیک هنوز ناشناخته است و مطالعات بسیاری جهت شناسایی دقیق‌تر مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی و ارتباط آن‌ها با هم نیاز است.

منابع

1. Tronick E., Hunter R.G. (2016) Waddington Dynamic Systems, and Epigenetics. Frontiers in Behavioral Neuroscience, 10(107).

1. Toutounchi M., Shahhosseini M., Moumenimoghadam M. and Baharvand H. (2007) Epigenetic of Stem Cells. The Cell, 9(1): 51-66.
2. Bird A. Perceptions of Epigenetics. (2007) Nature 447(7143): 396-398.
3. Feinberg A.P. and Tycko. B. (2004) The history of cancer epigenetics. Nature Reviews Cancer 4(2): 143-153.
4. BEERMAN, I. & ROSSI, D. J. 2015. Epigenetic Controlof Stem Cell Potential during Homeostasis, Aging,
5. and Disease. Cell Stem Cell,16,613-25.
6. FASOLINO, M. & ZHOU, Z. 2017. The Crucial Role of DNA Methylation and MeCP2 in Neuronal Function.
7. TEVEN, C. M., LIU, X., HU, N., TANG, N., KIM, S. H., HUANG, E., YANG, K., LI, M., GAO, J.-L., LIU, H.,NATALE, R. B., LUTHER, G., LUO, Q., WANG, L., RAMES, R., BI, Y., LUO, J., LUU, H. H., HAYDON, R. C., REID, R. R. & HE, T.-C. 2011. Epigenetic Regulation of Mesenchymal Stem Cells: A Focus on Osteogenic and Adipogenic Differentiation. Stem Cells International,2011.
8. MORAN-SALVADOR, E. & MANN, J. 2017. Epigenetics and Liver Fibrosis. Cellular and Molecular
9. Gastroenterology and Hepatology,4,125-134.
10. DOKMANOVIC, M., CLARKE, C. & MARKS, P. A. 2007. Histone deacetylase inhibitors: overview and
11. perspectives. Mol Cancer Res,5,981-9.
12. KOUZARIDES, T. 2007. Chromatin modifications and their function. Cell,128,693-705. LEE, K. H., JU, U. I., SONG, J. Y. & CHUN, Y. S. 2014. The histone demethylase PHF2 promotes fat cell
13. differentiation as an epigenetic activator of both C/EBPalpha and C/EBPdelta. Mol Cells,37,734-41.

14. Clapier, C. R., & Cairns, B. R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual review of biochemistry*, *78*, 273-304.
15. Vignali, M., Hassan, A. H., Neely, K. E., & Workman, J. L. (2000). ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Molecular and cellular biology*, *20*(6), 1899-1910.
16. Fry, C. J., & Peterson, C. L. (2001). Chromatin remodeling enzymes: who's on first?. *Current Biology*, *11*(5), R185-R197.
17. Narlikar, G. J., Sundaramoorthy, R., & Owen-Hughes, T. (2013). Mechanisms and functions of ATP-dependent chromatin-remodeling enzymes. *Cell*, *154*(3), 490-503.
18. Jarillo, J. A., Piñeiro, M., Cubas, P., & Martínez-Zapater, J. M. (2009). Chromatin remodeling in plant development. *International Journal of Developmental Biology*, *53*(8-9-10), 1581-1596.
19. SATO, F., TSUCHIYA, S., MELTZER, S. J. & SHIMIZU, K. 2011. MicroRNAs and epigenetics. Febs j,278,1598-609.
20. LIU, L., LI, Y. & TOLLEFSBOL, T. O. 2008. Gene-environment interactions and epigenetic basis of human diseases. Curr Issues Mol Biol,10,25-36.
21. STOGER, R. 2008. Epigenetics and obesity. Pharmacogenomics,9,1851-60.
22. TEVEN, C. M., LIU, X., HU, N., TANG, N., KIM, S. H., HUANG, E., YANG, K., LI, M., GAO, J.-L., LIU, H.,NATALE, R. B., LUTHER, G., LUO, Q., WANG, L., RAMES, R., BI, Y., LUO, J., LUU, H. H., HAYDON, R. C., REID, R. R. & HE, T.-C. 2011. Epigenetic Regulation of Mesenchymal Stem Cells: A Focus on Osteogenic and Adipogenic Differentiation. Stem Cells International,2011.
23. LEE, K. H., JU, U. I., SONG, J. Y. & CHUN, Y. S. 2014. The histone demethylase PHF2 promotes fat cell differentiation as an epigenetic activator of both C/EBPalpha and C/EBPdelta. Mol Cells,37,734-41.
24. HEMMING, S., CAKOUROS, D., ISENMANN, S., COOPER, L., MENICANIN, D., ZANNETTINO, A. &GRONTHOS, S. 2014. EZH2 and KDM6A act as an epigenetic switch to regulate mesenchymal stem cell lineage specification. Stem Cells,32,802-15.
25. XIE, H., LIM, B. & LODISH, H. F. 2009. MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity. Diabetes,58,1050-7.
26. SAIDI, N., GHALAVAND, M., HASHEMZADEH, M. S., DOROSTKAR, R., MOHAMMADI, H. & MAHDIAN-SHAKIB, A. 2017. Dynamic changes of epigenetic signatures during chondrogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Biomed Pharmacother,89,719-731.
27. ORTEGA, F. J., MORENO-NAVARRETE, J. M., PARDO, G., SABATER, M., HUMMEL, M., FERRER, A.,RODRIGUEZ-HERMOSA, J. I., RUIZ, B., RICART, W., PERAL, B. & FERNÁNDEZ-REAL, J. M. 2010. MiRNA Expression Profile of Human Subcutaneous Adipose and during Adipocyte Differentiation. PLOS ONE,5,e9022.
28. SALMA, N., XIAO, H., MUELLER, E. & IMBALZANO, A. N.2004. Temporal recruitment of transcription factors and SWI/SNF chromatin-remodeling enzymes during adipogenic induction of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma nuclear hormone receptor. Mol Cell Biol,24,4651-63.
29. MUSRI, M. M., GOMIS, R. & PARRIZAS, M. 2007. Chromatin and chromatin-modifying proteins in adipogenesis. Biochem Cell Biol,85,397-410.
30. FUJIKI, K., KANO, F., SHIOTA, K. & MURATA, M. 2009.Expression of the peroxisome proliferator activated receptor gamma gene is repressed by DNA methylation in visceral adipose tissue of mouse models of diabetes. BMC Biol,7,38.

Evaluation of Dorsban effect on mesenchymal stem cell survival

Omid Rezaie[1*]; Ali Barzegar[2]; Mozhgan Abasi[3]; **Valiollah Babaeizad[4]**

1- MSc Student, Department of Basic Sciences, Sari Agriculture Science and Natural Resources University, Sari, Iran

2- Associate Professor, Department of Basic Sciences, Sari Agriculture Science and Natural Resources University, Sari, Iran

2- Assistant Professor, Department of Tissue engineering, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

3- Associate Professor, Department of Plant Protection, Sari Agriculture Science and Natural Resources University, Sari, Iran

**Corresponding Author Email Address: omid.r.k.1991@gmail.com*

Abstract

Doresban is one of the most common organophosphate insecticides, which causes various diseases during human growth and development. Studies have shown that oxidative stress in human cells, which is stimulated by various factors, including insecticides, causes different diseases such as cancer, diabetes, and diseases that destroy the nervous system. Doresban disrupts the evolution of nerve cells and enhances the differentiation of neuronal progenitor cells into glia cells. Animals have been used for research on human evolution but a novel approach has developed due to moral issues, expenses, and difficulty of working with animals. Stem cells that have the ability to regenerate and differentiate into different types of cells are an ideal option for studying the human development pathways. There are three different types of stem cells; Embryonic Stem Cells (EMCs), Mesenchymal Stem Cells (MSCs), and Induced Pluripotent Stem Cells (IPSCs). Mesenchymal stem cells can be extracted from different adult tissues. Although their less differentiation ability compared with EMCs and IPSCs, they have a significant role in cell therapy owing to their presence in various tissues. Mesenchymal stem cells have the ability to generate neuronal stem cells that can differentiate into neural cells including neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. In this study, the viability of mesenchymal stem cells was treated with concentrations of zero (control), 200 µM, and 600 µM of Dorsban over a period of 24 hours. Cell viability in the 200 µM treatment compared to control show a significant reduction in survival, Also, in the 600 µM treatment, the survival rate decreased compared to the control treatment and 200 µM treatment, which is also significant. The results of this study can be expressed as increasing the concentration of Dorsban in the treatments, reducing the survival of mesenchymal stem cells.

Keywords: Doresban, mesenchymal stem cell, MTT assay

ارزیابی زنده‌مانی سلول های بنیادی مزانشیمی تحت تاثیر سم دورسبان

امید رضائی*[۱]؛ علی برزگر [2]؛ مژگان عباسی[۳]؛ ولی اله بابائی زاد[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و
۲- منابع طبیعی ساری، مازندران،
۳- دانشیار گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران
۴- استادیار دانشکده فناوریهای نوین دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۵- دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران،

omid.r.k.1991@gmail.com

چکیده

دورسبان یکی از رایج‌ترین سموم حشره‌کش ارگانوفسفره است که موجب بروز بیماری‌های مختلف در طی رشد و تکامل انسان می‌شود. مطالعات نشان داده استرس اکسیداتیو در سلول‌های انسانی که توسط عوامل مختلفی از جمله حشره‌کش‌ها القا می‌شود باعث بروز بیماری‌های متفاوتی مانند: سرطان، دیابت و بیماری‌های تخریب کننده سیستم عصبی می‌شوند. دورسبان در مسیر تکاملی سلول‌های عصبی اختلال ایجاد کرده و تمایز سلول‌های پیش‌ساز عصبی به سلول‌های گلیا را تقویت می‌کند. پیش از این از حیوانات جهت تحقیقات تکاملی در انسان مورد استفاده قرار می‌گرفت که باتوجه به مشکلات اخلاقی، هزینه بالا و سختی کار با حیوانات، کشت سلول‌های بنیادی انسان و تمایز آن‌ها رویکردی جدید در پژوهشهای تکاملی ایجاد شده است. سلول‌های بنیادی که توانایی خودنوزایی و تمایز به رده‌های مختلف سلولی را دارند گزینه‌ای ایده آل در جهت بررسی مسیرهای تکوین و تکامل انسان هستند. سلول‌های بنیادی شامل سه نوع سلول‌های بنیادی جنینی (ESCs[167])، سلول‌های بنیادی مزانشیمی(MSCs[168]) و سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (IPSCs[169]) هستند. سلولهای بنیادی مزانشیمی که از بافت های مختلف بزرگسالان قابل استخراج است اگرچه قدرت تمایزی کمتری نسبت به سلول‌های بنیادی جنینی و پرتوان القایی دارد، اما چون در بافت های مختلفی حضور داشته و در ترمیم بافت ها پس از آسیب و جراحت نقشی بارز دارند اهمیت فراوانی در سلول درمانی دارند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانایی تولید سلول‌های بنیادی عصبی را داشته که امکان تمایز به انواع عصبی بالغ از جمله سلول‌های نورونی، آستروسیت و الیگودندروسیت را دارند. در این پژوهش میزان زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با غلظت‌های صفر(شاهد)، ۲۰۰ میکرومولار و ۶۰۰ میکرومولار سم دورسبان در بازه زمانی ۲۴ ساعت تیمار شد که میزان زنده‌مانی سلول در تیمار ۲۰۰ میکرومولار در مقایسه با تیمار شاهد کاهش معناداری در زنده‌مانی را نشان می‌دهد، همچنین در تیمار ۶۰۰ میکرومولار میزان زنده‌مانی نسبت به تیمار شاهد و تیمار ۲۰۰ میکرومولار کاهش یافته که معنادار نیز می باشد. نتایج این مطالعه را می‌توان به این صورت بیان نمود که با افزایش غلظت سم دورسبان در تیمارها، کاهش میزان زنده‌مانی سلول های بنیادی مزانشیمی را شاهد بوده‌ایم.

واژگان کلیدی: سلول بنیادی مزانشیمی، کلروپیریفوس، تست MTT

[167] Embryonic stem cells
[168] Mesenchymal stem cells
[169] Induced pluripotent stem cells

۱.مقدمه

بسیاری از بیماری‌ها با آسیب و تخریب بافت در بدن همراه هستند که مشکلاتی اساسی در بحث سلامت مطرح می‌کنند، از این رو پژوهشگران جهت دستیابی به منبع دائمی بافتی، برای استفاده در درمان این گونه بیماری ها هستند. در این میان سلول‌های بنیادی توجه بسیاری از محققان علوم پزشکی را به خود جلب کرده و کاربرد این سلول‌ها نقطه عطفی در سلول درمانی و پزشکی ترمیمی ایجاد کرده است. به طوری که سلول‌درمانی و بافت‌درمانی در طیف وسیعی از بیماری‌ها مورد بررسی قرار گرفته است(Brown, C., et al., 2019).

سلول‌های بنیادی از نظر توان تمایزی شامل ۵ نوع است که شامل:

۱. سلول‌های بنیادی همه توان[۱۷۰] : این سلول‌ها قادرند همه سلول‌ها اعم از سلول‌های فرد و سلول‌های برون جنینی (جفت) را بسازند مانند بلاستومرهای یک جنین دوسلولی که هر سلول آن می تواند یک فرد کامل را بسازد.
۲. سلول‌های بنیادی پرتوان[۱۷۱]: سلول‌هایی هستند که می توانند غالب یا همه سلول‌های فرد را بسازند. مثلا سلول‌های بنیادی جنینی تحت شرایط خاص می‌توانند یک فرد را بسازند، ولی قادر به ایجاد سلول‌های برون جنینی (جفت) نیستند. سلول-هایی که از گنادهای جنینی(fetus) به دست می‌آیند و به آن‌ها سلول‌های زاینده جنینی[۱۷۲] گفته می‌شود نیز جزو این دسته هستند.
۳. سلول‌های بنیادی چند توان[۱۷۳]: تعداد محدودتری از انواع سلول ها را ایجاد می کنند مانند سلول های بنیادی واقع در بافت های بزرگسال.
٤. سلول های بنیادی اولیگو پوتنت[۱۷۴]: سلول هایی مانند سلول‌های بنیادی لنفوئید یا سلول‌های بنیادی میلوئید در این گروه قرار گرفته و تنها می‌توانند به تعداد کمی از سلول‌ها تمایز پیدا کنند.
۵. سلول‌های بنیادی تک توان[۱۷۵]: این سلول‌ها تنها می‌توانند به یک نوع سلول تبدیل شوند مانند سلول‌های بنیادی ماهیچه ای بالغ.(Sobhani, A.,et al.,2017)

سلول های بنیادی مزانشیمی برخلاف سلول های بنیادی جنینی و سلول های پرتوان القایی دارای مزایایی از قبیل عدم تحریک سیستم ایمنی، عدم ایجاد تومور پس از انجام پیوند و فاقد محدودیت‌های اخلاقی بوده و پیوند اتولوگ را نیز امکان‌پذیر می‌سازند. سلول های بنیادی مزانشیمی از بافت‌های مختلفی از جمله مغز استخوان، پالپ دندان، مایع *آمنیوتیک* ، جفت، خون بندناف و بافت چربی استخراج می‌شوند(Inden, M.,et al 2016)، اما استخراج آن‌ها از بافت چربی بدلیل میزان فراوان این بافت آسان‌تر است(Horwitz, E. M.,et al 2006). علاوه بر این، این سلول ها قابلیت تولید سلول‌های بنیادی عصبی را دارند که امکان تولید انواع سلول‌های نورونی، آستروسیت و الیگودندروسیت را امکان‌پذیر می‌کند(Limke, T. L.,et al 2002).

[170] totipotent
[171] pluripotent
[172] embryonic germ cell
[173] multipotent
[174] Oligopotent
[175] Unipotent

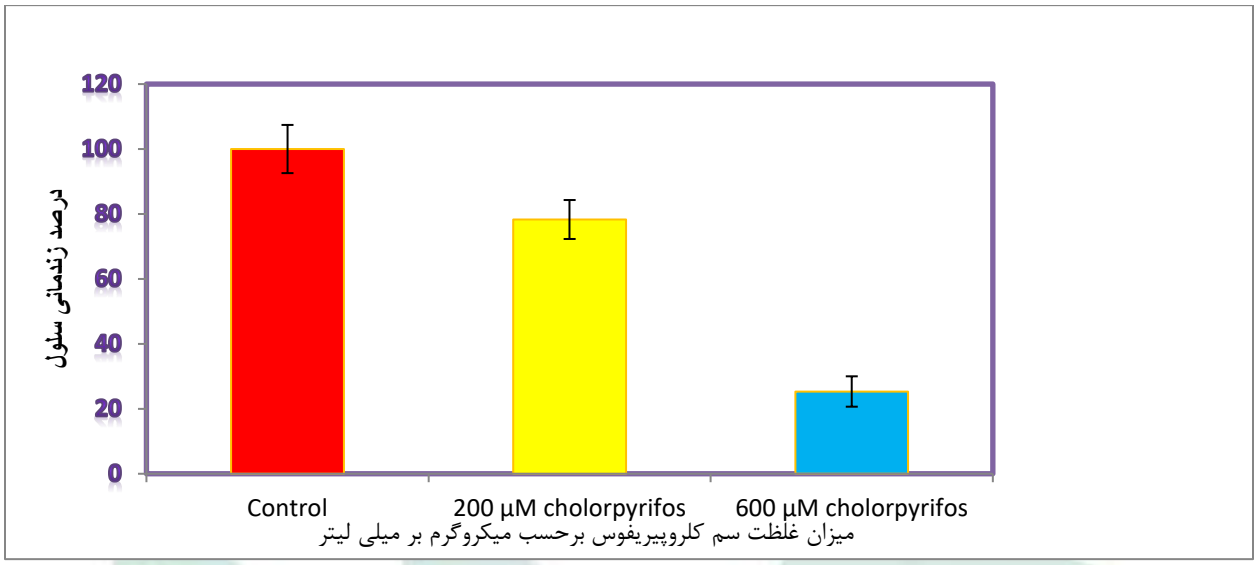
اثرات زیان آور سموم کشاورزی و ایجاد بیماری‌های مختلف ناشی از آن‌ها در دنیای امروز انکارناپذیر است. ایران از جمله کشورهایی است که مصرف سموم کشاورزی در آن به میزان قابل توجهی بالاست. ارگانوفسفره‌ها بدلیل خاصیت آلکیله کنندگی، قادرند ساختمان و عملکرد پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک‌ها و لیپیدها را تغییر دهند(Salehi, M.,et al 2003). اگرچه نشان داده شده که دورسبان در حیوانات بزرگسال نسبتا بی ضرر است اما مطالعات بعدی مشخص کرد که در تکوین سلول‌های عصبی مداخله می‌کند(Monnet-Tschudi, F., et al2000). مکانیسم عمل دورسبان در تکوین سلول‌های عصبی پیچیده است و بطور دقیق مشخص نیست. دورسبان در تکوین باعث آسیب به سلول‌های عصبی به ویژه در مغز نارس و اختلال در تکوین سلول‌های گلیا (آستروسیت، الیگودندروسیت، میکروگلیا) می‌شود(Garcia, S. J.,et al 2003).

۲.مواد و روش‌ها

سلول های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از بافت چربی از پژوهشکده رویان تهران خریداری شد و با محیط کشت DMEM به همراه ۱۰٪ سرم جنین گاوی و ۱٪ آنتی بیوتیک پنی سیلین / استرپتومایسین شرکت ایده زیست نو ترکیب کشت داده شد. پس از ۳ روز تعویض محیط کشت انجام گرفت. پس از اینکه سلول ها به تراکم ۷۰٪ رسیدند، محیط کشت سلولی خارج و با بافر PBS شستشو داده شد و ۱میلی لیتر محلول تریپسین/EDTA **(0.**25**%** Trypsin/**0.**53 mM EDTA) تریپسینه شد. پس از گذشت مدت ۲ دقیقه، مقدار مناسبی محیط کشت حاوی سرم جهت خنثی سازی آنزیم تریپسین اضافه و پس از سانتریفیوژ و به دست آوردن رسوب سلولی به میزان ۱ میلی لیتر محیط کشت به آن اضافه و هموژن سازی صورت گرفت. در ادامه توسط لام نئوبار شمارش سلولی انجام گرفت و به تعداد مناسب در هر چاهک ۹۶ سلول سید شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط کشت خارج و محیط کشت فاقد سرم به همراه غلظت‌های مختلف سم به چاهک اضافه گردید. پس از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های صفر(شاهد)، ۲۰۰میکرومولار و ۶۰۰ میکرومولار سم دورسبان تست زنده‌مانی سلولی به وسیله کیت MTT شرکت زیست نو ترکیب انجام شد. جهت ارزیابی زنده مانی سلول‌ها مقدار ۹۰ میکرولیتر محیط کشت به همراه ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT به هر چاهک اضافه و جهت تبدیل ترکیب MTT به فورمازان به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد. پس از ۴ ساعت بخش فوقانی مایع چاهک‌ها به آرامی خارج و 100 میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه و جهت حل‌شدن کریستال‌ها به مدت 20 دقیقه در تاریکی قرار گرفت و سپس با استفاده از دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۹۰ نانومتر بررسی شد (Mosmann, 1983). به منظور رسم نمودارها و تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار Excel و SPSS استفاده شد.

۳. نتایج و بحث

همانطور که در شکل ۱-۱ نشان می دهد جهت بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تیمار ۲۴ ساعت غلظت‌های صفر(شاهد)، ۲۰۰ میکرومولار و ۶۰۰ میکرومولار سم دورسبان انجام گرفت که در تیمار ۲۰۰ میکرومولار میزان زنده‌مانی نسبت به تیمار شاهد کاهش معناداری دارد و همچنین تیمار ۶۰۰ میکرومولار نیز نسبت به تیمار شاهد و تیمار ۲۰۰ میکرومولار میزان زنده‌مانی کمتری را نشان می دهد که معنادار می باشد. این چنین می‌توان بیان نمود که با افزایش غلظت سم دورسبان در تیمارها، میزان مرگ سلولی ناشی از سم در سلول های بنیادی مزانشیمی افزایش می یابد.



شکل ۱-۱: نمودار زنده مانی سلول بنیادی مزانشیمی

مطالعات نشان داده است سم دورسبان در غلظت ۵۰ میکرومولار واکنش های اکسیداسیون- احیا را در سلول های سرطانی پستان از حالت تعادل خارج می‌کند و از طریق افزایش سطح درون سلولی پروتئین کیناز p-ERK1/2 موجب کاهش توان تکثیر سلولی می‌شود(Ventura, C.,et al 2015). اگرچه غلظت‌های پایین دورسبان اثر بازدارندگی بر میزان بیان و فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز دارد اما در غلظت‌های کم، میزان آپوپتوز سلولی را افزایش نمی‌دهد. سلول‌های بنیادی عصبی که جهت بررسی‌های تکاملی عصبی ابتدایی به کار می‌روند طی تیمارهای مختلف دورسبان مورد بررسی قرار گرفتد اما تنها در غلظت بالا(۱۲۰ و ۲۴۰ میکرومولار) افزایش مرگ سلولی را نشان دادند اما در غلظت پایین (۰, ۰.۱, ۱, ۱۰, ۲۰, ۳۰ و ۶۰ میکرومولار)مسیر تمایزی را به سلولهای گلیال تقویت کرده در حالی که در تمایز به سلول‌های نورونی تاثیری ندارد(Sandoval, L., et al 2019). همچنین غلظت ۳۰ میکرومولار دورسبان در سلول‌های بنیادی القا شده باعث کاهش بیان ژن PAX6 که در تکامل اولیه نورون زایی نقش دارد می‌شود(Yamada, S., et al 2017). در بررسی که تاثیر دورسبان در تمایز سلول‌های بنیادی موش به سلول های نورونی را مورد بررسی قرار داد مشخص شد افزایش غلظت سم زنده‌مانی سلولی را کاهش داده و در غلظت ۴۶۰ میکرومولار نیمی از سلول‌ها آپوپتوز شده اند(Zarei, M. H.,et al 2016). در این بررسی با توجه به مطالعات صورت گرفته و با استفاده از روش MTT میزان زنده ماندن سلول‌های بنیادی مزانشیمی به طورکمی تعیین شد. نتایج حاصل حاکی از افزایش میزان کشندگی سم دورسبان در غلظت‌های بالا بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی است.

۴. نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه امروزه از سموم مختلف ازجمله دورسبان در کشاورزی به وفور استفاده می‌شود این بررسی خاطر نشان می‌کند درصورت در معرض گرفتن افراد در برابر سموم، ممکن است این سموم بر زندمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی که در اکثر بافت های بزرگسالان وجود دارد تاثیر گذاشته و مرگ سلولی را افزایش دهد. از سوی در صورت جراحت یا بیماری ها احتمال ترمیم بافت ها نیز کاهش می‌یابد.

منابع

1- Brown, C., McKee, C., Bakshi, S., Walker, K., Hakman, E., Halassy, S., ... & Chaudhry, G. R. (2019). Mesenchymal stem cells: cell therapy and regeneration potential. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, *13*(9), 1738-1755.
2- Sobhani, A., Khanlarkhani, N., Baazm, M., Mohammadzadeh, F., Najafi, A., Mehdinejadiani, S., & Aval, F. S. (2017). Multipotent stem cell and current application. *Acta Medica Iranica*, 6-23.
3- Inden, M., Yanagisawa, D., Hijioka, M., & Kitamura, Y. (2016). Therapeutic effects of mesenchymal stem cells for Parkinson's disease. *Ann Neurodegener Dis*, *1*(1), 1002-1009.
4- Horwitz, E. M., Andreef, M., & Frassoni, F. (2006). Mesenchymal stromal cells. *Current opinion in hematology*, *13*(6), 419.
5- Limke, T. L., & Rao, M. S. (2002). Neural stem cells in aging and disease. *Journal of cellular and molecular medicine*, *6*(4), 475-496.
6- Salehi, M., Asgari, A. R., & Ahmadi, S. (2013). The role of paraoxon toxicity on oxidative stress induction in rat heart and spleen. *ZUMS Journal*, *21*(84), 13-23.
7- Monnet-Tschudi, F., Zurich, M. G., Schilter, B., Costa, L. G., & Honegger, P. (2000). Maturation-dependent effects of chlorpyrifos and parathion and their oxygen analogs on acetylcholinesterase and neuronal and glial markers in aggregating brain cell cultures. *Toxicology and applied pharmacology*, *165*(3), 175-183.
8- Garcia, S. J., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (2003). Developmental neurotoxicity elicited by prenatal or postnatal chlorpyrifos exposure: effects on neurospecific proteins indicate changing vulnerabilities. *Environmental health perspectives*, *111*(3), 297-303.
9- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, 65(1-2), 55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
10- Ventura, C., Venturino, A., Miret, N., Randi, A., Rivera, E., Núñez, M., & Cocca, C. (2015). Chlorpyrifos inhibits cell proliferation through ERK1/2 phosphorylation in breast cancer cell lines. *Chemosphere*, *120*, 343-350.
11- Sandoval, L., Rosca, A., Oniga, A., Zambrano, A., Ramos, J. J., González, M. C., ... & Motas, M. (2019). Effects of chlorpyrifos on cell death and cellular phenotypic specification of human neural stem cells. *Science of The Total Environment*, *683*, 445-454.
12- Yamada, S., Kubo, Y., Yamazaki, D., Sekino, Y., & Kanda, Y. (2017). Chlorpyrifos inhibits neural induction via Mfn1-mediated mitochondrial dysfunction in human induced pluripotent stem cells. *Scientific reports*, *7*(1), 1-12.

13- Zarei, M. H., Soodi, M., Qasemian-Lemraski, M., Jafarzadeh, E., & Taha, M. F. (2016). Study of the chlorpyrifos neurotoxicity using neural differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Environmental toxicology*, *31*(11), 1510-1519.

Insilico Analysis and comparison of Rubisco large subunit anti-diabetic bioactive peptides in vegetables

Seyedeh Fahimeh Razavi[1*]; Leila Zarandi-Miandoab[2]; Nader Chaparzadeh[3]; Farshad Pouryousef[4]

1- MSc Student of Cellular and Molecular Biology, Biology Department, Faculty of Basic Science, Azarbaijan Shahid Madani University
2- Assistant Professor of Plant Physiology, Biology Department, Faculty of Basic Science, Azarbaijan Shahid Madani University
3- Professor of Plant Physiology, Biology Department, Faculty of Basic Science, Azarbaijan Shahid Madani University
4- MSc Student of Cellular and Molecular Biology, Biology Department, Faculty of Basic Science, Azarbaijan Shahid Madani University

*Corresponding Author Email address: fahimeh.razavi@azaruniv.ac.ir

Abstract
Plant proteins are known precursors of bioactive peptides. To use these peptides, protein sources must be stable and available. Ribulose bisphosphate carboxylase / oxygenase (Rubisco) is a key enzyme in photosynthesis that catalyzes the stabilization of carbon dioxide. This enzyme exists in 4 forms (I, II, III, IV), which form I is characteristic of higher plants and the dominant form. This enzyme is found in all photosynthetic organisms. Is considered to be the most abundant protein on the earth. Rubisco is a 560 kDa multi-subunit protein that is classically composed of eight large (catalytic) and eight small (regulatory) subunits to form a hexadecameric protein structure. The results of sequence homogeneity study of large subunits of different plants indicate that large subunits of Rubisco are more protected than small subunits. It is an essential amine among plant proteins. In the present study, the frequency of occurrence of bioactive peptides in the large subunit of basil, spinach, watercress, coriander, parsley and radish as vegetables for daily human consumption was investigated. Antioxidant, antihypertensive, anti-diabetic and anti-inflammatory properties were observed in all vegetables studied. The data of this study showed that in general, the large subunit of Rubisco in all types of vegetables studied had a greater ability to control diabetes and then cope with high blood pressure than other activities. Simulations of human gastrointestinal enzymatic digestion conditions for the large Rubisco subunit in radish also resulted in the development of 19 nontoxic anti-diabetic peptides. Reported data suggest new applications for such plants in the pharmaceutical, medical, and food industries.

Keywords: Rubisco, bioactive peptide**,** vegetable, Insilco

آنالیز و مقایسه Insilico پپتیدهای زیست فعال ضددیابت زیر واحد بزرگ روبیسکو در سبزیجات

سیده فهیمه رضوی[1*]؛ لیلا زرندی میاندوآب[2]؛ نادر چاپارزاده[3]؛ فرشاد پوریوسف[4]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

۲- استادیار فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

۳- استاد فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

۴- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: fahimeh.razavi@azaruniv.ac.ir

چکیده

پروتئین‌های گیاهی پیش‌سازهای شناخته شده پپتیدهای فعال زیستی هستند. جهت استفاده از این پپتیدها، منابع پروتئینی باید پایدار و در دسترس باشند. ریبولوز بیس فسفات کربوکسیلاز/اکسیژناز (Rubisco) یک آنزیم کلیدی در فتوسنتز است که تثبیت دی‌اکسیدکربن را کاتالیز می‌کند. این آنزیم به ۴ شکل (I,II,III,IV) وجود دارد که فرم I مشخصه گیاهان عالی و فرم غالب روبیسکو است. این آنزیم در همه موجودات فتوسنتز کننده وجود دارد، از این رو این آنزیم به‌عنوان فراوان‌ترین پروتئین روی کره زمین در نظر گرفته می‌شود. روبیسکو یک پروتئین چندزیرواحدی با وزن مولکولی ۵۶۰ کیلودالتون است که به طور کلاسیک از هشت زیرواحد بزرگ (کاتالیزوری) و هشت زیرواحد کوچک (تنظیمی) تشکیل شده است تا یک ساختار پروتئینی هگزادکامریک تشکیل شود. نتایج بررسی هم‌ترازی توالی زیر واحد بزرگ روبیسکو گیاهان مختلف مبین آن است که زیر واحد بزرگ روبیسکو نسبت به زیر واحد کوچک محافظت شده‌تر است، همچنین از نقطه نظر تغذیه زیر واحد بزرگ پروتئین روبیسکو دارای ترکیب فوق العاده ایده‌آلی از اسیدهای‌آمینه ضروری در بین پروتئین‌های گیاهی است. در مطالعه حاضر فراوانی وقوع پپتیدهای زیست فعال در زیر واحد بزرگ روبیسکو گروه سبزیجات ریحان، اسفناج، شاهی، گشنیز، جعفری و تربچه به‌عنوان سبزیجات مصرفی روزانه انسان مورد بررسی قرار گرفت. خواص آنتی‌اکسیدان، ضدفشارخون، ضد دیابت و ضد التهاب در همه سبزیجات مورد مطالعه مشاهده شد. داده‌های این پژوهش نشان دادند که به طور کلی زیرواحد بزرگ روبیسکو در همه انواع سبزیجات مورد مطالعه توانایی بیشتری در مهار دیابت و سپس مقابله با فشارخون بالا نسبت به سایر فعالیت‌های مورد بررسی از خود نشان دادند. همچنین شبیه‌سازی شرایط هضم آنزیمی دستگاه گوارش انسان برای زیرواحد بزرگ روبیسکو در تربچه به ایجاد۱۹ نوع پپتید ضددیابت غیرسمی انجامید. داده‌های گزارش شده کاربردهای جدیدی را برای چنین گیاهانی در زمینه داروسازی، پزشکی و همچنین صنایع غذایی مطرح می‌کند.

واژگان کلیدی: Rubisco، پپتید زیست فعال، سبزی، Insilico

۱.مقدمه

ما می‌دانیم که مصرف روزانه سبزیجات به طور روزانه با سلامتی مطلوب در طول زندگی همراه است. در سطح بین‌المللی، دستورالعمل‌های رژیم غذایی مبتنی بر غذا، مصرف انواع سبزیجات و میوه‌ها را تشویق می‌کنند، اما در سطح جهانی، مردم دستورالعمل مصرف سه مرتبه یا بیشتر سبزیجات را در طول روز را رعایت نمی‌کنند. سبزیجات منابع خوبی از ویتامین‌ها و مواد معدنی، فیبر و

بسیاری از ترکیبات فعال زیستی هستند که سلامتی را ارتقا می‌دهند و انرژی را تامین می‌کنند (Rush et al., 2019). به طور کلی گیاهان قادر به بیوسنتز طیف وسیعی از ترکیبات و متابولیت‌های اولیه و ثانویه هستند و در این امر که نقش دارو داشته باشند، پیش رو هستند. در سال‌های اخیر علاوه بر ترکیبات مذکور، ترکیبات نوظهوری به نام "زیست فعال" مورد توجه قرارگرفته‌اند. تاکنون ترکیبات زیست فعال زیادی از انواع پروتئین و چربی‌ها گزارش شده است، با این وجود ترکیبات مشتق شده از پروتئین‌ها جزء متداول‌ترین انواع مورد مطالعه هستند (Shahidi and Zhong, 2008). ریبولوز ۱و۵ بیس فسفات کربوکسیلاز / اکسیژناز (RuBisCO) آنزیم اصلی در فتوسنتز و تنفس نوری در گیاهان است (Udenigwe et al., 2013). ساختار هترو هگزادکامری پروتئین روبیسکو با وزن ۵۴۰کیلودالتون است که ۸ زیر واحد بزرگ با وزن (هر زنجیره ۵۰ تا ۵۵ کیلودالتون) و ۸ زیر واحد کوچک با وزن (هر زنجیره ۱۲ تا ۱۸ کیلودالتون) دارد (Andersson and Backlund, 2008). این آنزیم به‌عنوان فراوان‌ترین پروتئین زمین، با تخمین سهم بیش از نیمی از کل پروتئین‌های محلول در برگ گیاهان، معرفی شده است (Udenigwe and Howard, 2013) بنابراین، روبیسکو می‌تواند یک منبع جذاب و پایدار زیست فعال باشد (Udenigwe et al., 2017). در چند سال اخیر، ابزارها و پایگاه‌های بیوانفورماتیکی به‌عنوان یک استراتژی مقرون به صرفه در هزینه و وقت، همچنین توانمند در استخراج گسترده پپتیدهای فعال زیستی از پیش‌سازهای پروتئینی بسیار مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Lacroix and Li-Chan, 2012). هدف از این مطالعه آنالیز و مقایسه Insilico انواع عمکلرد زیر واحد بزرگ آنزیم روبیسکو در گروه سبزیجات ریحان، اسفناج، شاهی، گشنیز، جعفری و تربچه و مقایسه میزان فراوانی وقوع پپتیدهای زیست فعال (A) در این گروه از سبزیجات مصرفی روزانه انسان و همچنین بررسی پپتیدهای زیست فعال ضد دیابت توسط ابزارهای بیوانفورماتیکی بود. داده‌های گزارش شده کاربردهای جدیدی را برای سبزیجات در زمینه داروسازی، و همچنین صنایع غذایی مطرح می‌کند.

۲.مواد و روش‌ها

۲-۱- توالی زیرواحدهای بزرگ و کوچک پروتئین روبیسکو در سبزیجات مصرفی روزانه

توالی زیرواحدهای بزرگ و کوچک پروتئین روبیسکو در گروه سبزیجات ریحان (A0A1Y0JYC2)، اسفناج (P00875)، شاهی (A0A6H1U9R7)، گشنیز (Q05579)، جعفری (A0A1B0YYU0) و تربچه (A0A249RTY5) با کدهای دسترسی ذکر شده از پایگاه داده UniProtKB/Swiss-Prot به آدرس (www.uniprot.org) به دست آمد.

۲-۲- فراوانی وقوع پپتید

فراوانی وقوع قطعات پپتیدی زیست فعال در توالی اولیه (A) در هر زیر واحد روبیسکو در سبزیجات مصرفی روزانه ریحان، اسفناج، شاهی، گشنیز، جعفری و تربچه از طریق پایگاه BIOPEP به دست آمد. اگر متصور شویم "N" تعداد کل باقی مانده اسیدهای آمینه در پروتئین و "a" نشان دهنده تعداد پپتیدهای فعال زیستی پنهان در یک توالی پروتئینی باشد، می‌توانیم فراوانی وقوع پپتیدهای زیست فعال در این پروتئین را به صورت A = a / N گزارش کنیم (Dziuba et al., 1999). در این مطالعه فعالیت‌های زیستی مرتبط با سلامت انسان شامل توانایی مهار، Angiotensin-converting enzyme (ACE)، Dipeptidyl peptidase IV و همچنین فعالیت Antioxidative و anti inflammatory، مورد بررسی قرار گرفت. برای هر فعالیت زیستی، مقادیر A برای زیر واحد بزرگ روبیسکو در سبزیجات مقایسه و نتایج در جدول ۱ ارائه شد.

۲-۳- شبیه‌سازی هضم دستگاه گوارش با تجزیه زیر واحد بزرگ پروتئین روبیسکو به وسیله آنزیم‌های گوارشی

شبیه‌سازی هضم آنزیمی دستگاه گوارش برای زیر واحد بزرگ پروتئین روبیسکو تربچه با اعمال همزمان اثر آنزیم‌های گوارشی تریپسین (EC 3.4.21.4) ، کیموتریپسین (EC 3.4.21.1) و پپسین (EC 3.4.23.1) از طریق پایگاه BIOPEP انجام شد و نتایج آن در جدول۲ ارائه شد.

۲-۴- پیش‌بینی سمیت پپتیدها

پیش‌بینی سمیت پپتیدهای زیست فعال ضددیابت حاصل از هضم زیر واحد بزرگ پروتئین روبیسکو تربچه با استفاده از ابزار آنلاین ToxinPred مورد بررسی قرار گرفت. روش پیش‌بینی مبتنی بر support vector machine (SVM) با مقدار آستانه ۰/۰ انتخاب شد. مقدار آستانه (۰/۰) برای جداسازی پپتیدهای سمی و غیر سمی استفاده شد. نتایج مربوط به این بخش در جدول۲ ارائه شد.

۳. نتایج و بحث

جدول ۱ میزان وقوع پپتیدهای فعال پنهان در زیر واحدهای روبیسکو را برای فعالیت‌های زیستی انتخاب شده نشان می‌دهد. با توجه به داده‌ها بیشترین میزان فراوانی وقوع پپتیدهای زیست فعال در زیر واحد بزرگ روبیسکو در گروه ریزجلبک‌ها مربوط به dipeptidyl peptidase IV inhibitor گزارش شد. DPP4 یک سرین‌پروتئاز است (Deacon, 2019) که واسطه غیرفعال شدن شبه گلوکاگون پپتید -۱ (GLP-1) و پلی‌پپتید بازدارنده معده (GIP) می‌شود. هر دو این هورمون‌های اینتگرینی سبب افزایش ترشح انسولین و بهبود تحمل گلوکز می‌شوند. بنابراین، پپتیدهای مهارکننده DPP4 می‌توانند عوامل عملکردی امیدوارکننده‌ای برای درمان دیابت نوع ۲درنظر گرفته شوند (Liu et al., 2019). با توجه به جدول۱، بیشترین الگوی ارزشA در dipeptidyl peptidase IV inhibitor برای تربچه (A= 0.6493) و کمترین آن برای سبزی گشیز (A= 0.5918) تخمین زده شد.

آنزیم ACE به‌عنوان تنظیم کننده فشار خون در سیستم رنین- آنژیوتانسین (Zhang and Zhang, 2013) نقش مهمی در آسیب شناسی بیماری‌های قلبی عروقی دارد. مطالعات نشان داده‌اند که مهارکننده‌های ACE می‌توانند با جلوگیری از تولید آنژیوتانسین II، به عنوان منقبض‌کننده قدرتمند عروق، فشار خون بالا را به طور بالقوه کاهش دهند (Lavoie and Sigmund, 2003). به طور کلی با توجه به جدول۱، تمام سبزیجات پس از خاصیت DPP4 inhibitor، الگوی ارزش بالایی از A در خاصیت مهارکنندگی فشارخون بالا نسبت به سایر فعالیت‌های زیستی بررسی شده از خود نشان دادند. سبزی جعفری با میزان 0.6075 بیشترین میزان ارزشA و سبزی گشنیز با میزان 0.5170 کمترین میزانA را در این خصوص نشان دادند.

آنتی‌اکسیدان‌ها مواد مهمی هستند که در میوه‌ها و سبزیجات وجود دارند. با افزایش مصرف آنها به صورت خام و فرآوری شده، یک رژیم غذایی غنی از سبزیجات و میوه‌ها می‌تواند خطر ابتلا به بیماری‌های مزمن انسانی را کاهش دهد، برای مثال مصرف رژیم غذایی سرشار از سبزیجات آنتی‌اکسیدان زندگی انسان را با کاهش خطر ابتلا به انواع مختلف سرطان، ویژه دهان و همچنین سرطان حلق، مری، ریه، معده و روده بزرگ مرتبط است (Jideani et al., 2021). در مورد فعالیت آنتی‌اکسیداتیو، زیرواحدهای بزرگ روبیسکو در گروه سبزیجات به ترتیب دارای الگوی ارزش جعفری (0.6075)، تربچه (0.5637)، شاهی (0.5553)، ریحان (0.5409)، اسفناج (0.5221) و گشنیز (0.5170) گزارش شدند.

التهاب اولین پاسخ بیولوژیکی سیستم ایمنی بدن به عفونت، آسیب یا تحریک است. شواهد نشان می‌دهد که اثر ضدالتهابی از طریق تنظیم سایتوکاین‌های التهابی مختلف، مانند اکسیدنیتریک، اینترلوکین‌ها، فاکتور نکروز تومور آلفا، اینترفرون گاما و همچنین پروستاگلاندین E2، انجام می‌شود. اثبات شده است که سبزیجات حاوی موادی هستند که اثر ضدالتهابی نشان می‌دهند، اما مکانیسم عملکرد آنها به طور کامل شناسایی نشده است (Zhu et al., 2018). در خصوص فعالیت ضدالتهابی این گروه از سبزیجات با توجه به جدول۱، بیشترین الگوی ارزشA به طور مشترک مربوط به ریحان، شاهی و تربچه گزارش شد.

جدول۱، میزان وقوع پپتیدهای فعال پنهان (A) در زیر واحد بزرگ روبیسکو را برای فعالیت‌های زیستی انتخاب شده نشان می‌دهد. بیشترین میزان الگوی ارزشA موجود در زیر واحد بزرگ پروتئین روبیسکو در سبزیجات مصرفی روزانه مربوط به قابلیت مهار کننده dipeptidyl peptidase IV بود.

protein	organism	Uniprotkb swiss-prot	ACE inhibitor	antioxidative	dipeptidyl peptidase IV inhibitor	anti inflammatory
Rubisco large chain	Ocimum basilicum	A0A1Y0JYC2	0.5409	0.0860	0.6457	0.0084
Rubisco large chain	Spinach	P00875	0.5221	0.0863	0.6358	0.0063
Rubisco large chain	Lepidium sativum	A0A6H1U9R7	0.5553	0.0877	0.6472	0.0084
Rubisco large chain	Coriandrum sativum	Q05579	0.5170	0.0771	0.5918	0.0068
Rubisco large chain	Petroselinum crispum	A0A1B0YYU0	0.6075	0.1075	0.6355	0.0047
Rubisco large chain	Raphanus sativus var. sativus	A0A249RTY5	0.5637	0.0856	0.6493	0.0084

جدول ۱:میزان وقوع پپتیدهای فعال پنهان در زیر واحد بزرگ روبیسکو را برای فعالیت‌های زیستی انتخاب شده نشان می‌دهد.

بر اساس جدول۱، بیشترین میزان الگوی ارزشA در میان گروه سبزیجات انتخاب شده برای فعالیت زیستی dipeptidyl peptidase IV inhibitor گزارش شد. همچنین از میان تمام سبزیجات بیشترین میزان وقوع قطعات پپتیدی زیست فعال در توالی اولیه به تربچه اختصاص یافت. از این رو لیست پپتیدهای ضد دیابت حاصل از هضم آنزیمی همزمان سه آنزیم دخیل در تجزیه گوارشی زیر واحد بزرگ آنزیم روبیسکو تربچه در دستگاه گوارش در جدول۲ گزارش شده است. طبق این جدول دی پپتیدهای AH, PL, GL, AL, VW, VN, VL, VH, VF, TK, TF, PW, PK, IH, GH, GF, EY, DR, DN ضد دیابت (dipeptidyl peptidase IV inhibitor) اعلام شدند. سمیت پپتیدهای مهارکننده ممکن است از توسعه مصرف پپتیدهای فعال به‌عنوان مواد غذایی مفید جلوگیری کند، لذا در این مطالعه پس از بررسی ۱۹ نوع پپتید زیست فعال ضد دیابت گزارش شده از تربچه، همگی غیرسمی گزارش شدند (جدول۲). بنابراین، این پپتیدها پس از بررسی‌های آزمایشگاهی و تجربی و غیره می‌توانند به‌عنوان گزینه مناسبی در سنتز غذایی یا دارویی و عملکردی برای مصارف انسانی پیشنهاد شوند.

جدول۲، شبیه‌سازی شرایط هضم آنزیمی گوارشی برای توالی زیر واحد بزرگ پروتئین روبیسکو تربچه و پپتیدهای زیست فعال ضد دیابت و لیست توالی ۱۹ نوع پپتید زیست فعال ضد دیابت پس از هضم با آنزیم‌های پپسین، تریپسین و کیموتریپسین که همگی غیرسمی گزارش شدند.

Proteins	EZ	Peptides	Activity	Toxicity prediction

Rubisco large chain of Raphanus sativus var. sativus	Pepsin (EC 3.4.23.1), trypsin (EC 3.4.21.4) chymotrypsin A (EC 3.4.21.1)	AL	Dpp4 inhibitor	Non-Toxin
		GL	Dpp4 inhibitor	Non-Toxin
		PL	Dpp4 inhibitor	Non-Toxin
		AH	Dpp4 inhibitor	Non-Toxin
		DN	Dpp4 inhibitor	Non-Toxin
		DR	Dpp4 inhibitor	Non-Toxin
		EY	Dpp4 inhibitor	Non-Toxin
		GF	Dpp4 inhibitor	Non-Toxin
		GH	Dpp4 inhibitor	Non-Toxin
		IH	Dpp4 inhibitor	Non-Toxin
		PK	Dpp4 inhibitor	Non-Toxin
		PW	Dpp4 inhibitor	Non-Toxin
		VW	Dpp4 inhibitor	Non-Toxin
		TF	Dpp4 inhibitor	Non-Toxin
		TK	Dpp4 inhibitor	Non-Toxin
		VF	Dpp4 inhibitor	Non-Toxin
		VH	Dpp4 inhibitor	Non-Toxin
		VL	Dpp4 inhibitor	Non-Toxin
		VN	Dpp4 inhibitor	Non-Toxin

جدول۲: هضم گوارشی زیرواحد بزرگ پروتئین روبیسکو تربچه و توالی ۱۹ نوع پپتید ضد دیابت غیرسمی را نشان می‌دهد.

۴. نتیجه‌گیری

مصرف روزانه سبزیجات ضامن سلامتی انسان می‌باشد. افزودن سبزیجات به وعده‌های غذایی، انسان را از بروز بیماری‌های مزمن مانند بیماری‌های قلبی، دیابت، سرطان و چاقی محافظت می‌نماید. بر اساس تجزیه و تحلیل in silico این مطالعه، زیر واحد بزرگ پروتئین روبیسکو موجود در سبزیجات مصرفی روزانه رژیم غذایی انسان می‌توان نتیجه گرفت که زیر واحد بزرگ این پروتئین دارای چشم اندازهای خوبی به‌عنوان پیش‌ساز پپتیدهای فعال زیستی است. با توجه به اهمیت بالای تغذیه‌ای گروه سبزیجات و همچنین فراوانی طبیعی روبیسکو در انواع گیاهان، این پروتئین برای تولید و استخراج پپتیدهای زیست‌فعال از سبزیجات به‌عنوان چشم‌اندازی بسیار مناسب پیش بینی می‌شود. همچنین در زمینه دارویی به نظر می‌رسد زیر واحد بزرگ آنزیم روبیسکو دارای عملکردهای بیولوژیکی مربوط به مدیریت و درمان بیماری‌های انسانی، مانند دیابت، بیماری‌های قلبی عروقی، التهاب و بیماری‌های مربط به تاثیرات اکسیدان‌ها می باشد. این یافته‌ها، مبین لزوم مطالعات بیشتر و پیشنهاد دهنده تحقیقات تجربی برای بررسی خواص دارویی و برنامه ریزی‌های مناسب تغذیه‌ای این گروه از سبزیجات به‌عنوان منابع روبیسکو و پپتیدهای زیست فعال است.

منابع

1. Andersson I., and Backlund A. 2008. Structure and function of Rubisco. Plant Physiology and Biochemistry, 46(3): 275-291.
2. Deacon C.F. 2019. Physiology and pharmacology of DPP-4 in glucose homeostasis and the treatment of type 2 diabetes. Frontiers in endocrinology, 80(10).
3. Dziuba J., Minkiewicz P., Nałecz D and Iwaniak A. 1999. Database of biologically active peptide sequences. Food/Nahrung, 43(3): 190-195.

4. Jideani A. I., Silungwe H., Takalani T., Omolola A. O., Udeh H. O. and Anyasi, T. A. 2021. Antioxidant-rich natural fruit and vegetable. products and human health, 24(1): 41-67.
5. Lacroix I.M. and Li-Chan E.C. 2012. Evaluation of the potential of dietary proteins as precursors of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitors by an insilico approach. Journal of Functional Foods, 4(2): 403-422.
6. Lavoie J.L. and Sigmund C.D. 2003. Minireview: overview of the renin-angiotensin system-an endocrine and paracrine system. Endocrinology, 144(6): 2179-2183.
7. Liu R., Cheng J., and Wu H. 2019. Discovery of food-derived dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides: A review. International journal of molecular sciences, 20(3): 463.
8. Rush E., Savila F.A., Jalili-Moghaddam S., and Amoah I. 2019. Vegetables: New Zealand Children Are Not Eating Enough. Frontiers in nutrition, 134(5).
9. Shahidi F., Zhong Y. 2008. Bioactive peptides. Journal of AOAC international, 91(4): 914-931.
10. Udenigwe C., Okolie C., Qian H., Ohanenye I.C., Agyei D. and Aluko R. 2017. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase as a sustainable and promising plant source of bioactive peptides for food applications. Trends in Food Science & Technology, 69: 74-82.
11. Udenigwe C.C., Gong M. and Wu S. 2013. In silico analysis of the large and small subunits of cereal RuBisCO as precursors of cryptic bioactive peptides. Process Biochemistry, 48(11): 1794-1799.
12. Udenigwe C.C., Howard A. 2013. Meat proteome as source of functional biopeptides. Food Research International. 54(1): 1021-1032.
13. Zhang B. and Zhang X. 2013. Separation and nanoencapsulation of antitumor polypeptide from Spirulina platensis. Biotechnology progress, 29(5): 1230-1238.
14. Zhu F., Du B., and Xu B. 2018. Anti-inflammatory effects of phytochemicals from fruits, vegetables, and food legumes A review. Critical reviews in food science and nutrition, 58(8): 1260-1270.

Assessment of pH effect on solubilization of inclusion body of recombinant Receptor Binding Domain in Spike protein

Maliheh Darvish[1*]; Seyed Omid Ranaei Siadat [2] ; Zahra Mousavi nejad[1]

1- Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran
2- Department Biochemistry, Protein Research Center, Shahid Beheshti University, G.C. Evin, Tehran

* Email: malihehdarvish67@gmail.com

Abstract

Receptor Binding Domain (RBD) of Spike protein in SARS-CoV-2 is a significant target to defend against covid-19 either by developing vaccines or producing drugs and inhibitors. High expression of recombinant RBD in E.coli leads to intracellular accumulation of protein as inclusion bodies. Solubilization of inclusion bodies is a main bottleneck for efficient recovery of the expressed RBD as bioactive protein. Using conventional methods such as a high concentration of chaotropic solvents to solubilize inclusion body disturbs the secondary structure of RBD and after removing the chaotropic salts, expoture of hydrophobic patches increases tendency of protein aggregation that results in low recovery of bioactive protein. During mild solubilization process which includes low concentration of urea at pH12 , it is expected by protecting of the native-like secondary structures subsequently reducing protein aggregation, yield of recovered bioactive RBD will increase.

RBD protein was overexpressed in E.coli as inclusion body. Separating of expressed RBD was done in two steps: first step was cell lysis leading to Inclusion Body isolation from cell debris and second step was solubilization of RBD Inclusion Bodies. To have bioactive form of RBD, mild solubilization at alkaline pH following refolding during purification were performed. Buffers containing 2-6 M urea as chaotropic agent at 8-12 pH were utilized to solubilize isolated Inclusion Bodies after cell lysis. Alkaline pH in IB's renaturation resulted in lower aggregation of RBD protein during refolding and upgraded recovery percent of RBD from inclusion bodies. The efficiency of RBD recovery from inclusion body improved by increasing pH from 8 to 12. The highest recovery percent of protein was about 50%, related to solubilization of inclusion body using 4 mol L^{-1} Urea, pH 12.

Mild solubilization methods were developed to protect native-like structures and provide an alternative to high concentration of chaotropes. In this study, the pH-based method to recover recombinant RBD from Inclusion bodies of E.coli has been described. we have demonstrated that Inclusion bodies solubilization using low concentration of denaturant at alkali pH can improve not only the purity of recombinant RBD after solubilization but also the biological activity post protein refolding. Furthermore, pH based solubilization reduced aggregation during refolding of protein.

Keywords: Mild Solubilization, Inclusion Body, Recovery, Aggregation, Chaotropic salts

بررسی اثر pH بر حل شدن انکلوژن‌بادی دامین اتصالی به گیرنده پروتئین spike نوترکیب

ملیحه درویش[1*]؛ سید امید رعنایی سیادت[2]؛ سیده زهرا موسوی‌نژاد[1]

۱- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران
۲- گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات پروتئین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

Email: malihehdarvish67@gmail.com

چکیده

دامین اتصال به گیرنده‌ی (RBD) پروتئین spike در ویروس SARS-CoV-2 هدف اصلی برای مقابله با بیماری کووید-۱۹ با تولید واکسن یا داروها و مهارکننده‌ها است. بیان بالای RBD نوترکیب در باکتری E.coli منجر به تجمع درون سلولی پروتئین به صورت انکلوژن بادی می‌شود. محلول کردن انکلوژن بادی‌ها مرحله‌ی محدودکننده در بدست آوردن بالاترین درصد RBD بیان شده به شکل پروتئین نوترکیب محسوب می‌شود. استفاده از روش‌های متداول از قبیل غلظت بالای حلال‌های کائوتروپیک برای حل کردن انکلوژن بادی‌ها می‌تواند ساختار دوم RBD را بهم بزند و با حذف نمک‌های کائوتروپیک، پچ‌های هیدروفوبی در معرض بیشتری قرار گرفته که منجر به افزایش تمایل پروتئین به ساختار اگریگه می‌شود و درنتیجه آن مقدار ریکاوری پروتئین زیست فعال کاهش می‌یابد. در حین فرایند محلول کردن به صورت ضعیف که حاوی غلظت پایینیتی از اوره در pH ۱۲ است، انتظار می‌رود با جلوگیری از تشکیل ساختارهای ثانویه شبه بومی و به دنبال آن کاهش اگریگیشن پروتئین، یازده ریکاوری RBD افزایش یابد.

پروتئین RBD در باکتری E.coli به صورت انکلوژن بادی بیان شد. جداسازی RBD بیان شده در دو مرحله انجام شد: اولین مرحله، شکست سلولی است که منجر به جداسازی انکلوژن بادی از خرده سلولی می‌شود و دومین مرحله محلول سازی انکلوژن بادی RBD است. برای بدست آوردن شکل زیست فعال RBD روش محلول کردن انکلوژن بادی در pH قلیایی و به دنبال آن فولدینگ همزمان با تخلیص انجام شد به این صورت که از بافرهای اوره با غلظت ۲ تا ۶ مولار در pH های ۸ تا ۱۲ استفاده شد. pH قلیایی در رناتوراسیون انکلوژن بادی ها اگریگیشن پروتئین RBD را حین فولدینگ کاهش و درصد ریکاوری RBD از انکلوژن بادی را افزایش می‌دهد. بازدهی ریکاوری پروتئین RBD از حالت انکلوژن بادی با افزایش pH از ۸ تا ۱۲ بهبود یافت به طوری که بالاترین درصد ریکاوری پروتئین حدود ۵۰٪ مربوط به بافر اوره ۴ مولار ، pH ۱۲ است.

روش‌های حل شدن ضعیف انکلوژن بادی برای جلوگیری از تشکیل ساختارهای مشابه ساختار اصلی و به عنوان روش جایگزین غلظت‌های بالای کائوتروپ‌ها مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه روش برپایه pH برای ریکاوری RBD از انکلوژن‌بادی شرح داده شد. این مطالعه نشان داد که حل کردن انکلوژن‌بادی با استفاده از غلظت کم ماده دناتوره کننده در pH قلیایی نه تنها باعث بهبود خلوص RBD نوترکیب می‌شود بلکه فعالیت زیستی پروتئین بعد از فولدینگ مجدد حفظ می‌شود. بعلاوه، حل کردن برپایه pH اگریگیشن را طی فرایند فولدینگ پروتئین کاهش می‌دهد.

واژگان کلیدی: حل شدن ضعیف، انکلوژن بادی، ریکاوری، اگریگیشن، نمک‌های کائوتروپی

۱.مقدمه

بیان پروتئین نوترکیب در *E.coli*، منجر به تجمع حدواسط‌های پروتئینی به صورت درون سلولی تحت عنوان انکلوژن بادی می‌شود. رناتوراسیون انکلوژن بادی‌های تشکیل شده و تبدیل آن‌ها به فرم زیست فعال پروتئین‌ها، مرحله محدودکننده در ریکاوری محصول نهایی با هزینه به صرفه محسوب می‌شود. بیان پروتئین در دمای بالا، غلظت بالای القاگر و بیان با پروموتور قوی باعث سرعت بالای ترجمه و تشکیل اگریگیت مولکول‌های پروتئینی ناقص فولد شده یا با فولدینگ اشتباه به صورت انکلوژن بادی می‌شود(Cubarsi et al., 2000). برای تولید پروتئین‌های زیست فعال لازم است انکلوژن بادی تحت فرایندهای جداسازی از سلول، حل شدن، فولدینگ مجدد[۱۷۶] و تخلیص قرار بگیرد(A. Singh et al., 2015). در بیشتر مواقع مراحل حل شدن انکلوژن بادی و ریفولدینگ همراه با بازده ریکاوری ضعیفی خواهد بود. با داشتن اطلاعاتی درمورد ساختار و خصوصیات عملکردی پروتئین، می‌توان بازده ریکاوری حل شدن انکلوژن بادی را افزایش داد(Burgess, 2009). در *E.coli* به دلیل اختصاصی بودن اگریگیشن پروتئین، بیشترین محتوای انکلوژن‌بادی‌ها را پروتئین نوترکیب مورد نظر تشکیل می‌دهد. به طور کلی برای حل شدن پروتئین‌های بیان شده به صورت انکلوژن بادی از غلظت‌های بالای نمک‌های کائوتروپیک[۱۷۷] استفاده می‌شود و سپس با حذف این نمک‌ها به حالت native فولد می‌شوند. از جمله اشکالات استفاده ازمولاریته‌ی بالای نمک‌های کائوتروپیک برای حل شدن انکلوژن بادی‌ها، آسیبی است که این ترکیبات به ساختار دوم پروتئین‌ها وارد می‌کنند و پچ‌های هیدروفوبی[۱۷۸] زنجیره پلی پپتیدی در معرض بیشتری قرار گرفته و احتمال شکل‌گیری رسوب[۱۷۹] پروتئینی افزایش می‌یابد و درنتیجه بازده ریکاوری کاهش می‌یابد(Nieba et al., 1997; A. Singh et al., 2015). ویژگی بسیار قابل توجه رسوب‌های پروتئینی در انکلوژن‌بادی‌ها، وجود ساختارهای دوم شبه native[۱۸۰] مربوط به پروتئین بیان شده و اینتراکشن بین مولکولی اختصاصی بین مولکول‌های پروتئین است که باعث شکل‌گیری رسوب پروتئینی می‌شود. انکلوژن‌بادی‌های شکل گرفته در بخش‌های مختلف سلول *E.coli* قرار گرفته و دارای ساختارهای مشابه هستند، که این موضوع نشان داده است که تشکیل انکلوژن بادی در مرحله آخر مسیر فولدینگ پروتئین صورت می‌گیرد. بنابراین پروتئین‌ها بیشترین ساختار دوم خود را حین تشکیل رسوب تا انکلوژن‌بادی حفظ می‌کنند. اگر فولدینگ مجدد پروتئین از این ساختارهای از قبل تشکیل شده آغاز شود بسیار مطلوبتر از زمانی خواهد بود که از مولکول‌های پروتئین کامل فولد نشده استفاده شود. حل شدن[۱۸۱] انکلوژن بادی‌ها با استفاده از روش‌ها و شرایط ضعیف[۱۸۲] بدون آسیب به ساختار دوم شبه native، منجر به ریکاوری پروتئین نوترکیب با بازده بالا می‌شود. منظور از شرایط خفیف استفاده از عوامل حل کننده ضعیف با غلظت پایین و شرایط pH بازی است. غلظت بالای کائوتروپ‌ها ازقبیل اوره و گوانیدین هیدروکلراید باعث دناتوراسیون کامل این ساختارهای دوم می‌شود و اغلب در طی فرایند فولدینگ مجدد باعث رسوب شدن پروتئین‌ها می‌شود(Surinder M Singh et al., 2008; Surinder Mohan Singh & Panda, 2005). ریکاوری پروتئین از انکلوژن بادی‌ها از چهار مرحله تشکیل شده است: جداسازی انکلوژن بادی‌ها از سلول؛ حل شدن انکلوژن بادی؛ فولدینگ مجدد پروتئین حل شده؛ و درنهایت تخلیص پروتئین. حل شدن انکلوژن بادی و فولدینگ درست پروتئین حل شده دو مرحله مهم و اساسی در ریکاوری پروتئین زیست فعال محسوب می‌شوند. فولدینگ

[176] Refolding
[177] Chaotropic Salts
[178] Hydrophobic patches
[179] Aggregates
[180] Native-like second structure
[181] Solubilization
[182] Mild condition

پروتئین‌های حل شـده با سـاختارهای شـبه native در شـرایط خفیف می‌تواند بازده ریکاوری را افزایش دهد(A. Singh et al., 2015).

در این مطالعه برای اثبات این اصـل، پروتئین نوترکیب دامین اتصـالی به گیرنده[۱۸۳] (RBD) در پروتئین spike ویروس SARS-CoV-2 بیان شده در *E.coli* به صورت انکلوژن بادی در بافر با pH قلیایی حاوی غلظت غیر دناتوره کننده از اوره به صورت محلول در می‌آید. ویروس SARS-CoV-2 داری چهار پروتئین سـاختاری اصـلی شـامل گلیکوپروتئین spike (s)، گلیکوپروتئین پوشـشـی (E)، گلیکوپروتئین غشـایی (M) و پروتئین نوکلئوکپسـید (N) اسـت. پروتئین Spike از سـه بخش تشـکیل شـده اسـت: یک بخش اکتودامین بزرگ، یک بخش درون غشا ترانس‌ممبرن و دم درون‌سلولی کوتاه. بخش اکتودامین شامل زیرواحد S1 اتصالی به گیرنده و زیرواحد S2 درون غشـایی می‌باشـد. دامین اتصـالی به گیرنده (RBD) در بخش C-ترمینال زیرواحد S1 قرار دارد. پروتئین نوترکیب RBD به مقدار زیاد در *E.coli* تولید و بیان می‌شود و به دلیل میزان بیان بالا و نبود سیسـتم فولدینگ در پروکاریوت‌ها، RBD تولید شده به صورت انکلوژن بادی استخراج می‌شود. در این مطالعه تلاش شده است شرایط بهینه برای حل شدن انکلوژن بادی RBD بیان شـده در سـویه *E.coli* یافت شـود به طوری که بیشـترین مقدار ریکاوری پروتئین RBD را نتیجه دهد. به این منظور، در مرحله حل شدن انکلوژن بادی RBD، از یافرهای اوره با غلظت‌های مختلف ۲ تا ۶ مولار و در pH های ۸ تا ۱۲ استفاده شد تا میزان ریکاوری پروتئین در هر شرایط بررسی شود و در نهایت بهترین بافر با بالاترین بازده ریکاوری بدست آید(Li, 2016; Tai et al., 2020; Wang et al., 2020).

۲.مواد و روش‌ها

۲-۱-مواد

در این مطالعه سلول‌های *E.coli* بیان کننده پروتئین نوترکیب RBD به صورت انکلوژن بادی استفاده شد. جرئیات پروتئین، کلون و وکتور استفاده شده در مطالعه‌ی دیگری بیان شده است. اوره از شرکت Carlo-erba، Tris-base و سدیم کلراید از شرکت مرک خریداری شد. سیستم الکتروفورز SDS-PAGE از شرکت BioRad خریداری شد.

۲-۲-آماده‌سازی انکلوژن بادی

بیان پروتئین RBD نوترکیب به شکل انکلوژن بادی در باکتری *E.coli* در حضور القاگر IPTG انجام شد به این صورت که سازه ژنی طراحی شده وکتور pET28a حاوی ژن RBD با برچسب 6XHis به روش شوک حرارتی به باکتری مستعد *E.coli* BL21 منتقل شد(Zhao et al., 2005). کلنی‌های باکتری ترنسفورم شده در محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین ۵۰ µg/ml برگزیده شدند. RBD نوترکیب به صورت انکلوژن‌بادی‌هایی طی فرایند کشت بچ با استفاده از باکتری ترنسفورم شده حاوی وکتور نوترکیب در حضور القاگر 1mM IPTG بیان شد. در پی جداسازی رسوب سلولی، سلول‌های باکتری در بافر 50mM Tris-base, 500mM NaCl, 0.5% Triton X-100, pH 8 به صورت سوسپانسیون در آمدند و به روش سونیکاسیون با سیکل‌های ۷ ثانیه پالس، ۳ ثانیه پاس، با قدرت ۲۰۰ وات ۲۰ سیکل و با قدرت ۴۰۰ وات ۴۰ سیکل شکسته شدند. انکلوژن بادی به صورت رسوب بعد از سانتریفیوژ با دور ۹۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ ºC بدست آمد(He et al., 2021; Zhao et al., 2005).

[183] Receptor Binding Domain

۲-۳-تخمین کل محتوای پروتئینی انکلوژن بادی

برای این منظور، انکلوژن بادی حاصل به طور کامل در 1M NaOH به مدت ۹۰دقیقه در حمام آب ۸۰ ºC حل شد. سپس نمونه با دور ۱۴۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محتوای کل پروتئین موجود در سوپرناتانت به روش لوری[۱۸۴] تعیین غلظت شد (BSA به عنوان پروتئین استاندارد مورد استفاده قرار گرفت)(Beiroti et al., 2014; Mohammadian et al., 2018).

۲-۴-تخمین مقدار RBD در انکلوژن بادی حاصل

انکلوژن بادی حاصل در بافر اوره ۴ مولار حل و با دور ۱۴۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب و سوپرناتانت با روش SDS-PAGE از جهت خلوص پروتئین RBD مورد بررسی قرار گرفتند و سپس با روش لوری مقدار پروتئین تخمین زده شد. براساس خلوص RBD و مقدار تخمین زده شده کل پروتئین، مقدار RBD در بخش‌های رسوب و سوپرناتانت و درمجموع مقدار RBD در انکلوژن بادی بدست آمد.

۲-۵-حل کردن انکلوژن بادی‌ها

برای این منظور، رسوب انکلوژن بادی بدست آمده را در بافر 100mM Tris-base بدون اوره و حاوی اوره با غلظت ۲، ۴و ۶ مولار به نسبت (w/v) ٪۵ حل شد. میزان حل شدن انکلوژن بادی در هرکدام از بافرهای ذکر شده در pH ۸، ۹، ۱۰ و ۱۲ مورد بررسی قرار گرفت. بعد از افزودن هر کدام از بافرها به رسوب انکلوژن بادی، نمونه ها ورتکس شد و به مدت نیم ساعت در دمای محیط با دور ۱۵۰ rpm شیک شدند. بعد از انکوباسیون، نمونه ها با دور ۹۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ ºC سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت بر روی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت و با روش لوری تعیین غلظت شد. بازده ریکاوری RBD محلول از حالت انکلوژن بادی در هرکدام از حالت‌های بافری محاسبه شد(Surinder M Singh et al., 2008).

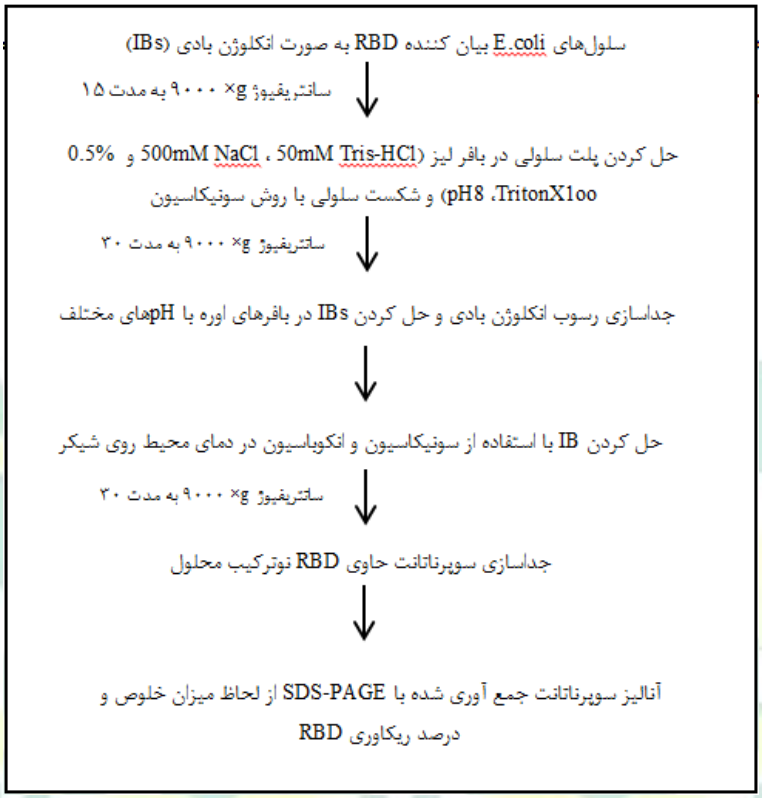
۳.نتایج و بحث

بعد از بیان RBD در سلول‌های *E.coli*، شکست سلولی به روش سونیکاسیون انجام شد تا جداسازی انکلوژن بادی‌ها صورت گیرد. مراحل بدست آوردن انکلوژن بادی در شکل (۱) به طور خلاصه نشان داده شد. پیش از حل کردن انکلوژن بادی‌ها، مقدار پروتئین توتال بیان شده و مقدار انکلوژن بادی اندازه‌گیری شد که به ترتیب ۱۶۰۰ µg/ml و ۷۰۲ بدست آمد. مقدار RBD نوترکیب در انکلوژن بادی بدست آمده ۶۹۲ µg/ml تخمین زده شد که حدود ٪۹۸ کل انکلوژن بادی را تشکیل می‌دهد.

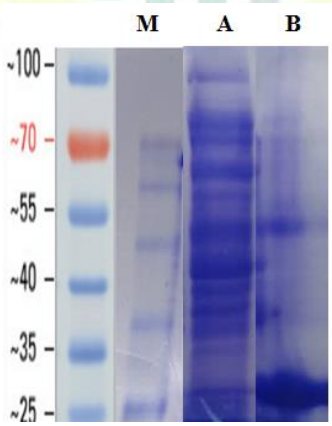
بعد از لیز سلولی و جداسازی سوپرناتانت مرحله اول، حضور پروتئین‌ها در این سوپرناتانت و رسوب انکلوژن بادی روی ژل SDS-PAGE بررسی شد (شکل۲). شکل (۲) نشان می‌دهد که سوپرناتانت مرحله اول شکست سلولی فاقد RBD محلول بوده و سایر پروتئین‌های محلول میزبان باکتریایی در مرحله اول حذف می‌شوند. این درحالی است که با حل کردن مقداری رسوب انکلوژن بادی

[184] Lowey method

در بافر نمونه و آنالیز آن روی ژل SDS-PAGE (شکل۲) کاملا مشهود است که RBD درصد زیادی از انکلوژن بادی را تشکیل می‌دهد. انکلوژن بادی‌های حاوی RBD با غلظت‌های مختلف ماده کائوتروپ (اوره) در pH های مختلف تا pH قلیایی حل شد و بازده ریکاوری پروتئین RBD برای هر کدام محاسبه شد.



شکل ۱: فرایند ریکاوری RBD نوترکیب بیان شده از انکلوژن بادی باکتری *E.coli*



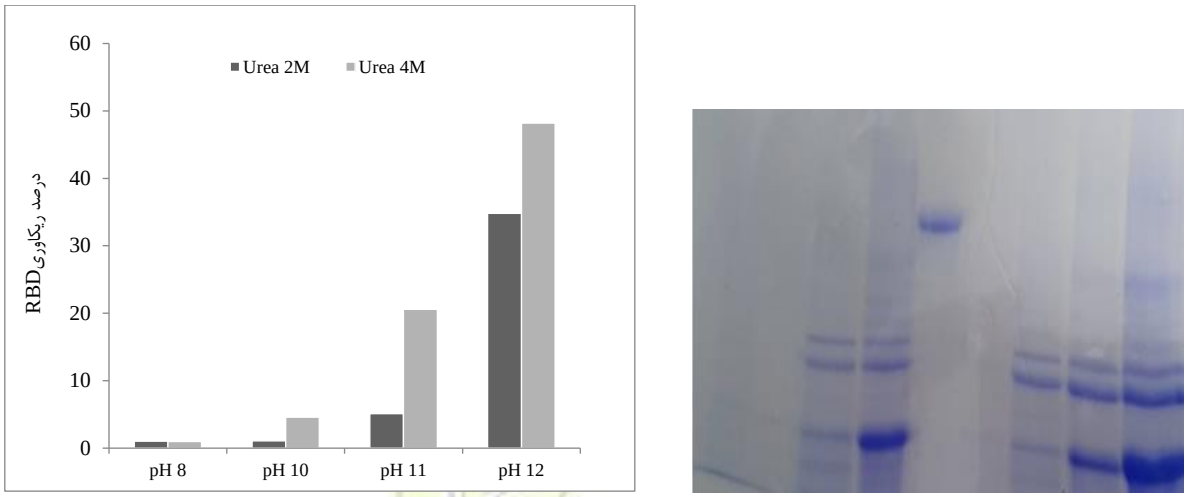
شکل ۲: آنالیز RBD بیان شده در *E.coli* (M) ماکر پروتئینی؛ (A) سوپرناتانت مرحله اول؛ (B) رسوب انکلوژن بادی حاوی RBD

در بررسی اولیه میزان حل شدن انکلوژن بادی در دو غلظت ۲ و ۴ مولار اوره هر کدام در pHهای ۸، ۹، ۱۰ و ۱۲ باهم مقایسه شدند. میزان خلوص و تعیین مقدار کل پروتئین و پروتئین هدف در جدول (۱) نشان داده شده است. براساس جدول (۱) و شکل(۳)، بیشترین بازده ریکاوری RBD از انکلوژن بادی مربوط به استفاده از بافر اوره با غلظت ۴ مولار در pH 12 بوده است و تاثیر pH قلیایی به وضوح در حل شدن انکلوژن بادی کاملا مشهود است. درمرحله بعد، تاثیر تغییر مقدار عامل کائوتروپیک (اوره) در pH ثابت بررسی شد به این صورت که انکلوژن بادی در دو بافر اوره با غلظت های ۴ و ۶ مولار و هردو در pH 12 حل شد. آنالیز نتیجه روی SDS-PAGE با تعیین مقدار RBD مورد بررسی قرار گرفت (جدول۱ و شکل۴). بازده ریکاوری RBD در دو بافر اوره ۴ و ۶ مولار pH12 تقریبا مشابه بوده است در حالی که میزان خلوص RBD محلول در بافر ۶ مولار بیشتر از بافر ۴ مولار اوره است. همانطور که در شکل (۴) مشخص است pH قیلیایی حدود ۱۲ به تنهایی قابلیت حل کردن انکلوژن بادی را ندارد و همراهی عامل کائوتروپیک اوره تا ۴ مولار بازده ریکاوری RBD را بالا می‌برد.

جدول ۱: پارامترهای محاسبه شده در هر کدام از شرایط محلول سازی انکلوژن بادی

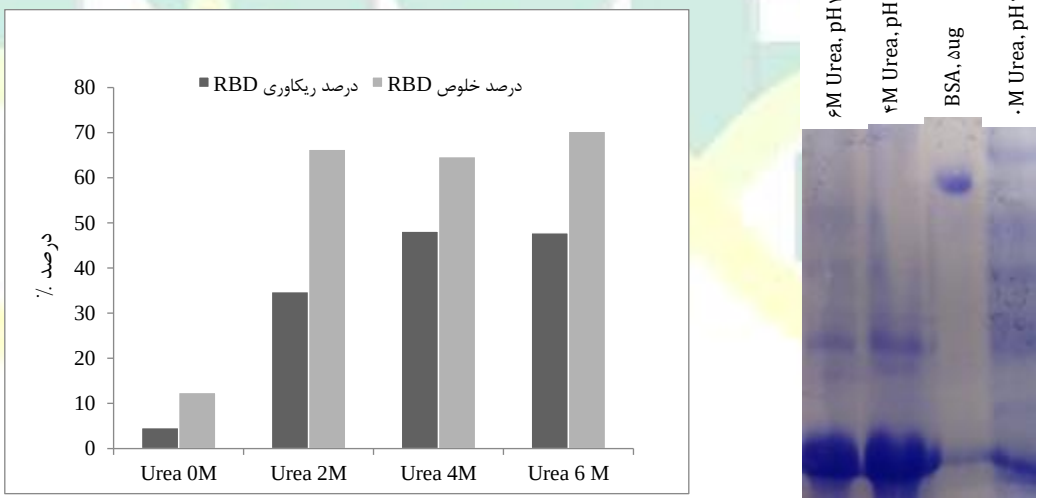
ترکیبات بافر محلول-سازی انکلوژن بادی	میانگین مقدار کل پروتئین در سوپرناتانت (µg/ml)	مقدار RBD نوترکیب در سوپرناتانت (µg/ml)	درصد خلوص RBD نوترکیب در سوپرناتانت (٪)	درصد ریکاوری RBD از انکلوژن بادی (٪)
Urea 2M, pH 8	10.6	10	94.3	1.03
Urea 2M, pH 10	11.03	10.5	95.2	1.1
Urea 2M, pH 11	217.6	47.2	21.7	5.1
Urea 2M, pH 12	484.4	321.42	66.3	34.8
Urea 4M, pH 8	9.97	9.25	92.8	1
Urea 4M, pH 10	229.4	42.5	18.5	4.6
Urea 4M, pH 11	403.8	190.1	47.1	20.6
Urea 4M, pH 12	687.4	444.7	64.7	48.2
Urea 6M, pH 12	627.3	441.2	70.3	47.8
Urea 0M, pH 12	343.1	42.5	12.4	4.6

۴M Urea, pH۱۲
۴M Urea, pH۱۱
۴M Urea, pH۱۰
۴M Urea, pH۸
BSA, ۵ug
۲M Urea, pH۱۲
۲M Urea, pH۱۱
۲M Urea, pH۱۰
۲M Urea, pH۸



شکل ۳ : نتایج SDS-PAGE (سمت راست) حل شدن انکلوژن بادی در بافرهای مختلف؛ نمودار درصد ریکاوری RBD در بافر اوره ۴ و ۲ مولار با pH ۸ تا۱۲ (سمت چپ)

به دلیل اینکه حذف اوره در مرحله بعدی می‌تواند مقدار RBD فولد شده را کاهش دهد و همچنین حضور اوره بیشتر، قابلیت دناتوره کردن پروتئین RBD را دارد و حذف آن نیاز به مراحل رفولدینگ با هزینه بیشتر را می‌طلبد، جهت حل کردن انکلوژن بادی RBD استفاده از بافر اوره ۴مولار با pH ۱۲ به عنوان بهینه‌ترین حالت انتخاب شد. برای حل کردن پروتئین RBD ، pH قلیایی همراه با غلظت نسبتا کم اوره به عنوان حل کننده ضعیف با بیشترین بازده ریکاوری برای این نوع انکلوژن بادی محسوب می‌شود.



شکل ۴: نتایج SDS-PAGE حل شدن انکلوژن بادی در بافر اوره ۶ و ۴ مولار (سمت راست). نمودار درصد ریکاوری RBD در بافر اوره ۰، ۲، ۴ و ۶ مولار با pH ۱۲ (سمت چپ)

با اینکه ریکاوری RBD از حالت انکلوژن بادی با استفاده از غلظت بالای اوره (۸ مولار) بیشتر خواهد بود و نسبت به بافر اوره با غلظت کمتر مقدار پروتئین بیشتری به صورت محلول در می‌آید، اطلاعات بدست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که pH بالا همراه با

غلظت کمتر اوره می‌تواند روش جایگزین استفاده از عوامل کائوتروپیک برای حل کردن انکلوژن بادی باشد. همچنین این مطالعات نشان داده است که pH قلیایی به تنهایی و بدون حضور عامل کائوتروپیک قادر به حل کردن انکلوژن بادی RBD نخواهد بود. الگوی حل شدن انکلوژن بادی پروتئین‌های مختلف براساس اینتراکشن بونی در رسوب پروتئینی متفاوت خواهد بود.
استراتژی‌های تخلیص RBD از چندین مرحله فرایند می‌تواند به فرایند یک مرحله‌ای و به دنبال آن کاهش هزینه تخلیص بهبود یابد. در این مطالعه به دلیل خلوص نسبتا بالای پروتئین نوترکیب RBD بعد از حل شدن انکلوژن بادی با استفاده از مواد شیمیایی و تغییرات pH، نیاز به مراحل مختلف کروماتوگرافی را کاهش می‌دهد. همچنین استفاده از مواد کائوتروپیک با غلظت کم مراحل و هزینه فولدینگ مجدد پروتئین RBD حل شده را کاهش می‌دهد. در مطالعات انجام شده برای بیان پروتئین RBD در سیستم پروکاریوتی و بدست آوردن RBD محلول از اوره با غلظت ۸ مولار استفاده شده که منجر به فرایندهای پرهزینه حذف اوره و چندین مرحله تخلیص شده است. براساس بررسی‌های ما، تاکنون مطالعه‌ای روی خصوصیات ساختاری پروتئین نوترکیب RBD بعد از حل شدن و خروج از حالت انکلوژن بادی و رفولدینگ آن صورت نگرفته است(Vallejo & Rinas, 2004). در مطالعات بعدی رابطه ساختار RBD و روش‌های حل کردن انکلوژن بادی مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

۴. نتیجه‌گیری

روش‌های کلاسیک برای ریکاوری پروتئین‌های نوترکیب از انکلوژن‌بادی‌های تولید شده در *E.coli* براساس استفاده از ترکیبات دناتوره‌کننده با غلظت بالا (از قبیل اوره، گوانیدینیوم هیدروکلراید و دترجنت‌ها) هستند که باعث باز شدن کامل ساختار پروتئین و دناتوره شدن آن‌ها می‌شود. درنتیجه باعث افزایش اگریگه شدن در حین رفولدینگ و کاهش ریکاوری پروتئین می‌شود. بررسی روش‌های حل کردن انکلوژن بادی که باعث حفظ فعالیت زیستی پروتئین نوترکیب، فولدینگ مناسب با هزینه و وقت کم و افزایش ریکاوری آن بسیار حیاتی است(Khan et al., 1998; Vallejo & Rinas, 2004). در این مطالعه با استفاده از غلظت کم ماده کائوتروپیک و تاثیر pH روی حل کردن انکلوژن‌بادی پروتئین مورد نظر قادر بودیم به بازده بالایی از پروتئین RBD برسیم و درعین حال با بدست آوردن خلوص مناسب RBD بدست آمده مراحل بعدی تخلیص را کاهش دهیم.

به طور کلی محدودیت‌های چشمگیر در فرایندهای مقیاس بالای تولید پروتئین نوترکیب محلول در سیستم پروکاریوتی شامل استفاده از غلظت‌های بالای مواد دناتوره کننده، هزینه بالای این مواد و حذف آن‌ها برای رفولدینگ و همچنین تغییرات غیرقابل برگشت ایجاد شده در ساختار پروتئین می‌باشد. در این مطالعه به اثر pH در محلول سازی انکلوژن‌بادی و کمک به عامل دناتوره کننده اوره برای محلول کردن RBD پرداختیم. این روش می‌تواند کاندید روش مناسب برای افزایش ریکاوری پروتئین‌های هدف زیست فعال از انکلوژن‌بادی‌ها در صنعت بیوتکنولوژی باشد.

سپاسگزاری

ابن مطالعه بخشی از پروژه تولید واکسن نوترکیب برپایه RBD علیه ویروس SARS-CoV-2 تحت حمایت شرکت پروتئین نوترکیب سبحان می‌باشد. از همکاران محترم در این شرکت به خصوص جناب آقای دکتر سید احسان رعنائی سیادت، مدیرعامل محترم شرکت، جهت همکاری بی وقفه‌شان کمال تشکر را داریم.

منابع

1. Beiroti, A., Kaveianpour, A., Sepahi, M., Arsalani, F., Tavakoli, P., & Jalalirad, R. (2014). Effect of post-solubilization conditions on the yield and efficiency of recombinant streptokinase purification at large-scale. *PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION*, *June*. https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.06.007
2. Burgess, R. R. (2009). Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 463, Issue 09). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63017-2
3. Cubarsi, R., Y, A. V., & Carrio, M. M. (2000). Fine architecture of bacterial inclusion bodies. *FEBS Letters*, *471*, 7–11.
4. He, Y., Qi, J., & Xiao, L. (2021). Purification and characterization of the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 spike protein from Escherichia coli. *Engineering in Life Sciences*, *21*, 453–460. https://doi.org/10.1002/elsc.202000106
5. Khan, R. H., Rao, K. B. C. A., Eshwari, A. N. S., Totey, S. M., & Panda, A. K. (1998). Solubilization of Recombinant Ovine Growth Hormone with Retention of Native-like Secondary Structure and Its Refolding from the Inclusion Bodies of Escherichia coli. *Biotechnol. Prog*, *189*(98), 722–728.
6. Li, F. (2016). Structure , Function , and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Reviews In Advance*, *18*(20), 1–25. https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301
7. Mohammadian, A., Kaghazian, H., Kavianpour, A., & Jalalirad, R. (2018). Inclusion body proteins solubilization using chemical combinations at low concentrations Alireza. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *93*(6), 1579–1587. https://doi.org/10.1002/j
8. Nieba, L., Honegger, A., & Krebber, C. (1997). Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable / constant domain interface : improved in vivo folding and physical characterization of an engineered scFv fragment. *Zurich Open Repository and Archive*, *10*, 435–444.
9. Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). *Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process*. 1–10. https://doi.org/10.1186/s12934-015-0222-8
10. Singh, Surinder M, Upadhyay, A. K., & Panda, A. K. (2008). *Solubilization at high pH results in improved recovery of proteins from inclusion bodies of E . coli*. *1134*(February), 1126–1134. https://doi.org/10.1002/jctb
11. Singh, Surinder Mohan, & Panda, A. K. (2005). *Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins*. *99*(4), 303–310. https://doi.org/10.1263/jbb.99.303
12. Tai, W., He, L., Zhang, X., Pu, J., & Voronin, D. (2020). Characterization of the receptor-

binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus : implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cellular & Molecular Immunology*, 1–8. https://doi.org/10.1038/s41423-020-0400-4

13. Vallejo, L. F., & Rinas, U. (2004). Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories*, *12*, 1–12. https://doi.org/10.1186/1475-2859-3-11
14. Wang, Y., Wang, L., Cao, H., & Liu, C. (2020). SARS - CoV - 2 S1 is superior to the RBD as a COVID - 19 subunit vaccine antigen. *Medical Virology*, *July*, 1–7. https://doi.org/10.1002/jmv.26320
15. Zhao, J., Zhao, Z., Wang, W., & Gao, X. (2005). Prokaryotic expression , refolding , and purification of fragment 450 – 650 of the spike protein of SARS-coronavirus. *Protein Expression and Purification*, *39*, 169–174. https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.10.004

Insilico analysis and comparison of seafoods with daily human protein bioactive peptides in Prevention of COVID-19

Farshad Pouryousef[1*]; Leila Zarandi-Miandoab[2]; Nader Chaparzadeh[3];Seyedeh Fahimeh Razavi[4]

1- MSc Student of Cellular and Molecular Biology, Biology Department, Faculty of Basic Science, Azarbaijan Shahid Madani University
2- Assistant Professor of Plant Physiology, Biology Department, Faculty of Basic Science, Azarbaijan Shahid Madani University
3- Professor of Plant Physiology, Biology Department, Faculty of Basic Science, Azarbaijan Shahid Madani University
4- MSc Student of Cellular and Molecular Biology, Biology Department, Faculty of Basic Science, Azarbaijan Shahid Madani University

**Corresponding Author Email address : farshadpouryousef2323@gmail.com*

Abstract

prevalence of coronavirus 2019 due to acute respiratory syndrome SARS-CoV-2, which began in late 2019 in Wuhan, China. In a short time it spread all over the world and many people lost their lives due to this epidemic. Although scientists have been looking for ways to manage and control COVID-19, there is still no specific drug to treat COVID-19. The two main approaches to treat COVID-19 are to neutralize the virus and to inhibit the host cell membrane receptors, where the corona virus attaches. The aim of this study was to focus on the insilico study to identify, measure and compare bioactive peptides with the ACE2 inhibitory activity of proteins in seafood and other human daily foods. In this study, Biopep web server was used to get the frequency of occurrence of bioactive peptides (A). This study shows that Beta-actin protein in fish meat and chlorella algae RuBisCo large subunit protein has the highest amount of bioactive peptides with ACE2 inhibitory activity compared to other daily human protein. In this study, the highest probability of bioactivity among peptide assemblies was reported by Peptide Ranker database for CF, FR, SF, DF and TF peptides in fish meat and GF, PL and DF peptides in chlorella algae. Therefore, the results indicate that fish meat and chlorella algae, introduced as a seafood, contain bioactive peptides with ACE2 inhibitory function.

Keywords: Corona virus, Bioinformatics, Bioactive peptide, Seafood, ACE-2 Inhibitory

آنالیز و مقایسه insilico پروتئین های سبد غذایی دریایی انسان با پروتئین های مصرفی روزانه بر پیشگیری از کووید-۱۹

فرشاد پوریوسف[۱*]؛ لیلا زرندی میاندوآب[۲]؛ نادر چاپارزاده[۳]؛ سیده فهیمه رضوی[۴]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

۲- استادیار فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

۳- استاد فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: *farshadpouryousef2323@gmail.com*

چکیده

شیوع بیماری کروناویروس ۲۰۱۹ ناشی از سندرم حاد تنفسی SARS-CoV-2 که در اواخر سال ۲۰۱۹ در ووهان چین آغاز شد. درمدت زمان کوتاهی به سراسر جهان گسترش یافت و افراد بسیاری به دلیل این بیماری همه‌گیر جان خود را از دست دادند. اگرچه دانشمندان به دنبال روش‌هایی برای مدیریت و کنترل COVID-19 بوده‌اند، هنوز داروی خاصی برای مقابله با COVID-19 وجود ندارد. دو رویکرد اصلی که باید در درمان COVID-19 دنبال شود، یکی خنثی کردن خود ویروس و دیگری مهار گیرنده‌های غشاء سلول میزبان است، جایگاهی که ویروس کرونا به آن متصل می‌شود. هدف از این تحقیق، تمرکز بر مطالعه insilico برای شناسایی، بررسی و مقایسه پپتیدهای زیست‌فعال با فعالیت مهارکنندگی ACE2 (جایگاه اتصال ویروس کرونا) در پروتئین‌های موجود در غذاهای دریایی و سایر غذاهای مصرفی روزانه انسان می‌باشد. در این تحقیق برای بدست‌آوردن فراوانی وقوع پپتیدهای زیست‌فعال(A) از وب سرور Biopep استفاده شد. این مطالعه نشان می دهد که پروتئین Beta-actin درگوشت ماهی و زیر واحد بزرگ پروتئین RuBisCo large subunit جلبک کلرلا دارای بیشترین میزان پپتیدهای زیست‌فعال با فعالیت مهارکنندگی ACE2 در مقایسه با سایر پروتئین‌های روزانه مصرفی انسان مورد بررسی در این تحقیق می باشند. همینطور در این مطالعه، بیشینه احتمال زیست‌فعالی در میان مجموعه پپتیدها، توسط پایگاه Peptide Ranker برای پپتید های CF، FR، SF، DF و TF در گوشت ماهی و پپتید های GF، PL و DF در جلبک کلرلا گزارش شد. از این‌رو نتایج نشان‌دهنده آن است که گوشت‌ماهی و جلبک‌کلرلا به عنوان سبدغذایی دریایی معرفی‌شده، دارای پپتیدهای زیست‌فعال با عملکرد مهارکنندگی ACE2 می باشد.

واژگان کلیدی: ویروس کرونا، بیوانفورماتیک، پپتید زیست فعال، غذا های دریایی، ACE-2 Inhibitory

۱.مقدمه

کروناویروس‌ها خانواده بزرگی از ویروس‌ها هستند که باعث ایجاد بیماری‌هایی در رده سرما خوردگی معمولی (برخی از ویروس های خانواده کرونا باعث سرما خوردگی ساده هم می شوند) تا شرایط حادتر مانند SARS-CoV-2 یا MERS-CoV می‌شوند. این ویروس از خانواده Coronaviridae می باشد که برای اولین بار در شهر ووهان چین شناسایی شد(Çakır et al., 2020). شروع شیوع پنومونی غیرعادی COVID-19 در 31 دسامبر 2019، گزارش شد. علایم شایع این بیماری عبارتند از تب، سرفه و تنگی نفس می‌باشند و سایر علایم هم ممکن است بصورت خستگی، درد عضلانی، اسهال، گلودرد، ازدست دادن حس بویایی و درد شکم نیز ظهور کنند(Abdelli et al., 2021).

اگرچه دانشمندان به دنبال روش‌هایی برای مدیریت SARS-CoV-2 هستند، ولی تاکنون دارو خاصی برای مقابله با COVID-19 وجود ندارد. دو رویکرد اصلی که باید در درمان SARS-CoV-2 صورت گیرد، یکی از آن ها خنثی کردن خود ویروس است و دیگری مهار کردن گیرنده های غشای سلول میزبان می باشد(Çakır et al., 2020).

هنگامی که ساختار SARS-CoV-2 شناسایی شد، مشخص شد که کروناویروس ها پروتئین‌های مشترکی دارند که با حروف S (SPIKE)، E (ENVELOPE)، M (MEMBRANE) و N (NUCLEOCAPSID) نام گذاری کرده‌اند. با شناسایی پروتئین‌های مرتبط با نحوه ورود ویروس به درون سلول، محققان بر روی مهار کردن پروتئین‌های دخیل در این مسیر، با استفاده از روش‌های insilico و آزمایشگاهی، تمرکز کرده‌اند(Ratha et al., 2020).

پروتئین اسپایک (S) SARS-CoV-2، یک گلیکوپروتئین سه زیرواحدی گذرنده از غشا می‌باشد که وظیفه شناسایی سلول میزبان را دارد و به عنوان یک واسطه برای ورود به سلول میزبان عمل می‌کند. پروتئین اسپایک دارای یک دومین اتصال به گیرنده (S1) می باشد که به دومین اتصال گیرنده به لیگاند (S2) بر روی گیرنده متصل می‌شود(Çakır et al., 2020).

برای ورود SARS-CoV-2 به داخل سلول میزبان، پروتئازهایی نیز مثل فورین و سرین اندوپپتیداز وابسته به کلسیم نیز نیاز می‌باشد که در غشاء سلول‌های میزبان (سلول‌های ریه) موجود می‌باشد. بعد از اتصال اسپایک ویروس به گیرنده سلول میزبان (S1/S2)، یک محل برش پروتئین S برای پروتئازها در دسترس قرار می گیرد. که بعد از برش باعث تسهیل ورود ویروس به داخل سلول میزبان می گردد. تحقیقات نشان می دهد که برای جلوگیری از آلودگی سلول های ریه توسط SARS-CoV-2، می توان خود گیرنده و یا پروتئازهای مرتبط در مسیر ورود ویروس به سلول میزبان را مورد هدف دارویی قرار داد(Çakır et al., 2020). با این حال ما در این مطالعه، بر روی پپتید های زیست‌فعالی که باعث مهار گیرنده ACE2 می شود، تمرکز کرده ایم.

آنزیم ACE2 حدود ۲۰ سال پیش کشف شد و بررسی ها نشان داد که میزان آنژیوتانسین (1-7) را در خون افزایش می دهد. آنزیم های ACE1 و ACE2 از نظر بیوشیمیایی مشابه هم هستند و درسیستم رنین-آنژیوتانسین-آلدوسترون (RAAS) ایفای نقش می‌کنند، با این تفاوت که در نوع سوبسترا و محصول آنزیم ها تفاوت هایی وجود دارد(Çakır et al., 2020).

رنین در زمان کاهش فشار خون از کلیه ترشح می‌شود و سپس سبب شکسته شدن آنژیوتانسینوژن کبدی به آنژیوتانسین I می‌شود که باعث افزایش جزئی فشار خون در بدن می‌شود. در صورت نیاز، آنژیوتانسین I توسط ACE1 در سطح سلول های ریه، تبدیل به آنژیوتانسین II می‌شود که باعث افزایش چشم‌گیر میزان فشار خون در بدن می‌شود. در صورتی که برای کاهش فشار خون آنژیوتانسین II توسط خود ACE2 به آنژیوتانسین (1-7) تبدیل می‌شود. همچنین آنژیوتانسین I توسط ACE2 به آنژیوتانسین (1-9) و سپس توسط ACE1 به آنژیوتانسین (1-7) تبدیل می‌شود(Imai Y et al., 2008).

آنژیوتانسین (7-1) در اصل یک متابولیت فعال بیولوژیکی می‌باشد که اثرات معکوس آنژیوتانسین II را دارد که در سیستم RAAS باعث کاهش فشار خون می‌گردد. آنژیوتانسین (7-1) از طریق افزایش بیان نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی (eNOS)، باعث انبساط عروق خونی (کاهش فشار خون)، کاهش التهاب و محافظت قلبی می‌شود(Imai Y et al., 2008).

بدلیل اینکه آنزیم ACE2 به عنوان دروازه ورود ویروس کرونا، شناخته شده است، با ورود ویروس کرونا به سلول های میزبان میزان غلظت آنزیم ACE2 در سطح سلول های ریه به شدت کاهش میابد. همچنین از میزان غلظت آنژیوتانسینوژن (7-1) نیز در خون کاسته می‌شود، سپس فشار خون افزایش یافته و همین امر بر روی عملکرد قلب تاثیر منفی می‌گذارد. در اثر کمبود آنژیوتانسین (7-1) در فضا بین سلولی سلول های ریه، تشدید التهاب ناشی از خود ویروس کرونا و سایر عوامل پاتوژن رخ می‌دهد (باعث تشدید سندرم حاد تنفسی بر اثر عفونت داخل ریه می‌گردد) که این امر سبب کاهش کارایی ریه در امر اکسیژن رسانی به ارگان‌های مختلف بدن می‌شود(Bergman and Silverman, 2020).

پس از ظهور همه‌گیری SARS-CoV-2 و مشخص شدن مسیر ورود ویروس به سلول های میزبان، داروهایی که دارای پتانسیل بالا برای اتصال به ACE2 هستند، توسط آنالیز های insilico مورد مطالعه قرار گرفته‌اند(Çakır et al., 2020). بر این اساس، در این مطالعه اثرات مهاری پپتیدهای زیست‌فعال مشتق شده از پروتئین‌های سبد غذایی دریایی انسان مانند: Fish Beta-actin، Fish NADH dehydrogenase subunit 6(mitochondrion)، Chlorella RuBisCo large subunit، و پروتئین‌های مصرفی روزانه مانند: Bovine Beta-lactoglobulin، Bovine Myosin Heavy chain 2، Gallus gallus Myosin heavy chain، Gallus gallus Myoglobin، Phaseolus vulgaris Leucogglutinin phytohemagglutinin، Phaseolus vulgaris phytohemagglutinin، Egg Ovalbumin و Egg Albumin موجود در مواد غذایی مثل گوشت‌ماهی، جلبک کلرلا، گوشت‌گاو، گوشت‌مرغ، لوبیا و تخم‌مرغ بر روی ACE را، با استفاده از روش مطالعه insilico مورد تجزیه و تحلیل قرار داده‌ایم.

۲.مواد و روش‌ها

۲-۱- توالی آمینواسیدی پروتئین‌های مورد بررسی

توالی پروتئینی پروتئین‌های مصرفی روزانه شامل Fish Beta-actin، Fish NADH dehydrogenase subunit 6(mitochondrion)، Chlorella RuBisCo large subunit، Bovine Beta-lactoglobulin، Bovine Myosin Heavy chain 2، Gallus gallus Myosin heavy chain، Gallus gallus Myoglobin، Phaseolus vulgaris Leucogglutinin phytohemagglutinin، Phaseolus vulgaris phytohemagglutinin، Egg Ovalbumin و Egg Albumin به ترتیب با کدهای دسترسی O42161.1، ARX78653.1، P12466، P02754، Q9BE41، P02197، P13538، P15231، Q43628، P01012، P19121 از پایگاه‌های داده پروتئینی UniProtKB/Swiss-Prot به آدرس www.uniprot.org و NCBI به آدرس www.ncbi.nlm.nih.gov بدست‌آمد.

۲-۱- فراوانی وقوع قطعات زیست فعال

فراوانی وقوع پپتیدهای زیست‌فعال مهارکننده ACE در پروتئین‌های فوق، توسط وب سرور BioPep به آدرس www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep محاسبه شد. داده‌های سایت BioPep بر اساس معادله $A=a/N$ می باشد که در آن "N" تعداد کل اسید های آمینه موجود در پروتئین و "a" تعداد پپتیدهای زیست‌فعال مهار کننده ACE موجود در توالی کل پروتئین و "A" فراوانی وقوع قطعات پپتیدی پپتیدهای زیست‌فعال با فعالیت مهارکنندگی ACE در توالی پروتئین های مصرفی می‌باشد که در جدول ۱ آورده شده‌است.

۲-۳- بررسی میزان فعالیت هضم آنزیم‌های گوارشی برتولید قطعات زیست‌فعال

برای هضم آنزیمی پروتئین‌های مصرفی، آنزیم های پروتئازی گوارشی مانند کیموتریپسین، تریپسین و پپسین در مطالعه Insilico انتخاب شدند. فراوانی وقوع قطعات پپتیدی با فعالیت معین توسط آنزیم‌ها (A_E) و فراوانی نسبی وقوع قطعات با فعالیت داده شده توسط آنزیم‌ها (W) توسط معادله $W=A_E/A$ در سایت BioPep محاسبه می‌شود که A' (فراوانی وقوع قطعات پپتیدی زیست‌فعال در توالی پروتئین برای هر آنزیم) توسط معادله $A'=A_E/W$ محاسبه شده است و در جدول ۲ آورده شده‌است.

۲-۴- رتبه‌بندی پپتیدهای زیست‌فعال

رتبه‌بندی پپتیدهای زیست‌فعال با فعالیت مهارکنندگی ACE بدست‌آمده توسط سایت Biopep، توسط نرم‌افزار آنلاین PeptideRanker به آدرس www.distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker پیش‌بینی شدند و پپتیدهایی که بیشترین احتمال فعالیت را داشتند در جدول ۳ آورده شده است. در واقع این پایگاه یک سرور مبتنی بر وب می باشد که احتمال فعالیت بیولوژیکی یک پپتید را پیش بینی می‌کند. این ابزار میزان فعالیت هر پپتید را در بازه صفر و یک ارائه می دهد. این اعداد مربوط به احتمال بیشترین و کمترین فعالیت پپتید زیست‌فعال مهارکننده ACE می‌باشد.

۳. نتایج و بحث

در این مطالعه توالی پروتئین‌های مصرفی روزانه انسان بررسی شده‌است. جدول ۱ میزان فراوانی وقوع پپتیدهای زیست‌فعال با فعالیت مهارکنندگی ACE در پروتئین‌های مورد بررسی را نشان می دهد. طبق جدول۱، پروتئین Beta-actin موجود در گوشت‌ماهی در مجموع دارای ارزش مهارکنندگی ACE بیشتری نسبت به سایر پروتئین های مورد بررسی می باشد.

	پروتئین	کد دسترسی	A
۱	Fish Beta-actin	O42161.1	0.5653
۲	NADH dehydrogenase subunit 6 (mitochondrion)	ARX78653.1	0.5029
۳	chlorella Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	P12466	0.5284
۴	Bovine Beta-lactoglobulin	P02754	0.5281
۵	Bovine Myosin heavy chain 2	Q9BE41	0.4113
۶	Gallus gallus Myoglobin	P02197	0.4610
۷	Gallus gallus Myosin heavy chain	P13538	0.4074
۸	phaseolus vulgaris Leucoagglutinating phytohemagglutinin	P15231	0.4103
۹	phaseolus vulgaris Phytohemagglutinin	Q43628	0.4015
۱۰	Egg Ovalbumin	P01012	0.4585
۱۱	Egg Albumin	P19121	0.3675

جدول ۱:میزان فراوانی وقوع پپتیدهای زیست‌فعال با فعالیت مهارکنندگی ACE

جدول ۲ فراوانی وقوع پپتیدهای زیست‌فعال (A') توسط آنزیم‌های گوارشی کیموتریپسین، تریپسین و پپسین، پس از هیدرولیز پروتئولیتیک پروتئین‌های مورد بررسی را نشان می دهد. در واقع پارامتر A' از معادله ($A'=AE/W$) برای هر آنزیم بصورت جداگانه محاسبه و نتایج در جدول ۲ ارائه شده‌است. همانطورکه مشاهده می‌کنید عدد A' بدست آمده برای هر آنزیم نزدیک به عدد A_{Total} (فراوانی وقوع پپتید های زیست فعال با فعالیت مهارکنندگی ACE) می‌باشد. بطور کلی از میان پروتئین‌های مصرفی انسان، غذا های دریایی که حاوی پروتئین های Beta-actin و Rubisco که به ترتیب مشتق شده از گوشت ماهی و جلبک می‌باشد، بیشترین میزان پپتیدهای مهار کننده ACE را دارا هستند.

	پروتئین	کیموتریپسین	تریپسین	پپسین
1	Fish Beta-actin	0.5459	0.5454	0.5454
2	NADH dehydrogenase subunit 6 (mitochondrion)	0.486	0.4869	0.4862
3	chlorella Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	0.5089	0.51	0.5088
4	Bovine Beta-lactoglobulin	0.5	0.5	0.5
5	Bovine Myosin heavy chain 2	0.3937	0.3932	0.3947
6	Gallus gallus Myoglobin	0.4492	0.4493	0.4491
7	Gallus gallus Myosin heavy chain	0.3887	0.3887	0.3879
8	phaseolus vulgaris Leucoagglutinating phytohemagglutinin	0.3913	0.3913	0.3912
9	phaseolus vulgaris Phytohemagglutinin	0.3792	0.3796	0.3803
10	Egg Ovalbumin	0.424	0.4237	0.4237
11	Egg Albumin	0.3467	0.3455	0.3464

جدول ۲:فراوانی وقوع پپتیدهای زیست‌فعال با فعالیت مهارکنندگی ACE توسط آنزیم‌های گوارشی

جدول۳: پپتید های بدست آمده از نرم افزار آنلاین هضم آنزیمی

	پپتیدهای زیست‌فعال	رتبه‌بندی پپتید
۱	GF	۰/۹۹
۲	CF	۰,۹۹
۳	FR	۰,۹۸
٤	RF	۰,۹۸
٥	AF	۰,۹۷
٦	RW	۰,۹۷
۷	GM	۰,۹٥
۸	DF	۰,۹٤
۹	SF	۰,۹٤
۱۰	GHF	۰,۹٤
۱۱	IF	۰,۹٤
۱۲	DE	۰,۹٤
۱۳	KF	۰,۹۰
۱٤	KW	۰,۸۹
۱٥	FGK	۰,۸٥
۱٦	TF	۰,۸۲
۱۷	VF	۰,۸۱
۱۸	PL	۰,۸۱
۱۹	GL	۰,۸۰
۲۰	VW	۰,۸۰

در جدول۳، پپتید های بدست آمده از Biopep، که توسط نرم افزار مشخص شده اند. پپتید های GF، CF، GHF، IF، DE و KF بیشترین پتانسیل هستند که اغلب غذا های دریایی پپتید های زیست فعال می باشد. گوشت زیست فعال CF، FR، SF، DF و TF می پپتید های زیست فعال GF، PL و DF احتمال فعالیت زیست فعالی گزارش نرم افزار آنلاین هضم آنزیمی در سایت PeptideRanker رتبه بندی شده اند FR، RF، AF، RW، GM، DF، SF، فعالیت مهار کنندگی ACE را دارا (گوشت ماهی و جلبک) منبع اصلی این ماهی حاوی بیشترین میزان پپتید باشد، همینطور جلبک کلرلا حاوی می باشد که این پپتید ها با بیشترین شدند.

۴. نتیجه‌گیری

بر اساس تجزیه و تحلیل insilico پروتئین های موجود در غذا های مصرفی روزانه، می توان نتیجه گرفت که غذا های دریایی دارای چشم انداز خوبی به عنوان پیش ساز پپتید های فعال زیستی در مقایسه با سایر پروتئین های غذایی معمول در سبد غذایی مصرفی روزانه هستند. باتوجه به فناوری کشت و پرورش غذا های دریایی در کشور، می توان از این صنعت برای توسعه تولیدات دارویی و غذایی کشور استفاده بهینه ای کرد. همانطور که گفته شد، غذا های دریایی دارای بیشترین میزان پپتید های زیست فعال در بحث مهار کردن ACE به عنوان یک استراتژی پیشگیری از بیماری کرونا می باشند. همچنین پیشنهاد میشود ساخت محصولی متشکل از پپتید های مشتق شده از پروتئین های غذا های دریایی، می تواند مکمل بسیار با ارزش و کارامدی در راستای بهره گیری از اثرات ضد کرونایی آن ها باشد. همچنین می توان از پپتید های موجود در پروتئین های غذا های دریایی برای مدیریت در درمان بیماری های انسانی مثل بیماری های قلبی-عروقی مربوط به سیستم RAAS استفاده گسترده ای کرد.

منابع

1. Çakır B, Okuyan B, Şener G, Tunalı-Akbay T. 27 November 2020. Investigation of beta-lactoglobulin derived bioactive peptides against SARS-CoV-2 (COVID-19): in silico analysis. European Journal of Pharmacology, S0014-2999(20)30873-6.
2. Abdelli I, Hassani F, Bekkel Brikci S, Ghalem S. 2021. In silico study the inhibition of angiotensin converting enzyme 2 receptor of COVID-19 by Ammoides verticillata components harvested from Western Algeria .VOL. 39, NO. 9, 3263–3276.
3. Ratha S, Renuka N, Rawat I, Bux F. 13 November 2020. Prospectives of algae derived nutraceuticals as supplements for combating COVID-19 and human coronavirus diseases. Nutrition, S0899-9007(20)30372-5.
4. Imai Y, Kuba K, Penninger J.2008. The discovery of angiotensin-converting enzyme 2 and its role in acute lung injury in mice. Experimental Physiology, *Exp Physiol* 93.5 pp 543–548.
5. Bergmann, Cornelia C., and Robert H. Silverman. "COVID-19: Coronavirus replication, pathogenesis, and therapeutic strategies." *Cleveland Clinic journal of medicine* 87.6 (2020): 321-327.

Study of cytochrom P450 2D6 gene regulation in AGS cell line following treatment with diazinon pesticide

Shima Yahoo Torghabe[1*]; Ali Barzegar[2]; Zahra Hosseini khah[3]; Ali Pakdin Parizi[4]

1*- Master Science Student, Cellular and Molecular Biology, Department of Science, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources
2- Associate Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources
3- Assistant Professor, Diabetes Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences
4-Assistant Professor, Research Institute of Genetics and Biotechnology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources

**Corresponding Author Email address: Shimayahoo2012@gmail.com*

Abstract

Agricultural pesticide poisoning is a global problem, leading to 300,000 deaths worldwide each year. Exposure to agricultural pesticides is inevitable. Organophosphate pesticides, including diazinon, are widely used in the field of agriculture and have effect on biological activities. Organophosphate pesticides is one of the most important causes of death worldwide, especially in developing countries. Pesticides can cause cancer in a variety of ways, including hormonal imbalances and epigenetic effects. Gastric cancer is the second leading cause of cancer death worldwide. North and northwest of Iran have the highest prevalence of this disease in the country. Organophosphate pesticides, including diazinon, may interfere with cytochrome (CYP450) P450 interactions with drugs and toxins, threatening human health. CYP450 comprises a family of enzymes that are responsible for about three-quarters of all reactions related to drug and toxin metabolism in the human population. This family contains a significant portion of CYP450 enzymes and is classified into 13 subfamilies. Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) is an important member of the second family, which is involved in the metabolism of 25% of drugs and 4% of pesticides.

Keywords: AGS cell line, Diazinon, Cytochrome P450

بررسی بیان ژن سیتوکروم P450 2D6 تحت تاثیر سم دیازینون

شیما یاهو طرقبه[۱]؛ علی برزگر[۲]؛ زهرا حسینی‌خواه[۳]؛ علی پاکدین پاریزی[۴]

*۱- دانشجو، کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- استادیار، مرکز تحقیقات دیابت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۲- استادیار، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: Shimayahoo2012@gmail.com*

چکیده

مسمومیت حاصل از سموم کشاورزی یک مشکل جهانی است و سالانه منجر به ۳۰۰۰۰۰ مورد مرگ و میر در سراسر جهان می‌شود. قرار گرفتن در معرض سموم کشاورزی اجتناب ناپذیر است. سموم ارگانوفسفره از جمله دیازینون، در کشاورزی به صورت گسترده استفاده می‌شوند و برروی فعالیت‌های زیستی، تاثیر زیادی دارند. این گروه از سموم، یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ‌ومیر در سراسر جهان، به ویژه در کشورهای درحال توسعه است. آفت‌کش‌ها از طریق راه‌های مختلف از جمله اختلال در میزان هورمون‌ها، اثرات اپی‌ژنتیکی باعث ایجاد سرطان می‌شوند. سرطان معده دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در سراسر جهان است. شمال و شمال غرب ایران دارای بالاترین میزان شیوع این بیماری در کشور می باشند. سموم ارگانوفسفره از جمله دیازینون ممکن است بر روی برهمکنش‌های سیتوکروم P450 (CYP450) با داروها، تداخل ایجاد کنند و مقاومت دارویی ایجاد می شود. این موضوع سلامت انسان را تهدید می‌کند. CYP450 خانواده‌ای از آنزیم‌ها را در برمی‌گیرد که مسئول حدود سه چهارم از کل واکنش‌های مربوط به متابولیسم داروها و سموم در جمعیت انسانی است. این خانواده بخش قابل توجهی از آنزیم‌های CYP450 را شامل می‌شود و در ۱۳ زیرخانواده طبقه‌بندی می‌شوند. سیتوکروم P450 2D6 (CYP2D6) یکی از اعضاء مهم خانواده دوم است که در متابولیسم ۲۵ درصد از داروها و ۴ درصد از آفت‌کش‌ها نقش دارد. سموم ارگانوفسفره با آلکیله کردن نواحی پروموتری ژن‌های مربوط به سیتوکروم P450 ، باعث ایجاد اختلال در بیان آن‌ها می‌شوند و به این ترتیب سلول را به سمت سرطانی شدن سوق می دهند. این مطالعه با هدف بررسی تاثیر سم دیازینون بر روی بیان ژن سیتوکروم P450 2D6 در رده سلولی سرطان معده (AGS) انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل تیمار شاهد (تیمار رده سلولی AGS با محیط کشت فاقد سم و سرم)، تیمار سلول با سم دیازینون در غلظت ۵ و همچنین ۱۰ میکرومولار بود. پس از تیمار بر روی سلول ها، بررسی بیان ژن با استفاده از Real Time PCR انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که بیان ژن CYP2D6 در رده سلولی AGS در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار سم دیازینون نسبت به نمونه شاهد به ترتیب کاهش و افزایش داشت. با توجه به یافته‌ها این سم می‌تواند باعث ایجاد سرطان شود. همچنین منجر به القای بیان سیتوکروم P450 2D6 می‌شود. بنابراین بهتر است که در پرورش محصولات کشاورزی از سموم جایگزین (سموم بیولوژیکی) که آسیب کمتری به بدن وارد می‌کنند، استفاده شود.

کلمات کلیدی: دیازینون، سیتوکروم P450 ، رده سلولی AGS ، بیان ژن

۱. مقدمه

سموم شیمیایی باعث ایجاد اختلالات زیادی در انسان و حیات وحش می‌شوند. ارگانو فسفات‌ها مثل دیازینون، از جمله سموم کشاورزی هستند که به طور گسترده استفاده می‌شوند (Sabarwal et al., 2018). این سموم همچنین در صنایع به عنوان حلال، نرم‌کننده، بازدارنده و در نیروهای دفاعی به عنوان عوامل عصبی استفاده می‌شوند (Holstege et al., 1997) . ساختارهای شیمیایی تشکیل‌دهنده دیازینون، به عنوان فرآورده‌های طبیعی در طبیعت وجود ندارند و از نظر بیوشیمیایی قابل سنتز نیستند. بنابراین در طول تکامل آنزیم‌های کاتابولیکی، میکروارگانیسم‌ها در معرض چنین ساختارهایی نبودند و توانایی استفاده از این ترکیبات را به عنوان منبع انرژی و کربن پیدا نکردند. در معنای گسترده‌تر، این ترکیبات مصنوعی از نظر تعداد و جهت‌گیری گروه‌های شیمیایی خاص، با ترکیبات طبیعی موجود متفاوت هستند (Rieger et al., 2002). انسان به طور گسترده در معرض انواع مواد شیمیایی محیطی، سموم و افزودنی‌های مواد غذایی و آلاینده‌ها قرار دارد که این مواد شیمیایی در نهایت می‌توانند متابولیسم سلولی را مختل کنند (Guengerich, 2020). همچنین قرار گرفتن در معرض سموم، با ابتلا به چندین بیماری در انسان از جمله آلزایمر، پارکینسون، بیماری‌های تنفسی، ناباروری، بیماری‌های قلبی و عروقی و سرطان وابسته است (Kaur et al., 2020). استفاده روز افزون از داروها و افزایش کاربرد آفت‌کش‌ها جهت بهبود کیفیت محصولات غذایی، خطر حضور هم‌زمان دارو و آفت‌کش را در بدن انسان افزایش می‌دهد. طبق مطالعاتی که در سال ۲۰۱۵ انجام شد، دیازینون یک حشره‌کش ارگانوفسفات با خواص ژنوتوکسیک است. این سم قادر است در هوا به صورت بخار و ذرات معلق حضور پیدا کند، که با سرطان ریه ارتباط مستقیم دارد، همچنین ارتباط آن با سرطان پروستات نیز به اثبات رسیده است (Jones et al., 2015). سیستم دفاعی که شامل سیتوکروم P450 است برای محافظت از ارگانیسم‌ها در برابر مواد سمی تکامل یافته است. دیازینون بر سیستم انتقال در غشای میتوکندری در کبد موش نیز اثر می‌گذارد و به آنزیم‌های سیتوکروم P450 (CYP450) در کبد انسان آسیب وارد می‌کند (Sams et al., 2003). آنزیم‌های CYP450 نقش مهمی در متابولیسم کارسینوژن‌ها و داروهایی دارند که باعث کاهش رشد تومور می‌شوند (Guengerich and Waterman, 2015). ایجاد تغییرات در متابولیسم وابسته به CYP2D6 توسط مواد شیمیایی درون‌زا، حساسیت این ژن را نسبت به سمومی که در محیط وجود دارد، کاهش می‌دهد در نتیجه احتمال بروز سرطان بالا می‌رود (Wang et al., 2014). مطالعات بسیاری در زمینه تاثیر سیتوکروم (CYP2D6) 2D6 بر اثربخشی داروی تاموکسیفن که دارویی جهت درمان سرطان پستان است انجام شده است. چگونگی هدف‌گیری ژن CYP2D6 به توسعه درمان مبتنی بر تاموکسیفن کمک می‌کند. این دارو در حضور فعالیت ژن CYP2D6 به خوبی متابولیزه می‌شود. در این راستا، بررسی اثرات تاموکسیفن بر روی رده‌های سلولی و مدل‌های حیوانی مورد بررسی قرار گرفته است (Chan et al., 2020). در این مطالعه تاثیر سم دیازینون که از سموم ارگانوفسفره است و از پرکاربردترین سموم دفع آفت در کشاورزی است، در رده‌ی سلولی سرطان معده بر روی ژن CYP2D6 مورد بررسی قرار گرفت. سرطان معده چهارمین سرطان شایع است. طبق مطالعات و بررسی‌های آماری، میزان شیوع آن در شمال و شمال غرب ایران زیاد است و یکی از دلایل بالا بودن میزان این سرطان در این نواحی، استفاده گسترده از سم دیازینون در کشاورزی گزارش شده است.

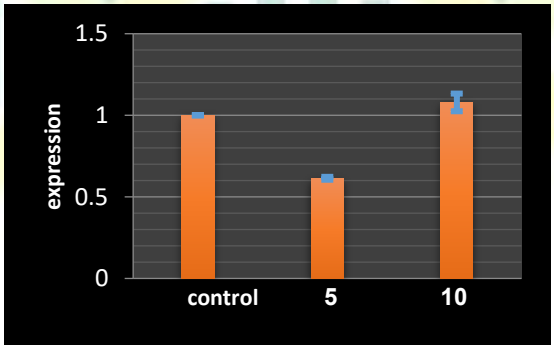
۲. مواد و روش

رده سلولی سرطانی معده انسانی بنام AGS از انستیتیو پاستور تهیه و به آزمایشگاه منتقل شد. سپس سلول‌ها به محیط کشت جدید منتقل و در انکوباتور CO_2دار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کشت سلول‌های رده AGS در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر

مکعبی (SPL, S.Korea) حاوی محیط کشت DMEM (Bio Idea, Iran) به همراه ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Fetal Bovin Serum; FBS) (Gibco, Italia) و یک درصد آنتی بیوتیک پنی‌سیلین (۱۰۰۰۰ unit/ml) و استرپتومایسین (۱۰۰۰۰unit/ml) (۱:۱) (Bio Idea, Iran) انجام شد. محیط کشت سلول‌ها هر دو روز یکبار تعویض شد. پس از اینکه تراکم سلولی موجود در فلاسک به میزان ۷۵ درصد رسید، درون چاهک‌های پلیت ۶ خانه به تعداد تقریبی ۳۰۰/۰۰۰ سلول در هر چاهک تقسیم شدند. سپس پلیت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه نگهداری شد تا تراکم سلولی به حدود تقریبی ۷۵ برسد. سپس محیط کشت مصرف شده از چاهک‌ها تخلیه شده و محیط کشت بدون سرم دارای آنتی‌بیوتیک به همراه غلظت‌های تعیین شده‌ی سم به چاهک‌ها اضافه شد. انحلال پذیری سم دیازینون در آب بسیار اندک است، اما در حلال‌های آلی (مثل الکل‌ها) به طورکامل حل می‌شود. به همین جهت از حلال DMSO برای تهیه محلول‌های سم با غلظت‌های مورد نیاز استفاده شد. غلظت DMSO به اندازه‌ای نبود که باعث مرگ سلولی شود. پس از نگهداری سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۴ ساعت، استخراج RNA از سلول‌های تیمار شده انجام گرفت. جهت بررسی کیفی نمونه‌ها، الکتروفورز آگارز انجام شد. از آنجا که RNA استخراج شده پایداری لازم جهت استفاده در واکنش‌های پلی‌مراز را ندارد، برای مطالعات بیان ژن از cDNA استفاده می‌گردد. پس از اینکه نمونه‌ها از نظر کیفی بررسی شدند، سنتز cDNA، توسط کیت پارس توس مشهد، انجام شد. در نهایت جهت بررسی میزان بیان ژن، Real-Time PCR انجام شد. واکنش Real-Time PCR توسط کیت یکتا تجهیز و با استفاده از دستگاه ABI Real-Time PCR Detection System (BioRad) انجام شد. در این واکنش از ژن β-actin به عنوان ژن خانه بان (Housekeeping Gene) جهت استانداردسازی استفاده شد. آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر ژن CYP2D6 با استفاده از نرم‌افزار Oligo 7 طراحی و مورد استفاده قرار گرفت.

۳. نتایج و بحث

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیان ژن CYP2D6 در رده سلولی AGS تحت تیمار سم دیازینون در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار نسبت به نمونه‌ی شاهد به ترتیب ۰/۶ درصد کاهش و ۱/۰۵ افزایش یافت (شکل۱).



شکل۱: نمودار مقایسه میانگین داده‌های مربوط به میزان بیان ژن CYP2D6 در رده‌ی سلولی AGS در تیمار با سم دیازینون با غلظت‌های ۵ و۱۰. خطای استاندارد بر روی هر کدام از نمودارها با رنگ آبی مشخص شده است.

۴.نتیجه گیری

این نتایج نشان داد که تیمار رده سلولی AGS با سم دیازینون در غلظت ۵ میکرومولار بیان ژن CYP۲D۶ را نسبت به نمونه شاهد، کاهش می‌دهد و تیمار در غلظت ۱۰ میکرومولار بیان ژن CYP۲D۶ را نسبت به نمونه شاهد، افزایش می‌دهد. بر اساس گزارش سازمان ملی ثبت سرطان (NCR)، استان مازندران یکی از مناطق پرخطر سرطان در ایران است. همچنین برخی مطالعات حاکی از بالا بودن میزان سموم کشاورزی در رودخانه های این استان بود (Khalili tanha et al., ۲۰۲۰). زمانیکه افراد به دهه ششم زندگی خود می‌رسند، با خطر ابتلا به سرطان به صورت تصاعدی مواجه می‌شوند (White et al., ۲۰۰۱). ۳۰ درصد از تومورهای بدخیم انسان ناشی از استفاده از تنباکو و بقیه توسط مواد مصنوعی مرتبط با رژیم غذایی، سبک زندگی و محیط زیست است. در گروه بزرگی از آنزیم های دخیل در متابولیسم مواد سرطان زا، CYP۴۵۰ مهم ترین آنزیم در متابولیسم است (Parsa., ۲۰۱۲). مطالعات انجام شده نشان داده‌اند که در حشره‌کش‌های ارگانوفسفره از جمله دیازینون، توسط سیتوکروم‌های P۴۵۰ بیوترانسفورماسیون انجام می‌شود (Buratti et al., ۲۰۰۲). همچنین مشخص شده است که میزان بیوترانسفورماسیون سموم ارگانوفسفره توسط CYP۴۵۰ها بر اساس نوع سوبسترا (سم ارگانوفسفره) متفاوت است. سطح mRNA ژن CYP۲D۶ و میزان پروتئین آن در ریه انسان با مقدار کم گزارش شده است. نتایج RT-PCR و آنالیز ایمونوشیمی نشان داد که میزان mRNA ژن CYP۲D۶ در مخاط برونشی ۳ برابر و در پارانشیم ریه ۶ برابر کمتر از کبد است. منطقی‌ترین توضیح برای بیان بیش از حد متابولیزه کننده های گسترده (extensive metabolizers) ژن CYP۲D۶ در میان بیماران سرطان ریه این است که CYP۲D۶ واسطه فعالسازی موضعی عوامل سرطان‌زا (procarcinogen) در دود تنباکو در ریه است (Guidice et al., ۱۹۹۷).

منابع

1) **Buratti, F. M., Volpe, M. T., Fabrizi, L., Meneguz, A., Vittozzi, L., & Testai, E. (2002).** Kinetic parameters of OPT pesticide desulfuration by c-DNA expressed human CYPs. Environmental toxicology and pharmacology, 11(3-4): 181-190.
2) **Chan, C. W., Law, B. M., So, W. K., Chow, K. M., & Waye, M. M. (2020).** Pharmacogenomics of breast cancer: highlighting CYP2D6 and tamoxifen. Journal of cancer research and clinical oncology, 146(6): 1395-1404.
3) **Guengerich, F. P. (2021).** A history of the roles of cytochrome P450 enzymes in the toxicity of drugs. Toxicological research, 37(1): 1-23.
4) **Guengerich, F. P., Waterman, M. R., & Egli, M. (2016).** Recent structural insights into cytochrome P450 function. Trends in pharmacological sciences, 37(8): 625-640.
5) **Guidice, J. M. L., Marez, D., Sabbagh, N., Legrand-Andreoletti, M., Spire, C., Alcaïde, E., ... & Broly, F. (1997).** Evidence for CYP2D6 expression in human lung. Biochemical and biophysical research communications, 241(1): 79-85.
6) **Holstege, C. P., Kirk, M., & Sidell, F. R. (1997).** Chemical warfare: nerve agent poisoning. Critical care clinics, 13(4): 923-942.
7) **Jones, R. R., Barone-Adesi, F., Koutros, S., Lerro, C. C., Blair, A., Lubin, J., ... & Freeman, L. E. B. (2015).** Incidence of solid tumours among pesticide applicators exposed to the organophosphate insecticide diazinon in the Agricultural Health Study: an updated analysis. Occupational and environmental medicine, 72(7): 496-503.

8) **Kaur, N., Starling, A. P., Calafat, A. M., Sjodin, A., Clouet-Foraison, N., Dolan, L. M., ... & Jaacks, L. M. (2020).** Longitudinal association of biomarkers of pesticide exposure with cardiovascular disease risk factors in youth with diabetes. Environmental research, 181: 108916.

9) **Khalili Tanha, G., Barzegar, A., Shokrzadeh, M., Nikbakhsh, N., & Ansari, Z. (2020).** Correlation between serum concentration of diazinon pesticide and breast cancer incidence in Mazandaran Province, northern Iran. Caspian Journal of Environmental Sciences, 18(3): 197-204.

10) **Rieger, P. G., Meier, H. M., Gerle, M., Vogt, U., Groth, T., & Knackmuss, H. J. (2002).** Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence. Journal of Biotechnology, 94(1): 101-123.

11) **Sabarwal, A., Kumar, K., & Singh, R. P. (2018).** Hazardous effects of chemical pesticides on human health–Cancer and other associated disorders. Environmental toxicology and pharmacology, 63: 103-114.

12) **Sams, C., Cocker, J., & Lennard, M. S. (2003).** 544 Metabolism of chlorpyrifos and diazinon by human liver microsomes. Toxicology Letters, (144): s146.

13) **Wang, X., Li, J., Dong, G., & Yue, J. (2014**). The endogenous substrates of brain CYP2D. European journal of pharmacology, 724: 211-218.

A review of cytochrome P4502D6 gene expression and its role in pathogenesis and xenobiotics excretion

Shima Yahoo Torghabe[1*]; Ali Barzegar[2]; Zahra Hosseini khah[3]; Ali Pakdin Parizi[4]

1*- Master Science Student, Cellular and Molecular Biology, Science Faculty, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources
2- Associate Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, Science Faculty, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources
3- Assistant Professor, Diabetes Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences
4-Assistant Professor, Research Institute of Genetics and Biotechnology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources

**Corresponding Author Email address : Shimayahoo2012@gmail.com*

Abstract

Cytochrome (CYP450) P450 comprises a family of enzymes that are responsible for about three-quarters of all drug metabolism reactions in the human population. These proteins were first discovered in 1958 due to a spectral difference in their unusual reduced carbon monoxide. The absorption peak was determined by the pigments in their structure at 450 nm. That is why they are called cytochrome P450. These enzymes are involved in many reactions that are essential for metabolism and the survival of living organisms. In the Human Genome Project, members of this gene family are classified into 57 genes and 58 pseudogenes, and are divided into 18 families and 43 subfamilies based on homology in the amino acid sequence of enzymes. There are different isoforms of CYP450, but most reactions metabolized by CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4. Cytochrome (CYP2D6) P4502D6 is an important member of the second family, which is involved in the metabolism of 25% of drugs and 4% of pesticides. With only 1.3 to 4% liver content, CYP2D6 in humans can metabolize more than 160 different drugs. This gene has many polymorphisms. The number of variants of CYP2D6 is currently reported to be 80, and this number is still growing. The frequency distribution of these allelic variants varies among different ethnic groups. CYP2D6 metabolic polymorphisms increase susceptibility to certain diseases such as cancer, Parkinson's, and Alzheimer's. Cytochrome enzymes activate (in some cases inactivate) some components that mediate carcinogen activation. They are also considered as targets for anti-cancer therapies. The expression and activity of CYP2D6 are regulated by a number of physiological, pathological and environmental factors at the transcriptional, post-transcriptional, translational and epigenetic levels. HNF4a (hepatocyte HNF-4a nuclear factor), which is one of the regulators of the CYP2D6 gene; by binding to a sequence of directly repeated elements in the promoter regulates the expression of the CYP2D6 gene. DNA hypermethylation and histone modifications can suppress CYP2D6 expression. Studies of the genome have identified a large number of genes that can regulate CYP2D6. During pregnancy, the expression of this gene is induced through unknown mechanisms.

Keywords: cytochrome P450, CYP2D6, xenobiotic, cancer,gene regulation

مروری بر بیان ژن سیتوکروم P4502D6 و نقش آن در بیماری‌زایی و دفع زنوبیوتیک‌ها

شیما یاهو طرقبه[۱*]؛ علی برزگر[۲]؛ زهرا حسینی‌خواه[۳]؛ علی پاکدین پاریزی[۴]

۱*- دانشجو، کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- استادیار، مرکز تحقیقات دیابت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۴- استادیار، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

*ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: Shimayahoo2012@gmail.com**

چکیده

سیتوکروم P450 (CYP450) خانواده‌ای از آنزیم‌ها را در برمی‌گیرد که مسئول حدود سه چهارم از کل واکنش‌های مربوط به متابولیسم داروها در جمعیت انسانی است. این پروتئین‌ها برای اولین بار در سال ۱۹۵۸ به دلیل اختلاف طیفی که در کربن مونوکسید کاهش یافته غیر معمولشان وجود داشت، کشف شدند. پیک جذبی توسط پیگمان‌های موجود در ساختار آن‌ها در ۴۵۰ نانومتر بود. بدین جهت سیتوکروم P450 نامیده شده‌اند. این آنزیم‌ها در واکنش‌های بسیاری دخیل هستند که برای متابولیسم و ادامه حیات جاندار، ضروری و مهم هستند. در پروژه‌ی ژنوم انسان، اعضای مربوط به این خانواده ژنی در ۵۷ ژن و ۵۸ شبه‌ژن طبقه‌بندی شده‌اند و در ۱۸ خانواده و ۴۳ زیر خانواده براساس همولوژی در توالی آمینواسیدی در آنزیم‌ها، تقسیم شده‌اند. ایزوفرم‌های مختلفی از CYP450 وجود دارد اما اکثر واکنش‌ها از طریق آنزیم‌هایCYP2C9 و CYP2C19 و CYP2D6 و CYP3A4 صورت می‌گیرد. سیتوکروم P4502D6 (CYP2D6) یکی از اعضاء مهم خانواده دوم است که در متابولیسم ۲۵ درصد از داروها و ۴ درصد از آفت‌کش‌ها نقش دارد. با تنها ۱/۳الی ۴ درصد محتوای کبدی، CYP2D6 در انسان می‌تواند بیش از ۱۶۰ داروی مختلف را متابولیزه کند. این ژن پلی‌مورفیسم‌های زیادی دارد. درحال حاضر تعداد واریانت‌های این ژن ۸۰ تا گزارش شده است که این تعداد همچنان در حال رشد است. توزیع این واریانت‌های اللی در میان گروه‌های قومی مختلف، متفاوت است. پلی‌مورفیسم‌های متابولیکی CYP2D6، حساسیت ابتلا به برخی از بیماری‌ها مانند سرطان‌ها، پارکینسون، آلزایمر را افزایش می‌دهند. آنزیم‌های سیتوکرومی بعضی از اجزایی که واسطه فعال شدن کارسینوژن‌ها هستند را فعال (در برخی موارد غیرفعال) می‌کنند. این آنزیم‌ها باعث فعال یا غیرفعال شدن داروهای ضدسرطان می شوند و همچنین به عنوان هدف برای درمان‌های ضد سرطان درنظر گرفته می شوند . بیان و فعالیت CYP2D6 توسط تعدادی از عوامل فیزیولوژیکی، پاتولوژیکی و محیطی در سطوح رونویسی، پس از رونویسی، ترجمه و اپی‌ژنتیک تنظیم می‌شود. hepatocyte nuclear factor (HNF-4a)که یکی از تنظیم کننده‌های ژن CYP2D6 است؛ به توالی directly repeated element در پروموتر متصل شده و باعث تنظیم بیان آن ژن می‌شود. هایپرمتیلاسیون DNA و تغییرات هیستونی می‌تواند بیان CYP2D6 را سرکوب کند. طی مطالعاتی که بر روی ژنوم صورت گرفته است، تعداد زیادی ژن شناسایی شده که می‌توانند CYP2D6 را تنظیم کنند. در دوران بارداری بیان این ژن طی مکانیسم‌های ناشناخته القا می‌شود.

کلمات کلیدی: سیتوکروم P4502D6، زنوبیوتیک، سرطان، تنظیم بیان ژن

۱. مقدمه

خانواده بزرگ سیتوکروم‌های P450 شامل تعداد زیادی آنزیم متنوع است که دارای یک گروه هم هستند و در تمام موجودات از پروکاریوت‌ها تا یوکاریوت‌ها (حیوانات، گیاهان، قارچ‌ها و...) یافت می‌شوند (Gillam and Hayes, 2013; Kelly and Kelly, 2013) . این آنزیم‌ها نه تنها در متابولیسم هورمون‌های استروئیدی، اسیدهای صفراوی، اسیدهای چرب اشباع نشده نقش دارند بلکه نقش مهمی نیز در متابولیسم داروها و سایر زنوبیوتیک‌ها دارند. اکسیداسیون از شایع‌ترین واکنش‌هایی است که توسط آنزیم‌های CYP450 انجام می‌شود. خانواده‌ی دو آنزیم‌های CYP450 در تغییر شکل زیستی بسیاری از ترکیبات زنوبیوتیک نقش دارد (Zanger and Schwab 2013). همچنین نقش اصلی در متابولیسم داروها را بر عهده دارد و در کبد و اندام‌های خارج کبدی (مغز و روده) بیان می‌شود. ژن CYP2D6 روی کروموزوم شماره ۲۲ (22q13) قرار دارد و دارای ۹ اگزون است. CYP2D6 تنوع بین فردی زیادی را از خود نشان می‌دهد. تغییرات ژنوتیپی در این ژن، از عوامل مهم تنوع در CYP2D6 است (Gough et al., 1993; Kimura et al., 1989). آنزیم CYP2D6 براساس سطح فعالیت، یکی از این چهار فنوتیپ را از جمله متابولیزه کننده ضعیف PM (poor metabolizer)، متابولیزه‌کننده متوسط IM (intermediate metabolizer) ، متابولیزه‌کننده گسترده EM (extensive metabolizer) و متابولیزه‌کننده فوق سریع UM (ultrarapid metabolizer) را به خود اختصاص می‌دهد (Gaedigk et al., 2017). این نتایج نشان‌دهنده نقش مهم پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی CYP2D6 در تعیین سطوح فعالیت این ژن است. به طوری که اطلاعات مربوط به ژنوتیپ‌های CYP2D6 را می‌توان برای تخمین فنوتیپ‌های CYP2D6 در فرد مورد نظر استفاده کرد (Pan *et al*., 2016). براساس اطلاعات مربوط به ژنوتیپ‌های CYP2D6، می‌توان افراد با فنوتیپ PM را شناسایی کرد زیرا سطح فعالیت این ژن در افراد حامل الل‌های بی‌معنی بسیار پایین است (Gaedigk et al., 2008). با این حال سطوح فعالیت CYP2D6 در افرادی که فنوتیپ غیر از PM را از خود نشان می‌دهند، تنوع گسترده‌ای را نشان می‌دهد، به طوری که نمی‌توان آن‌ها را به طور قابل اعتماد بر اساس اطلاعات ژنوتیپی پیش‌بینی کرد (Gaedigk et al., 2008). این نتایج نشان می‌دهند که تغییرپذیری در افراد غیر PM، چند عاملی است و علاوه بر پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی شناخته شده، عوامل دیگری نیز به طور بالقوه در تنوع آن نقش دارند. طبق آزمایشاتی که انجام شده، میزان فعالیت CYP2D6 با سطوح mRNA رابطه مستقیم دارد (Yang et al., 2010; Temesvari et al., 2012). بیان ژن در اکثر اعضای CYP1، CYP2، CYP3 و CYP4 در سطوح رونویسی، پس از رونویسی و در سطح اپی‌ژنتیکی تنظیم می شود (Zanger et al., 2014). گوناگونی فنوتیپی ژن‌های سیتوکروم انسانی علاوه بر گیرندهای هسته‌ای، می‌تواند توسط عوامل دیگر مثل فاکتورهای رونویسی سیس و ترانس، alternative splicing، پایداری پروتئین و RNA، بیان RNAهای تنظیمی (miRNA) و عوامل اپی‌ژنتیکی مثل متیلاسیون DNA و تغییرات هیستونی، تنظیم شود (Wray et al., 2003). اعضای زیر خانواده‌های CYP1A، 2B، 3A، 2C و 4Aدر انسان به شدت توسط برخی از عوامل بیگانه، زنوبیوتیک‌ها، داروها و برخی از عوامل محیطی القاپذیر هستند. با این حال CYP2D6 توسط القاکننده‌های شناخته شده در سایر سیتوکروم‌ها (دود سیگار، دگزامتازون، ریفامپین، اریترومایسین، اتانول و اومپرازول) القا نمی‌شود که نشان می‌دهد تنظیم آن با سایر سیتوکروم‌ها متفاوت است. تا به امروز تنها تعداد معدودی از فاکتورهای رونویسی که در تنظیم رونویسی ژن CYP2D6 نقش دارند، شناخته شده‌اند. این عوامل رونویسی شامل فاکتور رونویسیHNF4a ، و CCAAT/enhancer binding protein C/EBPa است. HNF4a عضوی از خانواده گیرنده هسته‌ای است و در توسعه کبد نقش دارد (Gonzalez, 2008).

۱-۱- تنظیم بیان ژن CYP2D6

طی یک مطالعه سیستماتیک که بر روی بیش از ۴۰۰ نمونه از بافت کبد انسان انجام شد، این نتیجه به دست آمد که بیان ژن HNF4a و سطوح mRNA آن، به طور قابل توجهی با میزان فعالیت CYP2D6 مرتبط است (Yang et al., 2010). در سلول‌های HepG2، بیان اکتوپیکال ژن HNF4a، فعالیت پروموتر ژن CYP2D6 را افزایش می‌دهد (Cairns et al., 1996). غیر فعال شدن ژن HNF-4a را با استفاده از RNA آنتی‌سنس منجر به کاهش قابل توجه در بیان ژن CYP2D6 می‌شود. این نتیجه بدین معناست که این فاکتور HNF-4a برای بیان ژن CYP2D6 ضروری است (Jover et al., 2001). پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی متعددی برای ژن HNF-4a گزارش شده است که متعاقبا بیان ژن CYP2D6 را تعدیل می‌کند. پلی‌مورفیسم G60D در ژن HNF-4a، باعث کاهش فعالیت این ژن و همچنین کاهش اتصال آن به DNA می شود که در نهایت منجر به کاهش بیان ژن CYP2D6 در کبد می‌شود (Lee et al., 2008). C/EBPa یک فاکتور رونویسی است که در بسیاری از بافت‌ها از جمله جفت، کبد و روده باریک بیان می‌شود این فاکتور، فعالیت زیستی متنوعی دارد و در متابولیسم مواد غذایی، کنترل چرخه سلولی و بازسازی کبد نقش دارد و بیان بیش از حد آن در سلول‌های HepG2 باعث افزایش سطح mRNA ژن CYP2D6 و افزایش سایر آنزیم‌های متابولیزه‌کننده دارو شد (Schrem et al., 2004).

۱-۱-۱- نقش عوامل اپی‌ژنتیکی در تنظیم بیان و فعالیت CYP2D6

بیان ژن‌های سیتوکرومی انسانی در طول رشد و تکاملشان توسط عوامل اپی‌ژنتیکی تنظیم می‌شود. با وجود اینکه این تغییرات بر بیان ژن و فنوتیپ آن‌ها تاثیر می‌گذارد، تغییری در توالی DNA ایجاد نمی‌کنند. متیلاسیون DNA و تغییرات هیستونی در تنظیم ژن‌های سیتوکروم در انسان نقش دارند و این تغییرات عمدتا در سرطان مشاهده می‌شود (Kim et al., 2010). اکثر ژن‌های CYP متابولیزه‌کننده دارو مانند CYP1A2، CYP3A4 وCYP2D6 در طی تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های کبدی، در شرایط آزمایشگاهی بیان نمی‌شوند (Park et al., 2015). تغییرات اپی‌ژنتیکی در سلول‌های کبدی مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی در انسان باعث مهار ژن CYP2D6 می‌شود که باعث غیر فعال‌سازی رونویسی این ژن در نتیجه هایپرمتیلاسیون جزایر CpG و تغییرات هیستونی مرتبط می‌شود. طی مطالعاتی که انجام شده است، مهار ترکیبی DNA متیل‌ترانسفراز و هیستون داستیلاز، باعث افزایش سطح رونویسی در CYP2D6 می‌شود (Park et al., 2015). این یافته‌ها نشان می‌دهند که تغییرات اپی‌ژنتیکی مثل متیلاسیون DNA و تغییرات هیستونی می‌توانند بیان CYP2D6 را تعدیل کنند.

۱-۱-۲- تنظیم بیان ژن CYP2D6 در دوران بارداری

یکی از عوامل فیزیولوژیکی که بر متابولیسم داروها میتواند تاثیر بگذارد بارداری است. القاکننده های اولیه آنزیم‌های متابولیزه کننده دارو (ریفامپین و فنوباربیتال) بیان CYP2D6 را القا نمی‌کنند و بیان و القاپذیری این ژن نسبت به سایر سیتوکروم‌ها متفاوت است. داده‌های بالینی جمع‌آوری شده نشان می‌دهند که متابولیسم دارو با واسطه ژن CYP2D6 در دوران بارداری افزایش می‌یابد و یک مورد نادر از القای این ژن را نشان می‌دهد (Pan et al., 2017). القای فعالیت ژن CYP2D6 در دوران بارداری، برای اولین بار در سال ۱۹۸۳بررسی شد. حداکثر غلظت در پلاسما پس از مصرف دوز خوراکی متوپرولول (که یک پروب برای سوبسترای CYP2D6 است)، در زنان پس از زایمان ۲۰ تا ۴۰ درصد بود (Hogstedt et al., 1983). در مطالعه بعدی مشخص شد که میزان متوپرولول تخمین زده

شده پس از تزریق دوز وریدی در زنان باردار، ۲۶ تا ۹۷ درصد بیشتر از بعد از زایمان بود (Hogstedt et al., 1985). در مطالعات بعدی از سایر سوبستراها (دکسترومتورفان، کلونیدین و پاراکسوتین) استفاده شد و افزایش مشابهی در متابولیسم داروها، توسط CYP2D6، در دوره بارداری، حاصل شد (Ververs et al., 2009). قابل ذکر است که این تغییر در افراد با فنوتیپ PM/IM مشاهده نشد (Ververs et al., 2009). طبق مطالعات انجام شده، فاکتور رونویسی KLF9 به خودی خود یک فعال‌کننده ضعیف در پروموتر ژن *CYP2D6* است اما به طور قابل توجهی فعالسازی پروموتر این ژن توسط HNF-4a (Hepatocyte nuclear factor-4a) که یکی از فعال‌کننده‌های رونویسی CYP2D6 است را افزایش می‌دهد (He et al., 2015). KLF9 یک فاکتور اصلی تنظیم‌کننده رونویسی است و برای تکثیر، چسبندگی و تمایز سلول‌های اندومتر رحم است که تمام این فاکتورها در دوران بارداری ضروری هستند (Pabona et al., 2012). KLF9، فاکتوری نوین جهت تنظیم بیان ژن CYP2D6 است که رونویسی این ژن را به واسطه افزایش بیان HNF4a (که از فاکتورهای اصلی رونویسی ژن CYP2D6 است) افزایش می‌دهد (Koh et al., 2014). یکی دیگر از عوامل فیزیولوژیکی که می‌تواند بیان این ژن را تحت تاثیر قرار بدهد، جنسیت است. جنسیت می‌تواند بر میزان فعالیت آنزیم‌های سیتوکرومی، به دلیل ایجاد نوسانات هورمونی (چرخه قاعدگی) تاثیر بگذارد. بنظر می‌رسد که این عامل فیزیولوژیکی، تنها تاثیر جزئی تا متوسط بر میزان فعالیت ژن CYP2D6 دارد. با این وجود با توجه به تنوع زیاد در فعالیت CYP2D6 که ناشی از تنوع پلی‌مورفیسمی است، اثرات جنسیتی بر فعالیت این ژن، محدود است.

۲-۱- نقش CYP2D6 در متابولیزه کردن داروها

برخی از پلی‌مورفیسم‌های ژن CYP2D6 دارای الل‌های بی معنی (Null allele) هستند که منجر به حداقل بیان ژن CYP2D6 می شوند و پروتئین‌های غیرفعال و ناکارآمد تولید می‌کنند. افراد حامل این الل‌ها، فنوتیپ PM را نشان می‌دهند. به طور مشابه، حضور پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی CYP2D6 که باعث کاهش بیان ژن می شوند با فنوتیپ IM مرتبط هستند (Zanger et al., 2004). افرادی که فنوتیپ PM را نشان می‌دهند، به دلیل وضعیت ژنتیکی‌شان عوارض جانبی بیشتری را هنگام مصرف داروهای ضدنئوپلاستی، ضد افسردگی و ضد روان پریشی تجربه می‌کنند. همچنین در هنگام مصرف داروهای افیونی، بی دردی کمی را حس می‌کنند. تاموکسیفن دارویی است که گیرنده استروژن را به صورت انتخابی تعدیل می‌کند که اغلب برای کاهش بروز علائم سرطان پستان در زنانی که در دوره یائسگی و یا قبل از آن هستند و مبتلا به سرطان پستان (گیرنده مثبت استروژن) هستند تجویز می‌شود. اگرچه این دارو به خوبی تحمل می‌شود اما می‌تواند باعث گرگرفتگی، بی‌حالی و حالت تهوع شود. متابولیسم تاموکسیفن پیچیده و گسترده است. تاموکسیفن دارای متابولیت ثانویه مهم به نام اندوکسیفن است که ۱۰۰ برابر بیشتر از تاموکسیفن، قدرت ضد استروژنی دارد (Goetz et al., 2018). مسیر اصلی تشکیل اندوکسیفن، دمتیلاسیون توسط CYP3A4/5 و سپس اکسیداسیون توسط CYP2D6 است (Goetz et al., 2018). در افرادی که ژن CYP2D6، با فنوتیپ PM/IM ظهور پیدا می‌کند، میزان اندوکسیفن تولید شده در پلاسما به شدت کم است (Martinez et al., 2014). همچنین ارتباط قوی بین سایر داروهای رایج مثل آمی تریپتیلین که توسط cyp2d6 متابولیزه می‌شود و فنوتیپی که افراد از خود نشان می‌دهند، وجود دارد و بعضا باعث ایجاد اثرات نامطلوب دارویی در افراد می‌شود (Hicks et al., 2013). CYP2D6 یک فارماکوژن بسیار مهم با ده‌ها هاپلوتایپ رایج است. این هاپلوتایپ‌ها می‌توانند به طور قابل توجهی بر

متابولیسم و قرار گرفتن سوبستراها در معرض CYP2D6 اثر بگذارند که منجر به پاسخ دارویی متغیر می‌شود (Taylor et al., 2020). غربالگری و ارزیابی پلی‌مورفیسم‌های CYP450، می‌تواند به درک پاسخ افراد مختلف به داروها به ما کمک کند. آگاهی از پلی‌مورفیسم‌های CYP450 برای شناسایی تغییرات ژنتیکی مرتبط با بیماری‌هایی که منشا آن‌ها CYP450 است و همچنین درمان با داروهایی که مختص فرد است، ضروری است. پلی‌مورفیسم‌های ژن‌های CYP450 را می‌توان با اندازه‌گیری تغییرات ژنوتیپی و فنوتیپی در افراد مختلف مشخص کرد. روش فنوتیپی به این صورت است که از یک داروی پروبی استفاده می‌شود و به دنبال آن نسبت دارو به متابولیت در خون و ادرار و بزاق فرد اندازه‌گیری می شود. در روش ژنتیکی، توالی DNA فرد تهیه و همچنین جهش‌هایی که در آن رخ داده به صورت دقیق مشخص می‌شود. تغییرات ژنتیکی با استفاده از واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز PCR، RFLP و روش SSCP مشخص می‌شود (Warning., 2019).

۳-۱- نقش CYP2D6 در متابولیزه کردن سموم

یکی از مهم‌ترین مونواکسیژنازهای خانواده CYP450، CYP2D6 است. این آنزیم مواد شیمیایی متنوعی از جمله سموم ارگانوفسفره را متابولیزه می‌کند. پلی‌مورفیسم‌های این ژن بر فعالیت آنزیم در متابولیزه کردن سموم نیز تاثیر می‌گذارند. CYP2D6 فعالیت‌های فیزیولوژیکی مهمی را در برابر مواد درون‌زا (endogenous) و بیگانه در اندام‌هایی مثل کبد و مغز ایفا می‌کند (Taylor et al., 2020) . سطح mRNA و پروتئین‌های CYP2D6 در حضور مواد شیمیایی خاصی که از سد خونی مغزی عبور می‌کنند، به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد و این مورد در کبد دیده نشده است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که متابولیت‌های مشتق شده از CYP2D6 در حضور زنوبیوتیک‌ها به صورت منحصر به فرد در نئوکورتکس و ماده سیاه مغز انسان در سطوحی بالاتر از آنچه که در کبد مشاده شده است، تشکیل می‌شود. بسیاری از عوامل محیطی مانند رژیم غذایی، سکونت در مناطق روستایی، قرار گرفتن در معرض نور خورشید و قرار گرفتن در معرض آفت‌کش‌ها، می‌توانند بر ژنوتیپ CYP2D6 اثر بگذارند و بنابراین خطر ابتلا به بیماری پارکینسون را در گروه‌های مختلف قومی افزایش دهد (He et al.,2015).

۴-۱- نقش CYP2D6 در بیماری زایی

وجود پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی در آنزیم‌های متابولیکی با میزان ابتلا به سرطان ارتباط تنگاتنگی دارد. تعداد زیادی از پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) در ژن CYP2D6 گزارش شده است که استعداد ابتلا به سرطان را بالا می‌برد. در سلول‌های سرطانی سطوح پایین CYP2D6 شناسایی شده است. برخی از مطالعات بالینی ارتباط بین ژنوتیپ‌های CYP2D6 و خطر ابتلا به سرطان‌های سر، گردن، سینه و ریه را نشان داده‌اند (Li and Lu., 2001). این ژن ممکن است رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی را از طریق تعدیل فعالیت زیستی و سم‌زدایی استروژن‌ها و پروکارسینوژن‌ها تحت تاثیر قرار دهد (Modugno et al., 2003) . همچنین متیلاسیون و مهار ژن CYP2D6 در پیشرفت آسیب‌های کبدی ناشی از داروهای ضدتوبرکلوزیس نقش کلیدی دارد (Xang et al., 2016). طی مطالعات اپیدمیولوژیکی که انجام شد، مشخص شد که شغل والدین، استفاده از سموم دفع آفت و عوامل محیطی و پلی‌مورفیسم ژنتیکی می‌تواند در بروز بیماری لوسمی حاد در کودکان نقش داشته باشد. در این مطالعه بر روی ۱۱۶ کودک مبتلا به لوسمی حاد (CAL) و ۱۶۲ نمونه کنترل بررسی انجام شد. طبق نتایجی که به دست آمد مشخص شد که بین بیماری CAL و قرار

گرفتن در معرض سموم و پلی‌مورفیسم ژن CYP2D6 ارتباط مستقیمی وجود دارد (Ferri et al., 2018). فعال‌سازی متابولیکی عوامل سرطان‌زا از طریق CYP2D6 انجام می‌شود و به این معنی است که یک بیمار با فنوتیپ EM، ترکیبات بیشتری را فعال می‌کند و بنابراین در معرض خطر بیشتری برای ابتلا به سرطان‌های سینه، مثانه، سر و گردن قرار دارد (Kroemer et al., 1995) . CYP2D6 در انسان درکبد، کلیه، روده و مغز بیان می‌شود و یک آنزیم مهم است که تعدادی از داروهای مهم بالینی را متابولیزه می‌کند. تغییرات بین فردی زیادی در بیان و فعالیت ژن CYP2D6 وجود دارد. تغییر در بیان و فعالیت این آنزیم باعث ایجاد تغییر در میزان متابولیزه شدن داروها، اثر بخشی درمانی و همچنین باعث ایجاد اثرات نامطلوب درمانی و تداخلات دارویی می‌شود. در بزرگسالان تفاوت میان بیان ژن‌های سیتوکرومی و قدرت متابولیزه‌کنندگی آن‌ها توسط تنوع ژنتیکی و به میزان کمتری با القای آنزیمی ناشی از در معرض قرار گرفتن داروها و زنوبیوتیک‌ها و یا مواد غذایی، تعیین می‌شود. برخلاف سایر سیتوکروم‌ها، CYP2D6 توسط بسیاری از عوامل محیطی تنظیم نمی شود و همچنین توسط القاکننده‌های رایج سیتوکروم‌ها (فنوباربیتال، ریفامپین) نیز القا نمی شود. با این حال ممکن است تفاوت‌های بین فردی در پاسخ به داروها توسط CYP2D6، بطور متوسط تحت تاثیر وضعیت هورمونی، رژیم غذایی، بیماری‌ها و زنوبیوتیک‌ها قرار بگیرد و بر میزان آنزیم در کبد، کلیه، مغز و روده اثر بگذارد. مطمئنا برای مشخص شدن نقش گیرنده‌های هسته‌ای، عوامل اپی‌ژنتیکی و سایر عوامل دیگر در تنظیم بیان ژن CYP2D6، به مطالعات بیشتری نیاز است.

۲. نتیجه‌گیری

CYP2D6 در انسان در کبد، مغز و کلیه بیان می‌شود و آنزیمی مهم است که تعدادی از داروهای مهم بالینی را متابولیزه می‌کند. تغییرات بین فردی زیادی در بیان و فعالیت CYP2D6 وجود دارد. تغییر در بیان و فعالیت این آنزیم ممکن است باعث تغییر متابولیسم دارو و اثربخشی درمانی شود. در بزرگسالان، تفاوت در بیان CYP و قدرت متابولیزه‌کنندگی آن توسط تنوع ژنتیکی و تا حدی کمتری با القای آنزیم ناشی از دارو درمانی، قرار گرفتن در معرض زبیوتیک‌ها یا عوامل غذایی تعیین می‌شود. برخلاف سایر CYP ها، CYP2D6 معمولاً توسط بسیاری از عوامل محیطی شناخته شده، تنظیم نمی شود و توسط القا کننده های رایج شناخته شده CYP مانند فنوباربیتال، ریفامپین و دگزامتازون القا نمی‌شود. با این حال، تفاوت‌های بین فردی در پاسخ به داروهای متابولیزه شده توسط CYP2D6 نیز ممکن است به طور متوسط تحت تاثیر وضعیت هورمونی، عوامل رژیم غذایی، بیماری ها و تنظیم فعالیت آنزیم توسط زنوبیوتیک‌ها در کبد و اندام های خارج کبدی مانند مغز، کلیه و روده باشد. CYP2D6 به سایتوکین ها و القا کننده های کلاسیک CYP حساس نیست. براساس نتایج حاصل از مطالعات آزمایشگاهی و بالینی، گیرنده‌های هسته‌ای از جمله (PXR) pregnane x receptor، (CAR) constitutive androstane receptor و (GR) glucocorticoid receptor در تنظیم بیان CYP2D6 نقش ندارند. با این حال، شواهد کافی وجود دارد که نشان می‌دهد چند گیرنده هسته‌ای مانند HNF-4a می‌تواند به شدت بیان CYP2D6 را تنظیم کند. علاوه بر این طی چندین مطالعه در سطح ژنوم مشخص شد که چندین مسیر شبکه ای وجود دارد که می تواند CYP2D6 را در کبد به شدت تنظیم کند. برای روشن شدن نقش گیرنده‌های هسته‌ای، عوامل اپی ژنتیک و سایر عوامل در تنظیم CYP2D6، مطمئناً مطالعات عملکردی و اعتبارسنجی بیشتری مورد نیاز است (He et al., 2015).

منابع

1. Cairns, W., Smith, C. D., McLaren, A. W., & Wolf, C. R. (1996). Characterization of the human cytochrome P4502D6 promoter: a potential role for antagonistic interactions between members of the nuclear receptor family. Journal of Biological Chemistry, 271(41): 25269-25276.
2. Ferri, G. M., Guastadisegno, C. M., Intranuovo, G., Cavone, D., Birtolo, F., Cecinati, V., ... & Santoro, N. (2018). Maternal exposure to pesticides, paternal occupation in the army/police force, and CYP2D6* 4

polymorphism in the etiology of childhood acute leukemia. Journal of pediatric hematology/oncology, 40(4): e207-e214.
3. Gaedigk, A., Sangkuhl, K., Whirl-Carrillo, M., Klein, T., & Leeder, J. S. (2017). Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. Genetics in Medicine, *19*(1): 69-76.
4. Gaedigk, A., Simon, S. D., Pearce, R. E., Bradford, L. D., Kennedy, M. J., & Leeder, J. S. (2008). The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. Clinical Pharmacology & Therapeutics, *83*(2): 234-242.
5. Goetz, M. P., Sangkuhl, K., Guchelaar, H. J., Schwab, M., Province, M., Whirl-Carrillo, M., ... & Klein, T. E. (2018). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline for CYP2D6 and tamoxifen therapy. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 103(5): 770-777.
6. Gonzalez, F. J. (2008). Regulation of hepatocyte nuclear factor 4α-mediated transcription. Drug metabolism and pharmacokinetics, 23(1): 2-7.
7. Gough, A. C., Smith, C. D., Howell, S. M., Wolf, C. R., Bryant, S. P., & Spurr, N. K. (1993). Localization of the CYP2D gene locus to human chromosome 22q13. 1 by polymerase chain reaction, in situ hybridization, and linkage analysis. Genomics, 15(2): 430-432.
8. He, Z. X., Chen, X. W., Zhou, Z. W., & Zhou, S. F. (2015). Impact of physiological, pathological and environmental factors on the expression and activity of human cytochrome P450 2D6 and implications in precision medicine. Drug metabolism reviews, 47(4): 470-519.
9. Hicks, J. K., Swen, J. J., Thorn, C. F., Sangkuhl, K., Kharasch, E. D., Ellingrod, V. L., Skaar, T. C., Müller, D. J., Gaedigk, A., Stingl, J. C., & Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (2013). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guideline for CYP2D6 and CYP2C19 genotypes and dosing of tricyclic antidepressants. Clinical pharmacology and therapeutics, 93(5): 402–408.
10. Jover, R., Bort, R., Gómez-Lechón, M. J., & Castell, J. V. (1998). Re-expression of C/EBPα induces CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genes in HepG2 cells. FEBS Letters, 431(2): 227-230
11. Kelly, S. L., & Kelly, D. E. (2013). Microbial cytochromes P450: biodiversity and biotechnology. Where do cytochromes P450 come from, what do they do and what can they do for us?. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 368(1612): 20120476.
12. Kimura, S., Umeno, M., Skoda, R. C., Meyer, U. A., & Gonzalez, F. J. (1989). The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. American journal of human genetics, 45(6): 889.
13. Koh, K. H., Pan, X., Zhang, W., McLachlan, A., Urrutia, R., & Jeong, H. (2014). Krüppel-like factor 9 promotes hepatic cytochrome P450 2D6 expression during pregnancy in CYP2D6-humanized mice. Molecular pharmacology, 86(6): 727-735.
14. Kroemer, H. K., & Eichelbaum, M. (1995). "It's the genes, stupid" Molecular bases and clinical consequences of genetic cytochrome P450 2D6 polymorphism. Life sciences, *56*(26): 2285-2298.
15. Lee, S. S., Cha, E. Y., Jung, H. J., Shon, J. H., Kim, E. Y., Yeo, C. W., & Shin, J. G. (2008). Genetic polymorphism of hepatocyte nuclear factor-4α influences human cytochrome P450 2D6 activity. Hepatology, 48(2): 635-645.
16. Lin, J. H., & Lu, A. Y. (2001). Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. Annual review of pharmacology and toxicology, 41(1): 535-567.
17. MJ Gillam, E., & A Hayes, M. (2013). The evolution of cytochrome P450 enzymes as biocatalysts in drug discovery and development. Current topics in medicinal chemistry, 13(18): 2254-2280.
18. Pabona, J. M. P., Simmen, F. A., Nikiforov, M. A., Zhuang, D., Shankar, K., Velarde, M. C., ... & Simmen, R. C. (2012). Krüppel-like factor 9 and progesterone receptor coregulation of decidualizing endometrial stromal cells: implications for the pathogenesis of endometriosis. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, *97*(3): E376-E392.
19. Pan, X., Ning, M., & Jeong, H. (2017). Transcriptional regulation of CYP2D6 expression. Drug Metabolism and Disposition, 45(1): 42-48.
20. Temesvari, M., Kobori, L., Paulik, J., Sárváry, E., Belic, A., & Monostory, K. (2012). Estimation of drug-metabolizing capacity by cytochrome P450 genotyping and expression. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 341(1): 294-305.

21. Schrem, H., Klempnauer, J., & Borlak, J. (2004). Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part II: the C/EBPs and D site-binding protein in cell cycle control, carcinogenesis, circadian gene regulation, liver regeneration, apoptosis, and liver-specific gene regulation. Pharmacological reviews, 56(2): 291–330.
22. Taylor, C., Crosby, I., Yip, V., Maguire, P., Pirmohamed, M., & Turner, R. M. (2020). A Review of the Important Role of CYP2D6 in Pharmacogenomics. Genes, 11(11): 1295.
23. Ververs, F. T., Voorbij, H. A., Zwarts, P., Belitser, S. V., Egberts, T. C., Visser, G. H., & Schobben, A. F. (2009). Effect of cytochrome P450 2D6 genotype on maternal paroxetine plasma concentrations during pregnancy. Clinical pharmacokinetics, 48(10): 677-683.
24. Wray, G. A., Hahn, M. W., Abouheif, E., Balhoff, J. P., Pizer, M., Rockman, M. V., & Romano, L. A. (2003). The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. Molecular biology and evolution, 20(9): 1377-1419.
25. Yang, X., Zhang, B., Molony, C., Chudin, E., Hao, K., Zhu, J., ... & Lum, P. Y. (2010). Systematic genetic and genomic analysis of cytochrome P450 enzyme activities in human liver. Genome research, 20(8): 1020-1036.
26. Zanger, U. M., Klein, K., Thomas, M., Rieger, J. K., Tremmel, R., Kandel, B. A., ... & Magdy, T. (2014). Genetics, epigenetics, and regulation of drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 95(3): 258-261.
27. Zanger, U. M., Raimundo, S., & Eichelbaum, M. (2004). Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 369(1): 23-37.
28. Zanger, U. M., & Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. Pharmacology & therapeutics, 138(1): 103-141.
29. Zhang, J., Zhu, X., Li, Y., Zhu, L., Li, S., Zheng, G., ... & Feng, F. (2016). Correlation of CpG island methylation of the cytochrome P450 2E1/2D6 genes with liver injury induced by anti-tuberculosis drugs: a nested case-control study. International journal of environmental research and public health, 13(8): 776.

Proteases and its applications in industry and medicine

Negin Hosseinpour [1]*; Dr. Sohrab Boozarpour [2]; Dr. Matia Sadat Borhani [2]; Dr. Mahmoud Salehi [2]; Esmaeil Hassanzadeh [1]

1. M.Sc. Student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences and Engineering, Gonbad Kavous University
2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences and Engineering, Gonbad Kavous University

** Corresponding Author Email address: negin.hp97@gmail.com*

Abstract

Proteases are a large group of enzymes that break down or hydrolyze proteins or peptides. These hydrolytic enzymes are found everywhere in nature and are known in all living forms including eukaryotes such as plants, animals, fungi, protists, prokaryotic domains including bacteria and archaebacteria and even viruses. The inability of plant and animal proteases to meet the current needs of the world has led to increased attention to microbial proteases, because microbial proteases can withstand harsh conditions in various industries and show good stability. Also, genetic manipulation of microbes is easier and with the help of genetic engineering and protein engineering methods, proteases can be designed that have more functional and stable capabilities than natural proteases. Proteases are the only group of enzymes that are of particular importance for their physiological and commercial applications. The use of chemicals around the world in various industries has increased dramatically and is affecting people's health. The modern world intends to replace these harmful chemicals with environmentally friendly products to improve life on the planet. This article reviews the many uses of proteases as a harmless and environmentally friendly catalyst in various industries including food industries such as dairy products, protein supplements, baby food, meat softening, production of various foods and fermented beverages as well as industries. Leather, detergent, photography, medicine, etc. are paid. In addition, the importance of proteases as an important tool in performing various experiments in molecular biology and genetic engineering and the treatment of various diseases is discussed.

Keywords: Enzyme, Peptidase, Microorganism, Proteolysis, Hydrolase

پروتئازها و کاربردهای آن در صنایع و پزشکی

نگین حسین‌پور[۱*]؛ دکتر سهراب بوذرپور[۲]؛ دکتر ماتیا سادات برهانی[۲]؛ دکتر محمود صالحی[۲]؛ اسماعیل حسن‌زاده[۱]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی دانشگاه گنبد کاووس

۲- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی دانشگاه گنبد کاووس

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: negin.hp97@gmail.com

چکیده

پروتئازها گروه وسیعی از آنزیم‌ها هستند که پروتئین‌ها یا پپتیدها را تجزیه یا هیدرولیز می‌کنند. این آنزیم‌های هیدرولیتیک در همه جای طبیعت یافت می‌شوند و در همه اشکال زنده شامل یوکاریوت‌ها مانند گیاهان، حیوانات، قارچ‌ها، پروتیست‌ها، حوزه‌های پروکاریوتها شامل باکتری‌ها و آرکی‌باکترها و حتی ویروس‌ها شناخته شده‌اند. ناتوانی پروتئازهای گیاهی و حیوانی در برآورده کردن نیازهای کنونی جهان منجر به افزایش توجه به پروتئازهای میکروبی شده‌است، زیرا پروتئازهای میکروبی می‌توانند شرایط سخت موجود در صنایع مختلف را تحمل کرده و پایداری مناسبی از خود بروز دهند. همچنین دستکاری ژنتیکی میکروب ها راحت‌تر بوده و می‌توان با روش های مهندسی ژنتیک و مهندسی پروتئین پروتئازهایی طراحی کرد که قابلیت های عملکردی و پایداری بیشتری نسبت به پروتئازهای طبیعی داشته باشند. پروتئازها تنها دسته‌ای از آنزیم‌ها هستند که با توجه به کاربردهایشان در زمینه‌های فیزیولوژیکی و تجاری، اهمیت ویژه‌ای دارند. استفاده از مواد شیمیایی در سراسر جهان در صنایع مختلف به شدت افزایش یافته است و بر سلامت افراد تأثیر می‌گذارد. دنیای مدرن قصد دارد این مواد شیمیایی مضر را با محصولات سازگار با محیط زیست جایگزین کند تا زندگی در این سیاره بهبود یابد. در این مقاله مروری به کاربردهای فراوان پروتئازها به عنوان یک کاتالیزور بی‌ضرر و سازگار با محیط، در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی مانند تولید لبنیات، مکمل‌های پروتئینی، غذای نوزادان، نرم‌کردن گوشت، تولید انواع مختلف غذاها و نوشیدنی‌های تخمیری و همچنین صنایع چرم، شوینده، عکاسی، داروئی و ... پرداخته می‌شود. به علاوه، به اهمیت پروتئازها به عنوان ابزاری مهم در انجام آزمایش‌های مختلف زیست شناسی مولکولی و مهندسی ژنتیک و درمان بیماری های مختلف پرداخته می‌شود.

واژگان کلیدی: آنزیم، پپتیداز، میکروارگانیسم، پروتئولیز، هیدرولاز

۱.مقدمه

پروتئازها که پپتیدازها یا پروتئینازها نیز نامیده می‌شوند، آنزیم‌هایی هستند که پروتئولیز را انجام می‌دهند. پروتئولیز یکی از مهم‌ترین واکنش‌های بیولوژیکی است. فعالیت پروتئولیتیک به دسته‌ای از آنزیم‌ها به نام پروتئازها نسبت داده شده است (López-Otín et al., 2008). این آنزیم‌ها توزیع گسترده‌ای دارند و فرآیندهای بیولوژیکی قابل توجهی را انجام می‌دهند. پروتئازها برای انجام این واکنش‌ها با مکانیسم‌های مختلف تکامل یافته‌اند و کلاس‌های مختلف پروتئاز می‌توانند این واکنش‌ها را با مکانیسم‌های کاتالیزوری کاملا متفاوت انجام دهند (King et al., 2014). پروتئازها در حیوانات، گیاهان، باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها یافت می‌شوند. پروتئازها در پردازش پروتئین، تنظیم عملکرد پروتئین، آپوپتوز، پاتوژنز ویروسی، هضم، فتوسنتز و بسیاری از فرآیندهای حیاتی دیگر نقش دارند. مکانیسم اثر پروتئازها آن‌ها را به عنوان پروتئازهای سرین، سیستئین یا ترئونین (هیدرولازهای نوکلئوفیل آمینو پایانی)، یا به عنوان پروتئازهای آسپارتیک، متالو و گلوتامیک طبقه بندی می‌کند، که پروتئازهای گلوتامیک تنها زیرگروهی است که تاکنون در پستانداران یافت نشده است (Shen and et al., 2006).

طبق طبقه‌بندی کمیسیون آنزیم، پروتئازها در کلاس 3 (هیدرولازها)، زیر کلاس 4 قرار می‌گیرند که هر آنزیم پروتئولیتیک دارای شماره منحصر به فردی به عنوان EC 3.4.x.x است(Contesini et al., 2017). با این حال، نامگذاری پروتئازها به دلیل تنوع زیاد در عملکرد و ساختار آنها ، با سیستم عمومی نامگذاری آنزیم مطابقت ندارند. در حال حاضر، پروتئازها بر اساس سه معیار اصلی طبقه‌بندی می‌شوند: ۱- نوع واکنش کاتالیز شده ۲- ماهیت شیمیایی محل کاتالیزوری ۳- رابطه تکاملی با ارجاع به ساختار(Barett et al., 1994).

پروتئازها به طور کلی به دو گروه عمده، یعنی اگزوپپتیدازها و اندوپپتیدازها، بسته به محل اثرشان، تقسیم می‌شوند. اگزوپپتیدازها فقط در نزدیکی انتهای زنجیره های پلی پپتیدی ،در نزدیکی انتهای آمینو یا کربوکسی سوبسترا، عمل می‌کنند. بر اساس محل عمل آنها در انتهای N یا C، آنها به ترتیب به عنوان آمینو و کربوکسی پپتیداز طبقه بندی می‌شوند. اندوپپتیدازها با عملکرد ترجیحی آنها در پیوندهای پپتیدی در نواحی داخلی زنجیره پلی پپتیدی ،دور از انتهای N و C، مشخص می‌شوند. وجود آمینو آزاد یا گروه کربوکسیل تأثیر منفی بر فعالیت آنزیم دارد. اندوپپتیدازها بر اساس مکانیسم کاتالیزوری خود به چهار زیر گروه تقسیم می‌شوند: ۱- پروتئازهای سرین۲- پروتئازهای آسپارتیک۳-پروتئازهای سیستئین۴- متالوپروتئازها (Hartley et al., 1960). با توجه به این ساختارها و عملکردها می‌توانند نقش مهمی در صنایع ایفا کنند که در ادامه به آن‌ها می‌پردازیم.

۲.مواد و روش ها

۲-۱-پروتئازهای گیاهی

استفاده از گیاهان به‌عنوان منبع پروتئازها تحت تأثیر عوامل متعددی مانند در دسترس بودن زمین برای کشت و مناسب بودن شرایط آب و هوایی برای رشد است. علاوه بر این، تولید پروتئازها از گیاهان یک فرآیند زمان‌بر است. پاپائین، بروملین، کراتینازها و فیسین برخی از پروتئازهای شناخته شده با منشاء گیاهی هستند(Schechler et al., 1967).

۲-۲- پروتئازهای حیوانی

آشناترین پروتئازهای با منشاء حیوانی تریپسین، پانکراس، کیموتریپسین، پپسین و رنین هستند. این‌ها به صورت خالص در مقادیر فله تهیه می‌شوند. با این حال، تولید آنها به در دسترس بودن دام برای کشتار بستگی دارد که به نوبه خود به میزان کشاورزی بستگی دارد (Hoffman 1974; Boyer 1971).

۳-۲- پروتئازهای میکروبی

ناتوانی پروتئازهای گیاهی و حیوانی در برآورده کردن نیازهای کنونی جهان منجر به افزایش توجه به پروتئازهای میکروبی شده است. میکروارگانیسم‌ها به دلیل تنوع بیوشیمیایی گسترده و حساسیت آن‌ها به دستکاری ژنتیکی منبع خوبی برای تولید آنزیم‌ها هستند. پروتئازهای میکروبی تقریباً ۴۰ درصد از کل فروش آنزیم در سراسر جهان را تشکیل می‌دهند. پروتئازهای حاصل از منابع میکروبی به آنزیم‌های منابع گیاهی و حیوانی ترجیح داده می‌شوند؛ زیرا تقریباً تمام ویژگی‌های مورد نظر برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی خود را دارند(Godfrey and West, 1996).

۱-۳-۲- پروتئازهای قارچی

قارچ‌ها نسبت به باکتری‌ها آنزیم‌های متنوع‌تری ایجاد می‌کنند. به عنوان مثال، *آسپرژیلوس اوریزه* پروتئازهای اسیدی، خنثی و قلیایی تولید می‌کند. پروتئازهای قارچی در محدوده وسیعی از pH (4 تا 11) فعال هستند و بر روی سوبستراهای زیادی اثر می‌کنند. با این حال، آن‌ها نسبت به آنزیم‌های باکتریایی سرعت واکنش کندتر و تحمل گرما کمتری دارند. آنزیم‌های قارچی را می‌توان به راحتی در فرآیند تخمیر حالت جامد تولید کرد. پروتئازهای اسیدی قارچی دارای pH بهینه بین 4 تا 4.5 بوده و بین pH 2.5 تا 6 پایدار هستند. آن‌ها به دلیل فعالیت در pH کم و ویژگی های دمایی مطلوب در صنایع مختلف به ویژه در صنعت پنیرسازی مفید هستند. پروتئازهای خنثی قارچی متالوپروتئازهایی هستند که در pH=7 فعال هستند و توسط عوامل چلاتور[۱۸۵] مهار می‌شوند. با توجه به فعالیت پپتیداز همراه و عملکرد خاص آنها در هیدرولیز پیوندهای اسید آمینه آبگریز، پروتئازهای خنثی قارچی مکمل عمل پروتئازهای گیاهی، حیوانی و باکتریایی در کاهش تلخی هیدرولیزهای پروتئینی مواد غذایی هستند. پروتئازهای قلیایی قارچی نیز در تجزیه پروتئین غذایی استفاده می‌شوند(Mala et al., 1998).

۲-۳-۲- پروتئازهای ویروسی

پروتئازهای ویروسی به دلیل دخالت عملکردی آن‌ها در پردازش پروتئین های ویروس‌هایی که باعث بیماری‌های کشنده خاصی مانند ایدز و سرطان می‌شوند، اهمیت پیدا کرده‌اند. پپتیدازهای سرین، آسپارتیک و سیستئین در ویروس‌های مختلف یافت می‌شوند (Rawlings and Barrett, 1993). همه پپتیدازهای ویروسی از نوع اندوپپتیدازها هستند. تاکنون هیچ متالوپپتیدازی در آن‌ها دیده نشده است. پروتئازهای آسپارتیک رتروویروسی، که برای مونتاژ و تکثیر ویروس مورد نیاز هستند، همودایمر هستند و به عنوان بخشی از پیش ساز پلی‌پروتئین بیان می‌شوند؛ پروتئاز بالغ بصورت اتولیز پیش ساز آزاد می‌شود. اطلاعات گسترده‌ای در مورد بیان، خالص

[185] chelating agents

سازی و تجزیه و تحلیل آنزیمی پروتئاز آسپارتیک رتروویروسی و همچنین انواع جهش یافته‌ی آن موجود است(Kuo and Shafer, 1994).

۳-۳-۲- پروتئازهای باکتریایی

بیشتر پروتئازهای تجاری، عمدتا خنثی و قلیایی، توسط ارگانیسم‌های متعلق به جنس *باسیلوس* تولید می‌شوند. پروتئازهای خنثی باکتریایی در محدوده pH 5 تا 8 فعال هستند و تحمل حرارتی نسبتاً کمی دارند. به دلیل سرعت واکنش متوسط، پروتئازهای خنثی نسبت به پروتئینازهای حیوانی ،تلخی کمتری در پروتئین های غذایی هیدرولیز شده ایجاد می‌کنند و از این رو برای استفاده در صنایع غذایی ارزشمند هستند. نوتراز، یک پروتئاز خنثی است که به مهارکننده‌های پروتئیناز طبیعی گیاهی حساس نیست و بنابراین در صنعت آبجوسازی مفید است. پروتئازهای خنثی باکتریایی بر اساس میل ترکیبی بالای آن‌ها با جفت اسید آمینه‌های آبگریز شناسایی می‌شوند. تحمل دمایی پایینی دارند که برای کنترل واکنش پذیری آن‌ها جهت تولید هیدرولیزهای غذایی با درجه هیدرولیز کم، مفید است. برخی از پروتئازهای خنثی متعلق به نوع متالوپروتئازها هستند و برای فعالیت خود به یون فلزی دو ظرفیتی نیاز دارند، در حالی که برخی دیگر پروتئینازهای سرین هستند که تحت تأثیر عوامل چلاتور قرار نمی‌گیرند. پروتئازهای قلیایی باکتریایی فعالیت زیادی در pH قلیایی، به عنوان مثال، pH=10 دارند و بر روی سوبستراهای زیادی اثر می‌کنند. دمای مطلوب فعالیت آن‌ها حدود 60 درجه سانتی‌گراد است. بنابراین پروتئازهای قلیایی باکتریایی برای استفاده در صنایع شوینده مناسب هستند(Mala et al., 1998).

۳.تایج و بحث

پروتئاز یکی از پرمصرف‌ترین آنزیم‌های صنعتی است که کاربردهای فراوانی در صنایع مختلف از جمله شوینده، چرم، بازیافت نقره، لبنیات، نانوایی، نوشابه‌سازی و صنایع دارویی و غیره دارد(Solanki et al., 2021).

۳-۱-استفاده در مواد شوینده

آنزیم پروتئاز از اواخر دهه 1990 در ترکیبات مواد شوینده ،به عنوان یکی از بزرگترین صنایع استفاده از پروتئازها، کاربرد دارد(Razzaq et al., 2019). پروتئاز، مواد غذایی مانند شیر، تخم مرغ، گوشت گاو، ماهی، خون و سایر ترشحات بدن را هضم می‌کند و کیفیت شستشوی مواد شوینده را، با کاهش زمان خیساندن، بالا می‌برد. این آنزیم‌هایی که به عنوان افزودنی‌های شوینده استفاده می‌شوند، به دلیل توانایی یونی‌شان، می‌توانند در مقادیر بسیار کم و در طیف pH و دمای بالا مفید باشند و باعث ماندگاری بیشتر و کارایی بهتر موادشوینده می‌شوند (Singh et al., 2016). پروتئازهای تولید شده توسط *Bacillus sp.* و پروتئازهای قلیایی برخی از سویه‌های قارچی، به دلیل سهولت ساخت آن‌ها در صنعت شوینده شهرت پیدا کرده‌اند (Tekin et al., 2020). پروتئاز تولید شده توسط *Bacillus licheniformis RP1* به عنوان یک ماده شوینده قوی با عملکرد پایدار در محلول ۱۰٪ (w/v) شوینده تجاری (Fabs Perfect) شناخته شده‌است، بنابراین از عملکرد تجاری بالایی برخوردار است(Singh et al., 2016).

۳-۲-استفاده در چرم سازی

پروتئازها برای شکستن ترکیبات غیر کلاژنی پوست و حذف پروتئین‌های غیر فیبریلاری استفاده می‌شوند. استفاده از این آنزیم‌ها برای پردازش چرم ،کیفیت چرم را افزایش می‌دهد و بنابراین چرم محکم‌تر و نرم‌تر با لکه‌های کمتر تولید می‌شود (Fang et al., 2017). همچنین، استفاده از این آنزیم‌ها در ساخت چرم باعث بهبود کیفیت چرم و در عین حال کاهش آلودگی محیط زیست شده‌است. افزایش کاربرد پروتئاز قلیایی در صنایع جدید چرم سازی به دلیل فعالیت الاستولیتیک و کراتینولیتیک است (Moridshahi et al., 2020). این خواص پروتئاز قلیایی در صنایع فرآوری چرم بسیار مؤثر است. کاربردهای خاص پروتئاز در مرحله خیساندن و از بین بردن موها در آماده سازی پوست مؤثر است (Zhou et al., 2018). کندن مو به روش آنزیمی هیچ گونه آسیبی به سطح پوست وارد نمی‌کند و چرم با کیفیت بالا را می‌توان به راحتی و با کمترین مواد شیمیایی تولید کرد. پروتئازهای قلیایی میکروبی در صنایع چرم بسیار محبوب شده‌اند. استفاده از آنزیم‌ها در فرآوری چرم ضرر کمتری به محیط زیست وارد می‌کند(Ammasi et al. 2020; Kalaikumari et al. 2019)

۳-۳-استفاده در عکاسی

بازیابی نقره از فتوفیلم‌ها یک تجارت بزرگ است. هر ساله نزدیک به 2 میلیارد رادیوگرافی از قفسه سینه، ماموگرافی و سیتی‌اسکن گرفته می‌شود (Cavello et al., 2015). از آنجایی که نقره در لایه امولسیونی به ژلاتین متصل است، می‌توان آن را شکست و نقره را آزاد کرد که می‌توان از آن به عنوان منبع نقره ثانویه استفاده کرد. روشی آنزیمی ممکن است توسعه یابد که می‌تواند نقره را به طور موثر و با حداقل تأثیر بر محیط زیست بازیابی کند(Al-Abdalall and Al-Khaldi, 2016). گزارش شده‌است که پروتئازها دارای فعالیت ژلاتینولیتیک عالی برای بازیابی موفق نقره از فیلم‌های اشعه ایکس هستند. پروتئازهای *Purpureocillium lilacinum* نیز توانایی هیدرولیز ژلاتین خوبی را نشان داده‌اند. پروتئازهای قلیایی تولید شده توسط *B. Subtilis*، *Streptomyces avermectnus* و *Conidiobolus coronatus* شناسایی شده اند که نقره را از فیلم‌های اشعه ایکس بازیابی می‌کنند و اطمینان می‌دهند که این فرآیند نسبت به استفاده از مواد شیمیایی، با محیط زیست سازگارتر است. استخراج نقره مبتنی بر آنزیم از فیلم‌های اشعه ایکس به منابع انرژی تجدیدپذیر بیشتر از سوخت‌های فسیلی متکی است؛ بنابراین، ممکن است یک فرآیند دوستدار محیط زیست تلقی شود(Cavello et al., 2015).

۴-۳-استفاده در سنتز پپتید

پروتئازهای ویروسی، قارچی، گیاهی و حیوانی در سال‌های اخیر برای سنتز بسیاری از پپتیدهای کوچک، به‌ویژه دی پپتیدها و تری پپتیدها با استفاده از یک فرآیند زیستی کنترل شده ترمودینامیکی یا جنبشی، مورد توجه زیادی قرار گرفته است. (Kumar and Bhalla, 2005; Motyan et al., 2013; Yang et al., 2020). پروتئازهای قلیایی وابسته به حلال آلی از جنس‌های *Aspergillus*، *Bacillus* و *Pseudomonas* در سنتز پپتیدها نقش دارند (Song et al., 2020). پپتیدهای تولید شده توسط پروتئاز، به عنوان فعال زیستی_درمانی ، در تولید مواد مغذی، کمک کننده‌های‌گوارشی، آنتی اکسیدان‌ها، تنظیم کننده‌های فشارخون و رژیم غذایی و ترکیبات دارویی نقش دارند (Nongonierma and FitzGerald, 2015; Nandan and Nampoothiri, 2020).

۵-۳-استفاده در صنایع لبنی

کاربرد عمده پروتئازها در صنایع لبنی در ساخت پنیر است. در پنیرسازی، وظیفه اصلی پروتئازها هیدرولیز پیوند پپتیدی خاص (پیوند Phe105-Met106) برای تولید پارا-κ-کازئین و ماکروپپتیدها است. در سال 1998،کیموزین تولید شده از طریق فناوری DNA نوترکیب، برای اولین بار، جهت بررسی کارایی و عملکرد، به پنیرسازان معرفی شد. پروتئازهای تولید شده توسط GRAS[186] (که از نظر ژنتیکی به عنوان میکروب‌های پاکسازی شده ایمن در نظر گرفته می‌شود) مانند *Mucor michei*، *Bacillus subtilis* و *Endothia parasitica* به تدریج جایگزین کیموزین در پنیرسازی شدند. شرکت Genencor International تولید کیموزین را در *Aspergillus niger* var. *awamori* افزایش داد (Godfrey and West, 1996).

۳-۶-استفاده در صنایع غذایی

استفاده از مواد شیمیایی در صنایع غذایی به طور قابل توجهی خطرناک است و تولیدکنندگان مواد غذایی در سراسر جهان، به دنبال پیدا کردن جایگزین های طبیعی برای آن‌ها هستند. استفاده از پروتئازهای میکروبی دوستدار محیط زیست، پتانسیل برجسته‌ای را در جایگزینی عوامل شیمیایی نشان داده است، در حالی که خواص محصولات غذایی را بهبود می‌بخشد. عملکرد پروتئازهای میکروبی به عنوان کاتالیزورهای زیستی از زمان‌های بسیار قدیم در تخمیر مواد غذایی مورد استفاده قرار گرفته است (Singh et al., 2016).همچنین مشخص شده است که پروتئازهای با منشاء میکروبی پایدارتر از همتایان خود در حیوانات یا گیاهان، با عملکرد بهتر جهت بهینه‌سازی یا اصلاح فرآیند هستند (Gurung et al., 2013).

۳-۷-استفاده در تولید خوراک دام

آنزیم‌های پروتئاز در خوراک دام ،به عنوان مکمل غذایی، می‌تواند به عنوان عنصری در فرمولاسیون رژیم غذایی حیوانات برای کمک به هضم پروتئین در دستگاه گوارش،مورد استفاده قرار گیرد (Hejdysz et al., 2020). تأثیر مخلوط پروتئازهای مکمل مختلف سیستئین پروتئاز و سرین اندوپپتیداز بر متغیرهای بهره‌وری در گاوهای هلشتاین شیرده توسط پارک و همکاران مورد مطالعه قرار گرفت. نتیجه آزمایش نشان داد که پروتئاز مکمل ،تولید شیر و گوشت و همچنین عوامل تولید نیتروژن را افزایش می‌دهد (Yang et al., 2020). یک سرین پروتئاز جدید که در *Bacillus licheniformis* به عنوان پروتئاز خوراک بیان می‌شود، درجه هیدرولیز، حل شدن و قابلیت هضم پروتئین‌ها را به میزان قابل توجهی افزایش می‌دهد (Naveed et al., 2021).

۳-۸-استفاده در داروسازی

تنوع گسترده و اختصاصی بودن پروتئازها در توسعه عوامل درمانی موثر است. از تجویز خوراکی پروتئازهای *Aspergillus oryzae* (Luizym و Nortase) به عنوان یک کمک کننده‌ی گوارشی برای اصلاح برخی از سندرم‌های کمبود آنزیم لیتیک استفاده شده است. کلاژناز *کلستریدیال* یا *سوبتیلیسین* به همراه آنتی بیوتیک‌های مختلف در درمان سوختگی‌ها و زخم‌ها استفاده می‌شود. آسپارژیناز جدا شده از *E. coli* برای از بین بردن آسپارژین از جریان خون در اشکال مختلف لوسمی لنفوسیتی استفاده می‌شود. پروتئاز قلیایی حاصل از *Conidiobolus coronatus* می‌تواند جایگزین تریپسین در کشت‌های سلولی حیوانی شود(Chiplonkar and et al., 1985).

۳-۹-استفاده در پزشکی

[186] genetically regarded as safe

پروتئازها خواص درمانی امیدوارکننده‌ای در زمینه پزشکی دارند. در تولید باندهای زخم و پماد نقش دارند. برخی از سندرم‌های کمبود آنزیم لیتیک با تجویز خوراکی پروتئازهای قلیایی تشخیص داده می‌شوند (Joshi and Satyanarayana, 2013). استفاده از این آنزیم فیبرینولیتیک ،کاربرد آینده آن را به عنوان یک داروی ضد سرطان و در درمان ترومبولیتیک نشان می‌دهد(Jaouadi et al., 2012).همچنین، از الاستوتراز برای درمان بیماری‌های مختلف مانند سوختگی، کربونکول، فورونکل و زخم استفاده می‌شود. پروتئازها دارای خواص درمانی متمایز هستند که در توسعه‌ی داروهای مختلف علیه بیماری‌های کشنده ،مانند ضد سرطان، ضد میکروبی، عفونت‌های ضد التهابی و عوامل انعقادی لخته‌ها و کاربردهای متنوع دیگر مفید هستند (Srilakshmi et al., 2015; Kumar and Jain, 2018). امروزه پروتئازها در درمان فیبروز کیستیک، سپسیس، اختلالات گوارشی، اختلالات شبکیه و بسیاری از بیماری‌های دیگر مفید هستند. علاوه بر این، آن‌ها همچنین به کاهش ناراحتی ناشی از گرفتگی سینه در زنان شیرده کمک می‌کنند (Banerjee and Ray 2017). آسپاراژیناز از *اشریشیا کلای* و کلاژناز نیز به ترتیب نقش مهمی در حذف آسپاراژین از خون در اشکال لوسمی لنفوسیتی، سوختگی و زخم دارند (Muneer et al., 2020). آنزیم ناتوکیناز از *Bacillus subtilis* در برابر بیماری‌های قلبی عروقی مفید است (Lan et al., 2020).

۴.نتیجه گیری

پروتئازها یک کلاس منحصر به فرد از آنزیم‌های بیولوژیکی هستند که هم عملکرد تخریبی و هم عملکرد سنتزی در فرایندهای شیمیایی دارند. پروتئازها به‌عنوان دوستدار محیط شناخته شده‌اند؛ بنابراین پتانسیل امیدوارکننده‌ای برای آینده دارند. عملکرد درمانی آن‌ها در برابر کنترل شیوع بیماری های همه گیر مانند مالاریا و ایدز و بیماری‌هایی مانند سرطان در حال توسعه است. چند دهه گذشته دانش ما را برای کشف کاربردهای این آنزیم‌ها در صنایعی فراتر از صنایع غذایی، مانند منسوجات، چرم، مواد شوینده، کشاورزی و صنایع دارویی افزایش داده‌است. «عصر OMICS» جهت‌گیری‌های آتی را برای استفاده از پتانسیل پروتئولیتیک این آنزیم‌ها در نانوتکنولوژی و سیستم‌های دارورسانی خاص یا هدفمند و همچنین برای فناوری تصویربرداری در تشخیص سرطان ارائه کرده‌است. پروتئازهای مهندسی شده جدیدی که توسط مولکول‌های کوچک فعال می‌شوند، فعالیت پروتئازهای انسانی و تغییر قابل توجه روند چرخه سلولی و احتمالاً حتی مرگ سلولی را کنترل می‌کنند. این مولکول‌ها استراتژی‌های بالقوه‌ای را برای هدف قرار دادن اهداف غیرقابل دسترس در داخل سلول‌ها ارائه می‌دهند که کاربردهای بالینی زیادی در آینده دارد.

در حال حاضر کاربردهای پروتئازها در بسیاری از زمینه‌های صنعتی گسترش یافته‌است، در حالی که آن‌ها به عنوان ابزارهای امیدوارکننده‌ای در داروسازی (درمانی و تشخیصی)، مدیریت ضایعات، تولید انرژی زیستی، کشاورزی و صنایع غذایی در حال بررسی هستند. محدودیت‌های تولید پروتئازهای میکروبی جدید و مطلوب می‌تواند مرتبط با ویژگی بستر، پایداری و هزینه‌های تولید باشد. فناوری‌های امروزه به طور گسترده، جهت کشف یا مهندسی پروتئازهای جدید برای غلبه بر این موانع، مورد استفاده قرار می‌گیرند. تلاش‌های آینده جهت جایگزینی روش‌های مرتبط آنزیمی یا پروتئازی به‌جای روش‌های صنعتی به طور قابل‌توجهی هم برای محیط زیست و هم برای بقای گونه‌های انسانی مفید خواهدبود.

منابع

2. Al-Abdalall A. H., and Al-Khaldi E. M. 2016. Recovery of silver from used X-ray film using alkaline protease from *Bacillus subtilis sub sp. subtilis*. Afr J Biotechnol, 1413–1416.

3. Ammasi R., Victor J. S. Chellan R. Chellappa M. 2020. Alkaline protease for an efficacious rehydration of skin matrix by a novel *Bacillus crolab MTCC 5468* in sustainable leather production: a green approach. Biotechnol Lett, 249–267.

4. Banerjee G., and Ray AK. 2017. Impact of microbial proteases on biotechnological industries. Biotechnol Genetic Engg Rev, 119–143.

5. Barett A. J,. 1994. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. Methods Enzymol, 1–15.
6. Boyer P. D,. 1971. The enzymes 3rd ed. New York, N.Y: Academic Press, Inc.
7. Cavello I. A., Crespo J. M. Garcia S. S. Zapiola J. M. Luna M.F. and Cavalitto S.F. 2015. Plant growth promotion activity of keratinolytic fungi growing on a recalcitrant waste known as Hair Waste Biotechnol Res Int.
8. Chiplonkar J. M., Gangodkar S. V. Wagh U. V. Ghadge G. D. Rele M. V. and Srinivasan M. C. 1985. Applications of alkaline protease from Conidiobolus in animal cell culture. Biotechnol Lett, 665–668.
9. Contesini F. J., Rodrigues de Melo R. and Sato H. H. 2017. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application, Crit Rev Biotechnol.
10. Fang Z., Yong Y. C. Zhang J. Du G. and Chen J. 2017. Keratinolytic protease: a green biocatalyst for leather industry. Appl Microbiol Biotechnol, 7771–7779.
11. Godfrey T., and West S. 1996. Industrial enzymology 2nd ed. New York, N.Y: Macmillan Publishers Inc, p. 3.
12. Gurung N., Ray S. Bose S. and Rai V. 2013. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. Biomed Res Int, 329121.
13. Hartley B. S. 1960.Proteolytic enzymes. Annu Rev Biochem, 45–72.
14. Hejdysz M., Kaczmarek S. A. Kubis M. Wiśniewska Z. Peris S. Budnik S. and Rutkowski A. 2020. The effect of protease and *Bacillus licheniformis* on nutritional value of pea, faba bean, yellow lupin and narrow-leaved lupin in broiler chicken diets. Br Poultry Sci, 287–293.
15. Hoffman T. 1974. Food related enzymes. Adv Chem Ser, 146–185.
16. Jaouadi N.Z., Jaouadi B. Aghajari N. and Bejar S. 2012. The overexpression of the SAPB of Bacillus pumilus CBS and mutated sapB-L31I/T33S/N99Y alkaline proteases in *Bacillus subtilis DB430*: new attractive properties for the mutant enzyme. Bioresour Technol,142–151.
17. Joshi S., and Satyanarayana T. 2013. Characteristics and applications of a recombinant alkaline serine protease from a novel bacterium *Bacillus lehensis*. Bioresour Technol, 76–85.
18. Kalaikumari S. S., Vennila T. Monika V. Chandraraj K. Gunasekaran P. and Rajendhran J. 2019. Bioutilization of poultry feather for keratinase production and its application in leather industry. J Clean Prod, 44–53.
19. King John V., Liang Wenguang G., Scherpelz Kathryn P. Schilling Alexander B. Meredith Stephen C. and Tang W. 2014. Molecular basis of substrate recognition and degradation by human presequence protease". Structure, 22 (7): 996–1007.
20. Kumar D., Bhalla T. C. 2005. Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications. Appl Microbiol Biotechnol, 726–736.
21. Kumar L., and Jain S. K. 2018. Proteases: a beneficial degradative enzyme in therapeutic applications. Inter J Sci Res Biol Sci, 114–118.
22. Kuo L. C., and Shafer J. A. 1994. Retroviral proteases. Methods Enzymol, 3–178.

23. Lan G., Li C. He L. Zeng X. and Zhu Q. 2020. Effects of different strains and fermentation method on nattokinase activity, biogenic amines, and sensory characteristics of natto. J Food Sci Technol, 57(12):4414–4423.

24. López-Otín C., Bond Judith S. 2008 . Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. Journal of Biological Chemistry, 283 (45): 30433–30437.

25. Mala B. R., Aparna M. T. Mohini S. G. and Vasanti V. D. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases, 62(3): 597–635.

26. Moridshahi R., Bahreini M. Sharifmoghaddam M. and Asoodeh A. 2020. Biochemical characterization of an alkaline surfactant-stable keratinase from a new keratinase producer, *Bacillus zhangzhouensis*. Extremophiles,693–704.
27. Motyan J. A., Toth F. and Tozser J. 2013. Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. Biomolecules, 923–942.

28. Muneer F., Siddique M. H. Azeem F. Rasul I. Muzammil S. Zubair M. and Nadeem H. 2020. Microbial l-asparaginase: purification, characterization and applications. Arch Microbiol, 1–15.

29. Nandan A., and Nampoothiri K.M. 2020. Therapeutic and biotechnological applications of substrate specific microbial aminopeptidases. Appl Microbiol Biotechnol, 5243–5257.
30. Naveed M., Nadeem F. Mehmood T. Bilal M. Anwar Z. and Amjad F. 2021. Protease-a versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: an updated review. Catal Lett, 307–323.
31. Nongonierma A. B., and FitzGerald R. J. 2015. The scientific evidence for the role of milk protein-derived bioactive peptides in humans: a review. J Funct Foods, 640–656.
32. Rawlings N. D., and Barrett A. J. 1993. Evolutionary families of peptidases. Biochem J, 205–218.
33. Razzaq A., Shamsi S. Ali A. Ali Q. Sajjad M. Malik A. and Ashraf M. 2019. Microbial proteases applications. Front Bioeng Biotechnol,7:110.
34. Schechler I., Berger A. 1967. On the size of the active site in proteases I papain. Biochem Biophys Res Commun, 157–162.
35. Shen Y., Joachimiak A. Rosner M.R. and Tang W.J. 2006. Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. Nature, 443 (7113): 870–874.
36. Singh R., Kumar M. Mittal A. and Mehta P .K. 2016. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 Biotech, 6:174.
37. Solanki P., Putatunda C. Kumar A. and Bhatia R. 2021. Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. Biotech, 11(10): 428.
38. Song P., Cheng L. and Tian K. 2020. Biochemical characterization of two new *Aspergillus niger* aspartic proteases. 3 Biotech, 10:303.
39. Srilakshmi J., Madhavi J. Lavanya S. and Ammani K. 2015. Commercial potential of fungal protease: past, present and future prospects. J Pharm Chem Biol Sci, 2(4):218–234.

40. Tekin A., Uzuner U. and Sezen K. 2020.Homology modeling and heterologous expression of highly alkaline subtilisin-like serine protease from *Bacillus halodurans C-125*. Biotechnol Lett.

41. Yang H., Liu Y. Ning Y. Wang C. Zhang X. Weng P. and Wu Z. 2020. Characterization of an intracellular alkaline serine protease from *Bacillus velezensis SW5* with fibrinolytic activity. Curr Microbiol, 1610–1621.

42. Zhou C., Qin H. Chen X. Zhang Y. Xue Y. and Ma Y. 2018. A novel alkaline protease from alkaliphilic *Idiomarina sp. C9–1* with potential application for eco-friendly enzymatic dehairing in the leather industry. Sci Rep, 16467.

Evaluation of antimicrobial activity of actinobacteria isolated by ichip method against some pathogenic microorganisms

Niki Ghoorchi MohebSeraj[1*]; Mojtaba Mohseni[2]; Hamed. Norouzi[3]

[1]MSc. student in Microbiology, Department of Microbiology, University of Mazandaran, Iran
[2]Associate Professor of Microbiology, Department of Microbiology, University of Mazandaran, Iran
[3]PhD of microbiology, Farhangian University, University of Mashhad, Iran

* *n.ghoorchi@stu.umz.ac.ir*

Abstract

Extensive use of antibiotics has led to an increase in antibiotic-resistant bacteria and a high mortality rate from infectious diseases. Therefore, finding a new source of antimicrobial compounds is crucial to overcoming antibiotic-resistant infectious diseases. Actinobacteria are an important source of secondary metabolites, especially various antimicrobial active compounds. The aim of the present study was to investigate the activity of antimicrobial compounds produced by *Streptomyces* isolated by ichip method. Primary screening of *Streptomyces* isolates producing antibacterial compounds was performed by cross-culture in Muller-Hinton agar medium. The active metabolites of the isolates were grown in AIM liquid culture medium and isolated by thin layer chromatography (TLC). The antibacterial activity of the isolated sections was measured by disk diffusion method. Also, the minimum growth inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of the isolated metabolites were evaluated. Primary screening results of Streptomyces isolates showed that both isolates had antibacterial activity against 10 bacteria. Also, a distinct growth inhibition halo was observed at the intersection of *Streptomyces* isolates and pathogenic bacteria. The results of antibacterial activity of active compounds isolated by TLC showed that the highest growth inhibition zone was related to Bacillus subtilis and Staphylococcus aureus. Also, the results of MIC and MBC, the secondary metabolite of the isolates, showed the highest antibacterial activity against Bacillus subtilis. The results of the present study showed that the secondary metabolites of both isolates had significant antibacterial activity against pathogenic bacteria. To identify the chemical structure of active compounds produced by Streptomyces isolates, a more detailed study is needed using instrumental analysis.

Keywords: Streptomyces, Natural active compounds, Antibacterial, ichip

ارزیابی فعالیت محصولات ضد میکروبی اکتینوباکترهای جداشده به روش ichip علیه برخی میکروارگانیسم‌های بیماریزا

نیکی قورچی محب سراج[۱*]؛ مجتبی محسنی[۲]؛ حامد نوروزی[۳]

[۱]دانشجو کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران
[۲]دانشیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران
[۳]دکتری میکروبیولوژی ، دانشگاه فرهنگیان مشهد

* *n.ghoorchi@stu.umz.ac.ir*

چکیده

استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به افزایش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و نرخ بالای مرگ و میر در اثر بیماریهای عفونی شده است. بنابراین یافتن منبع جدید تولید کننده ترکیبات ضدمیکروبی برای غلبه بر بیماری‌های عفونی مقاوم به آنتی‌بیوتیک کاملاً حیاتی است. اکتینوباکترها منبع مهم متابولیت‌های ثانویه به ویژه ترکیبات فعال ضد میکروبی مختلف هستند. هدف از پژوهش حاضر بررسی فعالیت ترکیبات ضد میکروبی تولید شده توسط *استرپتومایسس* جداشده به روش ichip بود. غربالگری اولیه جدایه‌های *استرپتومایسس* تولید کننده ترکیبات ضد باکتریایی، از روش کشت متقاطع در محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده شد. سپس متابولیت‌های فعال جدایه‌ها رشد کرده در محیط کشت مایع AIM استخراج شد و به کمک کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) جداسازی شد. فعالیت ضد باکتریایی بخش‌های جدا شده به روش انتشار از دیسک سنجیده شد. همچنین حداقل غلظت مهار کنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) متابولیت‌های جدا شده ارزیابی شد. نتایج غربالگری اولیه جدایه‌های *استرپتومایسس* نشان داد هر دو جدایه دارای فعالیت ضد باکتریایی علیه ۱۰ باکتری بودند. همچنین هاله توقف رشد مشخص در محل تقاطع رشد جدایه‌های *استرپتومایسس* و باکتری‌های بیماریزا مشاهده شد. نتایج فعالیت ضد باکتریایی ترکیبات فعال جدا شده به کمک TLC نشان داد بیشترین هاله توقف رشد مربوط به *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. همچنین نتایج MIC و MBC متابولیت ثانویه جدایه‌ها نشان داد بیشترین فعالیت ضد باکتریایی علیه *باسیلوس سوبتیلیس* داشت. نتایج پژوهش حاضر نشان داد متابولیت‌های ثانویه هر دو جدایه، فعالیت ضد باکتریایی قابل توجهی علیه باکتری‌های بیماریزا داشت. برای شناسایی ساختار شیمیایی ترکیبات فعال تولید شده توسط جدایه‌های *استرپتومایسس*، نیاز به مطالعه دقیق‌تر به کمک آنالیز دستگاهی است.

واژگان کلیدی: *استرپتومایسس*، ترکیبات فعال طبیعی، ضد باکتری، ichip

۱. مقدمه

اخیراً به دلیل ظهور میکروارگانیسم‌های بیماریزا مقاوم به آنتی‌بیوتیک، نیاز به آنتی‌بیوتیک‌های جدید احساس می‌شود. اعضای شاخه اکتینوباکتریا منبع امیدوار کننده‌ای از ترکیبات زیست فعال به ویژه آنتی‌بیوتیک‌ها هستند (۱). توانایی تولید انبوهی از متابولیت‌ها و آنزیم‌های ثانویه ، اکتینوباکتری‌ها را به یکی از میکروب‌های مورد بررسی در میان پروکاریوت‌ها تبدیل می‌کند که

طیفی از مولکول‌های فعال زیستی مانند ترکیبات ضد باکتری، ضد انگلی، ضد قارچی، ضد ویروسی، ضد سرطانی سنتز می‌کنند (۲). حدود ۲۳۰۰ نوع متابولیت ثانویه فعال توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شود و اکتینوباکترها بیش از ۷۵ درصد از آنتی بیوتیک‌ها و ترکیبات ضد میکروبی مختلف، تولید می‌کنند. این ترکیبات به عنوان منابع جدید فعال، شناخته می‌شوند (۳). به طور کلی بیشتر گونه‌های میکروبی کشت نشده باقی می‌مانند و اصلاح محیط‌های مغذی مصنوعی تنها افزایش تدریجی در قابلیت کشت را به همراه دارد. کشت درجا در ارتباط با میکروارگانیسمهایی است که با روش‌های معمول آزمایشگاهی قابل کشت نیستند. باکتری‌های خاک در محیط طبیعی خود رشد بیشتری دارند و تعدادی از آنها فقط در محیط طبیعی خود قادر به رشد هستند به همین علت از روش ichip برای رشد و جداسازی اکتینوباکترها می‌توان استفاده کرد. در این روش از تراشه جداسازی (ichip) استفاده می‌شود که با قرار دادن تنها یک تا چند سلول در هر محفظه، می‌توان میکروارگانیسم‌ها را در محیط طبیعی خود کشت داده و جداسازی کرد (۴).

در سال ۲۰۱۳، محسنی و همکارانش به بررسی خاصیت ضد قارچی جدایه‌های اکتینوباکترهای جداسازی شده از رسوبات دریای مازندران پرداختند. نتایج نشان داد از مجموع اکتینومیست های فعال جداشده، ۷ جدایه دارای فعالیت ضد قارچی خوب بودند (۵). در سال ۲۰۲۰، حسین و همکارانش به بررسی خاصیت ضد باکتریایی متابولیت ثانویه یکی از جدایه‌های متعلق به جنس *استرپتومایسس* پرداختند. در نتایج این پژوهش تاثیر خواص ضد باکتریایی متابولیت ثانویه روی باکتری *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* بررسی شد که مانع از رشد این باکتری بیماریزا شد (۶). در پژوهش حاضر محصولات فعال زیستی دو جدایه *استرپتومایسس* جدا شده از خاک به روش ichip، استخراج شد و فعالیت ضد باکتریایی متابولیت‌ها علیه برخی باکتری‌های بیماریزا بررسی شد.

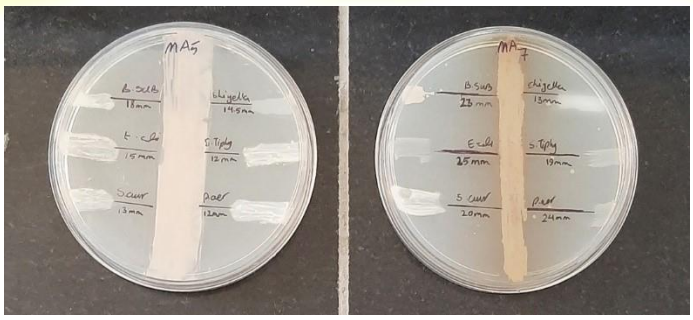
۲.مواد و روش‌ها

دو جدایه *استرپتومایسس* MA5 و MA7 که قبلا از خاک مناطق جنگلی گلستان به روش ichip جدا سازی شده بود در محیط کشت اختصاصی SCA آگار رشد داده شد. برای بررسی اثر ضد باکتریایی این دو جدایه، غربالگری اولیه به روش کشت متقاطع یا cross streak استفاده شد. هر دو جدایه روی محیط کشت مولر هینتون به صورت خط مستقیم کشت داده شد و برای رشد به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. سپس ۱۰ باکتری شامل *اشریشیا کلی*، *سالمونلا تیفی*، *باسیلوس سوبتی‌لیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شیگلا فلکسنری*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اسینتوباکتر بومانی*، *انتروکوکوس فاسیوم*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین به صورت یک خط عمود بر خط اصلی کشت جدایه (*استرپتومایسس*)، تلقیح شدند. مجددا پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرما گذاری شدند. هاله عدم رشد که نشان دهنده تاثیر فعالیت ضد باکتریایی دو جدایه MA5 و MA7 علیه باکتری‌های بیماریزا بود اندازه‌گیری شد. سپس غربالگری ثانویه برای دو جدایه MA5 و MA7 به روش انتشار از دیسک انجام شد. انجام این آزمایش نیازمند وجود متابولیت‌های ثانویه بود که با انتخاب محیط کشت اختصاصی اکتینوباکترها تحت عنوان AIM و بهینه سازی دما، pH، زمان رشد، هوادهی مناسب (توسط انکوباتور شیکردار) انجام شد. دو جدایه در محیط کشت مایع AIM کشت داده شد و به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار با دور ۱۸۰ rpm گرماگذاری شد. برای استخراج ترکیبات فعال ضد میکروبی از محیط رشد جدایه‌ها، محیط رشد به مدت ۱۵ دقیقه در ۷۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. پس از حذف توده سلولی جدایه‌ها، حلال اتیل استات به نسبت ۱:۱ به سوپرناتانت افزوده شد. برای جداسازی و حذف فاز آبی از فاز آلی اتیل استات (حاوی متابولیت ثانویه) از قیف جداکننده (دکانتور) استفاده شد. پس از تغلیظ عصاره خام جدایه‌ها، بخش‌های متابولیت‌ها با روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) جداسازی شد. برای بررسی فعالیت ضد باکتریایی متابولیت‌های جداشده علیه ۱۰ باکتری، از روش انتشار از دیسک روی محیط کشت مولر-هینتون آگار استفاده شد. به هر دیسک

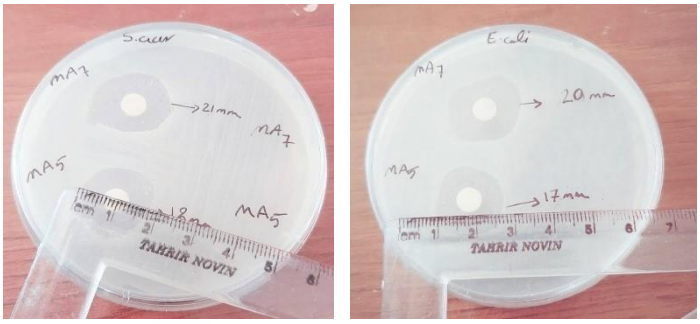
کاغذی استاندارد (شرکت پادتن طب، قطر ۶ میلی‌متر) حجم ۳۰ میکرولیتر از متابولیت جدایه‌های MA5 و MA7 افزوده شد. سپس دیسک‌ها روی محیط کشت تلقیح شده به صورت کشت چمنی ۱۰ باکتری (به طور مجزا) قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد (۷). همچنین برای بررسی فعالیت ضد باکتریایی متابولیت‌های استخراج شده به کمک TLC، از روش سنجش حداقل غلظت مهار کنندگی رشد (MIC) استفاده شد. غلظت متابولیت‌های دو جدایه با استفاده از روش استاندارد خارجی تعیین گردید. برای سنجش MIC از میکروپلیت ۹۶ چاهک حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر-هینتون براث و حجم ۱۰۰ میکرولیتر از ۱۰ باکتری (با غلظت نیم مک فارلند) استفاده شد. سپس هر متابولیت به طور جداگانه و با غلظت نهایی ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک افزوده شد. میکروپلیت به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. فعالیت مهارکنندگی رشد (MIC) به صورت کدورت رشد در طول موج ۴۲۰ نانومتر سنجیده شد. اولین چاهک بدون کدورت نشانه MIC است. برای تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) متابولیت‌ها، محیط رشد چاهک با غلظت‌های بالاتر از MIC به محیط کشت تازه نوترین آگار منتقل شد، عدم رشد باکتری در اولین غلظت، نشانه MBC است.

۳. نتایج و بحث

نتایج غربالگری اولیه به روش cross streak نشان داد هر دو جدایه MA7 و MA5 دارای فعالیت ضد باکتریایی علیه هر ۱۰ باکتری بودند (شکل ۱). نتایج اندازه‌گیری هاله عدم رشد در محل تقاطع خط رشد هر دو جدایه MA7 و MA5 نشان داد بیشترین فعالیت ضد باکتریایی علیه *باسیلوس سوبتی‌لیس* مشاهده شد. همچنین کمترین هاله عدم رشد مربوط به *سودوموناس آئروژینوزا* بود. برای بررسی فعالیت ضد باکتریایی، متابولیت‌های فعال جدایه‌ها به کمک TLC جداسازی شد. فعالیت ضد باکتریایی متابولیت‌ها به صورت هاله عدم رشد (آزمون انتشار از دیسک) علیه برخی باکتری‌های بیماریزا در شکل ۲ نشان داده شد. این نتایج نشان داد متابولیت‌های هر دو جدایه، فعالیت ضد باکتریایی مناسب علیه هر ۱۰ باکتری آزمایش شده داشتند. نتایج اندازه گیری قطر هاله عدم رشد متابولیت‌ها علیه هر باکتری در جدول ۱ خلاصه شده است. این نتایج نشان داد بیشترین فعالیت ضد باکتریایی متابولیت هر دو جدایه MA5 و MA7 علیه *باسیلوس سوبتی‌لیس* به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۲۰ و ۲۴ میلی‌متر سنجیده شد. همچنین این نتایج نشان داد متابولیت هر دو جدایه MA5 و MA7، فعالیت ضد باکتریایی مناسب علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) با قطر هاله عدم رشد به ترتیب ۱۴ و ۱۶ میلی‌متر داشت (جدول ۱). نتایج سنجش MIC و MBC متابولیت‌های ثانویه هر دو جدایه نیز به ترتیب با غلظت ۳ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر علیه *باسیلوس سوبتی‌لیس* اندازه گیری شد.



شکل ۱: غربالگری اولیه جدایه‌های MA7 و MA5 به روش کشت متقاطع (Cross streak)



شکل ۲: غربالگری ثانویه متابولیت‌های استخراج شده جدایه‌ها به روش انتشار از دیسک (کربی-بائر)

جدول ۱:غربالگری ثانویه متابولیت جدایه‌های MA5 و MA7 با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی متر) به روش انتشار ازدیسک

باکتری‌ها	MA7	MA5
MRSA	16 mm	14 mm
Escherichia coli	20 mm	17 mm
Staphylococcus aureus	21 mm	18 mm
Shigella flexneri	14 mm	12 mm
Salmonella typhi	18 mm	16 mm
Pseudomonas aeruginosa	17 mm	15 mm
Acinetobacter baumannii	16 mm	14 mm
Bacillus subtilis	24 mm	20 mm
Enterocoocus faecium	15 mm	17 mm
Listeria monocytogenes	14 mm	12 mm

۴. نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر محصولات فعال زیستی دو جدایه *استرپتومایسس* جدا شده از خاک به روش ichip، استخراج شد و فعالیت ضد باکتریایی متابولیت‌ها علیه برخی باکتری‌های بیماریزا بررسی شد. نتایج این بررسی نشان داد متابولیت‌های ثانویه هر دو جدایه، فعالیت ضد باکتریایی قابل توجهی علیه برخی باکتری‌های بیماریزا داشت. بنابراین با استخراج، خالص سازی و مطالعه دقیق تر متابولیت های فعال اکتینوباکترهای های خاک، شاید بتوان آنتی بیوتیک های جدید و مناسب برای درمان بیماری های عفونی ناشی از میکروارگانیسم‌های مقاوم، معرفی کرد .برای شناسایی ساختار شیمیایی ترکیبات فعال تولید شده توسط جدایه‌های *استرپتومایسس*، نیاز به مطالعه دقیق‌تر به کمک آنالیز دستگاهی است.

منابع

1. Rangseekaew, P., & Pathom-Aree, W. (2019). Cave actinobacteria as producers of bioactive metabolites. *Frontiers in microbiology*, *10*, 387.

2. Hoskisson, P. A., & Fernández-Martínez, L. T. (2018). Regulation of specialised metabolites in Actinobacteria–expanding the paradigms. *Environmental microbiology reports*, *10*(3), 231-238

3. Dehnad, A., Bakhshi, R., PARSA, Y. L., MONADI, S. A., Montazam, S. H., & ABDI, S. S. (2009). Screening of Streptomycetes with Antibacterial Activity from Soil Samples of Azarbaijan Regions of Iran.

4. Berdy, B., Spoering, A. L., Ling, L. L., & Epstein, S. S. (2017). In situ cultivation of previously uncultivable microorganisms using the ichip. *Nature protocols*, *12*(10), 2232-2242.

5. Mohseni, M., & Norouzi, H. (2013). Antifungal Activity of Actinomycetes Isolated from Sediments of the Caspian Sea. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, *23*(104), 79-87.

6. Hussain, A., Hassan, Q. P., & Shouche, Y. S. (2020). New approaches for antituberculosis leads from Actinobacteria. *Drug Discovery Today*.

lipase and its applications in industry and medicine

Esmaeil Hassanzadeh [1]*; Sohrab Boozarpour [۲]; Mahmoud Salehi [۲]; Matia Sadat Borhani [2]; Negin Hosseinpour [1]

1. M.Sc. Student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences and Engineering, Gonbad Kavous University,
2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences and Engineering, Gonbad Kavous University

** Corresponding Author Email address: samo.hzz7479@gmail.com*

Abstract

Lipases belong to the class of serine hydrolase and do not require any cofactors. Under normal conditions, lipases hydrolyze the ester bonds at the interface between the insoluble substrate phase and the aqueous phase, in which the enzyme remains soluble. Lipases are involved in conversion reactions such as esterification, interstrification, transesterification, alcoholism, acidolysis, and aminolysis. Among the various microbial enzymes, lipases are widely produced by bacteria, fungi, plants, and animals. Among these, fungal and bacterial lipases due to the diversity of substrates and high resistance in various chemical and physical environments, have received much attention in industry and due to efficient enzyme systems and production of extracellular enzymes, microbes are well Different habitats grow. Microbial lipases have many applications and are involved in various reactions and are widely available in nature and due to their high stability, they perform well. At present, their application is in the production of food processing, pharmacy, medicine and treatment, manufacturing and fermentation of paper, detergents and biodiesel fuels, etc. In this review, we want to examine a number of applications of this enzyme.

Keywords: enzyme, hydrolase, microorganism, biosensor

لیپاز و کاربردهای آن در صنایع و پزشکی

اسماعیل حسن‌زاده[1*]؛ سهراب بوذرپور[2]؛ محمود صالحی[۲]؛ ماتیا سادات برهانی [۲]؛ نگین حسین‌پور[۱]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی دانشگاه گنبد کاووس

۲-استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی دانشگاه گنبد کاووس

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: samo.hzz7479@gmail.com

چکیده

لیپازها متعلق به کلاس هیدرولازهای سرین هستند و به هیچ کوفاکتوری نیاز ندارند. در شرایط طبیعی، لیپازها پیوندهای استری را در سطح مشترک بین فاز سوبسترای نامحلول و فاز آبی، که آنزیم در آن محلول باقی می‌ماند، هیدرولیز می‌کنند. لیپازها در واکنش‌های تبدیلی مانند استریفیکاسیون، اینترسترفیکاسیون، ترانس استریفیکاسیون، الکلیز، اسیدولیز و آمینولیز نقش دارند. در بین آنزیم‌های میکروبی مختلف، لیپازها به طور گسترده به وسیله باکتری‌ها، قارچ‌ها، گیاهان و حیوانات قابل تولید هستند. از این میان لیپازهای قارچی و باکتریایی بدلیل تنوع سوبسترا و مقاومت زیاد در محیط‌های مختلف شیمیایی و فیزیکی، در صنایع مورد توجه فراوانی قرار گرفته‌اند و با توجه به سیستم‌های آنزیمی کارآمد و تولید آنزیم‌های خارج سلولی، میکروب‌ها به خوبی در زیستگاه های مختلفی رشد می‌کنند. لیپازهای میکروبی کاربردهای بسیار زیادی دارند و در واکنش‌های مختلفی دخالت می‌کنند و به صورت وسیع در طبیعت موجودند و بدلیل پایداری زیاد، عملکرد خوبی از خود نشان می دهند. در حال حاضر، کاربردشان در تولید فراوری موادغذایی، داروسازی، پزشکی و درمان، ساخت و تخمیرکاغذ، موادشوینده و سوخت‌های بیودیزل و... است. در این بررسی می‌خواهیم تعدادی از کابردهای این آنزیم را بررسی نماییم.

واژگان کلیدی: آنزیم، هیدرولاز، میکروارگانیسم، بیوسنسور

۱.مقدمه

لیپازها یا تری اسیل گلیسرول‌ها (EC 3.1.1.3) آنزیم‌هایی هستند که مسئول شکستن چربی‌ها به اسیدهای چرب و گلیسرول بوده و از کربوکسی استراز تشکیل شده‌اند و قادر به هیدرولیز تری گلیسیریدهای با زنجیره بلند می‌باشند. اندازه ژن تولید کننده‌ی این

آنزیم حدود 600-2000 جفت باز می باشد و همچنین حدود30-50 کیلو دالتون وزن دارد و می‌تواند به دو صورت داخل سلولی و خارج سلولی تولید شود (Shamim et al., 2018).

این آنزیم‌ها به میزان زیادی به وسیله گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند. بسیاری از سویه های مختلف گرم مثبت و گرم منفی باکتریایی باعث تولید آنزیم لیپاز می‌شوند که مهمترین آن‌ها از نظر تجاری متعلق به جنس‌های *باسیلوس* هستند که شامل *باسیلوس سوبتیلیس* ، *باسیلوس لیشنیفرمیس* ، *باسیلوس پامیلوس* ، *باسیلوس آلکالوفیلوس* ، *باسیلوس کوآگولانس* ، *باسیلوس استئاروترموفیلوس* و سایر سویه‌های باکتریایی است. لیپازها پس از پروتئازها و آمیلازها از نظر فروش در بازار جهانی، جایگاه سوم را به خود اختصاص داده‌اند. لیپازهای باکتریایی پایدارتر از لیپازهای حیوانی یا گیاهی هستند. پرمصرف‌ترین لیپازها از نظر تجاری لیپازهای تولیدی توسط میکروارگانیسم‌ها با منشأ باکتریایی، قارچی و مخمری هستند. بسیاری از ارگانیسم‌ها توانایی ترشح لیپاز را دارند اما در این میان باکتری‌ها از اهمیت بیشتری برخوردارند؛ چرا که: ۱) لیپازهای باکتریایی در حلال های آلی پایدارند، ۲) برای انجام فعالیت آنزیمی به کوفاکتور نیاز ندارند، ۳) روی طیف وسیعی از سوبسترا ها عمل می‌کنند و ۴) انتخاب‌پذیری فضایی (Enantio selectivity) خوبی دارند (هادی زاده شیرازی و همکاران، 1391؛ رجایی ملکی و همکاران، 1396؛ Bharathi and Rajalakshmi, 2019). در این بررسی به اهمیت لیپازهای میکروبی می‌پردازیم.

۲. مواد و روش ها

۲-۱- لیپاز جانوری

اولین لیپاز جدا شده مورد مطالعه در دهه 1830 از پانکراس خرگوش بود (Jaeger et al, 1994). لیپازها معمولاً در انسان‌ها و حیوانات دارای معده مونوگاستریک، وجود دارند (Sindhu and Pandey, 2021). آنزیم‌های لیپاز معمولاً در لوزالمعده و معده تولید می‌شوند و به هضم چربی‌ها کمک می‌کنند. لیپازهای اصلی دستگاه گوارش انسان لیپاز پانکراس (PL) و پروتئین مربوط به لیپاز لوزالمعده (PLRP2) هستند که توسط پانکراس ترشح می شوند. انسان همچنین دارای چندین آنزیم مرتبط از جمله لیپاز کبدی، لیپاز اندوتلیال و لیپوپروتئین لیپاز ،که در روده عملکردی ندارند، است (Me, 2002).

۲-۲- لیپاز گیاهی

لیپاز گیاهی در دهه‌ی 1970 کشف شد. لیپازهای گیاهی بیشتر در بافت های ذخیره انرژی مانند دانه‌های روغنی یافت می‌شوند. آن‌ها به عنوان کاتالیزورهای زیستی عمل می‌کنند که به دلیل ویژگی بالای بستر، هزینه تولید پایین و پذیرش آسان دارویی به دلیل منشاء یوکاریوتی، مورد توجه می‌گیرند. از این رو لیپازهای گیاهی پتانسیل خوبی برای کاربردهای تجاری در صنایع سنتز آلی، موادغذایی، شوینده‌ها و صنایع دارویی نشان می‌دهند. با این حال، بیان کم و مشکلات زیاد مربوط به بیان نوترکیب آن‌ها، کاربرد تجاری آن‌ها را محدود کرده و چالش‌هایی را برای بسیاری از محققان ایجاد کرده است (Seth et al., 2014).

۲-۳- لیپاز میکرو ارگانیسم ها

لیپازهای مشتق شده از منابع میکروبی اولین بار در اوایل قرن بیستم شناسایی شدند (Jaeger et al., 1994). لیپازهای میکروبی به طور قابل توجهی از نظر طبیعت متنوع هستند (Gupta et al., 2004). علاوه بر این، لیپازهای تولید شده توسط برخی میکروارگانیسم‌هایی که در زیستگاه‌های مختلف زندگی می‌کنند، دارای خواص منحصربه‌فردی هستند که اغلب برای تولید صنعتی مفیدتر می‌باشند (Verma et al., 2021). بیشتر لیپازهای شناسایی شده در میکروارگانیسم‌ها آنزیم‌های خارج سلولی ترشحی هستند که آن‌ها را می‌توان در خلوص بالا جداسازی کرد و درنتیجه برای تولید انبوه مناسب اند. به این ترتیب، لیپازهای میکروبی منبع اصلی آنزیم‌های صنعتی هستند. در میان میکروارگانیسم‌ها، لیپاز در باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها فراوان است. شایع ترین منابع باکتریایی لیپازها عبارتند از *Bacillus spp*.، *Pseudomonas spp*.، *Staphylococcus sp*. و *Burkholderia sp*. (Bharathi and Rajalakshmi, 2019; Priyanka et al., 2019). در بین لیپازهای قارچی هم، لیپازهای جدا شده از *Thermomyces lanuginosus*، *Rhizopus oryzae*، *Aspergillus niger*، *Candida Antarctica* و *Candida Rugosa* از ارزش صنعتی مهمی برخوردارند (Sarmah et al., 2017).

۳. نتایج و بحث

لیپاز میکروبی در حال حاضر در بسیاری از کاربردهای بیوتکنولوژی و صنعت استفاده می‌شود. انتظار می رود که بازار این آنزیم‌ها در 5 سال آینده بیشتر گسترش یابد. در میان جریان کاربردهای صنعتی، لیپازهای میکروبی به طور گسترده برای تولید مواد غذایی، دارو، مواد شوینده، کاغذ، سوخت بیودیزل، لوازم آرایشی و پزشکی و... استفاده می‌شود (Newswire., 2018).

۱-۳- استفاده در صنعت نساجی

در صنعت نساجی از لیپازها برای حذف روان‌کننده‌ها استفاده می‌شود که توانایی جذب پارچه را برای رنگ‌پذیری بهتر افزایش می‌دهند. همچنین، در سیستم‌های سایشی جین، برای کاهش فرکانس ترک‌ها و رگه‌ها استفاده می‌شود. آنزیم‌های لیپاز برای رسوب‌زدایی پارچه‌های پنبه‌ای و جین، در طول آماده‌سازی تجاری آن، استفاده می‌شوند(Senthil Raja et al., 2012).

۲-۳- استفاده در صنعت مواد شوینده

لیپازها پس از پروتئازها دومین ماده مهم افزودنی به مواد شوینده هستند. این خود 32 درصد از کل فروش لیپاز را تشکیل می‌دهد. براساس برآوردها، سالانه یک هزار تن لیپاز به سیزده میلیارد تن مواد شوینده اضافه می‌شود (Mehta et al., 2017) که فاضلاب های حاصل از آن‌ها هیچ گونه خطری برای آبزیان و محیط زیست نخواهد داشت (Kumar et al., 2016). لیپاز اضافه شده به مواد شوینده می‌تواند ، انعطاف‌پذیری پارچه را افزایش دهد(Kumar et al., 2016). لیپازهایی که به مواد شوینده اضافه می‌شوند باید در یک محیط قلیایی قوی، در دمای بالا و با سورفکتانت‌های مختلف که معمولاً در مواد شوینده معمولی استفاده می‌شوند، عمل کنند که لیپازهای

مشتق شده از *A.niger* و *B.subtilis* از این ویژگی‌ها برخوردارند و می‌توانند کاندیدای مناسبی برای فرمولاسیون شوینده باشند (Saraswat et ai., 2017; Unni et al., 2016).

۳-۳-استفاده در صنایع غذایی

لیپاز می‌تواند برای تصفیه روغن، از طریق حذف اسیدهای چرب آزاد، مورد استفاده قرار گیرد. این روش همچنین ممکن است برای اصلاح روغن‌های با کیفیت پایین برای به دست آوردن یک محصول با ارزش افزوده بالا مورد استفاده قرار گیرد. لیپاز همچنین می‌تواند برای بهبود طعم غذا استفاده شود. در صنایع لبنی، لیپاز چربی شیر را هیدرولیز می‌کند. این می‌تواند تا حد زیادی طعم و مزه محصولات لبنی را بهبود بخشد و ارزش غذایی آنها را افزایش دهدکه به این فرآیند بیولیپولیز می‌گویند (Konkit and Kim, 2016). همچنین از لیپاز در فرآوری نوشیدنی‌های الکلی برای بهبود طعم و افزایش جذابیت محصول استفاده می‌شود (Chandra et al., 2020)

۳-۴-استفاده در لوازم آرایشی

لیپازها در فرکردن و حالت دادن مو استفاده می‌شوند و همچنین به عنوان ترکیبی از کرم‌های ضد چاقی موضعی یا به‌عنوان تجویز خوراکی استفاده می‌شوند. رتینوئیدها (ویتامین A و مشتقات آن) از نظر تجاری در لوازم آرایشی و دارویی مانند محصولات مراقبت از پوست بسیار مهم هستند بنابراین از لیپازهای تثبیت شده برای تهیه مشتقات رتینول محلول در آب استفاده می‌شود. (Smythe et al.,1951).

۳-۵- استفاده در صنعت کاغذ سازی

در صنعت کاغذسازی، افزودن لیپاز می‌تواند رزین‌ها و روغن‌های آلوده کننده و استرها را از خمیر کاغذ حذف کند که این به کاهش شکستگی و تضمین کیفیت و ظرفیت تولید کاغذ کمک می‌کند (Almeida et al., 2018; Horchani et al., 2012). همچنین لیپاز می‌تواند باقی‌مانده آنیون و رسوب قیر در کاغذسازی را تصفیه کند بنابراین از اثرات منفی بر عملکرد تجهیزات کاغذسازی جلوگیری می‌شود (Demuner et al.,2011; Liu et al., 2012).

۳-۶-استفاده در پزشکی و داروسازی

لیپاز یک آنزیم اساسی است که به متابولیسم چربی کمک می‌کند و به عنوان یک نشانگر زیستی برای تولید واسطه‌های دارویی مانند اسیدهای چرب غیر اشباع عمل می‌کند. برای درمان تومورهای بدخیم از لیپاز استفاده می‌شود، زیرا آن‌ها فعال کننده فاکتور نکروز تومور هستند (Bancerz, 2017). لیپاز همچنین می‌تواند به فرآیند تولید داروی کایرال کمک کند (Kumar et al., 2017). دای و شیا در سال 2005 دریافتند که انتخاب پذیری انانتیومری لیپاز در هنگام استفاده از پنی *سیلیوم اکستندوس* برای تقسیم لایه میانی بیشتر از 100 است. جداسازی ایزومرهای ایبوپروفن از مزایای این فناوری است، که لیپاز باکتری *Rhodothermus marinus DSM*

4252استر ایبوپروفن را به صورت تثبیت شده به ایبوپروفن خروجی (S)- انانتیوپور تجزیه می‌کند (Memarpoor Yazd et al., 2018). علاوه براین از لیپازها برای ادغام انواع داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی ناپروکسن و همچنین لوبلوزول (دارو ضد سکته مغزی) استفاده می‌شود (Lee et al., 1995; Xin et al., 2001). از لیپاز استخراج شده کاندیدا روگوزا برای تولید داروی لواستاتین استفاده می‌شود که باعث می‌شود سطح کلسترول سرم کاهش یابد. علاوه بر این، هیدرولیز نامتقارن استر 3- فنیل گلیسیدیک اسید که یک واسطه کلیدی در سنتز دیلتیازم هیدروکلراید، گشادکننده عروق کرونر پرکاربرد، است با استفاده از لیپاز قارچ *S.marcescens* سنتز می‌شود (Matsumae et al.,1993).

۳-۷-استفاده به عنوان بیوسنسور

بیوسنسور یا حسگر زیستی ترکیبی از یک جزء بیولوژیکی با یک نشان‌گر فیزیکوشیمیایی است و به تجزیه و تحلیل برهمکنش‌های بیومولکولی کمک می‌کند (Gopinath et al.,2012; Baldrichi et al., 2004) به طور کلی حسگرهای زیستی ممکن است به گروهای مختلف اعم از؛ حساس به الکتروشیمیایی، الکتریکی، نوری و یا جرمی طبقه بندی شوند (Li et al., 2010). لیپازها می توانند روی سطح حسگر تثبیت شوند و به عنوان حسگرهای لیپیدی زیستی برای تعیین کلسترول خون مورد استفاده قرار گیرند (Herrera-Lopez., 2012). همچین لیپازها برای اصلاح محیط استفاده شده‌اند (kumar et al., 2020) مثلا می‌توان به عنوان بیوسنسور برای شناسایی آلاینده‌های محیطی مانند آفت کش‌ها استفاده کرد (Bucur et al., 2018; Ma et al., 2018).

۴- نتیجه گیری

میکروارگانیسم‌ها قادر به تولید چندین آنزیم برای بقای خود هستند. در میان آنزیم‌ها، از لیپازها عمدتاً استفاده‌های زیادی می‌شود. این آنزیم‌های تجزیه کننده چربی به دلیل کاربردهایشان در زمینه های مرتبط با پزشکی و صنایع مختلف، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند که دوستدار محیط زیست هستند و این خود یک مزیت به حساب می آید. براین اساس، باید راه‌های زیادی برای بهبود خواص لیپازهای میکروبی به عنوان ابزاری برای افزایش فعالیت، بهره‌وری و پایداری حرارتی و همچنین کاهش هزینه‌های تولید وجود داشته باشد. بنابراین تحقیقات بیشتر متمرکز بر آنالیزهای بیوشیمیایی، آنزیم‌شناسی و شناختن بیشتر کاربردهای لیپاز، نقش مهمی در تجاری سازی آتی آن خواهد داشت.

منابع

۱-رجایی ملکی ص.، احمدی اسبچین س. سید علیپور ب. و ریاضی غ. 1396. جداسازی و شناسایی باکتری‌های نمک‌دوست تولیدکننده آنزیم لیپاز از تالاب میانکاله. مجله علمی- پژوهشی زیست شناسی دریا، 9(5).

۲. هادی زاده شیرازی ن.، رنجبر ب. و خواجه خ. 1391. جداسازی آنزیم لیپاز از باکتری *Pseudomonas aeruginosa HR59* حاصل از عفونت‌های سوختگی و بهینه سازی محیط کشت آن با استفاده از روش Box-Behnken . مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی، مجله زیست شناسی ایران، 26(2).

3. Almeida A. F. D., Terrasan C. R. F. Terrone C. C. Tauk-Tornisielo S. M. and Carmona E. C. 2018. Biochemical properties of free and immobilized Candida viswanathii lipase on octyl-agarose support: hydrolysis of triacylglycerol and soy lecithin. Process Biochem. 65, 71–80.
4. Baldrich E., Restrepo A. and O'Sullivan C. K. 2004. Aptasensor development: elucidation of critical parameters for optimalaptamer performance. Analytical Chemistry, vol. 76, no. 23, pp. 7053–7063.
5. Bancerz R., 2017. Industrial application of lipases. Postepy Bioche, 63, 335–341.
6. Bharathi D., and Rajalakshmi G. 2019. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. Department of Biotechnology, Hindusthan College of Arts and Science College, Coimbatore- 028, Tamilnadu, India.
7. Bucur B., Munteanu F. D. Marty J. L. and Vasilescu A. 2018. Advances in enzyme-based biosensors for pesticide detection. Biosensors (Basel) 8:27.
8. Chandra P., Enespa. Singh R. and Arora P. K. 2020. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. Microb. Cell Fact, 19:169.
9. Demuner B. J., Junio N. P. and Antunes A. 2011. Technology prospecting on enzymes for the pulp and paper industry. J. Technol. Manag. Innov. 6, 148–158.
10. Gopinath S. C. B., Awazu K. and Fujimaki M. 2012. Waveguidemode sensors as aptasensors. Sensors, vol. 12, no. 2, pp. 2136–2151.
11. Gupta R., Gupta N. and Rathi P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64, 763–781.
12. Herrera-Lopez E. J., 2012. Lipase and phospholipase biosensors: a review, Methods in Molecular Biology, vol. 861, pp. 525–543.
13. Horchani H., Aissa I. Ouertani S. Zarai Z. Gargouri Y. and Sayari A. 2012. *Staphylococcal* lipases: biotechnological applications. J. Mol. Catal. B Enzymatic 76, 125–132.
14. Jaeger K., Ransac E. Dijkstra S. Colson B. W. Van Heuvel C.M. and Misset O. 1994. Bacterial lipases. FEMS Microbiol. Rev, 15, 29–63.
15. Konkit M., and Kim W. 2016. Activities of amylase, proteinase, and lipase enzymes from *Lactococcus chungangensis* and its application in dairy products. J. Dairy Sci. 99, 4999–5007.
16. Kumar A., Dhar K. Kanwar S. and Aror P. K. 2016. Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. Biol. Proced Online, 18:2.
17. Kumar A., Gudiukaite R. Gricajeva A. Sadauskas M. Malunavicius V. and Kamyab H. 2020. Microbial lipolytic enzymes – promising energy-efficient biocatalysts in bioremediation. Energy, 192:116674.
18. Kumar R., Banoth L. Banerjee U. C. and Kaur J. 2017. Enantiomeric separation of pharmaceutically important drug intermediates using a Metagenomic lipase and optimization of its large scale production. Int. J. Biol. Macromol. 95, 995–1003.
19. Lee W. M., Kim K. J. Kim M. G. and Le S. B. 1995. Enzymatic resolution of racemic ibuprofen esters: effects of organic cosolvents and temperature. Journal of Fermentation and Bioengineering, 613–615.
20. Li D., Song S. and Fan C. 2010. Target-responsive structural swiching nucleic acid-based sensors.Accounts of chemical Recerch,vol. 5,631-641.
۲۱. Liu K., Zhao G. He B. Chen L. and Huang L. 2012. Immobilization of pectinase and lipase on macroporous resin coated with chitosan for treatment of whitewater from papermaking. Bioresour. Technol, 123, 616–619.
22. Ma B., Cheong L. Z. Weng X. Tan C. P. and Shen C. 2018. Lipase@ZIF-8 nanoparticles-based biosensor for direct and sensitive detection of methylparathion. Electrochim. Acta 283, 509–516.
23. Matsumae H., Furui M. and Shibatani T. 1993. Lipase-catalyzed asymmetric hydrolysis of 3-phenylglycidic acid ester, the key intermediate in the synthesis of diltiazem hydrochloride, Journal of Fermentation and Bioengineering, vol. 75, no. 2, pp. 93–98.
۲۴. Me L., 2002. The triglyceride lipases of the pancreas. J Lipid Res, 43 (12): 2007–16.
۲۵. Mehta A., Bodh U. and Gupta R. 2017. Fungal lipases: a review. J. Biotech. Re, 8, 58–77.
26. Memarpoor Yazd M., Karbalaei Heidari H. R. and Doroodmand M. M. 2018. Enantioselective hydrolysis of ibuprofen ethyl ester by a thermophilic immobilized lipase, ELT, from *Rhodothermus marinus*. Biochem. Eng. J. 130, 55–65.

27. Newswire P., 2018. Industrial Enzymes Market - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, and Forecast 2017 - 2025. New York NY: PR Newswire.
28. Priyanka P., Kinsella G. Henehan G. T. and Ryan B. J. 2019. Isolation, purification and characterization of a novel solvent stable lipase from *Pseudomonas reinekei*. Protein Expr. Purif, 153, 121–130.
29. Saraswat R., Verma V. Sistla S. and Bhushan I. 2017. Evaluation of alkali and thermotolerant lipase from an indigenous isolated *Bacillus strain* for detergent formulation. Electron. J. Biotechnol, 30, 33–38.
30. Sarmah N. Revathi D. and Sheelu G. Yamuna Rani K. Sridhar S. and Mehtab V. 2017. Recent advances on sources and industrial applications of lipases. Biotechnol. Prog, 34, 5–28.
31. Senthil Raja K., Vasanthi N. S. Saravanan D. and Ramachandran T. 2012. Use of bacterial lipase for scouring of cotton fabrics. Indian Journal of Fiber & Textile Research, vol. 37, pp. 299–302.
32. Seth S., Chakravorty D. Kumar Dubey V. and Patra S. 2014. An insight into plant lipase research – challenges encountered. Protein Expression and Purification, Pages 13-21.
33. Shamim S., Liaqat U. and Rehman A. 2018. Microbial lipases and their applications – a review. Abasyn Journal of Life Sciences, 1(2): 54-76.
34. Sindhu R., and Pandey A. 2021. in Innovative Food Processing Technologies.
35. Smythe C. V., 1951. Microbiological production of enzymes and their industrial applications. Economic Botany, vol. 5, no. 2, pp. 126–144.
36. Unni K. N., Priji P. Sajith S. Faisal P. A. and Benjamin S. 2016. *Pseudomonas aeruginosa strain BUP2*, a novel bacterium inhabiting the rumen of Malabari goat, produces an efficient lipase. Biologia 71, 378–387.
37. Verma S., Meghanshi G. K. and Kumar R. 2021. Curent perspectives for microbial lipases from extremophiles and metagenenomic. Biochimie 182, 23–36.
38. Xin J., Li S. Xu Y. Chui J. and Xia C. 2001. Dynamic enzymatic resolution of naproxen methyl ester in a membrane bioreactor. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 76, 579–585.

Evaluation the expression alternation of CYP2C19 gene induced by diazinon pesticide in AGS cell line

Minoo Molavi [1*]; Ali Barzegar [2] ; Zahra Hosseini khah[3] ; Yaser Khalili[4]

1- Student of Department of Biology, Faculty of Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
2- Associate Professor of Department of Biology, Faculty of Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
3- Assistant Professor of Molecular Medicine Diabetes Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences
4- Associate Professor of Department of Science, Faculty of Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

**Corresponding Author Email address: minoomlv@gmail.com*

Abstract

Gastric cancer is one of the most common cancers and the second most common cause of cancer deaths worldwide. Gastric cancer ranks fourth in incidence (after lung, breast and colorectal) and second in mortality (after lung cancer) among all cancers worldwide. The risk of advanced gastric carcinoma is directly related to aging, so it occurs most often between the ages of 55 and 80 and is rare under the age of 30. In addition, men are twice as likely as women to get stomach cancer. Moreover, it is evaluated that the consumption of pesticides in agricultural lands is over three billion liters and use of these pesticides in the north province of Iran is essential due to the rice cultivation and agriculture industry. Being constantly exposed to low doses of these toxic substances is related to a variety of disease such as cancers, reproductive abnormalities and nervous system problems. Cytochrome p450 proteins are a large family of intracellular enzymes that play a major role in the metabolism of foreign compounds. This superfamily is active in the first phase of detoxification enzymatic reactions in the body. Cytochrome p450 enzymes play an important role not only in the metabolism of drugs, environmental pollutants and other xenobiotics but also in the biosynthesis of steroid hormones, metabolism of fat-soluble vitamins and the oxidation of unsaturated fatty acids to intracellular messenger. Cytochrome p450 CYP2C19 (CYP2C19) is an important member of these enzymes which play a key role in the metabolism of about 10% of drugs. This enzyme is generally expressed in the liver, intestines and to a lesser extent in other parts such as the stomach. In this study, the expression alternation of CYP2C19 gene induced by diazinon pesticide in AGS cell line will be investigated.

Keywords: Cytochrome p450, Xenobiotics, Gastric Cancer

بررسی تاثیر سم دیازینون بر بیان ژن CYP2C19 در رده سلولی AGS سرطان معده

مینو مولوی[۱*]؛ علی برزگر[۲]؛ زهرا حسینی‌خواه[۳]؛ یاسر خلیلی[۴]

۱. دانشجو کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲. دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳. استادیار پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات دیابت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۴. استادیار گروه علوم پایه، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: *minoomlv@gmail.com*

چکیده

سرطان معده یکی از شایع‌ترین بیماری‌های بدخیم با یکی از بالاترین علل مرگ و میر در سراسر جهان می‌باشد. این بیماری چهارمین رتبه از لحاظ میزان شیوع (پس از سرطان‌های ریه، پستان و کلورکتال) و دومین رتبه در مرگ و میر (پس از سرطان ریه) را در بین تمامی سرطان‌ها دارد. خطر ابتلا به آدنوم کارسینومای معده‌ی پیشرفته با افزایش سن رابطه مستقیم دارد، بدین صورت که بیشتر در سنین ۵۵ تا ۸۰ سال رخ داده و در سنین زیر ۳۰ سالگی نادر می‌باشد. همچنین احتمال ابتلا به سرطان معده در مردان دو برابر زنان می‌باشد. از طرفی امروزه آمار جهانی استفاده از سموم کشاورزی و آفت‌کش‌ها در مزارع کشاورزی بالغ بر سه میلیارد لیتر می‌باشد و مصرف این سموم در کشور ایران، بخصوص در استان‌های شمالی به‌دلیل زراعت برنج یک جز مهم و ضروری به‌شمار می‌رود. مواجهه مداوم با دوزهای پایین از این سموم می‌تواند با انواعی از سرطان‌ها، ناهنجاری‌های تولیدمثلی و مشکلات سیستم عصبی در ارتباط باشد. سیتوکروم‌های p450 (CYP p450) خانواده بزرگی از آنزیم‌های داخل سلولی هستند که نقش اصلی متابولیسم ترکیبات خارجی را بر عهده دارد. این ابرخانواده در فاز اول واکنش‌های آنزیمی سم‌زدایی در بدن فعالیت می‌کنند. سیتوکروم‌های p450 نه تنها در متابولیسم ترکیبات خارجی بلکه در بیوسنتز هورمون‌های استروئیدی، ویتامین‌های محلول در چربی، اسیدهای صفراوی، اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر ضروری و متابولیسم داروها نقش کلیدی ایفا می‌کند. سیتوکروم CYP2C19 p450 (CYP2C19) یکی از اعضای مهم خانواده دو این آنزیم‌ها است که نقش کلیدی در متابولیسم حدود ۱۰ درصد از داروها را دارد. این آنزیم عموما در کبد، روده و به میزان کمتر در سایر بخش‌ها مانند معده بیان می‌شود. در این پژوهش تغییر بیان ژن CYP2C19 ناشی از سم دیازینون در رده سلولی AGS بررسی شده است. بر اساس اطلاعات به دست آمده از این پژوهش، به نظر می‌رسد بیان سیتوکروم CYP2C19 با افزایش غلظت دیازینون ارتباط مستقیم دارد.

واژگان کلیدی: سیتوکروم p450، زنوبیوتیک‌ها، سرطان معده.

۱.مقدمه

اگرچه شیوع سرطان معده در بسیاری از کشورها رو به کاهش است، با این‌حال همچنان یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها و دومین علت شایع مرگ و میر در سراسر جهان می‌باشد (Parkin et al., 2001). از آنجا که مراحل اولیه بیماری غالبا بدون علائم خاصی می‌باشد، تشخیص بیماری معمولا در مراحل پیشرفته اتفاق می‌افتد (Maconi et al., 2008). سرطان معده یک بیماری چند عاملی است. عوامل مختلفی از جمله عوامل محیطی و عفونی وجود دارند که در روند ایجاد بیماری موثر می‌باشند. برای مثال از موارد قابل ذکر می‌توان به هلیکوباکترپیلوری اشاره کرد (Piazuelo and Correa, 2013). عواملی مانند مصرف دخانیات و الکل، رژیم غذایی نامتعادل، چاقی بیش از حد و عدم فعالیت‌های فیزیکی نیز می‌تواند در ایجاد بیماری موثر باشد (Irigaray et al., 2007). احتمال ابتلا به سرطان معده در مردان دو برابر زنان می‌باشد و معمولا بین سنین ۴۰ تا ۷۰ سال (بصورت میانگین ۶۰ سال) اتفاق می‌افتد. کاهش وزن، درد شکم، حالت تهوع و استفراغ، سیری زودرس و علائم زخم معده می‌تواند از نشانه‌های سرطان معده باشد. جهت درمان سرطان معده عموما از روش‌های معمول از جمله شیمی‌درمانی، رادیوتراپی، جراحی و درمواردی ترکیبی از این روش‌ها استفاده می‌شود (Lyake and Lopez, 2004). آفت‌کش‌ها مواد شیمیایی هستند که توسط بسیاری از کشاورزان در سرتاسر دنیا به‌منظور کنترل آفات گیاهی استفاده می‌شوند. استفاده درست و به‌اندازه از این مواد شیمیایی از نظر بسیاری از محققین کارشناس تایید و برای افزایش میزان تولید و بالا بردن کیفیت محصولات کشاورزی موثر گزارش شده است. افزایش مصرف این مواد شیمیایی و استفاده نادرست از آن‌ها نگرانی‌هایی در رابطه با خطر و آسیبی که در پشت پرده‌ی استفاده از این ترکیبات نهفته است، به‌وجود می‌آورد (Jimenez, 1995). معمول‌ترین روش دسته‌بندی سموم کشاورزی بر پایه ساختار شیمیایی آن‌هاست که بر این اساس به چهار دسته عمده شامل ارگانوکلرین‌ها، ارگانوفسفره‌ها، کاربامات‌ها و پیرتوروئیدها تقسیم می‌شوند. دیازینون از مشهور ترین آفت‌کش‌های ارگانوفسفره می‌باشد که ترکیب پایه آن اسید فسفریک است. این ترکیبات از نظر شیمیایی چندان پایدار نبوده و برای مدت طولانی در طبیعت باقی نمی‌مانند. همچنین این ترکیبات دارای خواص فیزیکی و شیمیایی از قبیل حلالیت در آب، پایداری و سمیت برای پستانداران هستند (دهقانی و همکاران، ۱۳۹۱؛ بهرامی و همکاران، ۱۳۹۳). اگرچه دیازینون توسط آژانس محافظت از محیط زیست (EPA)، براساس تست‌های سمیت ژنی و جهش‌زایی به عنوان یک ترکیب به احتمال زیاد سرطان‌زا دسته‌بندی شده است، مطالعات *In Vitro* و *In Vivo* نیز نشان می‌دهد دیازینون باعث القای سرطان می‌شود (Lerro et al., 2015). آنزیم‌های سیتوکروم p450 نخستین بار در سال ۱۹۵۴ توسط کلینژن‌برگ (Klingenberg) با مطالعه خصوصیات اسپکتروفتومتری رنگیزه‌های بخش میکروزومی کبد رت معرفی شدند. وقتی که یک عامل احیاکننده به میکروزوم‌های رقیق شده که به مونوکسیدکربن گازدار شده بودند اضافه شد، یک طیف جذبی منحصر به‌فرد با ماکزیمم جذب در ۴۵۰ نانومتر ظاهر گردید. این باند جذبی در میان هموپروتئین‌ها منحصر به‌فرد بوده و بعنوان خصوصیت بارز پروتئین‌های سیتوکروم p450 مطرح می‌باشد و نام p450 مشتق شده از خصوصیات این رنگیزه با ماکزیمم باند جذبی در ۴۵۰ نانومتر است (Porter, 2004 and Klingenberg, 2003). تاکنون ۵۷ خانواده ژن سیتوکروم p450 در انسان شناسایی شده است. ژن‌های سیتوکروم p450 براساس توالی پروتئین کدکننده به ۱۸ خانواده و ۴۴ زیرخانواده دسته‌بندی می‌شوند (Nelson, 2009). سیتوکروم CYP2C19 از خانواده دو این آنزیم‌ها می‌باشد که به‌طور قابل توجهی در پاکسازی

و متابولیسم داروهای فراوانی ازجمله مهارکننده‌های پمپ پروتون، چندین داروی ضدافسردگی، دیازپام، فلونیترازپام، پروگانیل، کاریسوپرودل و برخی باربیتورات‌ها نقش دارد (Goldestein, 2001 and Desta et al., 2002). ژن CYP2C19 به میزان زیادی در کبد، روده و به میزان کمتری در معده بیان می‌شود. در برخی افراد مبتلا به سرطان معده کاهش فعالیت CYP2C19 مشاهده شده است. این کاهش فعالیت هم در افرادی که تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند و هم در افرادی که دارای تومورهایی در مرحله III و IV بودند، مشاهده شده است (Burns et al., 2016). باتوجه به مصرف فراوان سم دیازینون در مزارع کشاورزی، بخصوص در استان‌های شمالی کشور، در این پژوهش تاثیر سم دیازینون بر بیان ژن سیتوکرومی CYP2C19 در رده سلولی AGS بررسی می‌شود.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه غلظت‌های مختلف سم دیازینون

دیازینون با جرم مولکولی ۳۰۴/۳۵، مایعی کهربایی رنگ است که بویی شبیه به استر دارد. دیازینون در آب حلالیت کمی دارد اما در حلال‌های آلی مثل الکل‌ها به‌طور کامل محلول می‌شود. برای تهیه محلول‌های سم با غلظت‌های مورد نیاز از حلال DMSO استفاده کردیم. در این پژوهش از ذخیره تکنیکال سم با غلظت ۳/۷ مولار و خلوص ۹۸ درصد استفاده شد. با کمک گرفتن از مطالعات انجام شده بر روی تاثیر این سم، سه تیمار به شرح غلظت‌های صفر (شاهد)، ۵ و ۱۰ میکرومولار از سم تعریف شد و سم دیازینون با استفاده DMSO از رقیق‌سازی شد (Medina-Diaz and Elizondo, 2005; Abbas et al., 2012).

۲-۲- تهیه کشت سلولی از رده سلولی AGS

رده سلول سرطانی معده انسانی به نام AGS از دانشگاه علوم پزشکی مازندران تهیه شد. مورفولوژی این سلول اپی‌تلیالی است و در انکوباتور مرطوب با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 به خوبی رشد می‌کند. کشت این سلول‌ها در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مکعبی (SPL، کره جنوبی) حاوی محیط کشت DMEM به‌همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی FBS و یک درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین- استرپتومایسین با نسبت یک به یک انجام شد. محیط کشت سلول‌ها هر دو روز یک بار با محیط جدید تعویض شد و تراکم حدود ۸۰ درصدی سلول برای انجام کشت مجدد (Subculture) مناسب در نظر گرفته شد. یکی از فلاسک‌های کشت تا زمان رسیدن به تراکم مناسب ۷۵ درصد در انکوباتور نگهداری شد. سپس روند کشت در ظروف شش‌خانه همانند فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مکعب پیگیری شد و در هر چاهک از ظروف ۶ خانه تعداد تقریبی ۳۰۰ هزار سلول کشت شد. بعد از گذشت ۴۸ ساعت تراکم سلولی در چاهک‌های ظرف شش خانه کشت سلول به میزان تقریبی ۷۰ درصد سلول رسید. سپس محیط کشت کامل مصرف شده از چاهک‌ها تخلیه و به‌جای آن محیط کشت بدون سرم همراه با آنتی‌بیوتیک و غلظت‌های مشخص شده از سم دیازینون محلول در DMSO ریخته شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت استخراج RNA از سلول‌های تیمار شده انجام گرفت (Medina-Diaz and Elizondo, 2005).

۲-۳- استخراج RNA

برای استخراج RNA در ابتدا محیط کشت داخل چاهک‌های حاوی سلول AGS خارج شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول ترایزول (یکتاتجهیز) به هر چاهک اضافه شد . به‌مدت پنج دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و در نهایت سوسپانسیون حاصل به میکروتیوب منتقل شد و حدود ده دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. در مرحله بعد ۳۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه و پس از ورتکس و قرار گرفتن در دمای اتاق به‌مدت سه دقیقه، ۲۰ دقیقه با سرعت g ۱۱۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. فاز بالایی با ۴۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول مخلوط شد و پس از مدت زمان چهل دقیقه انکوبه در دمای ۲۰-، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه با سرعت g ۱۱۰۰۰ سانتریفوژ شد. در ادامه اتانول ۷۵ درصد به رسوب RNA اضافه شد و در ادامه سانتریفوژ به‌مدت ۵ دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور g ۷۵۰۰ صورت گرفت. در مرحله آخر، RNA در آب حاوی دی‌اتیل پیروکربنات حل شد. به‌منظور کسب اطمینان از عدم تجزیه RNA استخراج شده، کیفیت نمونه‌های RNA به‌کمک الکتروفورز ژل آگارز و کمیت آن‌ها توسط اسپکتروفتومتری بررسی شد. سپس cDNA با استفاده از کیت پارس‌توس از روی RNA استخراج شده، سنتز شد.

۴-۲: بررسی بیان ژن‌های CYP2C19 و GAPDH به کمک Real-Time PCR

تکثیر قطعات مورد نظر توسط دستگاه Real-Time PCR انجام شد. واکنش Real-Time PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر انجام شد. این محلول شامل ۱۰۰ نانوگرم cDNA، ۷.۵ میکرولیتر مسترمیکس Real-Time PCR(2x) و ۰.۳ پیکومول آغازگرهای اختصاصی بود که با آب دوبار تقطیر استریل به حجم ۱۵ رسانده شد. شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعالسازی اولیه در دمای ۹۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ سیکل دناتوراسیون به مدت ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه و مرحله Annealing توام به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه بود.

۳. نتایج و بحث

نتایج واکنش Real-Time PCR نشان می‌دهد که با افزیش غلظت سم در محیط کشت سلول‌ها، میزان بیان ژن CYP2C19 نیز افزایش می‌یابد. پس از محاسبه‌ی میزان عملکرد آغازگرهای اختصاصی به واسطه منحنی استاندارد میزان تغییر بیان ژن CYP2C19 در سلول‌های تیمار شده با سم نسبت به تیمار شاهد مقایسه شد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت سم میزان بیان CYP2C19 بصورت نمایی افزایش می‌یابد و در بیشترین غلظت سم (۱۰ میکرومولار) بیان ژن CYP2C19 تا ۲/۱۹ برابر افزایش می‌یابد.

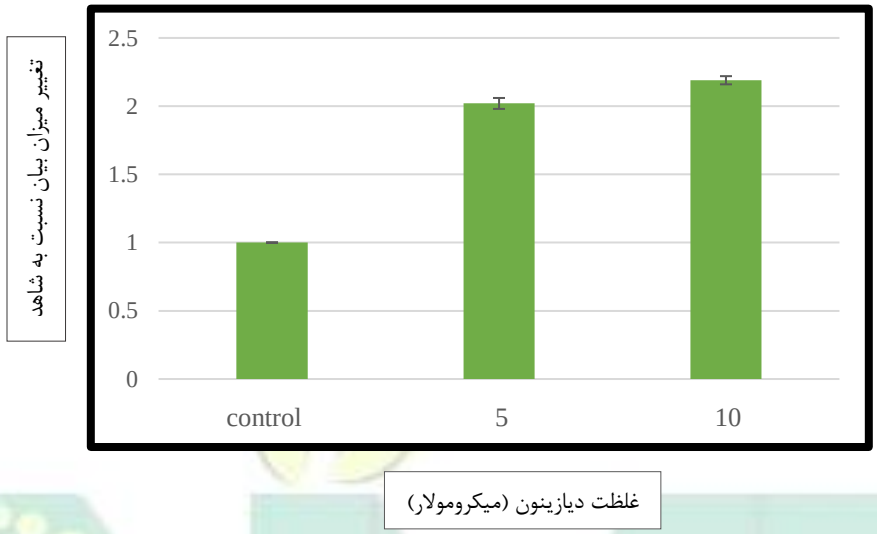
طبق آمار اعلام شده سرطان معده یکی از شایع‌ترین انواع سرطان‌ها و دومین عامل مرگ ناشی از سرطان می‌باشد (Maconi et al.; 2008). شمال و شمال غرب ایران از جمله استان‌های گلستان و مازندران جز مناطق با شیوع بالا هستند (ملک‌زاده و همکاران، ۱۳۸۷). زمینه‌ی ژنتیکی افراد در بروز انواع سرطان‌های مختلف نقش اساسی بازی می‌کند. در کنار عوامل ژنتیکی، عوامل و محرک‌های خارجی و داخلی نیز تاثیر بسزایی در بروز و پیشرفت این بیماری دارند (مهدی‌پور و عطری، ۱۳۷۶). از جمله عوامل ژنتیکی بروز سرطان می‌توان به پلی‌مورفیسم، جهش و تغییرات اپی‌ژنتیکی اشاره کرد که در کنار عواملی مانند نقص سیستم ایمنی و بهم خوردن کنترل ترشح هورمون‌ها، عوامل داخلی بروز سرطان را شکل می‌دهند. فاکتورهای متعددی از جمله عوامل شیمیایی مانند استعمال دخانیات و سموم کشاورزی، عوامل زیستی مانند عفونت‌های ویروسی و باکتریایی مثل هلیکوباکترپیلوری و عوامل فیزیکی مانند پرتوهای با طول موج کوتاه از جمله اشعه ایکس و فرابنفش سبب افزایش ریسک ابتلا به سرطان معده می‌گردند (پارسا، ۱۳۹۰). آفت‌کش‌ها ترکیبات شیمیایی هستند که برای آسیب رساندن به آفات طراحی شده و بطور آگاهانه در محیط استفاده می‌شوند تا با

کمک آن‌ها بتوان حشرات، باکتری‌ها، علف‌های هرز، جوندگان و آفت‌های دیگر را کنترل نمود (بهرامی و همکاران، ۱۳۹۳). امروزه میزان زیادی از این سموم و آفت‌کش ها به منظور کنترل آفات گیاهی در زمین‌های کشاورزی، بخصوص در مناطق شمالی کشور به دلیل زراعت برنج و کشاورزی گسترده، مورد استفاده قرار می‌گیرند. این آفت‌کش‌ها می‌توانند از طریق آبیاری و بارندگی وارد منابع آب سطحی شده و باعث آلودگی این آب‌ها شوند و یا از طریق تاثیر بر محصولات کشاورزی و ورود به جیره‌ی غذایی سلامت انسان را تهدید می‌کند (شکرزاده و همکاران، ۱۳۹۱). سیتوکروم‌های p450 یک ابرخانواده متشکل از آنزیم‌هایی می‌باشند که مسئول متابولیسم اکسیداتیو بسیاری از داروها و زنوبیوتیک‌ها در بدن می‌باشند (Wrighton et al.; 1996). به نظر می‌رسد سه زیر خانواده از این آنزیم‌ها، CYP1، CYP2 و CYP3، نقش کلیدی در متابولیسم اکثر داروها و ترکیبات بیگانه برای بدن را به عهده دارند (Nelson et al., 1993; Wrighton and Stevens, 1992; Oritz de Montellano, 1995). آنزیم سیتوکروم 2C19 (CYP2C19) یکی از اعضای مهم خانواده دو این آنزیم‌ها می‌باشد که در متابولیسم حدود ۱۰ درصد از داروهایی که بصورت متداول استفاده می‌شوند، نقش کلیدی دارد. مطالعه حاضر به منظور بررسی تاثیر آفت‌کش دیازینون بر بیان ژن CYP2C19 در رده سلولی AGS انجام گردید. در این پژوهش اثر القایی و یا کاهشی یکی از پر مصرف‌ترین سموم کشاورزی ارگانوفسفره به نام دیازینون بر میزان بیان ژن آنزیم CYP2C19 به روش Real-time PCR بررسی شد.

آنزیم‌های سیتوکرومی مونواکسیژنازهایی هستند که واکنش‌های اکسیداسیون را با اضافه کردن یک اتم از مولکول اکسیژن به سوبسترای مورد نظر از طریق مسیرهای انتقال الکترون با الکترون‌های تامین شده از NADPH و گاهی NADH، برعهده دارند. بجز انواع خاصی از سیتوکروم‌ها، مانند سیتوکروم‌هایی که در مسیر بیوسنتز استروئیدها نقش دارند، سایر مسیرهای سیتوکرومی در شبکه آندوپلاسمی سلول‌های مهره داران و با بالاترین ظرفیت متابولیسمی زنوبیوتیک‌ها در کبد رخ می‌دهد (Chambers et al.; 2010). مشخص شده است که ترکیبات مختلف ارگانوفسفره و کربامات به‌طور مستقیم توسط آنزیم‌های فاز ۱ مانند CYP2C8 ، CYP2C9، CYP2C19 و CYP2C18 متابولیزه می‌شوند (Usmani et al.; 2004).

پیش‌تر سامس و همکاران در پژوهشی متابولیسم سموم ارگانوفسفره مثل کلروپیفوس و دیازینون توسط برخی آنزیم‌های سیتوکرومی p450 را بررسی کردند و اعلام کردند که متابولیسم دیازینون عموما توسط چهار آنزیم سیتوکروم p450 به نام‌های CYP2C19، CYP1A2، CYP2B6 و CYP3A4 رخ می‌دهد. در این بین قابلیت CYP2C19 هم در فعالسازی و هم در متابولیسم دیازینون در رتبه‌ی اول و CYP3A4 در رتبه‌ی آخر قرار دارد (Sams et al.; 2004). مشخص شده است که حشره‌کش های ارگانوفسفره دیگر مانند پاراتیون و مالاتیون نیز می‌توانند باعث ایجاد بدخیمی در رده سلول‌های نرمال MCF-10F بافت اپی‌تلیال پستان با افزایش قابلیت تکثیر مستقل و خصوصیات تهاجمی گردند. این ترکیبات سبب افزایش بیان پروتئین‌های p53 و c-Ha-ras، همراه با ناپایداری میکروستلایت‌ها (ریز ماهواره‌ها) برای p53 در لوکوس 17p13.1 و برای c-Ha-ras در لوکوس 11p14.1 می‌شوند (Calaf, G. M., et al.; 2009). بررسی تاثیر دیازینون بر بیان ژن‌های *CYP3A4* و *CYP2E1* در رده سلولی سرطان معده نشان داد که این سم در غلظت ۱۰ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت باعث افزایش بیان *CYP3A4* به میزان ۲۸/۵ برابر و افزایش بیان *CYP2E1* به میزان ۵/۰۵ برابر می‌شود (گلستانیان و همکاران، ۱۳۹۵؛ پاک سرشت و همکاران، ۱۳۹۵).

یافته‌های این بررسی نشان می‌دهد که با افزایش میزان سموم ارگانوفسفره در محیط کشت رده سلولی AGS، میزان بیان ژن CYP2C19 در سلول‌ها افزایش قابل ملاحظه‌ای می‌یابد. اثر القایی سم دیازینون در غلظت ۱۰ میکرومولار برای مدت ۲۴ ساعت بر روی بیان ژن CYP2C19 بیشترین میزان بین تیمارها بود و افزایشی ۲/۱۹ برابری نسبت به سلول‌های تیمار نشده نشان داد.



نمودار ۱:نمودار فوق نشان می‌دهد که با افزایش غلظت دیازینون در محیط کشت سلول‌ها، میزان بیان ژن CYP2C19 نیز در رده سلولی AGS افزایش می‌یابد.

منابع

۱. بهرامی، ع (۱۳۹۳). راهنمای کنترل مواجهه با آفت‌کش‌ها. پاییز ۹۳ نوبت اول، انتشارات پژوهشکده محیط‌زیست، تهران؛ وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی.

۲. پارسا، ن. (۱۳۹۰). عوامل محیطی ژن‌ها در بروز سرطان. نشریه نشاء علم ۲ (۱): ۱۲-۱۹.

۳. پاک سرشت، ز. برزگر، ع. رحیمی میانجی، ق. ابراهیم‌زاده، م، ع. (۱۳۹۵). تاثیر آفت‌کش‌های ارگانوفسفره و عصاره میوه آقطی (Sambucus ebulus L.) در القاء یا بازدارندگی متیلاسیون ناحیه پروموتر ژن CYP2E1 و بررسی میزان متیلاسیون آن در بافت‌های سرطانی معده، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

۴. دهقانی، د. لیموئی، م. زرقی، ا. (۱۳۹۱). بررسی تاثیر زیانبار آفت‌کش‌ها با تاکید بر مسئله مقاومت در بندپایان حایز اهمیت بهداشتی (مقاله مروری). مجله علمی پزشکان کردستان، (۱۷): ۸۴-۱۰۰.

۵. گلستانیان، ر. برزگر، ع. رحیمی میانجی، ق. ابراهیم‌زاده، م، ع. (۱۳۹۵). تاثیر آفت‌کش‌های ارگانوفسفره و عصاره میوه آقطی (Sambucus ebulus L.) در اثر القا یا بازدارندگی متیلاسیون ناحیه پروموتر ژن CYP3A4 و بررسی میزان متیلاسیون آن در بافت‌های سرطانی معده، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

۶. ملک‌زاده ر.، ریاحی، الف. و سجادی، ع. (۱۳۸۷). سرطان معده در ایران. مجله گوارش، ۲ (۱۳): ۱۱۲-۱۰۷.

۷. مهدی‌پور پ. و عطری م. (۱۳۷۴) جنبه‌های ژنتیک سرطان پستان. موسسه نشر کلمه، تهران.

8. Abass, K., et al. (2012). "Characterization of human cytochrome P450 induction by pesticides." Toxicology 294(1): 17-26.

9. Aitken, A. E. and E. T. Morgan (2007). "Gene-specific effects of inflammatory cytokines on cytochrome P450 2C, 2B6 and 3A4 mRNA levels in human hepatocytes." Drug Metabolism and Disposition 35(9): 1687-1693.

10. Arefayene, M., et al. (2003). "Sequence diversity and functional characterization of the 5′-regulatory region of human CYP2C19." Pharmacogenetics and Genomics 13(4): 199-206.

11. Burns, K., et al. (2016). "High CYP2C19 phenotypic variability in gastrointestinal cancer patients." Cancer chemotherapy and pharmacology 77(1): 195-204.

12. Desta, Z., et al. (2002). "Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism." Clinical pharmacokinetics 41(12): 913-958.

13. Gerbal-Chaloin, S., et al. (2001). "Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture." Drug Metabolism and Disposition 29(3): 242-251.

14. Goldstein, J. A. (2001). "Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily." British journal of clinical pharmacology 52(4): 349-355.

15. Hashizume, T., et al. (2002). "Involvement of CYP2J2 and CYP4F12 in the metabolism of ebastine in human intestinal microsomes." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 300(1): 298-304.

16. Helsby, N., et al. (2008). "CYP2C19 pharmacogenetics in advanced cancer: compromised function independent of genotype." British journal of cancer 99(8): 1251-1255.

17. Irigaray, P., et al. (2007). "Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview." Biomedicine & Pharmacotherapy 61(10): 640-658.

18. Jiménez, J. N. (1995). Plaguicidas y salud en las bananeras de Costa Rica, San José, CR: ASEPROLA.

19. Klingenberg, M. (2003). "Pigments of rat liver microsomes." Archives of biochemistry and biophysics 409(1): 2-6.

20. Layke, J. C. and P. P. Lopez (2004). "Gastric cancer: diagnosis and treatment options." American family physician 69(5): 1133-1140.

21. Lerro, C. C., et al. (2015). "Organophosphate insecticide use and cancer incidence among spouses of pesticide applicators in the Agricultural Health Study." Occupational and environmental medicine 72(10): 736-744.

22. Mace, K., et al. (1998). "Characterisation of xenobiotic-metabolising enzyme expression in human bronchial mucosa and peripheral lung tissues." European journal of cancer 34(6): 914-920.

23. Maconi, G., et al. (2008). "Role of symptoms in diagnosis and outcome of gastric cancer." World journal of gastroenterology: WJG 14(8): 1149.

24. McFadyen, M. C. E., et al. (2001). "Cytochrome P450 CYP1B1 over-expression in primary and metastatic ovarian cancer." British journal of cancer 85(2): 242-246.

25. Medina-Díaz, I. M. and G. Elizondo (2005). "Transcriptional induction of CYP3A4 by o, p′-DDT in HepG2 cells." Toxicology letters 157(1): 41-47.

26. Murray, G. I., et al. (1997). "Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1." Cancer research 57(14): 3026-3031.

27. Nelson, D. R. (2009). "The cytochrome p450 homepage." Human genomics 4(1): 1-7.

28. Parkin, D. M., et al. (2001). "Cancer burden in the year 2000. The global picture." European journal of cancer 37: 4-66.

29. Piazuelo, M. B. and P. Correa (2013). "Gastric cancer: overview." Colombia Medica 44(3): 192-201.

30. Ramamoorthy, A. and T. C Skaar (2011). "In silico identification of microRNAs predicted to regulate the drug metabolizing cytochrome P450 genes." Drug metabolism letters 5(2): 126-131.

31. Williams, M. L., et al. (2000). "A discordance of the cytochrome P450 2C19 genotype and phenotype in patients with advanced cancer." British journal of clinical pharmacology 49(5): 485-488.

A Review of Function of Cytochrome Enzyme CYP2C19 in the Metabolism of Xenobiotics

Minoo Molavi [1*]; Ali Barzegar [2] ; Zahra Hosseini khah[3] ; Yaser Khalili[4]

1- Student of Department of Biology, Faculty of Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
2- Associate Professor of Department of Biology, Faculty of Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
3- Assistant Professor of Molecular Medicine Diabetes Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences
4- Associate Professor of Department of Science, Faculty of Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

**Corresponding Author Email address: minoomlv@gmail.com*

Abstract

Humans are often exposed to a wide range of contaminants that can increase the risk of diseases such as cancer. We are exposed to many foreign chemicals (xenobiotics) every day. These compounds are often lipophilic and may accumulate as toxins in the body unless converted to water-soluble products and then excreted from the body. Cytochrome P450 enzymes often catalyze the first step of such detoxification pathways. Of all the metabolizing enzymes, cytochrome P450 are the most important ones. Reactions catalyzed by these enzymes usually convert xenobiotics into harmless metabolites that are excreted easily. Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion (ADME) are four pharmaco/toxicokinetics steps that determine the internal dose of chemicals to which an organism is exposed. All cytochrome P450 enzymes are similar in general structure and mechanism. However, there are also significant differences in the function of individual enzymes and the structure and properties of their active sites. The human CYP2C subfamily consists of four highly homologous genes CYP2C8, CYP2C18, CYP2C9 and CYP2C19, which are located in an approximate 500 kbp cluster on chromosome 10. Members of the CYP2C family accounts for about 18% of the total cytochrome P450 content of the liver, the major form is CYP2C9 followed by CYP2C19 and CYP2C8. It has been shown that transcription factors such as androstane receptor (CAR), pregnane X receptor (PXR) and glucocorticoid receptor (GR) are involved in the transcriptional regulation of CYP2C9 and CYP2C19. Members of the CYP2C family are responsible for the metabolism of about 20% of clinically important drugs as well as xenobiotics. In this review, we will discussed xenobiotics and the role of cytochromes in their metabolisms and then the structure and function of the CYP2C19 gene will be reviewed.

Keywords: Cytochrome p450, CYP2C, detoxification, transcription factors

مروری بر عملکرد آنزیم سیتوکرومی CYP2C19 در متابولیسم زنوبیوتیک‌ها

مینو مولوی [۱*]؛ علی برزگر [۲]، زهرا حسینی‌خواه [۳]، یاسر خلیلی [۴]

۱- دانشجو کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲-دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- استادیار پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات دیابت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۴- استادیار گروه علوم پایه، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: *minoomlv@gmail.com*

چکیده

انسان غالبا در معرض طیف وسیعی از آلاینده‌هایی است که می‌تواند سبب بالا رفتن خطر ابتلا به بیماری‌هایی از جمله انواع سرطان‌ها شود. ما روزانه با مواد شیمیایی بیگانه متعددی (زنوبیوتیک‌ها) مواجه می‌شویم. چنین ترکیباتی اغلب چربی‌دوست هستند و ممکن است بصورت مواد سمی در بدن تجمع یابند مگر اینکه به محصولات محلول در آب تبدیل شده و سپس از بدن دفع گردند. آنزیم‌های سیتوکرومی P450 غالبا اولین گام چنین مسیرهای سم‌زدایی را کاتالیز می‌کنند. از بین تمامی آنزیم‌های متابولیزه کننده، آنزیم‌های سیتوکرومی P450 مهم‌ترین آن‌ها هستند. واکنش‌هایی که توسط این آنزیم‌ها کاتالیز می‌شوند، معمولا زنوبیوتیک‌ها را به متابولیت‌های بدون ضرر و قابل دفع تبدیل می‌کند. جذب، توزیع، متابولیسم و دفع (ADME)، چهار مرحله فارماکو/توکسیکینتیک هستند که دوز داخلی مواد شیمیایی که ارگانیسم در معرض آن قرار می‌گیرد را تعیین می‌کنند. تمامی آنزیم‌های سیتوکرومی P450 در ساختار و مکانیسم کلی شباهت دارند. با این‌حال، تفاوت‌های قابل‌توجهی نیز در عملکرد هر کدام از این آنزیم‌ها و ساختار و ویژگی‌های بخش‌های فعال آن‌ها وجود دارد. خانواده دو آنزیم‌های سیتوکرومی (CYP2C) شامل چهار ژن بسیار هومولوگ CYP2C8، CYP2C18، CYP2C9 و CYP2C19 می‌باشد که بصورت یک خوشه ژنی ۵۰۰ کیلوبازی روی کروموزوم ۱۰ قرار گرفته‌اند. اعضای خانواده CYP2C حدودا ۱۸ درصد از کل محتوای سیتوکروم P450 کبد را تشکیل می‌دهند که اصلی‌ترین آن‌ها CYP2C9، سپس CYP2C19 و CYP2C8 می‌باشد. مشخص شده است که در تنظیم رونویسی CYP2C9 و CYP2C19 فاکتورهای رونویسی از قبیل رسپتور سازنده آندروستان (CAR)، رسپتور پروگنان X (PXR) و رسپتور گیلکوکورتیکوئید (GR) مشارکت دارند. اعضای خانواده CYP2C مسئول متابولیسم حدود ۲۰ درصد از داروهای مهم بالینی و هم‌چنین زنوبیوتیک‌ها می‌باشند. در مقاله مروری پیش‌رو ابتدا به زنوبیوتیک‌ها و نقش سیتوکروم‌ها در متابولیسم آن‌ها پرداخته می‌شود و سپس مروری بر ساختار و عملکرد ژن *CYP2C19* انجام می‌گردد.

واژگان کلیدی: سیتوکروم p450، CYP2C، **سم‌زدایی، فاکتورهای رونویسی**

۱.مقدمه

زندگی مدرن امروزه با استفاده از مواد شیمیایی درآمیخته شده است و انسان و بسیاری از گونه‌های محیطی در معرض تعداد زیادی از این ترکیبات هستند. در مورد اثرات نامطلوب اکثر این مواد شیمیایی دانش کمی موجود است. حتی علیرغم اینکه داروها قبل از عرضه به بازار مورد بررسی‌های بالینی و غیر بالینی قرار می‌گیرند، گاهی‌اوقات عوارض جدی و غیر منتظره‌ای ایجاد می‌کنند. برای درک اثرات مفید یا نامطلوب مواد در بدن انسان، باید بدانیم که چه مقدار از دوز خارجی به محل اثر می‌رسد (دوز داخلی) و چه مقدار از آن از بدن دفع می‌گردد. جذب، توزیع، متابولیسم و دفع (ADME) چهار مرحله فارموکینتیک یا تاکسیکوکینتیک هستند که دوز داخلی و ناحیه هدف در بدن را تعیین می‌کنند. متابولیسم و دفع توام با یکدیگر سبب از بین رفتن زنوبیوتیک‌ها، ترکیبات بیگانه برای بدن، می‌شوند (H Raunio et al., 2015).

بیشتر موجودات زنده سیستم‌هایی برای جلوگیری از جذب زنوبیوتیک‌ها، از بین بردن آن‌ها و ترمیم و سازگاری با آسیب‌ها ایجاد کرده اند. توانایی بدن انسان‌ها برای پاکسازی زنوبیوتیک‌ها شامل مسیرهای آنزیمی خاصی است که در طول تکامل برای کنترل اجزا تشکیل دهنده موجود در رژیم غذایی ایجاد شده است. زنوبیوتیک‌ها تحت تاثیر یک یا چند مسیر آنزیمی شامل فاز ۱ اکسیداسیون، احیا و هیدرولیز و فاز ۲ پیوستگی (conjugation)، قرار می‌گیرند. متابولیسم زنوبیوتیک‌ها، معمولا ترکیبات چربی‌دوست را به مشتقات آب‌دوست‌تر تبدیل می‌کند تا به راحتی از طریق ادرار از بدن دفع شوند. پروتئین‌های ناقل نقش مهمی در چهار مرحله متابولیسم زنوبیوتیک‌ها (ADME)، بواسطه‌ی جابجایی این ترکیبات و متابولیت‌هایشان از طریق غشاء سلولی، ایفا می‌کنند (Gonzalez. et al., 2017).

۱-۱-آنزیم‌های سیتوکرومی P450 (CYP)

واکنش‌های فاز ۱ توسط آنزیم‌های سیتوکرومی P450 (CYP) و مونواکسیژنازهای حاوی فلاوین (FMO)، اپوکسید هیدرولازها (EH) و دیگر آنزیم‌های فاز ۱ (سایر آنزیم‌های اکسید کننده، احیا کننده و هیدرولیز کننده) انجام می‌گردد. آنزیم‌های سیتوکرومی ابرخانواده بزرگی از پروتئین‌های هِم را تشکیل می‌دهند که تعداد زیادی از ترکیبات درون‌زا (endogenous) و برون‌زا (exogenous) را متابولیزه می‌کنند. از ۵۷ شکل مختلف آنزیم‌های سیتوکرومی، حدود ۱۰ CYP کبدی مسئول متابولیسم اکسیداتیو زنوبیوتیک‌ها در انسان می‌باشند و تنها ۷ CYP مسئول متابولیسم تقریبا ۹۰ درصد داروها می‌باشد. CYPها هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای، آمین‌های آروماتیک، آمین‌های هتروسیکلیک، آفت‌کش‌ها، علف‌کش‌ها و طیف وسیعی از داروها را متابولیزه می‌کنند (Pelkonen et al., 2008; Testa et al., 2012; Guengerich and Munro, 2013).

زیرخانواده CYP2C انسانی شامل چهار ژن بسیار هومولوگ CYP2C8، CYP2C18، CYP2C9 و CYP2C19 می‌باشد که بر روی یک خوشه ژنی ۵۰۰ کیلوبازی بر روی ناحیه ۲۴ بازوی بلند کروموزوم ۱۰ قرار گرفته‌اند. زیرخانواده CYP2C حدود ۱۸٪ از کل محتوای سیتوکروم P450 کبد یک بزرگسال را تشکیل می دهد (Shimada et al., 1994) که اصلی‌ترین آن CYP2C9، سپس CYP2C19 و CYP2C8 می‌باشد (Goldstein et al., 1994; Edwards et al., 1998). میزان کمی از mRNA و پروتئین CYP2C9 در روده‌ی کوچک و سایر بافت‌های خارج کبدی نیز یافت شده است (Klose et al., 1999). رسپتور سازنده آندروستان (CAR)، رسپتور پروگنان (PXR) و همچنین گیرنده گلیکوکورتیکوئید (GR) در تنظیم رونویسی CYP2C9 و CYP2C19 شناخته شده اند (Ferguson et al., 2002; GerbalChaloin et al., 2002; Chen et al., 2003). اعضای زیرخانواده CYP2C متابولیسم حدود ۲۰

درصـــد از داروهای مهم بالینی را به عهده دارند (Goldstein, 2001). از جمله این داروها میتوان به ضـــد انعقاد وافارین، امپرازول، عامل ضد صرع فنی‌توئین، آنتی‌هیپرگلیسمی و بسیاری از عوامل ضدالتهابی غیراستروئیدی اشاره کرد (Kaminsky and Zhang, 1997; Andersson et al., 1993; Giancarlo et al., 2001; Wester et al., 2000; Kidd et al., 1999; Leemann et al., 1993).

مطالعات انجام شـــده درمورد بیان آنزیم‌های CYP2C کبدی انســـان، هیچ پروتئین یا فعالیت کاتالیزوری قابل‌تشـــخیصـــی را بین هفته‌های ۱۶ و ۴۰ بارداری نشان نداد، اگرچه سطوح پایین mRNA در بافت جنینی مشاهده شد. سطح آنزیم و فعالیت آن در ماه اول پس از تولد بیشتر بوده و در یک سالگی به سطح بزرگسالان می‌رسد که نشان می‌دهد بلوغ CYP2C تنها به سن پس از تولد بستگی دارد (Treluyer et al., 1997).

۱-۲-سیتوکروم CYP2C19

CYP2C19 مسئول متابولیسم حدود ۱۰ درصد از عوامل درمانی که بصورت متداول استفاده می‌شوند شامل مهار کننده های پمپ پروتون (مانند امپرازول، ازوامپرازول لانزاپرازول، پنتوپرازول)، داروهای ضد افسردگی (امیپرامین، آمیتریپلین، سترالین، فلوکستین، سیتالوپرام) ، داروهای ضد تشنج (فنیتوئین، اس-مفنیتوئین)، داروهای خواب‌آور و آرام‌بخش (دیازپام، فلونیترازپام، کلوبازام، فنوباربیتال)، داروی ضدمالاریا (پروگانیل)، ضدرتروویروس‌ها (نلفیناویر)، ضدقارچ‌ها (وریکنازول)، داروهای ضد پلاکت (کلوپیدوگرل، پاراسوگرل)، می‌باشد (Kanebratt, K., et al. 2008;Farid, N. A., et al. 2010; Goldstein, J. A. 2001; Desta, Z., et al. 2002). این سوبستراها معمولا آمیدها یا بازهای ضعیف با دو گیرنده پیوندهای هیدروژنی هستند (Zhou, H., et al. 1990; Schmucker, D. L., et al., 1990). ژن CYP2C19 از ۹ اگزون تشکیل شده است که یک پروتئین ۴۹۰ اسید آمینه‌ای را کد می‌کنند. این ژن بر روی کروموزوم ۱۰ درون یک خوشه ژنی که شامل ژن‌های CYP2C می‌باشد، قرار گرفته است. لوکوس ژن CYP2C شامل چهار ژن CYP2C8، CYP2C9، CYP2C18 و CYP2C19 می‌باشد که مجموعا ۴۸ کیلوباز اندازه دارد. از بین این ۴ ژن، ژن CYP2C19 با ۹۳.۹ کیلوباز بلندترین اندازه ژن را دارد (Scott et al.; 2012). ساختار سه بعدی CYP2C19 هنوز به طور کامل مشخص نشده است، اما می‌توان آن را تا حدودی از روی ساختار CYP2C9 پیش بینی کرد (Pelkonen, O., et al.; 1998). افراد را بسته به ظرفیت متابولیکی CYP2C19 می‌توان به چهار دسته تقسیم کرد: متابولیزه کننده‌های گسترده (EM) که حامل آلل‌های نرمال هستند؛ متابولیزه‌کننده‌های میانی (IM) که دارای یک آلل معیوب هستند؛ متابولیزه‌کننده‌های ضعیف (PM) که دارای دو آلل معیوب هستند، و متابولیزه‌کننده‌های بسیار سریع (UM) که دارای آلل‌های هموزیگوت هستند که سبب افزایش بیان یا فعالیت CYP2C19، بیشتر از گروه اول می‌شوند (Uppugunduri, R. S., et al.; 2012).

۱-۳-القا و مهار CYP2C19 توسط زنوبیوتیک‌ها

تداخلات دارویی ناشی از القا و مهار آنزیم، نگرانی عمده پزشکان و بیماران است. مهارکننده CYP2C19 با رقابت برای جایگاه فعال آنزیم، سبب افزایش سطح پلاسمایی سوبستراهای CYP2C19 می‌گردد و درصورتیکه دارو بایستی فعال شود، مهار سبب کاهش اثربخشی آن دارو می‌گردد. در مقابل، القای آنزیم سبب افزایش حذف داروی فعال می‌گردد که منجر به شکست در درمان شده و در مورد داروی غیرفعال، القا ممکن است با افزایش دسترسی شکل فعال آن، کارایی دارو را افزایش دهد (Park, B., et al.; 1996). CYP2C19 یک آنزیم القاپذیر است و القا یا مهار این آنزیم می‌تواند برگشت‌پذیر یا برگشت ناپذیر باشد (Lin, J. H. and A. Y. Lu;

1998). سوبستراهای CYP2C19 ممکن است باعث القا آنزیمی شوند که روی متابولیسم خودش یا سوبستراهای مشترک تاثیر بگذارد. سوبستراها همچنین می‌تواند سبب مهار متابولیسم خودش یا سایر سوبستراها، از طریق رقابت برای جایگاه فعال آنزیم شود.

القای یک آنزیم مستلزم ایجاد تعادلی بین تولید آنزیم و تجزیه آن می‌باشد. این یک فرایند آهسته است و عمدتا شامل تنظیم‌کننده‌های رونویسی یک ژن می‌باشد (Pelkonen, O., et al.; 1998). همچنین القای CYP2C19 ممکن است تحت تاثیر ژنوتیپ آن قرار بگیرد، همانطور که القای CYP2C19 توسط ریفامپسین در فنوتیپ متابولیزه‌کننده‌های گسترده مشاهده شده اما در متابولیزه‌کننده‌های ضعیف القایی گزارش نشده است. علاوه بر این، رژیم غذایی و سن نیز می‌تواند بر القای آنزیم اثر بگذارد.

اگرچه شواهدی درمورد تاثیر استروژن بر رونویسی CYP2C19 موجود است، تنها گزارش‌های کمی تفاوت‌های جنسیتی را در بیان و فعالیت CYP2C19 نشان داده است (Xie et al.; 1997; Löfgren et al.; 2009; Hägg et al.; 2001). میزان هورمون رشد و تستوسترون بیان CYP2C19 را تنظیم می‌کند (Löfgren et al.; 2009). همچنین در پژوهشی مشخص شده است تیمار هورمون رشد در مردان مسن CYP2C19 را به میزان کمتری نسبت به زنان مهار می‌کند (Jürgens et al.; 2002). برعکس، افزایش بیان CYP2C19 در مردان مشاهده شده که با تیمار هورمون رشد، سرکوب شده بود (Löfgren et al.; 2009). با این‌حال، تحقیقات بیشتری برای بررسی چگونگی تاثیر عوامل خارجی مختلف بر بیان CYP2C19 در جنسیت‌های مختلف مورد نیاز است.

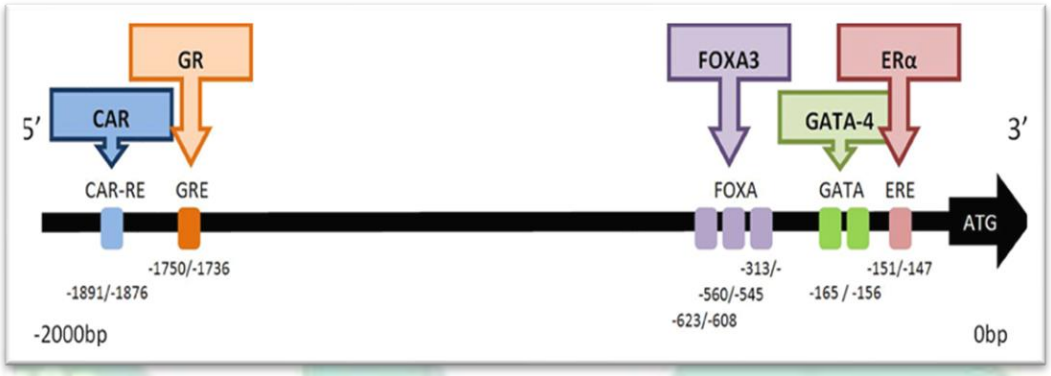
مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی اولیه که بیان ژن را کنترل می‌کنند، متیلاسیون و استیلاسیون هستند. متیلاسیون DNA ابتدا در نواحی غنی از سیتوزین و گوانین (CG)، که به جزایر CpG شناخته می‌شوند، در ژنوم پستانداران رخ می‌دهد. DNA متیل ترانسفرازها در متیلاسیون نواحی غنی از سیتوزین-گوانین نقش دارند (Rountree, M. R., et al; 2001.). علاوه بر تغییر کانفورماسیون کروماتین، متیلاسیون نواحی پروموتری ممکن است با اتصال فاکتورهای رونویسی نیز تداخل داشته باشد (Keshet, I., et al.; 1986). مشخص شده است که الگوهای متیلاسیون تغییر یافته در بیان ژن‌های سیتوکرومی تاثیرگذار اند (Caiafa, P. and M. Zampieri; 2005). جزایر CpG کمی در پروموتر ژن *CYP2C19* مشخص شده است اما اهمیت آن‌ها در بیان ژن *CYP2C19* هنوز مشخص نشده است (Ingelman-Sundberg et al.; 2007).

یکی دیگر از مکانیسم‌های متداول کنترل بیان ژن بواسطه RNAهای غیر کدکننده یا میکرو RNA (microRNA) انجام می‌شود. میکرو RNA بیان ژن را با اتصال به ناحیه ترجمه نشده سر ۳' توالی mRNA هدف سرکوب می‌کنند و ترجمه را با برش mRNA هدف یا سرکوب ترجمه مختل می‌کند (Bushati, N. and S. M. Cohen; 2007).

۱-۴-نواحی اتصالی فاکتورهای رونویسی روی ژن *CYP2C19*

جایگاه اتصالی برای برخی فاکتورهای عملکردی رونویسی بر روی ژن *CYP2C19* مشخص شده است. از جمله این فاکتورهای رونویسی می‌توان به ERα، CAR، GR، HNF3γ و GATA-4 اشاره کرد (Mwinyi et al.; 2010a; Mwinyi et al.; 2010b; Chen et al.; 2003; Bort et al.; 2004). مشخص شده است که عنصر پاسخ‌دهنده CAR (CAR-RE) در ناحیه ۱۸۹۱-/۱۸۷۶- پروموتر ژن *CYP2C19* از نظر عملکردی فعال است. اتصال پروتئین بصورت مونومر یا هترودایمر با گیرنده رتینوئید X (RXR) یا گیرنده پرگنان X (PXR) صورت می‌گیرد. حذف این ناحیه، اتصال این فاکتورها را کاملا مختل می‌کند (Chen et al.; 2003). رابطه مهمی بین CAR mRNA و رونویسی *CYP2C19* در کبد انسانی وجود دارد (Wortham, M., et al.; 2007). عنصر پاسخ‌دهنده گلوکوکورتیکوئید

() در ناحیه ۱۷۵۰-/۱۷۳۶- پروموتری و عنصر پاسخ‌دهنده استروژن نیز در ناحیه ۱۵۱-/۱۴۷- ژن *CYP2C19* قرار گرفته‌اند. جایگاه قرارگیری دو فاکتور رونویسی مهم FOXA3 و GATA-4 نیز در پروموتر ژن *CYP2C19* مشخص شده است (Bort et al.; 2004).



شکل۱: نواحی اتصالی فاکتورهای رونویسی در ناحیه پروموتر ژن *CYP2C19* (Helsby and Burns, 2012).

۱-۵-ارتباط سیتوکروم‌ها با بیماری‌ها

تغییر در تنظیم و عملکرد سیتوکروم‌ها منجر به ایجاد بیماری‌هایی از جمله چاقی، دیابت، استیتوهپاتیت (steatohepatitis)، بیماری‌های مربوط به کبد و برخی سرطان‌ها می‌گردد. همچنین بین رژیم غذایی و پیشرفت این بیماری‌ها نیز ارتباطاتی وجود دارد که نشان می‌دهد تنظیم سیتوکروم‌ها بواسطه رژیم غذایی نیز ممکن است به مکانیسم‌های بیماری‌زا کمک کند. بنابراین با تغییر فعالیت سیتوکروم‌ها، عوامل غذایی ممکن است بر تبدیل مواد شیمیایی به گونه‌های سمی واکنش‌دهنده و رادیکال‌های آزاد تاثیر بگذارند. جدا از اثرات تنظیم تغییر یافته، برخی از مواد شیمیایی موجود در مواد غذایی نیز ممکن است مستقیما باعث مهار آنزیم‌های سیتوکرومی گردند که بدون شک به‌دلیل ظرفیت این آنزیم‌ها در اکسید کردن بسیاری از مواد شیمیایی است.

بیماری‌های کبدی نیز با کاهش فعالیت سیتوکروم‌ها همراه است که تاثیر عمده‌ای بر متابولیسم داروها می‌گذارد و منجر به افزایش سمیت دارو می‌شود. این کاهش فعالیت در همه سیتوکروم‌ها یکسان نیست و خانواده‌های CYP1A، CYP2C و CYP3A بیشتر از سایر سیتوکروم‌ها تحت تاثیر قرار می‌گیرند. کاهش میزان و فعالیت سیتوکروم‌ها در بیماری‌های کبدی، ممکن است بر اثر عوامل دیگری مانند اختلالات هورمونی و تولید سیتوکین‌ها نیز رخ دهد (Villeneuve, J.-P. and V. Pichette; 2004).

به نظر می‌رسد که در انسان، CYP2C19 به شدت نسبت به بیماری‌های کبدی حساس است. بعنوان نمونه گزارش شده است که مسیرهای متابولیکی امپرازول، اس-مفنی‌تونین و آمینوپیرین، سه سوبسترای CYP2C19، در بیماران مبتلا به سیروز کاهش می‌یابد (Giannini et al.; 2002; Piqué et al.; 2002; Arns et al.; 1997; Villeneuve et al.; 1986).

۲. نتیجه‌گیری

سرطان معده یکی از شایع ترین سرطان ها و یکی از متداول ترین علل مرگ و میر ناشی از سرطان است. بروز، مطالعات تشخیصی و گزینه‌های درمانی در طی دهه‌های گذشته پیشرفت‌های قابل توجهی داشته است با این حال پیش‌آگاهی از این بیماری بخصوص در مراحل پیشرفته همچنان ضعیف می‌باشد (Catalano, V., et al.; 2009). فاکتورهای متعددی از جمله عوامل شیمیایی، عوامل زیستی و عوامل فیزیکی مختلفی در ایجاد و افزایش خطر ابتلا به سرطان معده دخیل هستند. از جمله این فاکتورها می‌توان به استعمال دخانیات، قرار گرفتن در معرض سموم کشاورزی و آفت‌کش‌ها، عفونت با هلیکوباکترپیلوری و مواجهه با امواج با طول موج کوتاه اشاره کرد (پارسا، ۱۳۹۰). امروزه شاهد استفاده فراوانی از این سموم و آفت‌کش‌ها در صنعت کشاورزی، بخصوص در مناطق شمالی کشور می‌باشیم. مواجهه مداوم حتی با دوزهای پایینی از این سموم و اضافه شدن آن‌ها به جیره غذایی انسان می‌تواند برای سلامت کشاورزان و مصرف کنندگان بسیار تهدید آمیز باشد (شکرزاده و همکاران، ۱۳۹۱). جهت کاهش ریسک ابتلا به بیماری‌هایی از قبیل انواع سرطان‌ها، سیستم هایی در موجودات زنده تعبیه شده است که نقش سم‌زدایی و متابولیسم انواع داروها، سموم و بطور کلی زنوبیوتیک‌ها را دارند. آنزیم‌های سیتوکرومی p450 گروهی از هم‌پروتئین‌های داخل سلولی هستند که اکسیژن مولکولی را برای متابولیسم اکسیداتیو طیف وسیعی از مواد شیمیایی آلی چربی‌دوست فعال می‌کنند. سیتوکروم‌های p450 در بسیاری از فرایندهایی که جهت حفظ سلامت افراد ضروری است، مشارکت دارند. در حال حاضر یکی از بیشترین زمینه تحقیقات، بر نقش این آنزیم‌ها در متابولیسم داروها و زنوبیوتیک‌ها تاکید دارد. مطالعات اولیه جیمز و الیزابت میلر به قابلیت برخی از مواد شیمیایی در ایجاد سرطان متمرکز شد. محور اصلی این فرضیه این است که اتصالات کوالانسی برخی از مواد شیمیایی به ماکرومولکول‌هایی مانند DNA، RNA و پروتئین‌ها، یک گام کلیدی در فرایندی چند مرحله‌ای است که در نهایت منجر به ایجاد سرطان می‌گردد (Hasler et al.; 1999). توانایی آنزیم‌های سیتوکرومی انسانی در کاتالیز متابولیسم برخی زنوبیوتیک‌های پروکارسینوژن در مطالعات in vitro مشخص گردیده است (Guengerich et al.; 1996). یکی از اعضای مهم سیتوکروم‌های p450، سیتوکروم CYP2C19 می‌باشد که در متابولیسم ۱۰ درصد از داروهایی که بصورت متداول استفاده می‌شود، نقش دارند. ژن کدکننده CYP2C19 پلی‌مورفیک و دارای چندین آلل می‌باشد که در نهایت سبب تغییر فعالیت این آنزیم می‌شود. علاوه بر این، فعالیت آنزیم به سطح بیان پایه این آنزیم نیز بستگی دارد که توسط فاکتورهای رونویسی تنظیم می‌گردد. برهمکنش‌های ژنتیکی که در ناحیه پروموتر این ژن اتفاق می‌افتد، ممکن است سرانجام به تغییر وضعیت رونویسی منجر شود. این برهمکنش‌ها همچنین بر القا، مهار و برهمکنش‌های دارویی سوبستراهای این ژن تاثیرگذار است.

منابع

۱. پارسا، ن. (۱۳۹۰). عوامل محیطی ژن‌ها در بروز سرطان. نشریه نشاء علم ۲ (۱): ۱۲-۱۹.

2. Andersson, T., et al. (1993). "Identification of human liver cytochrome P450 isoforms mediating omeprazole metabolism." British journal of clinical pharmacology 36(6): 521-530.
3. Arns, P. A., et al. (1997). "Mephenytoin disposition and serum bile acids as indices of hepatic function in chronic viral hepatitis." Clinical Pharmacology & Therapeutics 62(5): 527-537.
4. Bort, R., et al. (2004). "Role of hepatocyte nuclear factor 3γ in the expression of human CYP2C genes." Archives of biochemistry and biophysics 426(1): 63-72.
5. Bushati, N. and S. M. Cohen (2007). "microRNA functions." Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 23: 175-205.

6. Caiafa, P. and M. Zampieri (2005). "DNA methylation and chromatin structure: the puzzling CpG islands." Journal of cellular biochemistry 94(2): 257-265.
7. Catalano, V., et al. (2009). "Gastric cancer." Critical reviews in oncology/hematology 71(2): 127-164.
8. Chen, Y., et al. (2003). "Identification of constitutive androstane receptor and glucocorticoid receptor binding sites in the CYP2C19 promoter." Molecular pharmacology 64(2): 316-324.
9. Desta, Z., et al. (2002). "Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism." Clinical pharmacokinetics 41(12): 913-958.
10. Edwards, R. J., et al. (1998). "Development of a comprehensive panel of antibodies against the major xenobiotic metabolising forms of cytochrome P450 in humans." Biochemical pharmacology 56(3): 377-387.
11. Farid, N. A., et al. (2010). "Metabolism and disposition of the thienopyridine antiplatelet drugs ticlopidine, clopidogrel, and prasugrel in humans." The Journal of Clinical Pharmacology 50(2): 126-142.
12. Ferguson, S. S., et al. (2002). "Regulation of human CYP2C9 by the constitutive androstane receptor: discovery of a new distal binding site." Molecular pharmacology 62(3): 737-746.
13. Giancarlo, G. M., et al. (2001). "Relative contributions of CYP2C9 and 2C19 to phenytoin 4-hydroxylation in vitro: inhibition by sulfaphenazole, omeprazole, and ticlopidine." European journal of clinical pharmacology 57(1): 31-36.
14. Giannini, E., et al. (2002). "13C-Aminopyrine breath test to evaluate severity of disease in patients with chronic hepatitis C virus infection." Alimentary pharmacology & therapeutics 16(4): 717-725.
15. Goldstein, J., et al. (1994). "Evidence that CYP2C19 is the major (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase in humans." Biochemistry 33(7): 1743-1752.
16. Goldstein, J. A. (2001). "Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily." British journal of clinical pharmacology 52(4): 349-355.
17. Gonzalez, F. J., et al. (2017). Drug Metabolism. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 13e. L. L. Brunton, R. Hilal-Dandan and B. C. Knollmann. New York, NY, McGraw-Hill Education.
18. Guengerich, F. P., et al. (1996). "New applications of bacterial systems to problems in toxicology." Critical reviews in toxicology 26(5): 551-583.
19. Guengerich, F. P. and A. W. Munro (2013). "Unusual cytochrome P450 enzymes and reactions." Journal of Biological Chemistry 288(24): 17065-17073.
20. Hägg, S., et al. (2001). "Influence of gender and oral contraceptives on CYP2D6 and CYP2C19 activity in healthy volunteers." British journal of clinical pharmacology 51(2): 169-173.
21. Hasler, J. A., et al. (1999). "Human cytochromes P450." Molecular aspects of medicine 20(1-2): 1-137.
22. Helsby, N. A. and K. E. Burns (2012). "Molecular mechanisms of genetic variation and transcriptional regulation of CYP2C19." Frontiers in genetics 3: 206.
23. Ingelman-Sundberg, M., et al. (2007). "Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects." Pharmacology & therapeutics 116(3): 496-526.
24. Jürgens, G., et al. (2002). "Effect of growth hormone on hepatic cytochrome P450 activity in healthy elderly men." Clinical Pharmacology & Therapeutics 71(3): 162-168.
25. Jürgens, G., et al. (2002). "Effect of growth hormone on hepatic cytochrome P450 activity in healthy elderly men." Clinical Pharmacology & Therapeutics 71(3): 162-168.
26. Kaisary, A., et al. (1987). "Genetic predisposition to bladder cancer: ability to hydroxylate debrisoquine and mephenytoin as risk factors." Cancer research 47(20): 5488-5493.
27. Kaminsky, L. S. and Z.-Y. Zhang (1997). "Human P450 metabolism of warfarin." Pharmacology & therapeutics 73(1): 67-74.

28. Kanebratt, K., et al. (2008). "Cytochrome P450 induction by rifampicin in healthy subjects: determination using the Karolinska cocktail and the endogenous CYP3A4 marker 4β-hydroxycholesterol." Clinical Pharmacology & Therapeutics 84(5): 589-594.
29. Keshet, I., et al. (1986). "DNA methylation affects the formation of active chromatin." Cell 44(4): 535-543.
30. Kidd, R. S., et al. (1999). "Pharmacokinetics of chlorpheniramine, phenytoin, glipizide and nifedipine in an individual homozygous for the CYP2C9* 3 allele." Pharmacogenetics 9(1): 71-80.
31. Klose, T. S., et al. (1999). "Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs." Journal of biochemical and molecular toxicology 13(6): 289-295.
32. Ko, J.-W., et al. (1997). "Evaluation of omeprazole and lansoprazole as inhibitors of cytochrome P450 isoforms." Drug metabolism and disposition 25(7): 853-862.
33. Leemann, T., et al. (1993). "A major role for cytochrome P450TB (CYP2C subfamily) in the actions of non-steroidal antiinflammatory drugs." Drugs under experimental and clinical research 19(5): 189-195.
34. Lin, J. H. and A. Y. Lu (1998). "Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications." Clinical pharmacokinetics 35(5): 361-390.
35. Löfgren, S., et al. (2009). "Regulation of human CYP2C18 and CYP2C19 in transgenic mice: influence of castration, testosterone, and growth hormone." Drug metabolism and disposition 37(7): 1505-1512.
36. Mwinyi, J., et al. (2010). "Regulation of CYP2C19 expression by estrogen receptor α: implications for estrogen-dependent inhibition of drug metabolism." Molecular pharmacology 78(5): 886-894.
37. Park, B., et al. (1996). "Relevance of induction of human drug-metabolizing enzymes: pharmacological and toxicological implications." British journal of clinical pharmacology 41(6): 477-491.
38. Pelkonen, O., et al. (1998). "Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes." Xenobiotica 28(12): 1203-1253.
39. Pelkonen, O., et al. (2008). "Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status." Archives of toxicology 82(10): 667-715.
40. Piqué, J. M., et al. (2002). "Pharmacokinetics of omeprazole given by continuous intravenous infusion to patients with varying degrees of hepatic dysfunction." Clinical pharmacokinetics 41(12): 999-1004.
41. Raunio, H., et al. (2015). "Modeling of interactions between xenobiotics and cytochrome P450 (CYP) enzymes." Frontiers in pharmacology 6: 123.
42. Rountree, M. R., et al. (2001). "DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer." Oncogene 20(24): 3156-3165.
43. Schmucker, D. L., et al. (1990). "Effects of age and gender on in vitro properties of human liver microsomal monooxygenases." Clinical Pharmacology & Therapeutics 48(4): 365-374.
44. Scott, S. A., et al. (2012). "PharmGKB summary: very important pharmacogene information for cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19." Pharmacogenetics and genomics 22(2): 159.
45. Shimada, T., et al. (1994). "Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 270(1): 414-423.
46. Shokrzadeh, M., et al. (2013). "Measuring Diazinon residue in Thampson orange." Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 23(105): 91-99.
47. Testa, B., et al. (2012). "Reactions and enzymes in the metabolism of drugs and other xenobiotics." Drug discovery today 17(11-12): 549-560.
48. Treluyer, J.-M., et al. (1997). "Developmental expression of CYP2C and CYP2C-dependent activities in the human liver: in-vivo/in-vitro correlation and inducibility." Pharmacogenetics 7(6): 441-452.
49. Uppugunduri, R. S., et al. (2012). "Transcriptional regulation of CYP2C19 and its role in altered enzyme activity." Current drug metabolism 13(8): 1196-1204.

50. Villeneuve, J. P., et al. (1986). "Prognostic value of the aminopyrine breath test in cirrhotic patients." Hepatology 6(5): 928-931.
51. Villeneuve, J.-P. and V. Pichette (2004). "Cytochrome P450 and liver diseases." Current drug metabolism 5(3): 273-282.
52. Wester, M. R., et al. (2000). "CYP2C19 participates in tolbutamide hydroxylation by human liver microsomes." Drug metabolism and disposition 28(3): 354-359.
53. Wortham, M., et al. (2007). "Expression of constitutive androstane receptor, hepatic nuclear factor 4α, and P450 oxidoreductase genes determines interindividual variability in basal expression and activity of a broad scope of xenobiotic metabolism genes in the human liver." Drug metabolism and disposition 35(9): 1700-1710.
54. Xie, H.-G., et al. (1997). "Evidence for the effect of gender on activity of (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase (CYP2C19) in a Chinese population." Pharmacogenetics 7(2): 115-119.
55. Zhou, H., et al. (1990). "Induction of polymorphic 4′-hydroxylation of S-mephenytoin by rifampicin." British journal of clinical pharmacology 30(3): 471-475.

Association between LAMA1 Gene Polymorphisms with Jaw Growth: An *in silico* Study

Fatemehzahra Rezanezhad[1], Mohammadkazem Heydari[1], Abasalt Hosseinzadeh Colagar[1]*, Valiollah Arash[2]

1. Department of Molecular and Cell Biology; Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.
2. Department of Orthodontics, Dental School, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.

**Corresponding Author E-mail: ahcolagar@umz.ac.ir*

Abstract

Proper jaw growth is one of the most important and influential factors in a person's beauty, speech and self-confidence. Mandibular retrusion and protrusion due to mandibular growth disorder cause to physical and mental problems for the person. Proper growth of bones, muscles and cartilage led to growth of the jaw. The growth of facial skull bones has a significant effect on jaw-tooth relationships. Cartilage tissue is considered to the greatest growth center in bones, which known as a main center of mandibular growth. Cartilage is derived from chondrocytes, and a chondrocyte closed to pericellular matrix (PCM), especially Laminin proteins. In this study, we investigate missense polymorphisms (missense) of Laminin alpha 1 (LAMA1) gene at the *in silico* study. For this aim, missense polymorphisms with a frequency of more than 0.1 were first extracted from the NCBI database. The effect of selected snps on protein pathogenicity was investigated from online servers Polyphen2, PROVEAN, PhD-SNP, and protein stability from I-Mutant and MUpro. The results of the analysis from the NCBI database showed that there are 11 missense polymorphisms with a frequency greater than 0.1 for the LAMA1 gene. Analyzes also showed that rs1050349 polymorphisms is associated with the possibility of pathogenicity in more servers. As a result, this polymorphism could be considered by researchers for further analysis as a gene marker involved in the formation and growth of cartilage for jaw bone deformity.

Keywords: Laminin Alpha 1, Condyl cartilage, *in silico* study, Jaw deformity, Missense

ارتباط بین چندشکلی‌های ژن LAMA1 با رشد فک صورت: یک مطالعه کامپیوتری

فاطمه‌زهرا رضانژاد[۱]؛ محمدکاظم حیدری[۲]؛ اباصلت حسین‌زاده کلاگر[۳*]؛ ولی‌اله آرش[۴]

۱- دانشجو کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم‌پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
۲- دانشجو دکتری، زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم‌پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
۳- استاد، زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، علوم‌پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
۴- دانشیار، ارتودنسی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

* ایمیل نویسنده **مسئول مکاتبات**: *ahcolagar@umz.ac.ir*

چکیده

رشد صحیح فک یکی از عوامل مهم و تاثیرگذار در زیبایی، تکلم و اعتماد به نفس فرد است. عقب رفتگی و یا جلوآمدگی فک پایین که به دلیل اختلال در رشد فک پایین ایجاد می‌شوند می‌تواند باعث بروز مشکلات جسمی و روحی برای فرد شود. اختلال در رشد بافت های استخوانی، عضلانی و غضروفی منجر به اختلال در رشد فک می شود. به عنوان مثال، اختلال در رشد استخوان‌های جمجمه صورت اثر قابل توجهی بر روابط فکی و دندانی دارد، و اختلال در بافت‌های غضروفی همچون غضروف کندیل،که به عنوان اصلی‌ترین مرکز رشد فک پایین است، نقش مهمی در بدشکلی اسکلت صورت دارد. از آنجائیکه غضروف از کندروسیت منشا می‌گیرند و یک کندروسیت وابستگی شدیدی به تشکیلات ماتریکس اطراف سلولی(PCM) خود منجله پروتئین های لامینین می-دارد. هدف این مطالعه بررسی چندشکلی‌های دگرمعنی (Missense) ژن لامینین آلفا یک (LAMA1)، بعنوان یکی از اجزاء مهم ماتریکس خارج سلولی، در ارتباط با بدشکلی فک صورت در یک مطالعه‌ی کامپیوتری (in silico) است. برای این منظور ابتدا چندشکلی‌های دگرمعنی با فراوانی بیش از ۰/۱ از پایگاه‌داده NCBI استخراج شدند. سپس بررسی اثر SNPهای انتخاب شده روی بیماری‌زایی پروتئین‌ها از سرروهای برخط Polyphen2، PROVEAN، PhD-SNP، و پایداری پروتئین‌ها از I-Mutant و MUpro انجام شد. نتایج حاصل از آنالیز از پایگاه داده NCBI نشان داد ۱۱ چندشکلی بدمعنی با فراوانی بیشتر از ۰/۱ برای ژن LAMA1 وجود دارد. همچنین آنالیزها نشان داد چندشکلی rs1050349 در سرورهای بیشتری با احتمال بیماریزایی در ارتباط می باشد از اینرو این چندشکلی می‌تواند برای آنالیز بیشتر به عنوان یک مارکر ژنی دخیل در شکل‌گیری و رشد غضروف برای بدشکلی استخوان فک مورد توجه محققین بعدی قرار گیرند.

واژگان کلیدی:آنالیز کامپیوتری، بدشکلی فک، جهش دگرمعنی، غضروف کندیل، لامینین آلفا یک

۱.مقدمه

اختلال در رشد فک (عقب رفتگی و یا جلوآمدگی فک پایین) بعنوان یکی از عوامل مهم در شکل‌گیری فکی- صورتی در نظر گرفته می‌شود. عقب رفتگی و جلو آمدگی فک پایین به ترتیب از مشخصه های ظاهری کلاس II و III رابطه فکی-اسکلتی‌اند. عقب رفتگی فک پایین (Mandibular retrusion) به عنوان یکی از شایع‌ترین ناهنجاری‌های رشدی صورت بوده که یکی از دلایل ایجاد کلاس II رابطه اسکلتی-فکی است. این اختلال نه تنها زیبایی صورت را تحت تاثیر قرار می دهد بلکه می‌تواند باعث آپنه انسدادی خواب در موارد شدید گردد (Balkhande et al., 2018). شواهدی وجود دارند که نشان می‌دهد ژنتیک نقش مهمی در عقب رفتگی

فک پایین ایفا می‌کند (Weaver et al., 2017). همچنین پروگناتیسم مندیبولار (Mandibular prognathism) که در کلاس III مشاهده می‌شود، یک ناهنجاری دندانی-صورتی است که در آن رشد بیش از حد فک پایین اتفاق می‌افتد. این بدشکلی منجر به برآمدگی بیشتر فک پایین نسبت به فک بالا و اورجت منفی دندان‌های جلویی بالا می‌شود (van Vuuren, 1991). نمای ناخوشایند چهره ناشی از MP ممکن است اعتماد به نفس فرد را در زندگی اجتماعی کاهش داده و یا باعث مشکلات شدید روانی در وی گردد. علاوه بر این، دندان‌های قدامی تحتانی نمی‌توانند در جایگاه درستی با دندان‌های بالایی قرار گرفته و آنها را گاز بگیرند که این مسئله منجر به کاهش راندمان جویدن در فرد (English et al., 2002) و احتمال بروز اختلالات گوارشی و به خطر افتادن وضعیت تغذیه فرد می‌شود. از طرفی ناهماهنگی میان فک بالا و پایین ممکن است باعث نقص در گفتار و شکل تلفظ فرد شود (Guan et al., 2018). از طرفی دیگر رشد اسکلت جمجمه‌ای صورت تا حد زیادی بر روابط فکی، اکلوزالی (روابط دندانی- فکی) و عملکردهای دهانی-دندانی اثرگذار است (Mizoguchi et al., 2013). در رشد اسکلت جمجمه صورت، بافت‌های غضروفی نقش مهمی را به عنوان مکان‌های اصلی رشد اجزای آناتومی مربوطه ایفا می‌کنند. در یک استخوان بلند، دو غضروف جدا از هم (غضروف مفصلی و صفحه رشد) در مرحله رشد وجود دارند. غضروف مفصلی به عنوان ضربه‌گیر در برابر بار مکانیکی و صفحه رشد به عنوان محل رشد عمل می‌کند (Yoshimura, 1992). غضروف کندیل فک پایین به عنوان مهمترین مرکز رشد در ساختار جمجمه صورت با مورفوژنز اسکلت جمجمه صورت و عملکرد مفصل گیجگاهی-فکی در ارتباط است (Takano-Yamamoto, 1991). روند رشد غضروف کندیل طیف وسیعی از جهات قدامی تا خلفی را در بر میگیرد و در نتیجه رشد و مورفولوژی فک پایین بسیار متفاوت بوده و اختلال در رشد کندیل به شدت بر مورفولوژی فک و صورت و روابط اکلوزالی اثرگذار است (Mizoguchi et al., 2013). غضروف کندیل یک بافت ناهمگن حاوی سلول‌ها در مراحل مختلف بلوغ است (Chen et al., 2012) که شامل فیبروبلاست‌ها، سلول‌های پیش‌ساز استئوکندرال و سلول‌های غضروفی می‌باشد. این غضروف محیطی حاوی استخوان کندرویید بوده که یک بافت تخصصی کلسیفیه شده با خواص مورفولوژیکی حدواسط میان استخوان و غضروف است (Beresford, 1981). این بافت هیبریدی ممکن است نقش مهمی در تنظیم سرعت تشکیل استخوان در فرآیندهای استخوان سازی داخل غشایی و یا اندوکندرال (درون غضروفی) داشته باشد (Mizoguchi et al., 2013) که این مهم، امکان رشد کندیل در جهت‌های متفاوت و ایجاد مورفولوژی‌های متنوع در فک را می‌دهد. یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد غضروف کندیل این است که سلول‌های لایه تکثیر شونده‌ی آن دارای پتانسیل تمایزی فراوان (Multilineage) است که می‌توانند به سلول‌های پیش‌ساز چربی، استئوبلاست‌ها و کندروسیت ها تمایز یابند (Silbermann, 1990). کندروسیت‌ها در بافت‌های غضروفی به وسیله ماتریکس دور سلولی (PCM) باریک احاطه شده‌اند. از پروتئین‌های اصلی PCM میتوان به کلاژن چهار (Col IV)، نیدوژن، پرلکان و لامینین (LAM) اشاره کرد که نقش مهمی در غشای پایه دارند. خانواده لامینین از جمله ژن‌هایی است که در کندروسیت‌ها بیان می‌گردد. لامینین ها خانواده‌ای از گلیکوپروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی با ساختار هتروترایمری متشکل از یک زنجیره α، β و γ هستند که حداقل ۱۶ لامینین هتروترایمری مختلف را ایجاد می‌کنند (Aumailley et al., 2005). این زیرواحدها از طریق پیوندهای دی-سولفیدی درون مولکولی قادرند یک بازوی بلند و سه بازوی کوتاه همراه با بخش‌های کروی شکل در انتهای بازوها ایجاد کنند. این پروتئین‌ها بخش بزرگی از ترکیبات غشای پایه را تشکیل می‌دهند که در انواع گسترده‌ای از فرآیندهای بیولوژیکی شامل چسبندگی سلولی، تمایز، مهاجرت، پیام رسانی و متاستاز نقش ایفا می‌کنند. از جمله لامینین‌هایی که در کندروسیت‌ها بیان می‌گردد می توان به لامینین آلفا یک (LAMA1) اشاره کرد (Kvist et al., 2008). ژن این پروتئین روی کروموزوم ۱۸، در ناحیه p11.3118 قرار دارد که رونوشتی با طول ۹۲۲۸ نوکلئوتید (AC: NM_0055559.4) تولید می‌کند. از این رونوشت پروتئینی به طول ۳۰۷۵ آمینواسید از ۶۳ اگزون کد می¬شود که از آمینواسید یک تا ۱۷ جزء توالی نشانه و آمینواسید ۱۸ تا ۳۰۷۵ متعلق به زنجیره پروتئینی آلفا یک

است، که مخفف آن توسط کمیته جهانی HGNC به صورت LAMA1 شناخته می شود. این پروتئین دچار تغییرات پس از ترجمه نیز می‌گردد که شامل ایجاد باندهای دی‌سولفیدی، گلیکوزیلاسیون در آمینواسیدها (از نوع N-لینک با اتصال به آسپاراژین) و فسفریلاسیون می‌باشد. از طرفی دیگر پروتئین LAMA1 دارای ۲۷ دمین شامل ۱۷ دمین Laminin EGF-like، پنج دمین Laminin G-link، یک دمین Laminin type A1 و یک دمین Laminin type A2 می¬باشد. همچنین این پروتئین دارای یک ناحیه به نام دمین I و II در موقعیت ۱۵۵۶ تا ۲۱۱۶ می‌باشد (این دو دمین به صورت آلفا هلیکس بوده که با ناحیه Coiled coil سایر لامینین ها برهمکنش دارد). شده این پروتئین دارای یک ساختار coiled coil در ۱۷۰۶ تا ۲۱۱۶ و یک موتیف به عنوان محل اتصال به سلول در موقعیت ۲۵۳۴ تا ۲۵۳۶ می‌باشد. از طرفی برخی از محققین گزارش نمودند که لامینین‌های بیان شده به وسیله کندروسیت‌ها/سلول-های غضروف‌ساز (سلول‌های پیش‌ساز و سلول‌های بنیادی) می‌تواند غضروف‌سازی را تحریک کند (Sun et al., 2020). با توجه به اهمیت این پروتئین در مسیر تکوینی و رشد سلول‌ها در مراحل مختلف نمو و بخصوص کندروسیت‌ها بنظر می‌رسد اختلال در ساختار این ژن باعث نقص در عملکرد این پروتئین و در نهایت تغییر سرنوشت تمایز در سلول‌های کندروسیت گردد. از جمله مواردی که سبب اختلال و نقص در ژن‌ها می‌گردد می‌توان به تغییر در توالی ژنی، بخصوص چندشکلی نوکلئوتیدی یا SNP اشاره کرد. هدف از این مطالعه بررسی SNPهای بدمعنی ژن LAMA1 با فراوانی حداقل ۰/۱ به منظور شناخت SNPهایی با احتمال بالاتر آسیب رسانی به ساختار و عملکرد پروتئین به منظور دست‌یابی به یک مارکر ژنتیکی با بدشکلی فکی- صورتی می‌باشد.

۲.مواد و روش‌ها

در این مطالعه به منظور بدست آوردن چندشکلی‌های ژن LAMA1 با فراوانی بیش از ۰/۱ از پایگاه داده NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) استفاده شد. سپس با استفاده از سرور برخط Polyphen2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/) برای پیش‌بینی اثر احتمالی جایگزینی یک اسیدآمینه با اسیدآمینه دیگر بر ساختار و عملکرد پروتئین استفاده شد بطوریکه هر چه نمره به یک نزدیک‌تر باشد احتمال آسیب به پروتئین بیشتر است. از سرور برخط PROVEAN (http://provean.jcvi.org/index.php) برای بررسی اثر جایگزینی اسیدآمینه بر عملکرد بیولوژیکی پروتئین استفاده شد که چندشکلی با نمره‌ی ۲/۵- و یا پایین‌تر احتمال ایجاد واریانت مخرب را افزایش می‌دهد درحالی که نمره بالاتر از ۲/۵- احتمال ایجاد واریانت طبیعی (غیرمخرب) را افزایش می‌دهد. از سرور PhD-SNP (https://snps.biofold.org/phd-snp/phd-snp.html) جهت پیش‌بینی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی مضر انسانی استفاده شد. از دو سرور I-Mutant2.0 (https://folding.biofold.org/i-mutant/i-mutant2.0.html) و MUpro (https://www.ics.uci.edu/~baldig/mutation.html) به منظور پیش‌بینی تغییرات پایداری پروتئین در برابر تغییرات تک نوکلئوتیدی استفاده شده که نمره بالاتر از صفر به معنی افزایش پایداری و نمره کمتر از صفر به معنی کاهش پایداری روتئین تولید شده در نظر گرفته شد.

۳. نتایج و بحث

رشد غضروف کندیل مندیبل از مهمترین عامل تاثیرگذار در رشد فک و زیبایی چهره می باشد (Balkhande et al., 2018). پروتئین لامینین از اجزا مهم کنام و همچنین ماتریکس خارج سلولی سلول‌ها است، که بر تمایز و رشد سلول‌ها بخصوص سلول های غضروفی موثر است، و تاکنون گزارشات زیادی از تغییر در محتوای ژنی و بخصوص چندشکلی‌های (پلی‌مورفیسم‌های) لامینین در ایجاد بیماری‌ها مختلف بیان شد (Kvist et al., 2008). آنالیز کامپیوتری از توالی ژنوم ژن لامینین آلفا یک (*LAMA1*)، حاصل از پایگاه داده NCBI نشان داد ۱۱ چندشکلی با فراوانی بیشتر از ۰/۱ برای این ژن وجود دارد. مطالعه این ۱۱ چندشکلی در سرورهای

Polyphen 2.0، PROVEAN و PhD-SNP نشان داد، چند شکلی rs1050349 در هر سه سرور بیماریزا و یا آسیب‌رسان است از طرفی دیگر چندشکلی‌های rs12961939 و rs662471 در هر دو سرور Polyphen2 و PROVEAN بیماریزا بودند (جدول ۱). همچنین مطالعه پایداری پروتئین‌ها در اثر جایگزینی نوکلئوتیدی نشان داد چند شکلی‌های rs12961939، rs11664063، rs671871، rs543355، rs566655 و rs1050349 در هر دو سرور I-Mutant و MUpro با کاهش پایداری همراه بودند ولی چند شکلی rs12607841 در هر دو سرور با افزایش پایداری همراه بود. این درحالی است که دیگر چندشکلی‌ها در دو سرور I-Mutant و یا MUpro با کاهش و یا افزایش پایداری همراه بودند. از طرفی گزارشات نشان داد که بین چندشکلی rs12961939 و بیماری گلیابلاستوما ارتباط وجود دارد (Backes et al., 2015). نتایج آنالیز این تحقیق نیز نشان داد این چندشکلی در حداقل دو سرور Polyphen2 و PROVEAN بیماریزاست و مطالعه اثر آن در پایداری پروتئین نیز نشان داد در هر دو سرور I-Mutant و MUpro با کاهش پایداری همراه است. از اینرو بنظر می‌رسد این چند شکلی ممکن است با تغییر در پایداری پروتئین و همچنین ساختار پروتئین سبب ایجاد بیماری گلیابلاستوما گردد.

۴. نتیجه‌گیری

براساس یافته های کامپیوتری ما در این تحقیق، چند شکلی rs1050349 در تمام سرورها دارای اثرات بیماریزا می باشد. لذا با توجه به اهمیت نقش لامینین در ماتریکس خارج سلولی پیشنهاد می‌گردد این چندشکلی، با توجه به فراوانی بیش از ۰/۱ در جمعیت‌ها، می تواند کاندید مناسبی برای مطالعات بعدی به عنوان یک مارکر ژنی باشد.

جدول ۱: نتایج حاصل از آنالیز چندشکلی‌ها در سرورهای برخط

SNPs	AA Ch*	Polyphen2		PROVEAN		PhD-SNP		I-Mutant		MUpro	
		Prediction	Score	Prediction	Score	Prediction	Score	Prediction	Score	Prediction	Score
rs62081533	I1659V	Benign	0.0	Neutral	0.303	Neutral	0.078	Inc Stab#	0.47	Dec Stab##	-0.653
rs12961939	S1577A	PD**	0.997	Del	-0.375	Neutral	0.169	Dec Stab	-0.39	Dec Stab	-1.123
rs12607841	A1763V	Benign	0.01	Neutral	-1.557	Neutral	0.219	Inc Stab	0.96	Inc Stab	0.114
rs11664063	A1876T	Benign	0.152	Neutral	-2.382	Neutral	0.220	Dec Stab	-1.38	Dec Stab	-0.836
rs671871	I2076T	Benign	0.0	Neutral	1.348	Neutral	0.110	Dec Stab	-0.38	Dec Stab	-1.778
rs662471	M1340V	PD	0.549	Del***	-2.593	Neutral	0.477	Inc Stab	0.20	Dec Stab	-1.068
rs543355	T2611A	Benign	0.0	Neutral	-0.545	Neutral	0.090	Dec Stab#	-1.16	Dec Stab	-0.183
rs566655	N674T	PD	0.751	Neutral	-1.720	Neutral	0.098	Dec Stab	-4.90	Dec Stab	-1.530
rs607230	K2002E	Benign	0.0	Neutral	0.969	Neutral	0.226	Dec Stab	-0.69	Inc Stab	0.199
rs2229848	A2675V	Benign	0.002	Del	-3.087	Neutral	0.224	Dec Stab	-1.32	Inc Stab	0.130
rs1050349	P1112R	PD	1	Del	-3.369	Dis****	0.751	Dec Stab	-1.66	Dec Stab	-0.386

*AA Ch= Amino acid change;** PD= Probably Damaging; ***Del= Deleterious; ****Dis= Disease; #Inc Stab= Increase stability; ##Dec Stab= Decrease stability.

منابع

3- Aumailley M., Bruckner-Tuderman L., Carter WG., Deutzmann R., Edgar D., Ekblom P. and Yurchenco PD. 2005. A simplified laminin nomenclature. Matrix Biology, 24(5), 326-332.
4- Backes C., Harz C., Fischer U., Schmitt J., Ludwig N., Petersen BS., ... and Meese E. 2015. New insights into the genetics of glioblastoma multiforme by familial exome sequencing. Oncotarget, 6(8), 5918.
5- Balkhande PB., Lakkakula BVKS and Chitharanjan AB. 2018. Relationship between matrilin-1 gene polymorphisms and mandibular retrognathism. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, 153(2), 255-261.e1.

6- Beresford W.A. 1981. Chondroid bone, secondary cartilage, and metaplasia. Urban & Schwarzenberg, USA, pp 454
7- English JD., Buschang PH. and Throckmorton GS. 2002. Does malocclusion affect masticatory performance? The Angle Orthodontist, 72(1):21-27.
8- Guan X., Song Y., Ott J., Zhang Y., Li C., Xin T., Li Z., Gan Y., Li J., Zhou S. and Zhou Y. 2015. The ADAMTS1 gene is associated with familial mandibular prognathism. Journal of Dental Research, 94(9), 1196-1201.
9- Kvist AJ., Nyström A., Hultenby K., Sasaki T., Talts JF. and Aspberg, A. 2008. The major basement membrane components localize to the chondrocyte pericellular matrix- a cartilage basement membrane equivalent? Matrix Biology, 27(1), 22-33.
10- Mizoguchi I., Toriya N. and Nakao Y. 2013. Growth of the mandible and biological characteristics of the mandibular condylar cartilage. Japanese Dental Science Review, 49(4), 139-150.
11- Silbermann M. and von der Mark K. 1990. An immunohistochemical study of the distribution of matrical proteins in the mandibular condyle of neonatal mice I Collagens. Journal of Anatomy, 170, 11.
12- Sun Y., Wang TL., Toh WS. and Pei, M. 2017. The role of laminins in cartilaginous tissues: from development to regeneration. European Cells and Materials, 34, 40-54.
13- Takano-Yamamoto T., Soma S., Nakagawa K., Kobayashi Y., Kawakami M and Sakuda M. 1991. Comparison of the effects of hydrostatic compressive force on glycosaminoglycan synthesis and proliferation in rabbit chondrocytes from mandibular condylar cartilage, nasal septum, and spheno-occipital synchondrosis in vitro. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, 99(5), 448-455.
14- van Vuuren C. 1991. A review of the literature on the prevalence of class III malocclusion and the mandibular prognathic growth hypotheses. The Australian Orthodontic Journal, 12(1):23-28.
15- Weaver CA., Miller SF and da Fontoura CS. 2017. Candidate gene analyses of 3-dimensional dentoalveolar phenotypes in subjects with malocclusion. American Journal of Orthod Dentofacial Orthop, 151(3),539-558.
16- Yoshimura K., Mizoguchi I., Sugawara J. and Mitani, H. 1992. Craniofacial growth changes associated with juvenile rheumatoid arthritis: a case report from 8 to 13 years of age. Japanese Orthodontic Society, 51, 398-404.

Investigation of enriched pathways of triple negative breast cancer in KEGG

Zeinab Darzi [1] *; Sohrab Boozarpour [2]; Moein Farshchian [3], Shaaban Ghalandarayeshi [4], Mina Lashkarboloki [5]

1- Master student of Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavous University

2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavous University

3- Stem Cell and Regenerative Medicine Research Group, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Khorasan Razavi Branch, Mashhad

4- Assistant Professor, Department of Mathematics and Statistics, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavous University

۵. Ph. D student, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University

* *Zeinab.darzii@gmail.com*

Abstract

One of the most common cancers in women in the world is breast cancer. Breast cancer is considered a heterogeneous cancer. Due to different morphological and phenotypic characteristics, different clinical behavior occurs. Negative triple breast cancer (TNBC) has a poor prognosis due to the lack of expression of common breast cancer markers. Therefore, in this study, we decided to study the expression of genes in triple negative breast cancer samples using RNA-Seq data. Cancer and normal data were downloaded from this NCBI SRA database. The keyword breast cancer was used to download the data. 90 data including 18 normal samples and 72 cancer samples were downloaded in the initial stage. Then, to remove the data from the contaminants, trimatic software was used, and finally, by creating a count file, the data were prepared for review in R software. The purpose of this step is to investigate DEGs or differences in gene expression in samples. At this stage, tidyverse packages, DESeq2, gplots were used. The GSEA software then performed a gene enrichment study based on the KEGG database using a file containing the gene rankings obtained from the previous step. In this study, RNAseq data after initial stages and conversion to count file and normalization by DESeq2 package in R software, were examined in GSEA software using KEGG gene set of twenty top pathways enriched with this set as Enrichment plot. was presented. Effective genes in cancer samples were introduced in the KEGG_NOD_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY and KEGG_CELL_CYCLE pathways. Some of these genes have increased expression in cancer samples such as MCM7, ANAPC10, etc. in the KEGG_CELL_CYCLE pathway and others have decreased expression such as TAB3, BIRC3, etc. in the KEGG_NOD_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY pathway.

Keywords: TNBC, Breast cancer, GSEA ،RNA-Seq

بررسی مسیرهای غنی شده سرطان پستان سه گانه منفی در KEGG

زینب درزی[۱*]؛ سهراب بوذرپور[۲]؛ معین فرشچیان[۳]، شعبان قلندر آیشی[۴] ، مینا لشکربلوکی[۵]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس

۲- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه گنبد کاووس

۳- گروه تحقیقات سلول های بنیادی و پزشکی بازساختی، مرکز آموزشی، فرهنگی و تحقیقاتی دانشگاهی ACECR واحد خراسان رضوی، مشهد

۴- استادیار گروه ریاضی و آمار، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه گنبد کاووس

۵- دانشجوی دکترای ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: *Zeinab.darzii@gmail.com*

چکیده

یکی از شایع‌ترین سرطان‌های زنان در جهان سرطان پستان می‌باشد. سرطان پستان به عنوان یک سرطان ناهمگون در نظر گرفته می‌شود. که به دلیل مشخصات مورفولوژیکی و فنوتیپی متمایز رفتار بالینی متفاوتی بروز می‌دهد. سرطان پستان سه گانه منفی (TNBC) به دلیل عدم بیان نشانگرهای معمول سرطان پستان پیش آگهی ضعیفی دارد. لذا در این تحقیق بر آن شدیم بیان ژن ها در نمونه های سرطان پستان سه گانه منفی را با استفاده از داده های RNA-Seq مورد مطالعه قرار دهیم. داده‌های سرطانی و نرمال از این پایگاه داده NCBI بخش SRA دانلود شد برای دانلود داده‌های مورد نظر از کلید واژه breast cancer استفاده شد. ۹۰ داده شامل ۱۸ نمونه نرمال و ۷۲ نمونه سرطانی در مرحله اولیه دانلود شد. سپس برای پاک کردن داده ها از آلودگی ها از نرم افزار تریموماتیک استفاده شد و در نهایت با ساخت فایل count داده ها آماده ی بررسی در نرم افزار R شدند. هدف از این مرحله بررسی DEGs یا تفاوت بیان ژن‌ها در نمونه‌ها است. در این مرحله از پکیج‌های tidyverse، DESeq2 ، gplots استفاده شد. سپس توسط نرم افزار GSEA ، با استفاده از فایلی که حاوی رتبه بندی ژن‌ها بود و از مرحله قبل به دست آمد بررسی غنی سازی ژن ها براساس پایگاه داده KEGG انجام شد. با استفاده از مجموعه ژنی KEGG بیست مسیر برتر غنی شده با این مجموعه به صورت پلات Enrichment بدست آمد. ژن های موثر در دو مسیر KEGG_NOD_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY و KEGG_CELL_CYCLE در نمونه های سرطانی معرفی شدند. برخی از این ژن ها در نمونه های سرطانی افزایش بیان داشته مانند MCM7، ANAPC10 و ... در مسیر KEGG_CELL_CYCLE و برخی دیگر کاهش بیان داشتند مانند TAB3، BIRC3 و .. در مسیر KEGG_NOD_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY .

واژگان کلیدی: TNBC ، سرطان پستان، GSEA، RNA-Seq

۱.مقدمه

یکی از شایع‌ترین سرطان‌های زنان در جهان سرطان پستان می‌باشد که در سال ۲۰۱۵ حدود ۵۷۰۰۰۰ مورد مرگ بر اثر این بیماری گزارش شده‌است(WHO , McGuire 2016). در سال ۲۰۱۷ در آمریکا چیزی معادل ۲۵۲۷۱۰ نفر مبتلا به سرطان پستان گزارش شده‌است که این رقم ۳۰ درصد از کل موارد سرطان‌های جدید را در این سال تشکیل می‌دهد(Rebecca, Kimberly et al. 2017). از آنجایی که سرطان پستان توانایی انتقال به اندام‌های دوردستی چون مغز، ریه، استخوان و کبد را دارد پس می‌توان آن را سرطانی متاستاتیک در نظر گرفت. تشخیص به موقع تا حدی می‌تواند میزان زنده ماندن را افزایش دهد. به طوری که این امر در آمریکای شمالی توانسته است میزان زنده ماندن تا ۵سال را بیش از ۸۰ درصد افزایش دهد(DeSantis, Fedewa et al. 2016). به منظور تشخیص زود هنگام بیماری در دهه گذشته از MRI استفاده می‌شد و در حال حاضر ماموگرافی جایگزین آن شده و تا حد زیادی باعث کاهش مرگ‌ومیر شده‌است(Drukteinis, Mooney et al. 2013).

از جمله عواملی که خطر ابتلا به سرطان را افزایش می‌دهد پیری، سابقه خانوادگی، جنسیت، جهش‌های ژنی، استروژن و سبک زندگی می‌باشد(Majeed, Aslam et al. 2014). سرطان پستان به عنوان یک سرطان ناهمگون در نظر گرفته می‌شود (Tomao, Papa et al. 2015)که به دلیل مشخصات مورفولوژیکی و فنوتیپی متمایز رفتار بالینی متفاوتی بروز می‌دهد(Marusyk and Polyak 2010). به طور کلی در برخی منابع سرطان پستان به زیرگروه‌هایی طبقه بندی شده‌است: لومینال، HER2 ، breast-like (Paik, Shak et al. 2004)، Triple-negative (Tang, Wang et al. 2016) .

مشخصه ی زیرگروه Triple Negative Breast Cancer عدم بیان ER، PR و HER2 می‌باشد که 15٪ سرطان‌های مهاجم پستان را تشکیل می‌دهد(Boyle 2012). TNBC یک بیماری حساس به هورمون است که تغییر هورمونی در طول زندگی زنان می‌تواند خطر ابتلا به این بیماری را افزایش دهد. Multiparity و سن پایین در بارداری اول و نسبت خطر ابتلا به این بیماری را افزایش می‌دهند. شیردهی و مدت زمان طولانی شیردهی و افزایش تعداد کودکانی که با شیر مادر تغذیه می‌شوند خطر ابتلا به TNBC را کاهش می‌دهد(Millikan, Newman et al. 2008). در خصوص شروع و توسعه TNBC اطلاعات کمی وجود دارد لذا بررسی بیان ژن های در مقیاس وسیع در داده ها RNA-Seq می تواند به درک ارتباطات ژن ها در این زیرگروه سرطان پستان کمک نماید.

۲.مواد و روش‌ها

۲-۱-جست و جوی داده‌های RNAseq

ابتدا برای جست‌وجوی داده‌های ایده‌آل از پایگاه داده NCBI بخش SRA استفاده شد. داده‌های سرطانی و نرمال از این پایگاه دانلود شد برای دانلود داده‌های مورد نظر از کلید واژه breast cancer استفاده شد. ۹۰ داده شامل ۱۸ نمونه نرمال و ۷۲ نمونه سرطان اولیه پستان از نوع TNBC دانلود شد. این نمونه‌ها از نوع TRANSCRIPTOMIC می‌باشند، که توسط دستگاه Illumina HiSeq X Ten توالی یابی شدند.

۲-۲-دانلود داده‌ها از سایت NCBI و آماده سازی اولیه

دانلود داده‌ها و انجام آنالیزهای اولیه در سیستم عامل اوبونتو نسخه Ubuntu 20.04.1 LTS و سرور مجازی لینوکس استفاده شد. دانلود داده‌های مورد نظر با فرمت fastq با استفاده از نرم‌افزار fastq-dump انجام شد.

۲-۳-پاکسازی داده‌ها از آلودگی‌ها با استفاده از نرم افزار Trimmomatic

در این مرحله داده با استفاده از نرم افزار تریموماتیک نسخه Trimmomatic-0.39 نصب شده بر روی سرور مجازی به نوعی از آلودگی‌ها پاکسازی شدند.

۲-۴-استفاده از نرم افزار hisat2

در مرحله چهارم از نرم‌افزار hisat2 استفاده شد، hisat2 برنامه‌ای با رویکرد هم ترازی برای نقشه خوانش‌های توالی نسل بعد می‌باشد این داده‌ها ممکن است داده‌های توالی یابی از کل ژنوم، ترانسکریپتوم و یا توالی اگزوم باشد که با یک ژنوم مرجع واحد مقایسه می‌شود.

۲-۵-استفاده از نرم افزار samtools

فایل sam حاصل از مرحله قبل در این مرحله توسط نرم افزاری به نام samtools به فایل bam تبدیل شد.

۲-۶-استفاده از نرم افزار htseq-count

در این مرحله با استفاده از نرم‌افزار htseq-count و یک فایل gtf، تعداد ژن‌های بیان شده در داده‌ها در فایلی با پسوند count شمارش و ثبت شد.

۲-۷-بررسی داده‌ها در نرم افزار R

پس از انجام تمامی مراحل بخش اول برای بررسی میزان بیان ژن از نرم افزار R استفاده شد. هدف از این مرحله بررسی DEGs یا تفاوت بیان ژن‌ها در نمونه‌ها است. در این مرحله از پکیج‌های tidyverse، DESeq2 ، gplots استفاده شد و با رسم پلات‌ها ۳۳ داده به دلیل همپوشانی با سایر داده‌ها حذف شدند. در انتهای این مرحله لیستی از ژن‌ها را به دست آورده که میزان بیان آن در هر نمونه مشخص شده‌است.

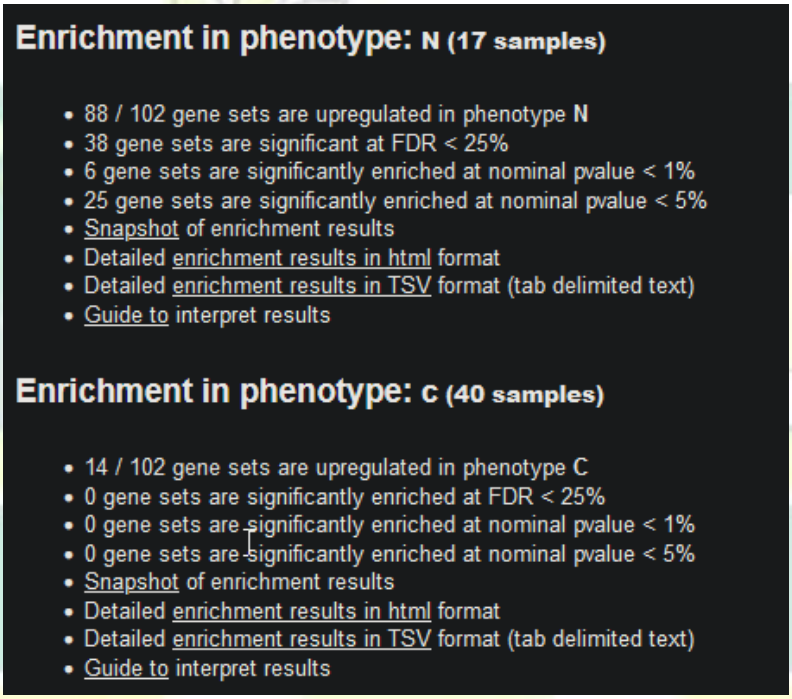
۲-۸-بررسی داده‌ها در نرم‌افزار GSEA

یکی از نرم افزارهای مهم برای تجزیه و تحلیل غنی سازی مسیر GSEA می‌باشد که با استفاده از یک آزمون مبتنی بر جایگشت لیست‌های ژنی رتبه بندی شده را آنالیز می‌کند. این نرم افزار فایلی که حاوی رتبه بندی ژن‌هاست و از مرحله قبل به دست آمده را دریافت می‌کند و پس از انجام آنالیز تعدادی پلات و اطلاعات را در اختیار ما قرار داد که در بخش نتایج به تفسیر این اطلاعات می‌پردازیم.

۳. نتایج و بحث

آنالیز بیان ژن ها از داده های بدست آمده از پایگاه داده SRA ، در سیستم عامل اوبونتو انجام گرفت. لیست ژن‌های حاصل از مرحله قبل در این مرحله ورودی ما برای نرم افزار GSEA می‌باشد. هدف از انجام این مرحله این است که ببینیم ژن‌های ما در کدام بخش از مسیرهای بیولوژیکی ایفای نقش می‌کنند. برای بررسی این داده ها در این بخش از gene set های kegg موجود در بخش MSigDB[۱۸۷] در این نرم افزار استفاده شد (c2.cp.kegg.v7.4.symbols.gmt).

در شکل۱، نتایج غنی سازی داده ها بر اساس مجموعه های ژنی پایگاه داده kegg را مشاهده می کنید. در گروه نرمال ما از میان ۱۰۲ مجموعه ژنی این پایگاه ۸۸ مجموعه ژن و از گروه سرطانی ۱۴ مجموعه ژن افزایش بیان داشتند و ۳۸ مجموعه ژن از نرمال ها دارای FDR<25% می‌باشد و هیچ مجموعه ژنی از گروه سرطانی به طور معنی دار در این بخش غنی نشده اند. FDR[188] یعنی اگر چهار بار این آزمایش تکرار شود به احتمال یک چهارم ممکن است نتیجه مثبت کاذب باشد. در خط بعد nominal pvalue < 1% را داریم که در واقع همان pvalue ، adj نشده می‌باشد و نرمال ها ۶ مجموعه ژن دارند و سرطانی ها هیچ مجموعه ژن غنی شده در این بخش را ندارند.



شکل ۱: نتایج غنی سازی داده ها بر اساس مجموعه های ژنی پایگاه داده ***kegg***

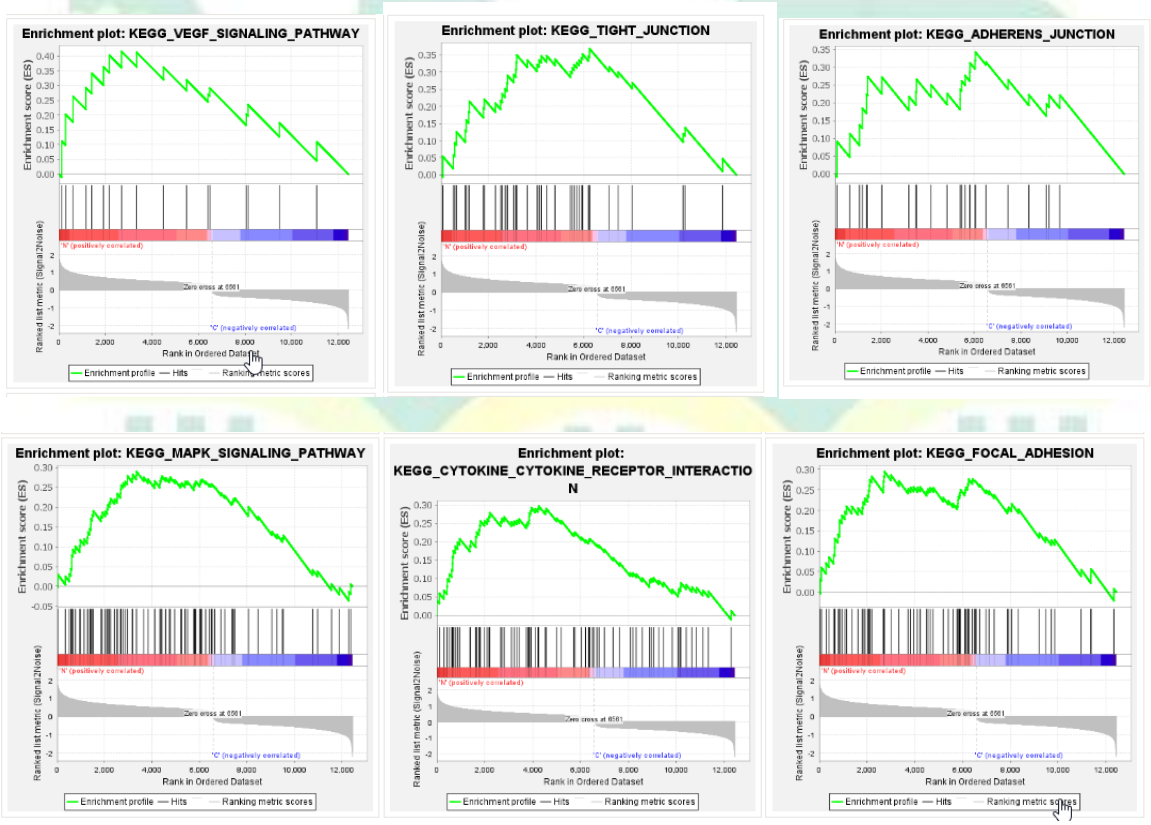
از قسمت snapshot نتایج غنی سازی توسط نرم افزار را به صورت نمودار می‌توانیم دریافت کنیم. در این بخش ۲۰ نمودار برتر مربوط به آنالیز به نمایش گذاشته می‌شود. این نمودار بر اساس امتیاز غنی سازی که نرم افزار به هریک از ژن‌های بیان شده داده است کشیده می‌شود، خطوط سیاه رنگ بیانگر ژن‌هاست، با افزایش بیان هر ژن در این مجموعه ژن نمودار به سمت بالا و با کاهش بیان نمودار به سمت پایین متمایل می‌شود. ژنی که بیشترین بیان را دارد Log fold change مثبت تری دارد و به سمت رنگ قرمز می‌رود و ژنی که بیان کمتر دارد Log fold change منفی تر می‌شود و در سمت رنگ آبی قرار می‌گیرد. در انتهای نمودار یک بخش

[187] Molecular Signatures Database
[188] false discovery rate

امتیازدهی وجود دارد و نشان دهنده آن است که ژن‌هایی که در سمت چپ و راست قرار می‌گیرند وزن بیشتری نسبت به ژن‌های قرار گرفته در ناحیه وسط نمودار دارند. از ژنی که بیشترین ES را دارد به سمت چپ در زیر نمودار سبزرنگ بیانگر ژن‌هایی است که بیشترین تاثیر را در این gene set دارند.

از میان این ۲۰ نمودار برای نمونه های نرمال ما ۶ نمودار از مهمترین مسیرها که در این گروه غنی شدند، و ۲ نمودار مهم را برای گروه سرطانی در این مقاله ارائه و تفسیر می کنیم.

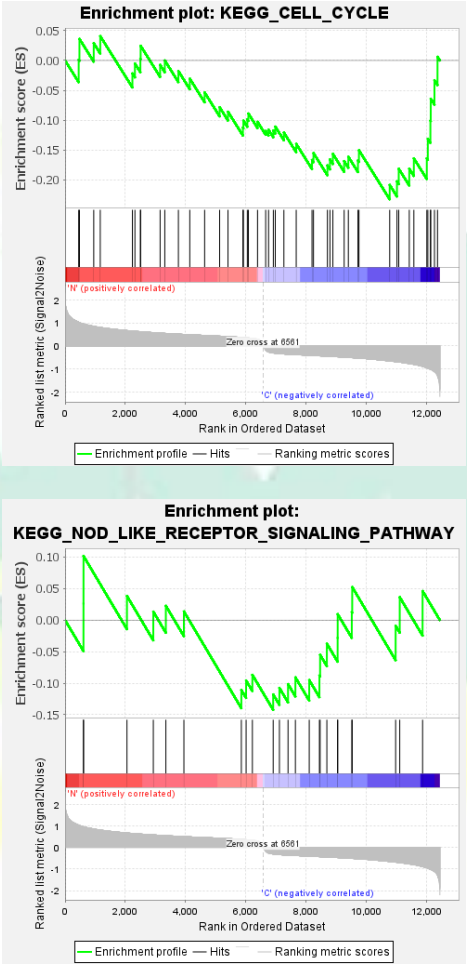
در شکل ۲، ۶ مسیرهای غنی شده در نمونه های نرمال ارائه شدند. مسیرهای KEGG_ADHERENS_JUNCTION، KEGG_TIGHT_JUNCTION، KEGG_VEGF_SIGNALING_PATHWAY، KEGG_FOCAL_ADHESION، KEGG_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION و KEGG_MAPK_SIGNALING_PATHWAY برای نمونه نرمال ما غنی شدند، یعنی ژن هایی که در این مسیر نقش دارند با توجه به نمره ES که نرم افزار به هر یک از آن ها می دهد با چه قدرتی می تواند مسیر مورد نظر را در نمودار به سمت بالا ببرد و در واقع نمونه های نرمال در این مسیرها به طور مثبت غنی شدند. در اینجا ژن ها با افزایش بیان نمودار را به سمت بالا می برند و مسیر را هدایت می کنند.



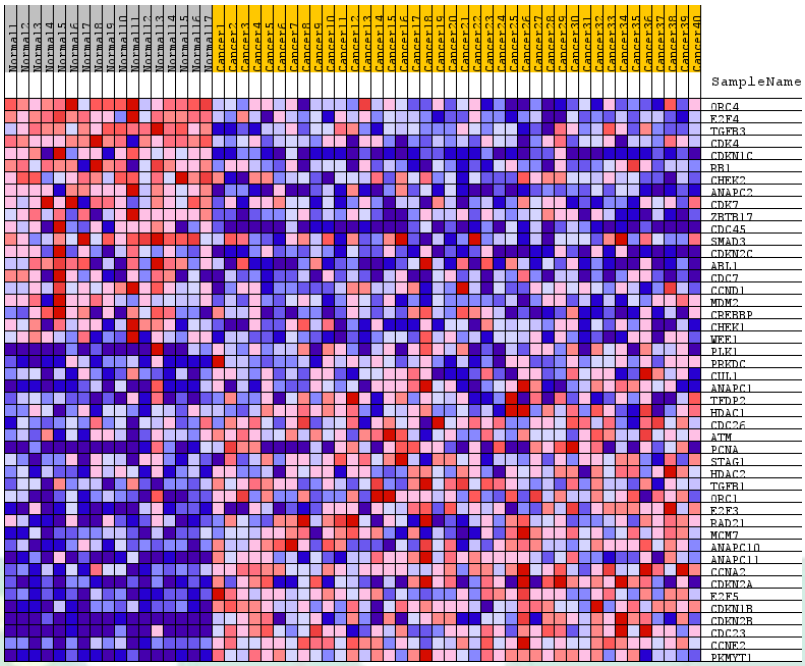
شکل ۲: Enrichment plot : ۶ پلات مهم غنی شده در نمونه های نرمال در پایگاه داده kegg

در شکل ۳، ۲نمودار غنی شده در نمونه های سرطانی نشان داده شده است، این مسیرها KEGG_NOD_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY و KEGG_CELL_CYCLE می باشند. در این نمودارها

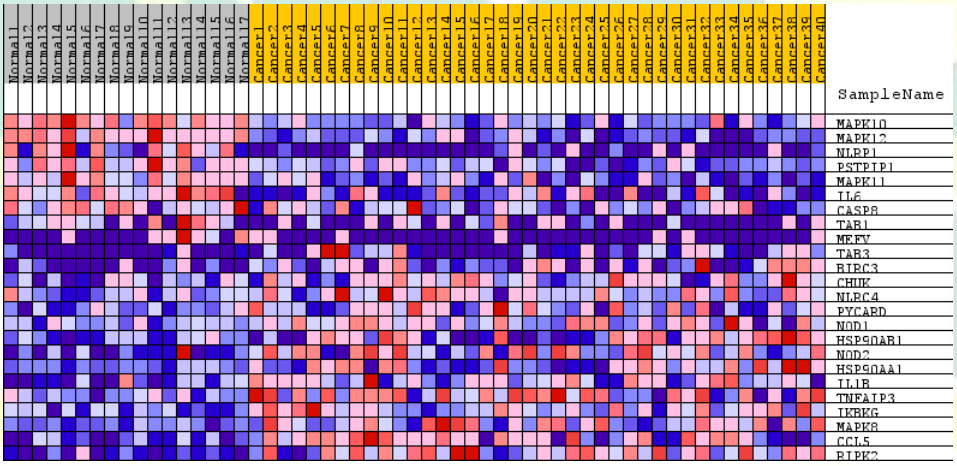
همان طور که مشخص شده نمودار به سمت پایین متمایل شده و سمت راست یعنی رنگ آبی حاوی ژن های موثری است که توانسته نمودار را به این صورت درآورد، ژن هایی که در سمت آبی قرار گرفتند با کاهش بیان خود مسیر را هدایت می کنند. در جدول۱، برخی از این ژن های مهم ذکر شده اند که این ژن ها با توجه به شکل ۴ و ۵ برای مسیر KEGG_CELL_CYCLE به طور میانگین در نمونه های سرطانی بررسی شده دچار افزایش بیان شدند و ژن های معرفی شده برای مسیر KEGG_NOD_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY به طور میانگین برای این نمونه های سرطانی کاهش بیان داشتند.



شکل ۳: Enrichment plot : ۲ پلات مهم غنی شده در نمونه های سرطانی در پایگاه داده kegg



شکل ۳: heatmap ژن های مهم در مسیر KEGG_CELL_CYCLE



شکل ۴: heatmap ژن های مهم در مسیر KEGG_NOD_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY

جدول ۲: ژن های مهم در دو مسیر غنی شده در نمونه های سرطانی

	SYMBOL	TITLE	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT	GeneSet

۱	MCM۷	na	۱۰۷۶۷	-۰.۶۵۷	-۰.۲۰۸۸	Yes	KEGG_CELL_CYCLE
۲	ANAPC۱۰	na	۱۱۰۰۸	-۰.۶۹۲	-۰.۲۰۲۷	Yes	KEGG_CELL_CYCLE
۳	ANAPC۱۱	na	۱۱۰۶۷	-۰.۷۰۲	-۰.۱۸۱۶	Yes	KEGG_CELL_CYCLE
۴	CCNA۲	na	۱۱۴۱۶	-۰.۷۶۹	-۰.۱۸۱۵	Yes	KEGG_CELL_CYCLE
۵	CDKN۲A	na	۱۱۵۶۸	-۰.۸۰۴	-۰.۱۶۴۲	Yes	KEGG_CELL_CYCLE
۶	TAB۳	na	۶۹۰۲	-۰.۳۰۸	-۰.۱۱۷۸	Yes	KEGG_NOD_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY
۷	BIRC۳	na	۷۱۰۹	-۰.۳۳۸	-۰.۱۰۷۵	Yes	KEGG_NOD_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY
۸	CHUK	na	۷۳۹۵	-۰.۳۶۴	-۰.۱۰۱۵	Yes	KEGG_NOD_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY
۹	NLRC۴	na	۷۶۳۹	-۰.۳۸۰	-۰.۰۹۰۸	Yes	KEGG_NOD_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY
۱۰	PYCARD	na	۸۰۹۸	-۰.۴۱۰	-۰.۰۹۵۱	Yes	KEGG_NOD_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY

۴. نتیجه‌گیری

یکی از پر چالش ترین نوع سرطان پستان زیرگروه Triple-negative می باشد. بررسی داده های RNAseq مربوط به سرطان پستان از نوع TNBC در این مطالعه نشان می دهد که مجموعه های ژنی KEGG_CELL_CYCLE و KEGG_NOD_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY در نمونه های سرطانی بررسی شده در این تحقیق به صورت منفی غنی شده اند که این ژن ها برای مسیر KEGG_CELL_CYCLE به طور میانگین در نمونه های سرطانی بررسی شده دچار افزایش بیان شدند مانند MCM7، ANAPC10 و ... و ژن های معرفی شده برای مسیر KEGG_NOD_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY به طور میانگین برای این نمونه های سرطانی کاهش بیان داشتند مانند TAB3، BIRC3 و ... ژن های مهم نامبرده در جدول یک که نقشی اساسی در تغییرات این مسیرها دارند می توانند در تحقیقات بعدی مورد توجه بیشتری قرار بگیرند.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از جناب آقای احمد صبوری، سرکار خانم سارا چیتگران و جناب آقای سعید خاتمی که در انجام برخی از مراحل مطالعه همکاری داشتند، صمیمانه سپاسگزارند.

منابع

1. Boyle, P. (2012). "Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations." Annals of Oncology **23**: vi7-vi12.
2. DeSantis, C. E., S. A. Fedewa, A. Goding Sauer, J. L. Kramer, R. A. Smith and A. Jemal (2016). "Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women." CA: a cancer journal for clinicians **66**(1): 31-42.
3. Drukteinis, J. S., B. P. Mooney, C. I. Flowers and R. A. Gatenby (2013). "Beyond mammography: new frontiers in breast cancer screening." The American journal of medicine **126**(6): 472-479.
4. Majeed, W., B. Aslam, I. Javed, T. Khaliq, F. Muhammad, A. Ali and A. Raza (2014). "Breast cancer: major risk factors and recent developments in treatment." Asian Pacific Journal of Cancer Prevention **1**.۳۳۵۸-۳۳۵۳ :(۸)۵
5. Marusyk, A. and K. Polyak (2010). "Tumor heterogeneity: Causes and consequences." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer **1805**(1): 105-117.
6. McGuire, S. (2016). "World cancer report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, international agency for research on cancer, WHO Press, 2015." Advances in nutrition **7**(2): 418-419.
7. Millikan, R. C., B. Newman, C.-K. Tse, P. G. Moorman, K. Conway, L. V. Smith, M. H. Labbok, J. Geradts, J. T. Bensen, S. Jackson, S. Nyante, C .Livasy, L. Carey, H. S. Earp and C. M. Perou (2008). "Epidemiology of basal-like breast cancer." Breast Cancer Research and Treatment **109**(1): 123-139.
8. Paik, S., S. Shak, G. Tang, C. Kim, J. Baker, M. Cronin, F. L. Baehner, M. G. Walker, D. Watson and T .Park (2004). "A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer." New England Journal of Medicine **351**(27): 2817-2826.
9. Rebecca, S., D. M. Kimberly and J. Ahmedin (2017). "Cancer statistics." Ca Cancer J Clin **67**.۳۰-۷ :(۲۷)
10. Tang, Y., Y. Wang, M. F. Kiani and B. Wang (2016). "Classification, treatment strategy, and associated drug resistance in breast cancer." Clinical breast cancer **16**(5): 335-343.
11. Tomao, F., A. Papa, E. Zaccarelli, L. Rossi, D. Caruso, M. Minozzi, P .Vici, L. Frati and S. Tomao (2015). "Triple-negative breast cancer: new perspectives for targeted therapies." OncoTargets and therapy **8**: 177-193.
12. WHO "Breast cancer".

Study and Bionformatics analaysis of the Sequence, structure and functional of a laccase-like enzyme

Shiva Khoshkhoo[1*]; Zahra Mousavi nejad[1]; Sara Gharavi[2]

1- MSc. Department of Biotechnology, Faculty of Biological Science, Alzahra University, Tehran,Iran
2- Assistant Professor of Biochemistry, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Science, Alzahra University, Tehran,Iran

Sh.khoshkhoo@student.alzahra.ac.ir

Abstract

Almost 25 million tons of plastic accumulate in the marine and terrestrial environment annually. One of the most common and durable petroleum-based plastics is Polyethylene. This synthetic polymer can accumulate in environments and be a threat for nature and human healty. laccases are enzymes that can oxidize a wide range of phenolic and non-phenolic compounds. Polyphenol oxidase is a laccase-like enzyme that can play an important role in polyethylene biodegradation. Based on pervious study a strain of *Actinomycetes* involve in the polyethylene biodegradation this process is probably handled by intra and extracellular enzymes.The aim of this study was to find gene sequence which is responsible for plastic degradation with similar activity to the laccase enzyme. structural and functional properties was analyzed by using bioinformatics methods.By the Nucleotide translation into the amino acid sequence, gene sequence was investigate by NCBI, EMBL, ExPASy database and Signal-5.0 server to assessment biochemical properties, structural domains and intra or extracellular enzyme in various spices. The three-dimensional structure of the bacterial polyphenol oxidase enzyme was analyzed by modeling in the I-TASSER server. Evaluating and optimizing the best model was done and its interactions with the specific substrate of laccase was investigated by Molegro that is a reliable molecular Docking software.Studies have shown that this enzyme is an oxidoreductase from copper oxidase family, which can be associated with the laccase enzymes. This intracellular enzyme uses copper atoms for its specific catalytic activity and has 245 amino acids with about 25.5 kDa molecular weight, which has similarity to small bacterial laccases in otherstrains. The reported modeling c-score is 1.01 by I-TASSER. Based on molecular docking, this reaction between important aminoacids residues involved in the active binding site and the ABTS as specific substrate is possible - e with a total potential energy of -146.315 kcal/mol (based on the MolDock score). Presence of the ABTS in the enzyme active site forms hydrogen bondsand esteric bonds between substrate and enzyme active site residue.

Keywords: Protein modeling, Molecular Docking, Polyphenol oxidase

مطالعه توالی، ساختار و عملکرد آنزیم شبه لاکاز باکتریایی با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی

شیوا خوشخو[1*]؛ سیده زهرا موسوی نژاد[2] ؛ سارا غروی[3]

۱- دانشجو، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی.، دانشگاه الزهرا تهران، ایران
۲-دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی.، دانشگاه الزهرا تهران، ایران

Sh.khoshkhoo@student.alzahra.ac.ir

چکیده

سالانه در محیط‌های زمینی و دریایی، حدود ۲۵ میلیون تن پلاستیک تجمع می‌یابد. پلی‌اتیلن، یکی از رایج‌ترین پلاستیک‌های ساخته شده بر پایه مواد نفتی و از بادوام ترین سازه‌های پلاستیکی محسوب می‌شود. این پلیمر مصنوعی می‌تواند در محیط‌های مختلف تجمع یافته و تهدیدی برای محیط زیست و انسان به شمار آید. لاکازها آنزیم‌هایی هستند که می‌توانند اکسیداسیون طیف وسیعی از ترکیبات فنلی و غیر فنلی را انجام دهند. پلی‌فنول‌اکسیداز، آنزیمی شبیه به لاکاز بوده که می‌تواند در تجزیه زیستی پلاستیک‌های پلی‌اتیلن و اکسیداسیون زنجیره هیدروکربنی آن کمک نماید. مطالعات نشان داده‌است که سویه‌ای از اکتینومیست‌ها در تجزیه زیستی پلی‌اتیلن نقش دارد و می‌تواند با تولید آنزیم‌های داخل و خارج سلولی به انجام این فرایند کمک کند.هدف از پژوهش، یافتن توالی نوکلئوتیدی مربوط به آنزیم‌های درگیر در تجزیه پلاستیک ،از سویه‌ی ذکر شده است که فعالیتی شبیه به آنزیم لاکاز داشته و خصوصیات ساختاری و عملکردی آن، با استفاده از مطالعات بیوانفورماتیکی مورد آنالیز قرارگرفته است. توالی نوکلئوتیدی مورد نظر بعد از ترجمه به توالی آمینواسیدی از نظر ویژگی‌های بیوشیمیایی، دومین‌های ساختاری و داخل و یا خارج سلولی بودن توسط پایگاه‌های داده NCBI، EMBL، ExPASy وسرور Signal-5.0 مورد بررسی قرارگرفت و به منظور مطالعه ساختار سه بعدی آنزیم، مدلسازی آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز باکتریایی توسط سرور I-TASSER انجام شد. بعد از انتخاب بهترین مدل و ارزیابی و بهینه‌سازی آن، میانکنش آن با سوبسترای اختصاصی آنزیم‌های لاکاز توسط نرم‌افزار داکینگ مولکولی مولگرو(Molegro Virtual Docker) صورت گرفت.بررسی‌ها نشان داد این آنزیم یک اکسیدوردوکتاز از خانواده آنزیمی مس اکسیدازها است که می تواند با آنزیم های لاکاز ارتباط داشته باشد. این آنزیم داخل سلولی، دارای اتم های مس به منظور انجام فعالیت کاتالیتیکی خود است. دارای ۲۴۵ آمینواسید و وزن مولکولی حدود ۲۵/۵ کیلودالتون است که وزن آن با لاکازهای کوچک باکتریایی در سویه‌های مشابه شباهت دارد.C-score گزارش شده از نتایج مدلسازی با I-TASSER برابر با ۱/۰۱ است. نتایج داکینگ مولکولی نشان داد سوبسترای اختصاصی ABTS می‌تواند با انرژی پتانسیل کل kcal/mol ۱۴۶/۳۱۵- بر حسب امتیاز MolDock با جایگاه فعال آنزیم برهمکنش داشته باشد و با ریشه های آمینواسیدی جایگاه فعال آنزیم پیوندهای هیدروژنی و استری ایجاد کند.

واژگان کلیدی: مدل‌سازی پروتئین، داکینگ مولکولی، پلی‌فنول اکسیداز

۱.مقدمه

پلاستیک‌ها، نقش مهمی در جنبه‌های مختلف اقتصادی کشورها به خاطر استفاده از آن‌ها در کشاورزی، ساختمان‌سازی، سلامت و کالاهای مصرفی و... در سراسر جهان دارند. آن‌ها بدنه اصلی بسیاری از صنایع هستند زیرا در تولید محصولات مختلف مثل لوازم خانگی، بطری‌های پلاستیکی، بسته‌بندی محصولات غذایی، آرایشی بهداشتی، دارویی و... استفاده می‌شوند.

پلی‌اتیلن، یکی از رایج‌ترین پلاستیک‌ها بر پایه مواد نفتی است که از بادوام ترین پلیمرهای پلاستیکی محسوب می‌شود. این پلیمر مصنوعی می‌تواند در محیط‌های مختلف تجمع یافته و تهدیدی برای محیط زیست و سلامت انسان به شمار برود. این پلیمر به صورت پلی‌اتیلن با چگالی بالا (High-density (HD-PE و پلی‌اتیلن با چگالی کم (Low-density (LD-PE تولید می‌شود و اغلب در صنعت بسته بندی از مهم‌ترین مواد مورد استفاده است. سالیانه در سراسر جهان حدود ۵۰۰ بیلیون یا یک تریلیون عدد از کیسه‌های خرید که کیسه‌های پلی‌اتیلنی هستند مورد استفاده قرار می‌گیرد. و تضادی واضح بین دوام قابل توجه این پلاستیک‌ها و زمان کوتاه‌مدت استفاده از این محصولات پلاستیکی، منجر به تجمع زباله‌های پلی اتیلن در محیط شده‌است که همین امر موجب نگرانی در جوامع بین‌المللی گردیده‌است.(Zeenat et al., 2021)

آنزیم‌ها کاتالیزورهای زیستی هستند که واکنش‌های شیمیایی برای به دست آوردن محصول یا محصولات ارزشمند نهایی را سرعت می‌بخشند. (Soud, 2019) لاکازها آنزیم‌هایی هستند که می‌توانند اکسیداسیون طیف وسیعی از ترکیبات فنلی و غیرفنلی را انجام دهندو به خانواده کوپرودوکسین‌ها بویژه کوپرودوکسین‌های چنددومینی تعلق دارند. (Nakamura & Go, 2005)

ویژگی‌های ساختاری این خانواده با تاخوردگی‌های دومین‌های کوپرودوکسین که شامل دو صفحه بتا که به‌صورت یک بشکه درآمده اند تعیین می‌شود. این موتیف بشکه مانند دارای حداقل ۷ زنجیره ناهمسو است که یک ساختار بشکه‌ای بسته را به‌وجود می‌آورند. (Arregui et al., 2019). در سال‌های اخیر استفاده و کاربرد لاکازهای باکتریایی در مقایسه با لاکازهای قارچی از نقطه نظر صنعتی به دلیل قابلیت و ویژگی‌های قابل توجه آن‌ها در حال گسترش است. بیوتکنولوژی انقلابی در استفاده از آنزیم‌های سنتی ایجاد کرده است تا در صنایع مختلف قابل استفاده باشد. (Ganesh et al., 2013)

پلی‌فنول‌اکسیداز آنزیمی شبیه به آنزیم لاکاز بوده که می‌تواند در تجزیه زیستی برخی پلاستیک‌ها نقش داشته باشد و به اکسیداسیون زنجیره هیدروکربنی پلی‌اتیلن کمک کند. آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز معمولا یک آنزیم داخل سلولی‌است؛ اما مطالعات نشان می‌دهد برخی از سویه‌های استرپتومایسس می‌توانند آن‌را به صورت خارج سلولی نیز تولیدکنند. مطالعات اخیر نشان داده‌است که سویه‌ای از اکتینومیست‌ها به نام *Streptomyces sp. Y1-SGS-IR* در تجزیه زیستی پلی‌اتیلن نقش دارد و می‌تواند با تولید آنزیم‌های داخل سلولی و خارج سلولی به انجام این فرایند کمک کند.(Soleimani et al., 2021)

هدف از این پژوهش، یافتن یک توالی نوکلئوتیدی مربوط به آنزیم‌های درگیر در تجزیه پلاستیک از سویه مورد نظر است که شبیه به آنزیم لاکاز بوده و خصوصیات ساختاری،عملکردی و بیوشیمیایی آن، با استفاده از مطالعات بیوانفورماتیکی مورد آنالیز قرارگرفت.

۲.مواد و روش‌ها

۲-۱. بررسی توالی نوکلئوتیدی و ترجمه آن به توالی آمینو اسیدی

توالی نوکلئوتیدی، به منظور ترجمه با استفاده از سرور Translate tool در پایگاه داده ExPASy به توالی آمینو اسیدی ترجمه شدند (ExPASy - Translate tool).

۲-۲. بررسی همردیفی توالی های ترجمه شده آنزیمی

توالی آمینو اسیدی، با استفاده از نرم افزار Blast در پایگاه داده NCBI به منظور بررسی همردیفی شان با توالی های موجود مورد آنالیز قرار گرفتند(BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (nih.gov)).

۲-۳. بررسی خواص بیوشیمیایی آنزیم‌ها

به منظور بررسی خواص بوشیمیایی آنزیم ، توالی آمینواسیدی آنزیم به سرور ProtParam موجود در پایگاه داده ExPASy داده شد و نتایج آن مورد تجزیه و تحلیل قر ار گرفت (https://web.expasy.org/protparam).

۲-۴. تعیین جایگاه نشانه پپتید درآنزیم

توالی های آمینواسیدی در سرور Signal-5.0 برای تعیین داخل یا خارجی بودن آنزیم مورد بررسی قرار گرفتند. SignalP-۵.۰ (dtu.dk)

۲-۵. پیش بینی ساختارهای دوم

بررسی ساختار های دوم مثل دومین ها و مناطق محافظت شده نیز با استفاده از پایگاه های داده NCBI، EMBL و ExPASy به ترتیب با نرم افزارهای Conserved domain وInterPr O انجام گرفت. فرمت های خام توالی به برنام های نام برده داده شدند پردازش و هم ترازی توالی ها با اطلاعات موجود در سرور ها انجام شده و نتایج گزارش شدند.

۲-۶. بررسی میانکنش آنزیم با لیگاند

۲-۶-۱. جستجوی ساختار لیگاند در پایگاه داده

جستجو برای یافتن سوبسترای ABTS در پایگاه داده Pubchem در NCBI صورت گرفت و بهترین لیگاند دارای ساختار سه بعدی انتخاب و فرمت sdf آن دریافت شد.Abts | C۱۸H۲۴N۶O۶S۴ - PubChem (nih.gov)

۲-۶-۲. جستجوی ساختار آنزیم

توالی پروتئینی آنزیم لاکاز در پایگاه NCBI، با بلست پروتئین- پروتئین و مقایسه با تمام پروتئین هایی که ساختار سوم ان ها به روش تجربی به دست امده است انجام گرفت و با توجه به امتیاز کم توالی‌های موجود، مدلسازی آنزیم پلی‌فنول اکسیداز از سرور I-TASSER انجام گرفت و بعد از ارزیابی و بهینه‌سازی مدل ساخته شده انجام شد.

I-TASSER server for protein structure and function prediction (zhanggroup.org)

۲-۶-۳. داکینگ مولکولی آنزیم لاکاز با سوبسترای ABTS

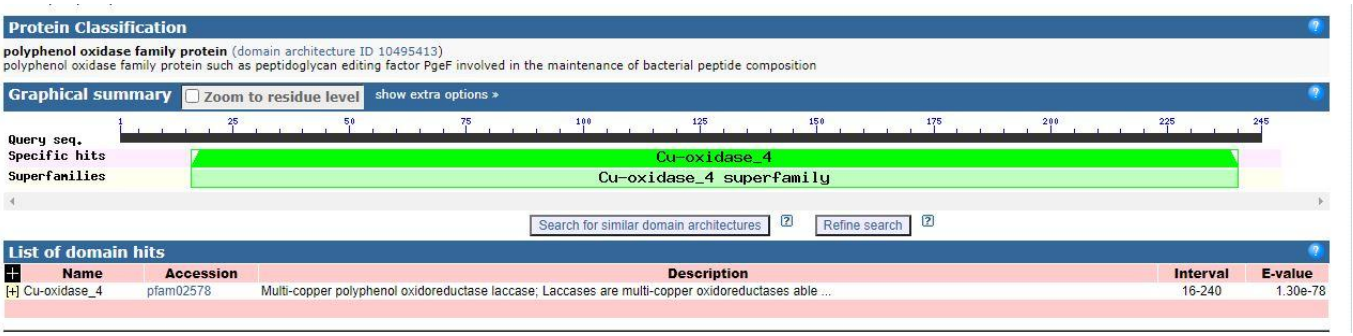
داکینگ بین انزیم لاکاز و سوبسترای ABTS به کمک نرم افزار Molegro Virtual Docker انجام گرفت اماده سازی و بهینه سازی انزیم و سوبسترا توسط نرم افزار صورت گرفته و رزیدوهای درگیر در جایگاه فعال انزیم برای واکنش با سوبسترا مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین رزیدوهای درگیر در پیوند های هیدروژنی استری و الکترواستاتیک نیز مشخص شدند.

۳. نتایج و بحث

بررسی‌ها نشان داد این آنزیم یک اکسیدوردوکتاز از خانواده آنزیمی مس اکسیدازها است که می تواند با آنزیم‌های لاکاز ارتباط داشته باشد. این آنزیم داخل سلولی، دارای اتم های مس به منظور انجام فعالیت کاتالیتیکی ویژه خود است. دارای ۲۴۵ آمینواسید و وزن مولکولی حدود ۲۵/۵ کیلودالتون است که وزن آن با لاکازهای کوچک باکتریایی در سویه‌های مشابه شباهت دارد.

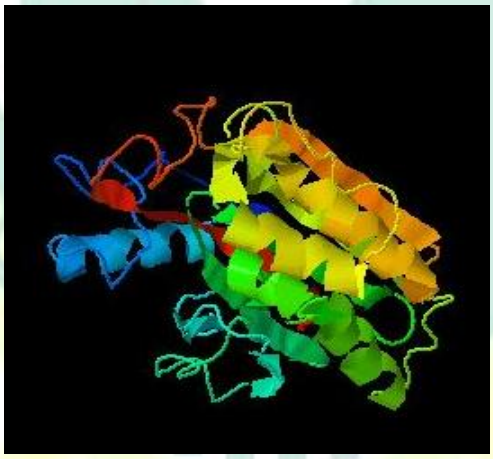
جدول ۳-۱: نتایج حاصل ازبررسی توالی‌ژنی و آمینولاسیدی آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز از سویه باکتریایی Streptomyces sp.IR-SGS-Y1

آنزیم های سویه IR-SGS-Y1	خانواده آنزیمی	دومین آنزیم	SP	CoE Or CoF	Number of aa	MW (kD)	PI	عملکرد آنزیم
Multicopper polyphenol oxidase	Cu-polyphenol OxRdtase	Laccase domain-containing protein Or Cu-oxidase-4	N	Cu	245	25.57	5.39	اکسیداسیون ترکیبات فنولی و غیر فنولی



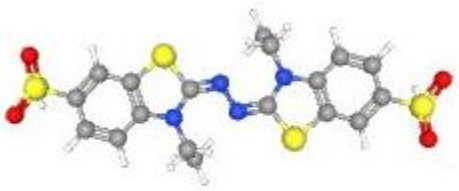
شکل ۳-۱: بررسی توالی آمینو اسیدی از نظر دومین‌های ساختاری

مدل‌سازی پروتئین توسط سرور I-TASSER انجام گرفت . ساختار پیش‌بینی شده برای ساختار سه بعدی آنزیم با فرمت pdb از سایت گرفته شد و ارزیابی و بهینه سازی آن توسط سرور RAMPAGE و 3D fine انجام گرفت.



شکل۳-۲: شمایلی از ساختار سه بعدی پیش‌بینی شده برای آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز توسط سرور I-TASSER

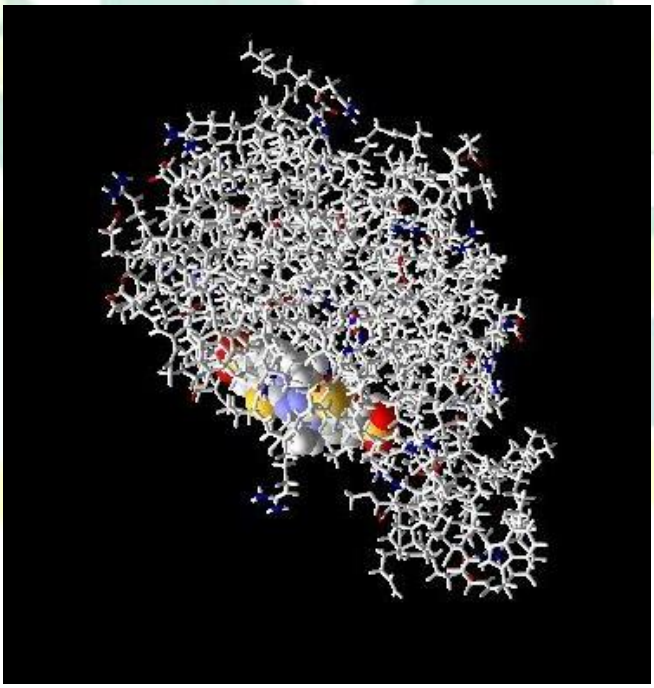
سوبسترای ABTS در پایگاه داده PubChem جستجو شد و ساختار سه بعدی آن در فرمت sdf دریافت و برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.



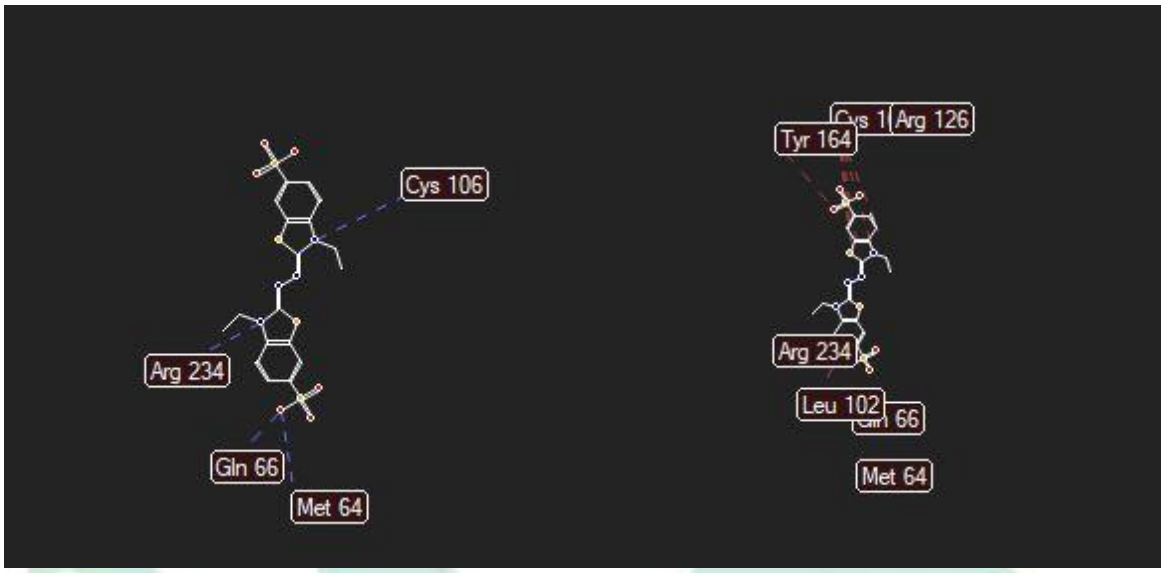
شکل ۳-۳: ساختار سه بعدی سوبسترای ABTS

نتایج حاصل از از مدل‌سازی، C-score برابر با ۱/۰۱ و RMSD معادل ۱/۲ را نشان داد.

داکینگ مولکولی احتمال انجام این واکنش و همینطور ریشه‌های مهم درگیر در اتصال آنزیم به سوبسترا را شناسایی کرد. سوبسترای اختصاصی ABTS می‌تواند با انرژی پتانسیل کل kcal/mol ۱۴۶/۳۱۵- بر حسب امتیاز MolDock با ساختار سه بعدی و فعال آنزیم برهمکنش کرده و با باقی‌مانده‌های آمینواسیدی سیستئین ۱۳۶، آرژنین ۲۳۴، گلوتامین ۶۶ و متیونین ۶۴ پیوند هیدروژنی و با لوسین ۱۳۲، تیروزین ۱۶۴، سیستئین ۱۳۶ و۱۰۶، آرژنین ۲۳۴،گلوتامین ۶۶ و متیونین ۶۴ پیوند استری ایجاد کند.



شکل۳-۴: داکینگ مولکولی بین سوبسترایABTS با جایگاه فعال آنزیم پلی‌فنول اکسیداز



شکل ۳-۵: اتصال باندهای استری (سمت راست) و هیدروژنی (سمت چپ) سوبسترای ABTS با جایگاه فعال آنزیم

۴. نتیجه‌گیری

در این پژوهش توالی هایی که در تجزیه نقش داشتند مشخص و جدا شد و پس از اطمینان از انتخاب توالی موثر در تجزیه ترکیبات آلی آروماتیک و غیرآروماتیک آنزیم مورد نظر از نقطه نظرات مختلفی مثل داخل یا خارج سلولی بودن آنزیم، وجود یا عدم وجود لیگاند با فلز خاص، اثر بروی سوبسترا، کلاس آنزیمی، دومین ها و خانواده پروتئینی و همچنین بررسی ساختار سوم پروتئین و برهمکنش آن با سوبسترای اختصاصی بررسی شد.

پلی‌فنول‌اکسیداز، آنزیمی شبیه به لاکاز بوده که می‌تواند در تجزیه زیستی پلاستیک‌های پلی‌اتیلن و اکسیداسیون زنجیره هیدروکربنی آن کمک نماید. در این بررسی آنزیم پلی‌فنول اکسیداز از آنزیم‌های شناسایی شده‌ای بود که می‌تواند با ABTS به عنوان سوبسترا واکنش دهد. انواع فرایندهای فیزیکی و شیمیایی وجود دارند که کاربرد بالقوه‌ای در رفع آلودگی‌های پلاستیکی دارند اما همه این فرایندها دوست‌دار محیط زیست نیستند. در این مورد آنزیم‌ها به عنوان ابزاری کاربردی و مفید به کمک محیط‌زیست آمده‌اند. با شناهت و بررسی آنزیم‌های شبه لاکازی همچون پلی‌فنول اکسیداز در فرایندی دوست‌دار محیط‌زیست و مقرون به صرفه می‌تواند به ما در فرایند تجزیه‌زیستی به رفع این آلودگی‌های پلیمری کمک می‌کند

سپاس گزاری

تقدیر و سپاسگذاری از اساتید پر افتخارم که در محضر و از آموزه‌هاشان بهره‌مند شده‌ام.

منابع

1. Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Luna, C. E., Herrera De Los Santos, M., Levin, L., Rojo-Domínguez, A., Romero-Martínez, D., Saparrat, M. C. N., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2019). Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microbial Cell Factories*, *18*(1), 1–33. https://doi.org/10.1186/s12934-019-1248-0
2. Ganesh, P., Dineshraj, D., Yoganathan, K., Soleimani, Z., Gharavi, S., Soudi, M., Moosavi-Nejad, Z., Nanda, S., Sahu, S. S., Yarahmadi, E., Ghoshoon, M., Dabagh, F., Ghasemi, Y., Flora, D., Adeyemi, A., George, W., Danso, D., Chow, J., Streita, W. R., … Sivan, A. (2013). Bacterial laccase: recent update on production, properties and industrial applications. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *3*(3), 204–210. https://doi.org/10.1007/s13205-017-0955-7
3. Nakamura, K., & Go, N. (2005). *Cellular and Molecular Life Sciences Function and molecular evolution of multicopper blue*. *62*(March), 2050–2066. https://doi.org/10.1007/s00018-004-5076-
4. Soleimani, Z., Gharavi, S., Soudi, M., & Moosavi-Nejad, Z. (2021). A survey of intact low-density polyethylene film biodegradation by terrestrial Actinobacterial species. *International Microbiology*, *24*(1), 65–73. https://doi.org/10.1007/s10123-020-00142-0
5. Soud, S. A. (2019). Biodegradation of polyethylene LDPE plastic waste using locally isolated Streptomyces sp. *Journal of Pharmeceutical Sciences and Research*, *11*(4), 1333–1339.
6. Zeenat, Elahi, A., Bukhari, D. A., Shamim, S., & Rehman, A. (2021). Plastics degradation by microbes: A sustainable approach. *Journal of King Saud University - Science*, *33*(6), 101538. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101538

Title Determination of physicochemical properties of Tannase enzyme of Klebsiella pneumoniae strain A9

Benafsheh Akbari rad [1*], Mahmood Nazari [2], Mohamad Taghi Beighi Nassiri [2], Tahere Mohamadabadi [2]

۱- MSc student of Animal genetic and Breeding, Agricultural science and Natural Resources University of Khuzestan, Iran
۲- Department of Animal Science, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

Corresponding Author Email: ar.orkide@yahoo.com

Abstract

Tannins are polyphenolic compounds and are also known as tannic acid. An important feature is their ability to bind to macromolecules such as protein, cellulose and pectin and make them inaccessible to digestive enzymes. This feature is considered as an undesirable feature in the food industry. Tannins are divided into two main groups: hydrolyzable tannins and condensed tannins. The two groups are structurally different. Tannins are mainly found in plant leaves, bark and wood. Tannase or tannin acyl hydrolase is an enzyme from the esterase family that reduces tannins, so the use of this enzyme in the food, pharmaceutical and chemical industries has been considered. This enzyme hydrolyzes ester and dipside bonds in hydrolyzable tannins. As a result, this hydrolysis produces gallic acid and glucose. Factors such as high production costs and insufficient knowledge of the physicochemical properties of this enzyme have limited the use of this enzyme in industry. The aim of this study was to determine the physicochemical properties of Tannase enzyme from Klebsiella pneumoniae strain A9. The Tannase enzyme produced by this strain was highly active. Initially, DNA extraction was performed using a DNA extraction kit. Then the samples along with the primers were sent to Gene Fanavaran Company for sequencing. Then the physicochemical properties of the enzyme tanase of the desired strain were performed using the Protparam database. The results of this study showed that the tannase enzyme produced by Klebsiella pneumoniae strain A9 has a high aliphatic coefficient and a high instability index. Therefore, it is not suitable for industrial production.

Keywords: Tannase, Klebsiella pneumoniae, Physicochemical properties

تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنزیم تاناز گونه کلبسیلا پنومونیه سویه A9

بنفشه اکبری راد*[۱] محمودنظری [۲] محمدتقی بیگی نصیری [۲] طاهره محمدآبادی [۲]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک دام -دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی -دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان-ملاثانی-ایران

۲- گروه علوم دامی -دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی -دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان-ملاثانی-ایران

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: *ar.orkide@yahoo.com*

چکیده

تانن ها ترکیبات پلی فنولیکی هستند و به عنوام تانیک اسید هم شناخته می شوند از ویژگی های مهم آن ها توانایی اتصال به ماکرومولکول هایی مانند پروتئین، سلولز و پکتین می باشد و آنها را از دسترس آنزیم های هضمی خارج می کنند. این خصوصیت به عنوان یک ویژگی نامطلوب در صنعت خوراک محسوب می شود. تانن ها به دو گروه اصلی تانن های قابل هیدرولیز و تانن های چگالیده تقسیم می شوند. این دو گروه تا حدودی از نظر ساختاری متفاوت هستند. عمدتا تانن ها را در برگ گیاهان، پوست درخت و چوب می توان یافت. تاناز یا تانن آسیل هیدرولاز آنزیمی از خانواده استراز ها می باشد که سبب کاهش تانن ها می شود به همین جهت کاربرد این آنزیم در صنایع خوراک، داروسازی و صنایع شیمیایی مورد توجه قرار گرفته است. این آنزیم سبب هیدرولیز پیوندهای استر و دیپسید در تانن های قابل هیدرولیز می شود. در نتیجه این هیدرولیز اسید گالیک و گلوکز را تولید می کند. عواملی مانند هزینه تولید بالا و عدم شناخت کافی از خصوصیات فیزیکو شیمیایی این آنزیم سبب ایجاد محدودیت در استفاده از این آنزیم در صنعت شده است. هدف از این مطالعه تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنزیم تاناز از باکتری کلبسیلا پنومونیه سویه A9 می باشد. آنزیم تاناز تولیدی این سویه فعالیت بالایی داشت. در ابتدا استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA انجام گرفت. سپس نمونه ها همراه پرایمر ها جهت توالی یابی به شرکت ژن فن آوران ارسال گردیدند. سپس خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنزیم تاناز سویه موردنظر با استفاده از پایگاه داده ای protparam انجام گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که آنزیم تاناز تولید شده توسط باکتری کلبسیلا پنومونیه سویه A9 دارای ضریب آلیفاتیک بالا و شاخص ناپایداری بالا می باشد. به همین جهت برای تولید صنعتی مناسب نمی باشد.

واژگان کلیدی: تاناز، خصوصیات فیزیکوشیمیایی، کلبسیلا پنومونیه

۱.مقدمه

تانن ها گروه منحصر به فردی از متابولیت های فنلی با وزن مولکولی بین ۵۰۰ تا ۳۰۰۰ دالتون هستند که تقریبا در تمام غذاها و نوشیدنی های گیاهی به طور گسترده توزیع می شوند (serrano et al., 2009). این ترکیبات به علت رسوب پروتئین در محلول ها نسبت به سایر ترکیبات پلیفنولیک متفاوت هستند. در گیاهان تانن ها را در برگ، پوست درخت و چوب می توان یافت. تانن ها به

علت اینکه نقش مستقیمی در متابولیسم گیاهان ندارند به عنوان ترکیبات متابولیکی ثانویه گیاهان در نظر گرفته می شوند. بعد از لیگنین، تانن ها دومین گروه فراوان فنول های گیاهی هستند. تانن آسیل هیدرولاز (E.C.3.1.1.20) معمولاً به عنوان تاناز شناخته می شود، تیغم این آنزیم منحصر به فرد را به طور تصادفی در سال ۱۸۶۷ گزارش کرد. او تشکیل گالیک اسید را زمانی که دو گونه قارچی در معرض محلول آبی تانن ها بودند را گزارش کرد. این دو گونه قارچی بعدها به عنوان پنیسیلیوم گلاکوم و آسپرژیلوس نیجر شناسایی شدند. تاناز ها در گیاهان، حیوانات و میکروارگانیسم ها وجود دارند و توسط باکتری، مخمر و قارچ تولید می شوند (Alberts, 2002). تانازها به طور عمده توسط میکروارگانیسم هایی مانند آسپرژیلوس، پیسیلومایسس، لاکتوباسیلوس و باسیلوس تولید می شوند (yao et al., 2017). بر طبق تحقیقات انجام شده توسط پاسچان و آلمن در سال ۱۹۹۸ کلبسیلا پنومونیه، متعلق به خانواده انتروباکتریاسه، ساکن طبیعی میکروبیوم دستگاه گوارش انسان و حیوانات سالم است (Navon-venezia et al., 2017). تاناز تولید شده توسط سویه های کلبسیلا وریکولا سویه پی ال پی جی_۱۷ ال سی، کلبسیلا پنومونیه وریکولا سویه پی ال پی اس_۱۸، کلبسیلا پنومونیه سویه پی ال پی جی_۱۷ اس سی، فعالیت مطلوبی در pH ۶ و دمای ۴۰ درجه سانتی گراد نشان داد (Sharma et al., 2017). تاناز تولیدی کلبسیلا پنومونیه سویه ام تی سی سی ۷۱۶۲ فعالیت مطلوبی در pH ۵/۵ و دمای ۴۰ درجه سانتی گراد نشان می دهد (Sivashanmugam and Jayaraman, 2011)، تاناز تولیدی کلبسیلا پنومونیه عراقی فعالیت مطلوبی در pH ۵/۵ و دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت نشان داد. تاناز خالص شده یک پپتید منفرد با جرم مولکولی تقریبی ۴۶.۵ کیلو دالتون است که توسط SDS-PAGE ارزیابی شده است (Abdal et al., 2020). اخیراً محققین سویه جدیدی از باکتری کلبسیلا پنومونیه را ثبت نمودند و درزمینه تأثیر برگ‌های ال ارکتوس کونوکارپوس به همراه دو باکتری کاهش‌دهنده تانن کلبسیلا پنومونیه و اسینتوباکتر و تاثیر بر فعالیت هضم و پارامترهای تخمیر قارچها و باکتری‌های شکمبه در گوسفند عربی را مورد مطالعه قراردادند. این محققین نشان دادند که تلقیح باکتریایی کلبسیلا و گونه‌های اسینتو باکتر می‌توانست فعالیت گوارش و برخی پارامترهای باکتری و قارچ شکمبه در گوسفند عربی را بهتر کند (Mohammadabadi et al., 2020). هم‌چنین تأثیر تاناز در استفاده در بهبود ارزش تغذیه‌ای خوراک‌های غنی از تانن مورد مطالعه قرار گرفتند و نشان داد که باکتری کلبسیلا پنومونیه سویه A9 بالاترین عملکرد را داشت (غیبی پور و همکاران، ۱۳۹۶).

۲.مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۳۹۹ در آزمایشگاه ژنتیک دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان واقع در ملاثانی در ۳۶ کیلومتری شمال شرقی اهواز، انجام‌شد. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA بر طبق پروتوکل شرکت سازنده انجام گرفت و با استفاده از پرایمرهای طراحی شده PCR انجام گرفت سپس محصول PCR به همراه پرایمر های طراحی شده جهت توالی یابی به شرکت ژن فن آوران ارسال گردید. صحت توالی به دست آمده با استفاده از پایگاه NCBI به آدرس اینترنتی https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi بلاست و مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس با استفاده از نرم افزار انلاین توالی نوکلئوتیدی ژن موردنظر https://www.expasy.org/resources/translate به توالی پروتئینی ترجمه گردید. سپس خصوصیات بیوشیمیایی توسط نرم افزار آنلاین https://www.expasy.org/resources/protparam مورد بررسی قرار گرفت و خصوصیات مانند وزن مولکولی، پی اچ ایزوالکتریک، شاخص ناپایداری، ضریب آلیفاتیک و گراویتی آن به دست آمد.

۳. نتایج و بحث

در این مطالعه با به دست آوردن اطلاعات توالی باکتری کلبسیلا پنومونیه سویه A9 برخی از خصوصیات بیوشیمیایی انزیم تاناز سویه های مورد نظر پیشبینی گردید. . از آنجاییکه جهت مطالعات بیوانفورماتیکی به توالی پروتئینی نیاز می باشد توالی نوکلئوتیدی ژن

موردنظر با استفاده از نرم افزار آنلاین https://www.expasy.org/resources/translate به توالی پروتئینی ترجمه گردید. سپس خصوصیات بیوشیمیایی توسط نرم افزار آنلاین https://www.expasy.org/resources/protparam مورد بررسی قرار گرفت. نتایج خصوصیات بیوشیمیایی در جدول شماره ۱ آمده است. نتایج این مطالعه بیوانفورماتیکی نشان داد که وزن مولکولی این آنزیم ۵۱۶۲۲/۰۹ می باشد.

بر اساس تحقیقات بجلکویست و همکاران در سال ۱۹۹۳ و آلتتلاند و همکاران در سال ۱۹۸۸ نقطه ایزوالکتریک پروتئین (pI) پی اچ که پروتئین در آن بار خالصی ندارد است (Nandi et al., 2005). مقدار نقطه ایزوالکتریک یا همان pI می تواند حلالیت یک محلول را در pH معین تحت تاثیر قرار دهد. چنین مولکول هایی در pH که با pI آن ها مطابقت داشته باشند دارای حداقل حلالیت در محلول های آب یا نمک هستند و اغلب از محلول رسوب می کنند. pH که در آن یک مولکول هیچ بار خالصی را حمل نمی کند یا از نظر آماری از نظر بار الکتریکی خنثی است (wikipedia). میزان theoretical pI برای این آنزیم ۵/۹۰ به دست آمد. شاخص بعدی که مورد ارزیابی قرار گرفت شاخص ناپایداری است که معادل ۴۵/۲۹ به دست آمد. و نشان دهنده ناپایدار بودن این آنزیم می باشد (جدول ۱).

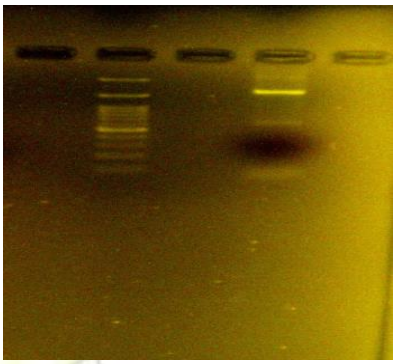
بر طبق تحقیقات راجرز و همکاران در سال ۱۹۸۶ پروتئین هایی که دارای نیمه عمر Invivo کمتر از ۵ ساعت هستند دارای شاخص ناپایداری بالاتر از ۴۰ هستند. درحالیکه آنهایی که دارای نیمه عمر In vivo بالاتر از ۱۶ ساعت هستند دارای شاخص ناپایداری پایینتر از ۴۰ هستند. برطبق تحقیقات گوروپساراد و همکاران در سال ۱۹۹۰ از شاخص ناپایداری می توان به عنوان نیمه عمر In vivo یک پروتئین استفاده کرد (Idicula-Thomas and Balaji, 2005). این میزان برای این آنزیم معادل ۴۵/۲۹ به دست آمد و این آنزیم در دسته آنزیم های ناپایدار قرار می گیرد.

ضریب آلیفاتیک حجم نسبی زنجیره های جانبی آلیفاتیک (آلانین، والین، لوسین و ایزولوسین) یک پروتئین می باشد. این شاخص می تواند به عنوان یک عامل موثر بر مقاومت پروتئین های کروی بر گرما در نظر گرفته شود (Ikai., 1980). این میزان برای این آنزیم معادل ۷۵/۸۹ به دست آمد. آنزیم با خصوصیات بیوشیمیایی مناسب جهت تولید صنعتی دارای پایین ترین میزان شاخص ناپایداری و بالاترین شاخص آلیفاتیک همزمان هستند.

در زمینه آنزیم تاناز از این گونه باکتری مطالعاتی انجام شده است. بهینه سازی تولید تاناز توسط کلبسیلا پنومونیه KP715242 جدید با استفاده از طرح کامپوزیت مرکزی (Kumar et al., 2015) ، خالص سازی و شناسایی یک تاناز گرمادوست از کلبسیلا پنومونیه(Kumar et al., 2015) KP715242، غربالگری، استخراج و خالص‌سازی تاناز تولید شده از جدایه‌های کلبسیلا پنومونی عراقی و تشخیص مولکولی ژن tanA (Abdal et al., 2020) تجزیه اسید تانیک توسط سویه های کلبسیلا جدا شده از مدفوع بز (Tahmourespour et al., 2016) و تأثیر برگهای تیمار شده کنوکارپوس ارکتوس ال با کلبسیلا پنومونیه و اسینتوباکتر به عنوان باکتری تجزیه کننده تانن بر فعالیت هضم میکروارگانیسم های شکمبه (Mohammadabadi et al., 2020) انجام گرفت.

جدول ۱: خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنزیم تاناز گونه کلبسیلا پنومونیه سویه A9

وزن مولکولی	پی اچ ایزوالکتریک	شاخص ناپایداری	شاخص آلیفاتیک	اختلاف شاخص ناپایداری و الفاتیک	گراوی
51622.09	5.90	45.29	75.89	30.6	-0.174



شکل۲: عکس ژل الکتروفورز ژن تاناز گونه کلبسیلا پنومونیه سویه A9

۴. نتیجه‌گیری

با توجه به تاثیر تانن ها بر کاهش هضم پذیری ماکرو مولکول ها ازجمله سلولز و پروتئین و به دنبال آن کاهش نرخ رشد استفاده از آنزیم تاناز در صنعت خوراک می تواند پیشنهاد مناسبی برای این مسئله باشد و تا حدودی ارزش غذایی خوراک های حاوی تانن را بهبود ببخشد. تولید صنعتی تاناز با مشکلاتی از جمله هزینه بالای تولید و عدم شناخت کافی در زمینه خصوصیات فیزیکوشیمیایی این آنزیم روبرو اســـت در نتیجه مطالعات بیوانفورماتیک این آنزیم می تولند در این زمینه اثر بخش واقع شـــود. تحلیل نتایج این مطالعه نشـان می دهد که با وجود عملکرد بالای آنزیم تاناز کلبســیلا پنومونیه ســویه A9 به علت بالا بودن شـاخص ناپایداری این آنزیم برای کلونینگ و تولید صنعتی مناسب نمی باشد.

منابع

۱. غیبی پور، م.، محمدآبادی، ط.، معتمدی، ح.، چاجی، م.، و عبدالزهره عباس.، ب. ۱۳۹۶. جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده تانن از دستگاه گوارش گوزن و استفاده در بهبود ارزش تغذیه‌ای خوراک‌های غنی از تانن. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان. دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی.

2. Abdal, A. K., Al-jubori, S. S., & Muslim, S. N. (2020). Screening, extraction and purification for tannase produced from Iraqi Klebsiella pneumonia isolates and molecular detection of tanA gene. Eurasian Journal of Biosciences, 14(1), 259-263.
3. Albertse, E. H. (2002). Cloning, expression and characterization of tannase from Aspergillus species (Doctoral dissertation, University of the Free State).
4. Idicula-Thomas, S., & Balaji, P. V. (2005). Understanding the relationship between the primary structure of proteins and its propensity to be soluble on overexpression in Escherichia coli. Protein Science, 14(3), 582-592.
5. Ikai, A. (1980). Thermostability and aliphatic index of globular proteins. The Journal of Biochemistry, 88(6), 1895-1898.
6. Kumar, M., Beniwal, V., & Salar, R. K. (2015). Purification and characterization of a thermophilic tannase from Klebsiella pneumoniae KP715242. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 4(4), 745-751.

7. Kumar, M., Rana, S., Beniwal, V., & Salar, R. K. (2015). Optimization of tannase production by a novel Klebsiella pneumoniae KP715242 using central composite design. Biotechnology Reports, 7, 128-134.
8. Mohammadabadi, T., Jolazadeh, A., & Ghezi, Z. (2020). Effect of treated Conocarpus erectus L. leaves with Klebsiella pneumoniae and Acinetobacter as tannin-degrading bacteria on digestion activity of rumen microorganisms. *Biotechnology in Animal Husbandry*, *36*(1), 1-16.
9. Nandi, S., Mehra, N., Lynn, A. M., & Bhattacharya, A. (2005). Comparison of theoretical proteomes: identification of COGs with conserved and variable pI within the multimodal pI distribution. BMC genomics, 6(1), 1-12.
10. Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., & Carattoli, A. (2017). Klebsiella pneumoniae: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. FEMS microbiology reviews, 41(3), 252-275.
11. Serrano, J., Puupponen-Pimiä, R., Dauer, A., Aura, A. M., & Saura-Calixto, F. (2009). Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. Molecular nutrition & food research, 53(S2), S310-S329.
12. Sharma, D., Mal, G., Kannan, A., Bhar, R., Sharma, R., & Singh, B. (2017). Degradation of euptox A by tannase-producing rumen bacteria from migratory goats. Journal of applied microbiology, 123(5), 1194-1202.
13. Sivashanmugam, K., & Jayaraman, G. (2011). Production and partial purification of extracellular tannase by Klebsiella pneumoniae MTCC 7162 isolated from tannery effluent. African Journal of Biotechnology, 10(8), 1364-1374.
14. Tahmourespour, A., Tabatabaee, N., Khalkhali, H., & Amini, I. (2016). Tannic acid degradation by Klebsiella strains isolated from goat feces. Iranian journal of microbiology, 8(1), 14.
15. Yao, J., Guo, G. S., Ren, G. H., & Liu, Y. H. (2014). Production, characterization and applications of tannase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 101, 137-147.
16. https://en.wikipedia.org/wiki/Isoelectric_point

Neutrigenomic effects of the most important herbal essential oils

Mahmood Nazari [1*], Negin Behkhoie [2], Benafsheh Akbari rad

[1*] Department of Animal Science, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
[2 and 3] MSc student of Animal genetic and Breeding, Agricultural science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

Corresponding Author Email: m.nazari@asnrukh.ac.ir

Abstract
Essential oils (EOs) are generally known to exert various pharmacological effects, such as antiallergic, anticancer, anti-inflammatory, and immunomodulatory effects. Current literature involving in vitro and in vivo studies indicates the potential of various herbal essential oils as suitable immunomodulators for the alternative treatment of infectious or immune diseases. This review highlights the cellular effects induced by EOs, as well as the molecular impacts of EOs on cytokines, immunoglobulins, or regulatory pathways. The results reviewed in this article revealed a significant reduction in relevant proinflammatory cytokines, as well as induction of anti-inflammatory markers. Remarkably, very little clinical study data involving the immunomodulatory effects of EOs are available. Furthermore, several studies led to contradictory results, emphasizing the need for a multiapproach system to better characterize EOs. While immunomodulatory effects were reported, the toxic potential of EOs must be clearly considered in order to secure future applications.

Keywords: Essential oils; Eucalyptus; Clove; Tea tree; Lavender

اثرات نوتریژنومیک مهمترین اسانس‌های گیاهی

محمود نظری *[۱] نگین به خوی[۲] و بنفشه اکبری راد[۳]

۱- استادیار گروه علوم دامی –دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی –دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان–ملاثانی–ایران
۲ و ۳ –دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک دام –دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی –دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان–ملاثانی–ایران

نویسنده مسئول: دکتر محمود نظری ایمیل : *m.nazari@asnrukh.ac.ir*

چکیده

اسانس ها عموماً برای اعمال اثرات دارویی مختلف مانند اثرات ضد حساسیت، ضد سرطان، ضد التهابی و تعدیل‌کننده ایمنی شناخته شده‌اند. این متن پتانسیل اسانس های مختلف گیاهی را به عنوان تعدیل کننده های ایمنی مناسب برای درمان جایگزین بیماری های عفونی یا ایمنی نشان می دهد. این بررسی اثرات سلولی ناشی از اسانس ها و همچنین اثرات مولکولی آنها بر روی سیتوکین ها، ایمونوگلوبولین ها یا مسیرهای تنظیمی را برجسته می کند. نتایج بررسی شده در این مقاله کاهش قابل توجهی در سیتوکین های پیش التهابی مربوطه و همچنین القای نشانگرهای ضد التهابی را نشان داد. قابل توجه است، داده های مطالعات بالینی بسیار کمی در مورد اثرات تعدیل کننده ایمنی اسانس ها در دسترس است. علاوه بر این، چندین مطالعه منجر به نتایج متناقضی شد که بر نیاز به یک سیستم چند رویکردی برای توصیف بهتر اسانس ها تاکید کردند. در حالی که اثرات تعدیل کننده سیستم ایمنی گزارش شده است، امکان سمیت اسانس ها باید به وضوح در نظر گرفته شود تا برنامه های کاربردی آینده ایمن تر شود.

واژگان کلیدی: اسانس، اکالیپتوس، میخک، درخت چای، اسطوخودوس

۱.مقدمه

اسانس ها (Eos) روغن‌های طبیعی بسیار غلیظی هستند که از گیاهانی مشتق می‌شوند که از متابولیت‌های معطر، فرار و ثانویه گیاهی تشکیل شده‌اند. اسانس ها عمدتاً با تقطیر با بخار استخراج می‌شوند و بوی بسیار شدیدی از خود نشان می دهند. ترکیبات اصلی در اسانس ها نشان‌دهنده مونو و سسکوی ترپن ها و چندین مشتق اکسیژن‌دار هستند. سایر مواد موجود در روغن‌ها عبارتند از الکل‌ها، آلدئیدهای آلیفاتیک و استرها. معمولاً اسانس ها شامل دو یا سه جزء اصلی هستند که فعالیتهای بیولوژیکی و خواص شیمیایی آنها را تعیین می‌کنند (Hotta et al. 2009). به عنوان مثال، اسانس میخک از ۷۰ تا ۷۶ درصد اوژنول تشکیل شده است، یک ترکیب فنلی که مسئول فعالیت‌های ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی آن است (Nogueira et al. 2014). با این حال، زیست فعالی EOs تحت تأثیر ترکیب کامل روغن، از جمله اجزای جزئی و احتمال هم‌افزایی، افزودنی و همچنین اثرات متضاداست (Marshall et al. 2018). پروفایل‌های زیست فعالیتی مختلف در یک اسانس یکسان در نتیجه تغییرات در ترکیب شیمیایی روغن گزارش شده است. عواملی مانند شرایط محیطی (دما، نور، مکان)، فیزیولوژی گیاه (سن گیاه و اجزای گیاه) و جنبه‌های ژنتیکی بر ترکیب شیمیایی و در نتیجه فعالیت بیولوژیکی این روغن‌ها تأثیر زیادی دارند. رویکردهای شیمی‌سنجی جدید می‌توانند زیست فعالی مواد چند جزئی را با

اطمینان بیشتری پیش‌بینی کنند.کاربرد اسانس ها بسیار متنوع است و به شدت به منبع گیاهی وابسته است. اسانس ها به طور گسترده در آروماتراپی، آرایشی و بهداشتی، صنایع غذایی (عوامل طعم‌دهنده و نگهدارنده) و صنعت داروسازی (عوامل ضد میکروبی و ضد درد) استفاده می شوند. علاقه به کاربردهای بیشتر اسانس ها به طور پیوسته در حال افزایش است. فعالیت‌های تعدیل‌کننده ایمنی آن‌ها از طریق مکانیسم‌های متعددی انجام می‌شود: مشخص شده است که اسانس ها سیستم ایمنی را با افزایش مقدار لنفوسیت‌های در گردش و افزایش فعالیت فاگوسیتی آنها تحریک می‌کند و در نتیجه پاکسازی باکتریایی را بهبود می‌بخشد. همچنین نشانداده شده است که اسانس ها پاسخ‌های درگیر در التهاب را سرکوب می‌کند و تولید سیتوکین را با تداخل با واسطه‌های کلیدی مسیرهای التهابی کاهش می‌دهد.

از آنجایی که فعال شدن پاسخ ایمنی با آسیب یا تخریب بافت مرتبط است، واکنش‌های التهابی با مکانیسم‌های متعددی تنظیم می‌شوند و معمولاً بلافاصله پس از از بین بردن علت التهاب، خاتمه می‌یابند. از دست دادن تنظیم پاسخ‌های التهابی ممکن است منجر به ایجاد بیماری‌های التهابی مزمن مانند آسم، تصلب شرایین و بیماری‌های التهابی روده شود. علاوه بر این، نقص ایمنی ممکن است زمانی رخ دهد که برخی از اجزای سیستم ایمنی ذاتی و سازگار به دلیل نقص ژنتیکی ارثی یا آسیب ناشی از عوامل خارجی، مانند دارو یا تغذیه، از کار بیفتند.

گیاهان دارویی و کاربردهای آن در سال‌های اخیر توجه زیادی را در زمینه پیشگیری و درمان بیماری‌ها به خود جلب کرده است. چندین گیاه و عصاره های آنها با موفقیت بر سلول‌های T و تولید سیتوکین و آنتی‌بادی در سطوح سلولی و مولکولی تأثیر می‌گذارند (Huang et al. 2008). به عنوان مثال، روغن پوست درخت دارچین و روغن جوانه میخک باعث افزایش ارتفاع پرزها در پوست می‌شوند. دوازدهه، ژژنوم، و روده دراز از جوجه‌های گوشتی تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس بیماری نیوکاسل نیز در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است. بنابراین، اسانس ها به عنوان جایگزینی برای محرک‌های رشد آنتی بیوتیکی در جوجه‌های گوشتی شناسایی شده‌اند. بنابراین، اثرات تعدیل‌کننده ایمنی امیدوارکننده اسانس‌های گیاهی می‌تواند برای درمان‌های جایگزین مورد استفاده قرارگیرد (Dong et al. 2019). علاوه بر این، ترکیبات طبیعی اغلب سازگاری بیمار را با عوارض جانبی کمتری نسبت به داروهای استاندارد دارویی نشان می‌دهند. در این تحقیق بر پاسخ‌های تعدیل‌کننده ایمنی چهار اسانس متداول (اکالیپتوس، میخک، درخت چای واسطوخودوس) تمرکز می‌کند که طبق بررسی ما، امیدوارکننده‌ترین اثرات را نشان می‌دهند.

۲.مواد و روش‌ها

این تحقیق با استفاده از پایگاه های اطلاعاتی ScienceDirect ، PubMed، وGoogle Scholar و عبارت‌های جستجوی اصلی «روغن‌های ضروری»، «تعدیل ایمنی»، «تحریک ایمنی»، «سرکوب سیستم ایمنی» و «التهاب» انجام شد. اسانس‌های مهمی که بر پاسخ ایمنی تأثیر می‌گذارند (عمدتا در اکالیپتوس، میخک، درخت چای و اسطوخودوس گزارش شده‌اند) به جستجو اضافه شدند که منجر به انتشارات خاصی پس از تحقیقات اولیه شد. در این بررسی، ما بر روی مقالات و بررسی‌های اخیر (۲۰۱۵-۲۰۲۰) تمرکز کردیم. مقالاتی که یافته‌های جالبی را در مورد چهار اسانس انتخابی و پاسخ ایمنی ارائه می‌دهند برای این بررسی انتخاب شدند.

۳.نتایج و بحث

۳-۱-اسانس اکالیپتوس

جنس اکالیپتوس متعلق به Myrtaceae خانواده و شامل تقریباً ۸۰۰ گونه از درختان و درختچه‌های گلدار است که بومی استرالیا هستند اما در سراسر جهان کشت می‌شوند. اکالیپتوس حاوی مقادیر زیادی ترکیبات فرار (به عنوان مثال،۸، ۱- سینئول، d- پینن،

سیترونل و لینالول) که بیشتر در برگ‌های گیاه یافت می‌شود. اسانس اکالیپتوس (EEO) سابقه طولانی در استفاده دارویی در درمان سرفه، سرماخوردگی، آنفولانزا و سایر عفونت‌های تنفسی دارد. جزء اصلی ۸، ۱- سینئول (اکالیپتول)، مونوترپن مسئول بوی تند و اهمیت درمانی آن است. نشان داده شده است که ترکیب ۸،۱- سینئول دارای خواص ضدالتهابی و ضددرد است و در بسیاری از محصولات مراقبت از سلامت دهان مانند دهانشویه‌ها و آدامس‌ها استفاده می‌شود. علاوه بر این، لیمونن و α- ترپینئول اجزای رایج در اسانس اکالیپتوس هستند (جدول ۱). با این حال، غلظت این ترکیبات فردی به طور گسترده‌ای بین گونه‌ها متفاوت است. ترکیب روغن همچنین به شرایط رشد گیاه، زمان برداشت، زمان استخراج و دما بستگی دارد. مصرف اسانس اکالیپتوس در دوزهای پایین به طور کلی برای بزرگسالان بی‌خطر است. با ای حال، اگر در غلظت‌های بالاتر مصرف شود، اسانس اکالیپتوس می‌تواند باعث سمیت سیستمیک، به ویژه در کودکان شود. عوارض جانبی رایج مسمومیت با اسانس اکالیپتوس در کودکان شامل افسردگی، هوشیاری، استفراغ و تشنج است. مسمومیت شدید در کودکان پس از مصرف ۳ تا ۵ میلی‌لیتر اسانس اکالیپتوس خالص گزارش شده است.

جدول ۱: اجزای اصلی اسانس‌های انتخاب شده

اکالیپتوس		میخک		درخت چای		اسطوخودوس	
ترکیب	محتوا	ترکیب	محتوا	ترکیب	محتوا	ترکیب	محتوا
اکالیپتول	۵۰٪/۸۰	اوژنول	٪۷۶-۷۰	terpinen-4-ol	٪۴۸-۳۰	لینالول	٪۴۵-۲۸
پینن-α	٪۲۶-۲	بتاکاریوفیلن	٪۱۷-۱۰	ترپینن- y	٪۲۸-۱۰	کافور	٪۱۲-۳
ترپینیل-α استات	٪۵-۲	هومولن-α	٪۲	ترپینن-α	٪۱۳-۵	اکالیپتول	٪۱۰-۲
ترپینئول-α	٪۳-۲	اوژنیل استات	٪۱۲-۱	ترپینئول-α	٪۸-۱	terpinen-4-ol	٪۷-۲
ترانسپینوکاروئول	٪۸-۱	α-cubebene	٪۲-۱	پ- سیمن	٪۸-۱	بتاکاریوفیلن	٪۶-۱
گلوبولول	٪۶-۱	کوپن-	٪۲-۱	پینن-α	٪۶-۱	بورنئول	٪۱۰-۱
لیمونن	٪۴-۱	نرولیدول	٪۱-۰	لیمونن	٪۳-۱	لیمونن	٪۳-۰
پینوکارون	٪۴-۱	فارنسول	٪۱>	سابینن	٪۴-۰	پینن-α	٪۲-۰
ترپینن-y	٪۲-۱	متیل چاویکول	٪۱>	کادینن-δ	٪۳-۰	بتاپینن	٪۲-۰
پ- سیمن	٪۷-۱	کاریوفیلن اکسید	٪۱>	اکالیپتول	٪۱۵-۰	میرسن	٪۲-۰

اخیراً اثرات تعدیل‌کننده ایمنی اسانس اکالیپتوس و اجزای آن توجه بیشتری را به خود جلب کرده است. محققین تاثیر EEO را بر روی ماکروفاژهای مشتق از مونوسیت انسانی (MDM) در شرایط آزمایشگاهی با میکروسکوپ کانفوکال همراه با مواد فلورسنت بررسی کردند (Serafino et al. 2008). نتایج نشان داد که فعالیت فاگوسیتیتیک در MDMهای انسانی در طول درمان EEO در مقایسه با آنهایی که با LPS درمان شده بودند، افزایش یافته است. در گروه‌های کنترل درمان نشده، ۷/۱۳ درصد سلول‌ها فعالیت فاگوسیتیزی را با میانگین ۱۱ دانه فاگوسیتوز در هر سلول نشان دادند. تیمار LPS به مدت ۶ ساعت کمی درصد سلول های فاگوسیتوز را به ۱۸.۲۶ درصد افزایش داد و بر تعداد دانه‌های فاگوسیتوز شده تأثیری نداشت، در حالی که تیمار با ۰.۰۰۸ درصد EEO درصد را با میانگین ۲۴ دانه فاگوسیتوز در هر سلول پس از ۲۴ ساعت افزایش به ۲۷.۱ درصد افزایش داد. علاوه بر این، پیش

درمانی با EEO به مدت ۲۴ ساعت قبل از چالش LPS، فعالیت فاگوسیتیک MDM های انسانی را در مقایسه با درمان LPS به تنهایی افزایش داد. تحرک سلول فعال ممکن است به افزایش توانایی فاگوسیتی کمک کند، زیرا MDM های تیمار شده با EEO نشان دهنده لاملیپودی و فیلوپودی دراز هستند. یک اثر غیراختصاصی EEO بر فعالیت فاگوسیتی MDMs با آزمایش سایر فرآورده های روغنی حذف شد، که بر فعالیت فاگوسیتی MDM تأثیری نداشت. با وجود این تحریک، تولید سیتوکین های پیش التهابی ناشی از LPS به طور قا در سلول هایی که از قبل با اسانس اکالیپتوس تیمار شده بودند، کاهش یافت. این اثر به ویژه برای سیتوکین های IL-6، IL-4 و TNFα مشهود بود. هنگامی که نوکودازول اضافه شد، فعالیت فاگوسیتی سلول های پیش تیمار شده با EEO مهار شد، در حالی که فعالیت سلول‌های تحریک شده با LPS تحت تاثیر قرار نگرفت.

علاوه بر این، تأثیر اسانس اکالیپتوس بر توانایی فاگوسیتی مونوسیت‌ها و گرانولوسیت های خون محیطی در موش های صحرایی دارای ایمنی و سرکوب شده پس از تجویز در داخل بدن نشان داد. در موش های دارای قابلیت ایمنی، مصرف اسانس اکالیپتوس به طور قابل توجهی درصد مونوسیت های در گردش را افزایش داد و به طور همزمان فعالیت فاگوسیتی و بیان گیرنده CD44 را افزایش داد، که واسطه چسبندگی به اندوتلیوم است، در نتیجه باعث افزایش اکستروازاسیون می‌شود. در موش‌های سرکوب شده با ۵-فلوئوروواوراسیل، تجویز اسانس اکالیپتوس منجر به بازیابی درصد گرانولوسیت‌های در گردش و بازیابی توانایی‌های فاگوسیتی گرانولوسیت‌ها و مونوسیت‌ها شد. از آنجایی که ۵- فلوئوروواوراسیل معمولا در شیمی درمانی استفاده می‌شود، این نتایج همچنین نقش احتمالی اسانس اکالیپتوس را در درمان های ترکیبی جدید برای بهبود درمان سرطان نشان می‌دهد (Serafino et al. 2008).

اثر اسانس اکالیپتوس و ماده اصلی تشکیل دهنده آن ۸، ۱-سینئول را بر فعالیت فاگوسیتیک ماکروفاژهای آلوئولی ریه بررسی گردید. هنگامی که سلول‌ها با EE03 ٪۰.۰۲ ساعت قبل از عفونت باکتریایی تحت درمان قرار گرفتند، افزایش در فعالیت فاگوسیتی ماکروفاژهای آلوئولی و پاکسازی پاتوژن داخل سلولی مشاهده شد. این نتایج با نتایج بالا مطابقت داشت. علاوه بر این، پیش درمانی با اسانس اکالیپتوس باعث کاهش تولید واسطه های پیش التهابی ناشی از LPS، مانند IL-1α ، IL-1β ، TNFα و NO در ماکروفاژهای آلوئولی ریه شد. علاوه بر این، ۸، ۱-سینئول اثر ضد التهابی مشابهی را نشان داد اما فقط IL-1β ، IL-1α و IL-۶ داخل سلولی را تحت تأثیر قرار داد. با این حال، به نظر می رسد ۱،۸- سینئول یک اثر بازدارنده قوی بر TNFa اعمال می‌کند (Yadav and Chandra 2017).

در مطالعه ای تأثیر اسانس را بر بیان سیکلواکسیژناز (COX-۲) با استفاده از سلول های اندوتلیال شریانی گاو تجزیه وتحلیل گردید و نشان دادند که EEO ٪۰.۰۱ فعالیت پروموتر COX-۲ ناشی از LPS را تا ۲۵٪ سرکوب می کند. اسانس های آویشن و میخک حتی اثرات قوی تری نسبت به LEO نشان دادند. در حالی که COX-۱ به طور اساسی در بسیاری از سلول ها و بافت ها بیان می‌شود، COX-۲ معمولا وجود ندارد اما از طریق محرک های متعدد درون و خارج سلولی، از جمله LPS وسیتوکین‌های پیش التهابی، القا می‌شود. بنابراین، COX-۲ یک واسطه کلیدی مسیرهای التهابی است. روغن‌های آویشن و میخک به عنوان آگونیست های گیرنده فعال شده با تکثیر پراکسی زوم (PPAR) عمل می کنند و در نتیجه یک حلقه بازخورد منفی را آغاز می کنند که بیان COX-۲ را تنظیم می کند. EEO باعث فعال سازی PPAR شد، اما این اثر معنی‌دار نبود. اینکه آیا ترکیبات منفرد در EEO اثرات آگونیست PPAR قوی‌تری نسبت به خود EEO برای مهار افزایش بیان COX-۲ نشان می‌دهند یا خیر، جای سوال دارد. برای دستیابی به دیدگاهی جامع در مورد این موضوع به تحقیقات بیشتری نیاز است (Hotta et al. 2009).

۳-۲-اسانس میخک

همراه با اکالیپتوس، میخک (SyZygium aromaticum) متعلق به Myrtaceae خانواده. میخک درختی همیشه سبز است که بومی اندونزی است و بیشتر به خاطر گل های معطرش پرورش می‌یابد. اسانس میخک (CEO) در طب سنتی عمدتا به عنوان مسکن در مراقبت از دندان و در درمان سوختگی‌ها و زخم ها استفاده می‌شود. ترکیب اصلی در میخک ترکیب اوژنول است یک ترکیب فنلی است که به رایحه گرم و تند روغن کمک می‌کند و خواص دارویی زیادی را نشان می‌دهد. آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب، ضد میکروبی و ضد درد اثرات اوژنول قبلا مستند شده است. این روغن همچنین از ترکیبات متعدد دیگری از جمله اوژنول استات، β-کاریوفیلن و α-هومولن تشکیل شده است. به طور کلی، اطلاعات در مورد سمیت سلولی EOs و اجزای سیتوتوکسیک فعال آنها محدود است، نشان داده شده است که CEO برای فیبروبلاست‌های انسانی و سلول های اندوتلیال در غلظت ۰.۰۳٪ بسیار سمی است. این اثر بیشتر به اوژنول نسبت داده می‌شود، با این حال مشخصات سمیت سلولی اسانس میخک ممکن است با بیش از یک جزء مشخص شود. علاوه بر این، CEO اثرات سمی کبدی قابل توجهی از خود نشان می دهد. مصرف ۱۰ میلی لیتر CEO می تواند باعث سمیت کبدی و اختلال عملکرد کلیه شود (Janes et al. 2005).

در تحقیقی هر دو اثر ضد التهابی و پیش التهابی در شرایط آزمایشگاهی CEO را بر روی ماکروفاژهای صفاقی موش تحریک شده با LPS نشان داده شد. سرکوب قابل توجهی از تولید و انتشار NO و TNFα پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون گزارش شد. در مطالعات قبلی نشان داده شد که اوژنول بیان نیتریک اکسید سنتاز القایی (iNO5) و همچنین آزادسازی TNFα را در ماکروفاژها مهار می‌کند و بنابراین ممکن است مسئول این اثر باشد (Dibazar et al. 2015).

همانطور که در بالا ذکر شد، زیست فعالی EOs تحت تأثیر عوامل بسیاری قرار می‌گیرد و با ترکیب شیمیایی روغن متفاوت است. منشا جغرافیایی متفاوت جوانه های گل میخک و روش‌های استخراج مورد استفاده در این دو مطالعه ممکن است مسئول نتایج متناقض به دست آمده باشند.

۳-۳-اسانس درخت چای

Melaleuca alternifolia درخت چای که معمولا به عنوان درخت چای شناخته می‌شود، از خانواده گیاه شناسی Myrtaceae و بومی استرالیا است. اسانس این درخت از دیرباز در طب عامیانه به عنوان یک داروی موضعی برای درمان کبودی ها و جراحات عفونی استفاده می‌شده است. اسانس درخت چای (TTO) از حدود ۱۰۰ ترکیب فرار تشکیل شده است که اکثریت آنها هیدروکربن های ترپن هستند. عنصر فعال اصلی تریینن-۴-اول است، یک مونوترین با خواص ضد میکروبی قوی محدود است و اجزای مسئول شناسایی نشده اند اسانس درخت چای خالص می تواند باعث افسردگی سیستم عصبی مرکزی و آتاکسی در کودکان شود. با این حال، داده ها در مورد مشخصات سمیت اسانس درخت چای آسیب پذیرترهستند. مصرف کمتر از ۱۰ میلی لیتر اسانس درخت چای هنگامی که در غلظت های بالاتر مصرف شود سمی است و می تواند باعث تحریک پوست و واکنش های آلرژیک در افراد مستعد شود.

اثر اسانس درخت چای را بر تولید واسطه های التهابی توسط مونوسیت های خون محیطی انسان فعال شده با LPS در شرایط آزمایشگاهی بررسی گردید. نتایج نشان داد که برخی از ترکیبات اسانس درخت چای برای مونوسیت ها در کشت سمی به نظر می رسد و اجزای محلول در آب تریینن-۴-ول، d-تربینیول و ۱،۸-سینیئول می توانند تولید واسطه های التهابی را به روشی غیرسمی سرکوب کنند. کاهش قابل توجه سطوح IL-10 ، IL-8 ، IL-1β ، TNFα و پروستاگلاندین 2E پس از ۴۰ ساعت انکوباسیون با اجزای محلول در آب TTO شناسایی شدند. در ماکروفاژهای انسانی تحریک شده با LPS، اسانس درخت چای اثر بازدارندگی مشابهی بر تولید IL-۱۸ و IL-۱۰ نشان داد، اما سطوح TNF بدون تغییر باقی ماند. این نتایج تا حدی متناقض نشان می دهد که فعالیت

بیولوژیکی اسانس درخت چای به شدت به نوع سلول و همچنین ترکیب و غلظت روغن بستگی دارد. هردو مطالعه terpinen-4-ol را به عنوان مسئول اصلی این اثرات، به احتمال زیاد با تداخل در مسیر NFKB، p38 ، یا ERK/MAPK شناسایی کردند (Hart et al. 2000).

همچنین اثرات ایمنی تحریکی اسانس درخت چای گزارش شده است. این مطالعه نشان داد که هر دو TTO و terpinen-۴- OI به طور مشابه تمایز میلوسیت های نابالغ را به مونوسیت‌های فاگوسیت کننده فعال القاء می کنند و بیان CD11b را افزایش می‌دهند، گیرنده‌ای که تا حدی مسئول فاگوسیتوز باکتری ها و قارچ های opsonized توسط الکوسیت‌ها است. در حالی که تحقیقات زیادی در مورد اثرات بازدارنده ایمنی اسانس درخت چای انجام شده است، اطلاعات کمی در مورد پتانسیل آن به عنوان یک عامل تحریک کننده ایمنی وجود دارد (Budhiraja et al. 1999).

۳-۴-اسانس اسطوخودوس

اسانس اسطوخودوس (LEO) معمولا از اسطوخودوس آنگوستیفولیا، گونه ای از گیاهان گلدار متعلق به Lamiaceae خانواده ای که به طور گسترده در دریای مدیترانه کشت می‌شود.

اسانس اسطوخودوس از گل ها و برگ های گیاه با بخار تقطیر می شود و حاوی غلظت بالایی از مونوترپنوئیدهای لینالول، لینالیل استات، ۱،۸-سینئول، کافور و ترپینن-۴-ول است. با این حال، ترکیب روغن به شدت بسته به منشاء جغرافیایی گیاه، عوامل محیطی و پارامترهای استخراج متفاوت است. برای سلول های اندوتلیال انسان و فیبروبلاست ها در غلظت ۰.۲۵ درصد سیتوتوکسیک است. سمیت سلولی عمدتا به ترکیب اصلی روغن لینالول و لینالیل استات نسبت داده می شود اسانس اسطوخودوس به عنوان یکی از ملایم‌ترین اسانس‌ها در نظر گرفته می‌شود، با این حال نگرانی‌ها در مورد واکنش های احتمالی آلرژی زا یا تحریک کننده پوست در حال افزایش است. علاوه بر این، لینالیل استات قبلا نشان داده شده است که اثرات ژنوتوکسیک را بر لنفوسیت های انسانی نشان می دهد.

محققین اثر محافظتی اسانس اسطوخودوس بر MDM های انسانی پس از عفونت با استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند. افزایش پاکسازی باکتریایی ممکن است به دلیل تنظیم مثبت بیان ژن های دخیل در تولید گونه های فعال اکسیژن (CYBB و NCF4) رخ دهد. این مشاهدات نشان می دهد که اسانس اسطوخودوس می تواند پاسخ های ایمنی ذاتی به باکتری ها را تحریک کند. علاوه بر این، اسانس اسطوخودوس با مهار تولید چندین سایتوکین پیش التهابی ناشی از باکتری، ازجمله IL-1a، IL-1B و IL-۶ توسط ماکروفاژها، اثرات تنظیمی بر پاسخ التهابی اعمال می کند. مشابه اسانس درخت چای ، تصور می شود اسانس اسطوخودوس اثرات ضدالتهابی خود را با القای بیان HO-۱ نشان می دهد (Giovannini et al. 2016).

اثر ضد التهابی قوی اسانس اسطوخودوس بر آسم برونشیال در موش بررسی گردید. آسم به شدت توسط سلول های Th2 و سیتوکین های آنها IL-5 ، IL-4، IL-13 هدایت می شود که باعث التهاب ائوزینوفیلیک در مجاری تنفسی می شود. استنشاق اسانس اسطوخودوس منجر به سرکوب التهاب آلرژیک مجاری تنفسی شد که با کاهش تجمع سلولی و تولید مخاط مشهود است. این مشاهدات نشان می‌دهد که اسانس اسطوخودوس دارای اثرات تعدیل کننده ایمنی قوی است و پتانسیل زیادی را به عنوان یک داروی ضد التهابی جایگزین برای اسم برونش نشان می دهد (Ueno-Iio et al., 2014).

۴.نتیجه گیری

این بررسی علاقه روز افزون به اثرات تعدیل کننده ایمنی اسانس های مشتق شده از گیاه و اجزای اصلی آنها را برجسته می‌کند. ویژگی‌های محافظتی، مانند خواص ضدباکتری، آنتی‌اکسیدانی یا ضد التهابی قبلاً به خوبی توضیح داده شده است. با این حال، سیستم

ایمنی اثرات اسانس ها تنها به صورت محدود در نظر گرفته شده است. علاوه بر این، عصاره های گیاهی در مقایسه با داروهای تعدیل کننده سیستم ایمنی، عوارض جانبی کمی را ایجاد می کنند. این بررسی، پتانسیل اسانس های مختلف را به عنوان درمان های جایگزین مناسب تعدیل کننده ایمنی برای بیماری های عفونی یا ایمنی تقویت می کند. علاوه بر این، این ترکیبات همچنین اثربخشی خوبی را به عنوان داروی پیشگیرانه ارائه می دهند که یک سبک زندگی سالم را ترویج می کند.

نتایج بررسی شده در این مطالعه کاهش قابل توجهی در سایتوکین‌های مربوطه مانند اینترلوکین های IL-10 ، IL-8 ، IL-6 ، IL-5 ، IL-4 ، IL-3 ، IL-1β ، IL-1α را نشان داد. اثرات اسانس ها عمدتا در سطح سلولی، از جمله در مونوسیت ها، ماکروفاژها، و سلول های Th، در زمینه تأثیرات مولکولی روی سیتوکین ها با ایمونوگلوبولین ها مورد بررسی قرار گرفته اند. فقط چند مطالعه به مکانیسم های ژنتیکی احتمالی پرداختند. تحقیقات بیشتری باید بر روی مسیرهای تنظیمی تمرکز کند. علاوه بر این، بسیاری از داده های تجزیه و تحلیل شده از کشت سلولی آزمایشگاهی و آزمایشات in vivo موش / موش به دست آمد. در واقع، شکاف بزرگی بین مطالعات آزمایشگاهی و آزمایش های درون تنی یا بالینی وجود دارد. علاوه بر کارآزمایی های بالینی رایحه درمانی، داده های کمی برای توصیف اثرات تعدیل کنندگی ایمنی اسانس ها در انسان در دسترس است. سازمان غذا و داروی ایالات متحده (FDA) بسیاری از اسانس ها را به عنوان "به طور کلی به عنوان ایمن شناخته شده" (GRAS) در نظر می گیرد، بنابراین تلاش بسیار کمی برای بررسی اثرات سمی روی بدن انجام شده است. با این وجود، مطالعات متعدد اثرات سمی اسانس ها را نشان داد، که به وضوح نیاز به سیستم های تست مناسب برای شناسایی شیوه های عمل آنها در متابولیسم را نشان می دهد.

به خصوص برای تعیین ارزش های سم شناسی موثر و حیاتی و همچنین سمیت حاد، تحقیقات بیشتری باید در ارگانیسمهای مدل جایگزین انجام شود. این واقعیت یک نکته کلیدی برای کاربردهای درمانی آینده است. در این راستا، رویکردهای چند عاملی به منظور جلوگیری از برآورد بیش از حد یا دست کم گرفتن خواص سم شناسی که منجر به محدودیت‌های غیرقابل توجیه یا گواهی ایمنی می‌شود، ضروری خواهد بود.

با این حال، اسانس ها با موفقیت به عنوان افزودنی خوراک برای جوجه های گوشتی یا خوک های از شیر گرفته شده استفاده شده‌اند و به وضوح اثرات تحریک کننده ایمنی را نشان داده اند، در حالی که هیچ سمیت زیستی مشاهده نشد. علاوه بر این، آزمایش های بالینی بیشتری با تمرکز بر تعدیل ایمنی مورد نیاز است، زیرا کشت سلولی آزمایشگاهی و آزمایش‌های in vivo شواهد قوی در زمینه خواص تعدیل کننده ایمنی اسانس ها انتخاب شده نشان داد.

منابع

1. Budhiraja, S.S.; Cullum, M.E.; Sioutis, S.S.; Evangelista, L.; Habanova, S.T. Biological activity of Melaleuca alternifola (Tea Tree) oil component, terpinen-4-ol, in human myelocytic cell line HL-60. J. Manip. Physiol. Ther. 1999, 22, 447–453.
2. Dibazar, S.P.; Fateh, S.; Daneshmandi, S. Immunomodulatory e_ects of clove (Syzygium aromaticum) constituents on macrophages: In vitro evaluations of aqueous and ethanolic components. J. Immunotoxicol. 2015, 12, 124–131.
3. Dong, L.; Liu, J.; Zhong, Z.; Wang, S.; Wang, H.; Huo, Y.; Wei, Z.; Yu, L. Dietary tea tree oil supplementation improves the intestinal mucosal immunity of weanling piglets. Anim. Feed Sci. Technol. 2019, 255, 114209.
4. Hart, P.H.; Brand, C.; Carson, C.F.; Riley, T.V.; Prager, R.H.; Finlay-Jones, J.J. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. Inflamm. Res. 2000, 49, 619–626.
5. Hotta, M.; Nakata, R.; Katsukawa, M.; Hori, K.; Takahashi, S.; Inoue, H. Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR_ and and suppresses COX-2 expression. J. Lipid Res. 2009, 51, 132–139.

6. Huang, C.-F.; Lin, S.-S.; Liao, P.-H.; Young, S.-C.; Yang, C.-C. The Immunopharmaceutical Effects and Mechanisms of Herb Medicine. Cell. Mol. Immunol. 2008, 5, 23–31.]
7. Janes, S.E.; Price, C.S.; Thomas, D. Essential oil poisoning: N-acetylcysteine for eugenol-induced hepatic failure and analysis of a national database. Eur. J. Pediatr. 2005, 164, 520–522.
8. Marshall, J.S.; Warrington, R.; Watson, W.; Kim, H.L. An introduction to immunology and immunopathology. Allergy Asthma Clin. Immunol. 2018, 14, 49.
9. Nogueira, M.N.M.; Aquino, S.G.; Rossa Junior, C.; Spolidorio, D.M.P. Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1_, IL-6 and IL-10 on human macrophages. Inflamm. Res. 2014, 63, 769–778.
10. Serafino, A.; Sinibaldi Vallebona, P.; Andreola, F.; Zonfrillo, M.; Mercuri, L.; Federici, M.; Rasi, G.; Garaci, E.; Pierimarchi, P. Stimulatory e_ect of Eucalyptus essential oil on innate cell-mediated immune response. BMC Immunol. 2008, 9, 17.
11. Ueno-Iio, T.; Shibakura, M.; Yokota, K.; Aoe, M.; Hyoda, T.; Shinohata, R.; Kanehiro, A.; Tanimoto, M.; Kataoka, M. Lavender essential oil inhalation suppresses allergic airway inflammation and mucous cell hyperplasia in a murine model of asthma. Life Sci. 2014, 108, 109–115.
12. Yadav, N.; Chandra, H. Suppression of inflammatory and infection responses in lung macrophages by eucalyptus oil and its constituent 1, 8-cineole: Role of pattern recognition receptors TREM-1 and NLRP3, the MAP kinase regulator MKP-1, and NF_B. PLoS ONE 2017, 12, e0188232.

A short review on industrial and therapeutic applications of plant proteases

Mahmoud Salehi[1]*, Niloofar Sadeghi[2], Salman Ahmadi[3], Zahra Jahani[2], Yeganeh sadat Mousavian[2]

1. Assistant Prof, Department of Biology, Faculty of Science and Engineering, Gonbad kavous University, Gonbad Kavous, Iran.

2. Undergraduate student, Department of Biology, Faculty of Science and Engineering, Gonbad kavous University, Gonbad Kavous, Iran.

3. MSc, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Email: salehi.mahmoud@gonbad.ac.ir

Abstract

Enzymes have become an indispensable part of our lives used in the industrial production of many chemicals, pharmaceuticals, and foodstuffs. Proteolytic enzymes, which hydrolyze peptide bonds in proteins, are one of the frequently used industrial enzymes because they have allocated about 60 percent of the whole enzyme industry to themselves. They are found in a variety of organisms from microorganisms to plants and animals. Because of some distinctive features like high reproduction rate, high biochemical diversity, space-limited culture, and easy genetic manipulation, microbial resources are more suitable for biotechnological purposes. However, plant proteases have attracted particular attention due to their broad substrate properties and stability over a wide range of pH and temperature. They are one of the most important commercial enzymes used in various industrial domains such as dairy, cooking, meat tenderizing, beverage, detergent, and leather industries. Also, their medical usages include partial healing of some wounds, cancers, gastrointestinal disorders, and infectious diseases. With regard to these unique characteristics, proteases are an emerging class of enzymes that have acquired different medical consumptions. This review aims to explain the industrial and therapeutic applications of various plant proteases and have a concise look at animal and bacterial proteases as well. Moreover, some pharmaceutical and curative uses of bromelain and papain have been mentioned. Overall, there is no doubt that identifying new resources of more efficient, more stable, and reusable enzymes is an urgent need of every industry.

Keywords: Proteases, industrial and therapeutic enzymes, bromelain, papain

مرور اجمالی بر کاربردهای صنعتی و درمانی پروتئازهای گیاهی

محمود صالحی[۱]؛ نیلوفر صادقی[۲]؛ سلمان احمدی[۳]؛ زهرا جهانی[۲]؛ یگانه سادات موسویان[۲]

۱. استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، دانشگاه گنبد کاووس
۲. دانشجو کارشناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، دانشگاه گنبدکاووس
۳. دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان

* salehi.mahmoud@gonbad.ac.ir

چکیده

امروزه آنزیم ها به عنوان ابزارهای ضروری به منظور تولید صنعتی بسیاری از مواد شیمیایی، دارویی و غذایی توسعه یافته اند. آنزیم های پروتئولیتیک که هیدرولیز پیوندهای پپتیدی در پروتئین‌ها را کاتالیز می‌کنند یکی از پرکاربردترین آنزیم های صنعتی می باشند به‌طوری که حدود ۶۰ درصد از کل صنعت آنزیم را به خود اختصاص داده‌اند. پروتئازها در ارگانیسم‌های متنوعی از قبیل گیاهان، حیوانات و میکروارگانیسم‌ها یافت می‌شوند. به دلیل ویژگی‌های متمایزی همچون سرعت بالای تکثیر، فضای کشت محدود ، تنوع بالای بیوشیمیایی و دست‌ورزی ژنتیکی آسان، منابع میکروبی در مقایسه با منابع گیاهی و جانوری برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی مناسب‌تر می‌باشند. با این وجود پروتئازهای گیاهی به دلیل ویژگی سوبسترایی گسترده و پایداری در طیف وسیعی از دما و pH توجه محققان را به خود جلب کرده‌اند. پروتئازهای گیاهی پتانسیل ویژه‌ای برای کاربرد در صنایع مختلف از جمله لبنیات، پخت و پز، نرم کردن گوشت، نوشیدنی، شوینده و چرم دارند. همچنین از کاربردهای پزشکی آنها می‌توان به بهبود نسبی برخی زخم‌ها، سرطان‌ها، اختلالات گوارشی و بیماری‌های عفونی اشاره کرد. با توجه به این ویژگی‌های خاص، پروتئازها یک کلاس نوظهور از آنزیم‌ها هستند که کاربردهای پزشکی متنوعی پیدا کرده‌اند. هدف این مطالعه مروری نگاهی اجمالی بر انواع پروتئازهای گیاهی و کاربردهای صنعتی و درمانی آن‌ها است. علاوه بر این پروتئازهای جانوری و میکروبی نیز به طور خلاصه مورد بحث قرار می‌گیرند و به برخی از کاربردهای دارویی و درمانی بروملین و پاپائین نیز اشاره می‌شود. بطور کلی می‌توان گفت که امروزه نیاز مبرمی به شناسایی منابع جدید برای آنزیم‌های کارآمدتر، پایدارتر و قابل استفاده مجدد در صنایع مختلف، که به آنزیم‌هایی با خواص ویژه نیاز دارند، وجود دارد.

واژگان کلیدی: پروتئازها، آنزیم‌های صنعتی و درمانی، بروملین، پاپائین

۱.مقدمه

آنزیم‌ها کاتالیزورهای زیستی هستند که تقریباً تمام فرایندهای بیولوژیکی را کاتالیز می‌کنند. از زمان‌های قدیم از آنزیم‌ها در تولید محصولات غذایی مختلف از جمله سرکه، شراب، آبجو، پنیر و خمیر ترش و در تولید کالاهایی مانند چرم و کتان استفاده شده است (Kirk et al., 2002). با این حال روش‌های استفاده از آنزیم‌ها به مرور زمان تغییر یافته است بطوری‌که در ابتدا عمدتا به صورت عصاره بافت‌های حیوانی، گیاهی و یا خود سلول‌های میکروارگانیسم مورد استفاده قرار می‌گرفتند اما پیشرفت در تکنیک‌های جداسازی و تولید آنزیم، استفاده از آنزیم‌های خالص شده را تسهیل کرد. این پیشرفت‌های فنی باعث شد آنزیم‌های بیشتری شناسایی شوند و ویژگی‌های ساختاری و مکانیسم کاتالیزوری آن‌ها مشخص شود بطوری‌که این امر کاربرد آن‌ها را ساده تر می‌کند (Tavano et al., 2018). امروزه آنزیم‌ها به عنوان ابزارهای ضروری به منظور تولید صنعتی بسیاری از مواد شیمیایی، دارویی و غذایی توسعه یافته‌اند. در صنایع غذایی از خاصیت هیدرولیتیکی پروتئازها برای از بین بردن کدورت ناشی از پروتئین‌های موجود در آب میوه‌ها و مشروبات الکلی، بهبود کیفیت غذاهای غنی از پروتئین، هیدرولیز پروتئین سویا، هیدرولیز ژلاتین، هیدرولیز کازئین و آب پنیر و نرم کردن گوشت استفاده می‌شود (Silva et al., 2021). عموما استفاده از آنزیم‌ها در صنعت نسبت به روش‌های شیمیایی سنتی مزایای زیادی دارند که عبارتند از: کیفیت بالاتر محصولات، هزینه پایین تولید، ضایعات کمتر و کاهش مصرف انرژی (Sabalza et al., 2014).

اکثر آنزیم‌های مورد استفاده در صنایع مربوط به خانواده هیدرولازها می‌باشند که باعث تجزیه انواع مواد طبیعی می‌شوند. پروتئازها گروه بزرگی از هیدرولازها می‌باشند که به دلیل استفاده گسترده در صنایع مختلف بیش از ۶۰ درصد فروش جهانی آنزیم را به خود اختصاص داده‌اند (González-Velázquez et al., 2021). پروتئازها به طور گسترده‌ای در تمامی گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم‌ها توزیع شده‌اند. این آنزیم‌ها بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی و ساختاری به ۶۲ کلان[189] و ۲۶۸ خانواده [190] تقسیم‌بندی می‌شوند (González-Velázquez et al., 2021). در گیاهان بیش از ۷۰۰ ژن کدکننده آنزیم‌های پروتئازی برای عملکردهای ویژه تنظیمی و بیوشیمیایی شناخته شده است (van der Hoorn and Rivas, 2018). بخش‌های مختلف گیاهان مخازن ارزشمندی از این مولکول‌های زیستی هستند. پروتئازهای خارج سلولی گیاهان نقش دفاعی در برابر علفخواران، حشرات و آفات دارند. علاوه بر این، لاتکس گیاهان به دلیل سطح پایین مواد مزاحم، سهولت خالص سازی و عملکرد مناسب پروتئازها می‌تواند منبع بالقوه پروتئازها باشد. پروتئازهای مشتق شده از گیاه به دلیل ویژگی سوبسترایی گسترده، پایداری بالا در شرایط حاد، حلالیت کافی و فعالیت در محدوده وسیعی از pH و دما، کاربرد امیدوارکننده‌ای در صنایع غذایی و بیوتکنولوژیکی پیدا کرده‌اند (Tomar et al., 2008). پروتئازهای گیاهی در صنایع دارویی، پزشکی و غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. به عنوان مثال، پروتئازها برای فرمولاسیون مواد شوینده، پنیرسازی، نرم کننده گوشت و تولید هیدرولیزهای پروتئینی با خواص عملکردی و یا زیست فعال استفاده می‌شوند (Mazorra-Manzano et al., 2018). این مطالعه مروری به یافته های اخیر در زمینه منابع، طبقه بندی و کاربردهای صنعتی و درمانی پروتئازهای گیاهی می‌پردازد.

۱-۱- منابع پروتئازی

پروتئازها در همه موجودات از قبیل گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم ها گزارش شده‌اند. نوع پروتئاز ترشح شده به میزبان و سازگاری آن با شرایط محیطی بستگی دارد. در ادامه منابع مختلف پروتئازی با ذکر مثال آورده شده است.

[189] Clan
[190] Family

۱-۲- منابع جانوری

تعداد اندکی پروتئاز جانوری وجود دارد که از لحاظ اقتصادی اهمیت ویژه‌ای دارند. از آنجا که تولید انبوه پروتئازهای جانوری وابسته به فراوانی کشتار حیوانات است، به منظور به حداقل رساندن کشتار حیوانات، فناوری DNA نوترکیب برای تولید گسترده پروتئازهای حیوانی مورد استفاده قرار گرفته است. تریپسین، سرین پروتئازی است که در روده مهره داران یافت می‌شود، این آنزیم پیوند پپتیدی را از انتهای کربوکسیل آمینواسیدهای لیزین یا آرژنین می‌شکند. تریپسین بدست آمده از گاو و خوک دارای وزن مولکولی ۲۳.۳ کیلو دالتون بوده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بهترین عملکرد را دارد. علاوه بر این که تریپسین به طور گسترده‌ای در آزمایشگاه کشت بافت و در فرایند جمع آوری سلول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد، در صنایع دارویی و غذایی نیز کاربرد گسترده‌ای دارد (Arshad et al., 2014).

کیموتریپسین سرین پروتئازی است که در شیره پانکراس حیوانات یافت می‌شود. این آنزیم پیوند پپتیدی را بعد از آمینو اسیدهای فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان هیدرولیز می‌کند. از کیموتریپسین خالص که یک آنزیم گران قیمت است برای اهداف تشخیصی و تجزیه‌ای استفاده می‌شود (Blow, 1976). کیموزین گاوی نوعی آسپارتیک پروتئاز است که از شیردان گوساله‌های شیرخوار بدست می‌آید. این آنزیم جزء اصلی رنت گوساله است و دارای ویژگی بسیار بالایی می باشد بطوری‌که باعث شکستن پیوند بین باقیمانده‌های فنیل آلانین ۱۰۵ و متیونین ۱۰۶ در کاپا-کازئین می‌شود. کایموزین گاوی در صنعت پنیر سازی مورد استفاده قرار می‌گیرد (González-Velázquez et al., 2021).

۱-۳- منابع میکروبی

تقریباً دو سوم پروتئازهای صنعتی از منابع میکربی بدست می‌آیند بطوری‌که حدود ۴۰ درصد از کل فروش جهانی آنزیم را به خود اختصاص داده‌اند (Freitas et al., 2015). ویژگی‌های متعددی از قبیل سرعت بالای تولید، نیاز به فضای کشت محدود، تنوع بالای بیوشیمیایی و دستورزی ژنتیکی آسان، میکروب‌ها را در مقایسه با گیاهان و جانوران برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی مناسب‌تر می‌سازد (Singhal et al., 2012, Mishra et al., 2017, Tavano et al., 2018). استخراج پروتئازها از میکروب‌ها به دو روش تخمیر حالت جامد[۱۹۱] و تخمیر غوطه سازی[۱۹۲] انجام می‌گیرد. از این دو فرایند تخمیر حالت جامد بیشتر ترجیح داده می‌شود زیرا انرژی کمتری مصرف می‌کند. میکروارگانیسم‌ها برای ترشح آنزیم به محیط رشد و شرایط محیطی بهینه نیاز دارند. پس از ترشح آنزیم یک سری مراحل خالص‌سازی باید انجام شود تا آنزیم خالص بدست آید. پروتئازها از میکروارگانیسم های مختلف مانند قارچ، باکتری و مخمر استخراج شده‌اند (Khan, 2013). پروتئازهای جدا شده از قارچها به دلیل اثر روی طیف گسترده‌ای از سوبستراها، پایداری در شرایط نامطلوب، تنوع زیاد و جداسازی میسلیوم با فرایند ساده فیلتراسیون توجه محققان را به خود معطوف کرده است. از پروتئازهای قارچی در اصلاح پروتئین‌های غذایی استفاده می شود (Veloorvalappil et al., 2013). آسپرژیلوس نیجر[۱۹۳]، آسپرژیلوس فلاوس[۱۹۴]، آسپرژیلوس اُریزا[۱۹۵]، ریزوپوس[۱۹۶] و سفالوسپوریوم[۱۹۷] از گونه های مهم قارچ های تولید کننده پروتئاز می‌باشند (Freitas et al., 2015, Song et al., 2020, Naveed et al., 2021). از میان پروتئازهای باکتریایی، آلکالین پروتئازها به دلیل فعالیت کاتالیزوری بالا

[191] Solid state fermentation
[192] Submerged fermentation
[193] *Aspergillus niger*
[194] *Aspergillus flavus*
[195] *Aspergillus oryzae*
[196] *Rhizopus*
[197] *Cephalosporium*

در pH های قلیایی (۸ تا ۱۲) و در محدوده دمایی بین ۵۰ تا ۷۰ درجه سانتی گراد و همچنین ظرفیت بالای تولید در صنایع مختلفی از قبیل چرم، مواد غذایی، لباسشویی، ابریشم و صنایع شوینده اهمیت اقتصادی بیشتری دارند (Veloorvalappil et al., 2013, Masi et al., 2021).

(Veloorvalappil et al., 2013, Masi et al., 2021). برخی از باکتری‌های تولید کننده پروتئاز عبارتند از: باسیلوس سابتیلیس[۱۹۸]، باسیلوس لچینیفورمیس[۱۹۹] و باسیلوس پامیلوس[۲۰۰] (Naveed et al., 2021, Sulistyaningtyas et al., 2021).

۱-۴- پروتئاز های گیاهی

پروتئازهای گیاهی در بسیاری از جنبه‌های فیزیولوژی و رشد گیاه نقش دارند. ژنوم‌های گیاهی صدها پروتئاز را کد می‌کنند که در فرآیندهایی مانند تجزیه پروتئین، تخریب پروتئین‌هایی که به صورت اشتباه تاخورده‌اند، پیری و مسیر یوبیکوئیتین/پروتئازوم نقش مهمی ایفا می‌کنند. پروتئازها همچنین از طریق برش در جایگاه‌های بسیار ویژه، مسئول تغییرات پس از ترجمه پروتئین‌ها هستند. این آنزیم‌ها در انواع فرآیندهای سلولی از جمله مهار نوری[۲۰۱] در کلروپلاست، مکانیسم‌های دفاعی، مرگ برنامه ریزی شده سلولی و فوتومورفوژنز در نهال در حال نمو و به حرکت درآمدن پروتئین‌های ذخیره‌ای در طول جوانه زنی نقش دارند (D'Ipólito Sebastián et al., 2018). علاوه بر این فعالیت این آنزیم‌ها به شدت تحت کنترل می‌باشد زیرا عملکرد آن‌ها بر پروتئین‌ها برگشت ناپذیر می‌باشد (van der Hoorn and Klemenčič, 2021). این آنزیم‌ها با چهار مکانیسم مختلف فرایند هیدرولیز پیوند پپتیدی را کاتالیز می‌نمایند و بر این اساس در چهار کلاس کاتالیزوری نام‌گذاری می‌شوند که عبارتند از: سیستئین پروتئازها، سرین پروتئازها، آسپارتیک پروتئازها و متالوپروتئازها. مکانیسم عمل سرین و سیستئین پروتئازها در مقایسه با متالوپروتئازها و آسپارتیک پروتئازها متفاوت است زیرا در جایگاه فعال دو آنزیم اول، آمینواسیدها به عنوان نوکلئوفیل عمل می‌کنند اما در متالوپروتئازها و آسپارتیک پروتئازها مولکول آب فعال شده این نقش را ایفا می‌کند (Dunn, 2002).

۱-۵- سیستئین پروتئازهای گیاهی

مکانیزم کاتالیزوری خانواده سیستئین پروتئازها (EC 3.4.22) (CPs) براساس عملکرد نوکلئوفیل گروه سولفیدریل سیستئین می‌باشد و دهنده پروتون/ باز عمومی در آن‌ها هیستیدین است. اگرچه در برخی از اعضای خانواده این گروه یک باقیمانده آسپارتات برای جهت گیری مناسب گروه ایمیدازول هیستیدین مورد نیاز است ولی در برخی دیگر فقط یک جفت کاتالیتیک لازم است (Domsalla and Melzig, 2008). براساس پایگاه داده MEROPS http://www.merops.ac.uk) (سیستئین پروتئازها به ۱۰ کلان[۲۰۲] (CA، CD، CE، CF، CH، CM، CN، CO و C-) تقسیم می‌شوند طوری‌که اغلب سیستئین پروتئازها متعلق به خانواده CA می‌باشند که به عنوان خانواده پاپائین هم شناخته می‌شود (Rawlings et al., 2010). سیستئین پروتئازهای گیاهان مناطق گرمسیری مانند کاریکا پاپایا[۲۰۳] (پاپائین، کیموپاپائین، کاریکاین و گلایسیل لندوپپتیداز)، آنلناس کموکوس[۲۰۴](برومولین میوه،

[198] *Bacillus subtilis*
[199] *Bacillus licheniformis*
[200] *Bacillus pumilus*
[201] Photoinhibition
[202] Clan
[203] *Carica papaya*
[204] *Ananas comosus*

بروملین ساقه، انانائین[۲۰۵] و کوموزاین[۲۰۶]) و فیکوس گلابراتا[۲۰۷] (فیسین) به دلیل فعالیت پروتئولیتیک قوی روی بیشتر سوبستراهای پروتئینی و فعال بودن در طیف گسترده‌ای از pH و دما از اهمیت تجاری قابل توجهی برخوردار هستند (Feijoo-Siota and Villa, 2011, Arshad et al., 2014). پروتئازهای پاپائین، بروملین و فیسین در فرایندهای مختلف صنعتی و پزشکی کاربرد دارند. برخی از این پروتئازها در صنایع لبنی برای تولید پنیر، در صنایع نوشیدنی برای تولید هیدرولیزت‌های پروتئینی محلول و خوش طعم، و همچنین به عنوان غذای مکمل، نرم کردن گوشت و برای تولید امولسیفایر استفاده می‌شوند. همچنین در سایر صنایع برای فرمولاسیون محیط کشت، جداسازی مواد ژنتیکی، موزدایی در چرم سازی، تولید آمینو اسیدهای ضروری مانند لیزین و در صنعت داروسازی اهمیت زیادی دارند (D'Ipólito Sebastián et al., 2018). استفاده از عصاره‌های گیاهی با محتوای بالای آنزیم‌های پروتئولیتیک دارای سابقه طولانی در طب سنتی است. بعنوان مثال بروملین مشتق شده از آناناس به دلیل توانایی اصلاح[۲۰۸] ساختارهای سطح سلول از طریق برش پپتیدها، می تواند از ادم، تجمع پلاکت‌ها و متاستاز جلوگیری کند (Salas et al., 2008). پروتئازهای ترشح شده توسط گیاهان گوشتخوار دارای اهمیت بیوتکنولوژیکی و دارویی می‌باشند. دروسا کاپنسیس[۲۰۹] یکی از این گیاهان است که دارای تعداد زیادی ژن کدکننده سیستیئن پروتئاز می‌باشد (Butts et al., 2016). پاپائین سیستئین پروتئازی است که از میوه‌های لاتکس کاریکا پاپایا[۲۱۰] بدست می‌آید. پاپائین به دلیل داشتن ایزوآنزیم‌های متعدد، ویژگی گسترده‌تری نسبت به سوبستراها دارد. پاپائین در pH ۵-۹ فعال است و تا دمای ۸۰ درجه سانتی گراد پایدار می‌باشد. پاپائین نقش مهمی در فرایندهای مختلف بیولوژیکی ایفا می‌کند و به طور گسترده‌ای در صنعت ترد کردن گوشت، طراحی دارو و غیره استفاده می‌شود (Olmoss, 2012). بروملین سیستئین پروتئاز مهم صنعتی است که از ساقه و شیره آناناس بدست می‌آید. این آنزیم در pH ۵-۹ فعال می‌باشد و دمای بهینه آن ۷۰ درجه سانتی گراد است و در محدوده وسیعی از فرایندهای صنعتی از قبیل ترد کردن گوشت، غذا، شوینده و نساجی کاربرد دارد (Arshad et al., 2014). همچنین بروملین می‌تواند به عنوان یک ماده فعال در خمیر دندان‌ها و محصولات پوستی کاربردهای گسترده‌ای داشته باشد (Arshad et al., 2014). نوعی فیسین با وزن مولکولی ۲۵ کیلودالتون از گیاه فیکوس یوهانسیس خالص سازی شده است که فعالیت بالایی در pH ۶-۷.۵ و دمای ۵۰ تا ۷۰ درجه سانتی گراد دارد. علاوه بر این پایداری قابل ملاحظه‌ای در حضور انواع حلال‌های آلی، شوینده و یون‌های فلزی دارد. بنابراین این آنزیم پتانسیل مناسبی برای استفاده در انواع صنایع مختلف بخصوص صنایع لبنی دارد (Afsharnezhad et al., 2019a, Afsharnezhad et al., 2019b).

۱-۶- آسپارتیک پروتئازهای گیاهی

آسپارتیک پروتئازهای (EC 3.4.23) (Aps) گیاهی گروهی از آنزیم‌های پروتئولیتیک با توالی حفاظت شده Asp-Gly-Thr در جایگاه فعال می‌باشند. اکثر آسپارتیک پروتئازهای گیاهی ویژگی‌های مشترکی دارند که عبارتند از: جزو خانواده A1 هستند، در pH اسیدی فعال‌اند، به طور ویژه توسط پپستاتین A مهار می‌شوند و دارای ۲ باقیمانده آسپارتیک اسید هستند که مسئول فعالیت کاتالیتیک می‌باشند (Simões and Faro, 2004, Darabi and Seddigh, 2015). آسپارتیک پروتئازها از دانه و برگ گیاهان مختلفی

[205] Ananain
[206] Comosain
[207] *Ficus glabrata*
[208] Modifying ability
[209] *Drosera capensis*
[210] *Carica papaya*

از قبیل اوریزا ساتیوا[۲۱۱]، کیوکومس ساتیوا[۲۱۲]، ویتانیا کواگیولانس [۲۱۳]و لیکوپرسیکوم اسکلنتوم [۲۱۴]نیز بدست می‌آید. براساس پایگاه داده MEROPS آسپارتیک پروتئازها با توجه به تشابه آمینواسیدها در جایگاه کاتالیتیک به ۱۶ خانواده گروه بندی شده‌اند (Figueiredo et al., 2021). جرم مولکولی این گروه از آنزیم‌ها از ۳۰ تا ۴۵ کیلو دالتون متغیر است. بالاترین فعالیت کلتالیتیک بیشتر آسپارتیک پروتئازها در محدوده pH ۴-۳ می‌باشد (Singh and Bindhu, 2020). برخی از آسپارتیک پروتئازهای گیاهی دارای ویژگی‌های مشابه رنت مشتق شده از گوساله بوده و از این رو در صنایع غذایی مورد توجه قرار گرفته‌اند (González-Velázquez et al., 2021). در پرتغال و برخی از مناطق اسپانیا، عصاره گل‌های خشک شده سینارا کاردونکولوس از زمان‌های قدیم برای تولید انواع پنیرهای سنتی گوسفندی مورد استفاده قرار می‌گرفته است. از این مایه پنیر برای تولید انواع پنیر با کیفیت بالا استفاده می‌شود (Reis and Malcata, 2011). در مناطق جنوب شرقی ایران نیز از عصاره میوه گیاه ویتانیا کواگیولانس به طور سنتی در تهیه پنیرهای محلی استفاده می‌شده است. در این گیاه آسپارتیک پروتئاز مسئول انعقاد شیر دارای وزن مولکولی ۳۱ کیلو دالتون است. بسیاری از خصوصیات بیوشیمیایی و ترمودینامیک این آنزیم مورد مطالعه قرار گرفته و نشان داده شده است که پایداری قابل ملاحظه‌ای در مقابل دما، شوینده‌ها، انواع یون‌های فلزی، حلال‌های آلی و ترکیبات دناتوره کننده دارد (Salehi et al., 2019, Ahmadi et al., 2021). تلاش‌های زیادی به منظور شناسایی آنزیم‌های منعقد کننده شیر در گیاهان، نقش آن‌ها در هیدرولیز کازئین و اثرشان در فرایند پروتئولیز در طی رسیدن پنیر، انجام شده است (Agboola et al., 2004). علاوه بر این چندین آسپارتیک پروتئاز از گونه سینارا و گیاهان دیگر کلون شده و با موفقیت در سیستم‌های باکتریایی و یوکاریوتی بیان شده است (Pais et al., 2006).

۱-۷- سرین پروتئازهای گیاهی

در سرین پروتئازها (SPs)، سرین موجود در جایگاه فعال نقش نوکلئوفیل را دارد و مکانیزم مشابه سیستئین پروتئازها دارند و برخی از آن‌ها از نظر تکاملی با سیستئین پروتئازها ارتباط دارند. سرین پروتئازها بزرگترین کلاس آنزیم‌های پروتئولیتیک در گیاهان را تشکیل می‌دهند (Van der Hoorn, 2008). سرین پروتئازها معمولاً به عنوان آنزیم‌های تجزیه کننده عمل می‌کنند. با این حال سوبتیلازهای گیاهی[۲۱۵] (سرین پروتئازهای شبه سوبتیلیزین) در چندین فرایند فیزیولوژیکی از جمله همزیستی، عفونت سلول‌های گیاهی، پاتوژنز در گیاهان آلوده به ویروس، جوانه زنی، پیام رسانی، تمایز بافت، زایلوژنز، پیری و مرگ برنامه ریزی شده سلولی نقش دارند (Sebastián et al., 2018). کوکومیسین شناخته شده‌ترین سرین پروتئازی است که از خربزه بدست می‌آید (D'Ipólito Sebastián et al., 2018). این آنزیم در فرایند هیدرولیز کلاژن جهت به دست آوردن ژلاتین، دلمه کردن شیر و سنتز دی پپتیدها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Silva-López and Gonçalves, 2019). پروتئاز شبه کوکومیسین از میوه کاچری به عنوان نرم کننده گوشت در شبه قاره هند استفاده می‌شود (Asif-Ullah et al., 2006). میلین[۲۱۶] سرین پروتئازی با وزن مولکولی ۷۵ کیلو دالتون می‌باشد که از لاتکس گیاه افوربیا میلی[۲۱۷] استخراج می‌شود. دما و pH بهینه این پروتئاز به ترتیب ۳۵ درجه سانتی گراد و ۹ می‌باشد. میلین به طور گسترده‌ای به عنوان یک عامل نرم کننده و به عنوان داروی ضد انعقاد استفاده می‌شود (Moro et al.,

[211] *Oryza sativa*
[212] *Cucumis sativus*
[213] *Withania coagulans*
[214] *Lycopersicon esculentum*
[215] Plant subtilases
[216] Miliin
[217] *Euphorbia milii*

2013). علاوه براین میلین کاندیدای خوبی برای کاربرد در صنایع غذایی است (Schall et al., 2001). ریتین[۲۱۸] سرین پروتئازی با وزن مولکولی ۵۷.۹ کیلودالتون است که از لاتکس ریتیا تینتوریا[۲۱۹] بدست می‌آید. دما و pH بهینه آنزیم به ترتیب ۷۰ درجه سانتی گراد و ۷.۵ تا ۱۰ می باشد. ریتین دارای پتانسیل مناسب برای استفاده در صنایع غذایی است (Tomar et al., 2008).

۱-۸- متالوپروتئازهای گیاهی

به آنزیم هایی که حاوی فلز هستند و فعالیت کاتالیتیک آن‌ها وابسته به کاتیون‌های دو ظرفیتی روی، کبالت، نیکل و کلسیم است متالوپروتئاز می‌گویند. با توجه به مطالعات انجام شده، جایگاه کاتالیتیک این گروه از آنزیم‌ها شامل باقیمانده‌های (Tyr,Trp) می‌باشد. اکثر متالوپروتئازهای قارچی و باکتریایی حاوی یون‌های روی هستند. روی برای فعالیت آنزیمی و کلسیم برای پایداری ساختار پروتئین ضروری می‌باشد. فعالیت متالوپروتئازها در محدوده pH ۵-۹ اپتیمم می‌باشد و با عوامل شلات کننده مانند EDTA و گاهی اوقات با فرآیند ساده دیالیز مهار می‌شوند ولی نسبت به مهارکننده‌های سیستئین یا سولفیدریل حساس نیستند (Naveed et al., 2021), (Kumar, 2020). در گیاهان متالوپروتئازها در گره‌زایی، تمایز پلاستید، مقاومت به گرما[۲۲۰]، تنظیم اندازه مریستم ریشه و اندام هوایی، حساسیت به ترکیبات اکسین و میوز نقش دارند (Sjögren et al., 2006). لوسین آمینوپپتیدازها نوعی متالوپروتئاز می باشند که در همه گونه‌ها یافت می‌شوند، این آنزیم‌ها در تنظیم نیمه عمر پروتئین در گیاهان نقش دارند، که تا حد زیادی تحت تاثیر باقی‌مانده آمینواسید انتهای آمینو قرار دارد (D'Ipólito Sebastián et al., 2018).

۱-۹- کاربردهای صنعتی پروتئازهای گیاهی

هیدرولیز پروتئین‌ها کاربردهای مختلفی در بسیاری از فرایندهای بیوتکنولوژیکی دارد. تمام آنزیم‌های پروتئولیتیک از جمله پروتئازهای گیاهی با توجه به دما، pH، حضور یا عدم حضور یک یون و دیگر فاکتورهای موثر، ویژگی‌های خاصی را نشان می‌دهند. این ویژگی‌ها کاربرد پروتئازها را در صنایع مختلفی از جمله تولید فرآورده‌های لبنی، تولید مواد غذایی، مواد شوینده و داروسازی تعیین می‌کنند (Roca et al., 2008, Folgado and Abranches, 2020). در ادامه به برخی از مهم‌ترین کاربردهای پروتئازهای گیاهی در صنایع مختلف اشاره می‌شود.

۱-۱۰- صنعت تولید فرآورده‌های لبنی

انعقاد شیر توسط آنزیم یک مرحله اساسی در تولید اکثر پنیرهاست و افزودن رنت یا مواد منعقد کننده به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. کیموزین اصلی‌ترین و قدیمی‌ترین آنزیم مورد استفاده برای انعقاد شیر است که در رنت گوساله‌ای وجود دارد و به طور گسترده در تولید پنیر استفاده می شود (Abebe and Emire, 2020). گیاهان منبع جذابی از آنزیم‌های منعقد کننده شیر هستند. از مهمترین انواع پروتئازهای گیاهی که در صنعت تولید لبنیات استفاده می‌شوند می‌توان به آسپارتیک پروتئازها اشاره نمود که از میوه، برگ و گل بسیاری از گیاهان از جمله گونه های سینارا کاردونکولوس[۲۲۱] (Silva et al., 2021) و ویتانیا کواگیولانس[۲۲۲] (Kazemipour et al., 2017, Salehi et al., 2017) بدست می‌آیند. علاوه بر آسپارتیک پروتئازها انواع دیگری از

[218] Wrightin
[219] *Wrightia tinctoria*
[220] Thermotolerance
[221] *Cynara cardunculus*
[222] *Withania coagulans*

پروتئازها نیز در این صنعت حائز اهمیت می‌باشند؛ به عنوان مثال فیسین که نوعی سیستئین پروتئاز بوده و از لاتکس درخت انجیر[۲۲۳] به دست می‌آید، فعالیت کاتالیزوری قوی دارد بطوری‌که می‌توان از آن در صنعت لبنیات جهت هیدرولیز پروتئین‌های موجود در شیر و تولید فراورده‌های گوناگون از جمله تولید شیر خشک نوزادان استفاده کرد. این توانایی در هیدرولیز پروتئین‌های شیر از اهمیت خاصی برخوردار است زیرا به میزان زیادی حساسیت زایی آن را کاهش می‌دهد (Aider, 2021).

۱-۱۱- صنعت پخت و پز

گندم یکی از بزگترین غلات برداشت شده در جهان است؛ با این وجود برخی پروتئین‌ها در ساختار گندم موجب آلرژی و حساسیت در برخی کودکان و بزرگسالان می‌شود. برای حل این مشکل از پاپائین برای تولید آرد ضد حساسیت استفاده می‌شود. پروتئازهای گیاهی در صنعت پخت و پز برای هیدرولیز کردن گلوتن استفاده می‌شوند، بنابراین توده پخت ممکن است راحت‌تر آماده شود (Feijoo-Siota and Villa, 2011). بروملین نیز برای تولید آرد ضد حساسیت بکار می‌رود، چراکه توانایی شکست گلوتنین گندم را دارد. همچنین پروتئازهای گیاهی در تولید مواد افزودنی کاربرد دارند، به دلیل این‌که مواد افزودنی در این صنعت موجب افزایش کیفیت غذا، جلوگیری از فاسد شدن غذا (ناشی از رشد میکرو ارگانیسم‌ها)، خوش طعم و سالم کردن غذا، افزایش ارزش غذایی، حفظ pH مناسب، جلوگیری از تخمیر شدن و حفظ رنگ و بوی مواد غذایی می‌شوند (Nitu and Sukhwinder, 2019, Kumar, 2020).

۱-۱۲- نرم کردن گوشت

نرم کردن گوشت یک فرآیند پیچیده می‌باشد بطوری‌که مکانیسم‌های متعددی در آن دخیل هستند که عبارتند از: تخریب کلاژن و میوفیبرین، کاهش قطر دسته‌های فیبر عضلانی، تغییر در طول سارکومر و تغییرات شیمیایی و ساختاری که در طول پیری رخ می‌دهند (Madhusankha and Thilakarathna, 2020). لطافت و کیفیت گوشت برای مصرف کنندگان گوشت بسیار مهم است. از مواد شیمیایی مختلف به منظور نرم کردن گوشت استفاده می‌شود. با این حال، استفاده از ترکیبات شیمیایی معایب خاصی در ویژگی‌های حسی گوشت ایجاد می‌کند. از نرم کننده‌های طبیعی ممکن است برای کاهش اثرات نامطلوب مواد شیمیایی استفاده شود. نرم کننده‌های طبیعی، برخی سبزیجات و میوه‌های حاوی آنزیم‌های پروتئولیتیک هستند که مسئول نرم شدن گوشت می‌باشند. پروتئازهای گیاهی تاثیر مطلوبی بر کیفیت گوشت دارند. آنزیم‌های گیاهی (از جمله پاپائین، فیسین، کاپلین و بروملین) به‌عنوان نرم‌کننده‌های گوشت به‌طور کامل مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. ۹۵ درصد از آنزیم‌های نرم کننده گوشت که در ایالات متحده استفاده می‌شوند، منشا گیاهی دارند. استفاده کارآمد از چنین آنزیم‌هایی در گوشت خام مستلزم تعیین کینتیک و ویژگی‌های آنزیمی و همچنین درک تأثیر شرایط محیطی گوشت (pH، دما) بر عملکرد آنزیم است (Ikram et al). مطالعات انجام‌شده نشان داده است که پاپائین بیشترین توانایی را در بهبود نرمی گوشت دارد، اگرچه باید احتیاط کرد زیرا آبدار بودن و تغییرات بافتی می‌تواند تأثیر منفی بگذارد. بروملین حساسیت را افزایش می دهد و کلاژن را بیشتر از پروتئین‌های انقباضی تجزیه می‌کند، در حالی که فیسین متعادل‌ترین تخریب پروتئین‌های میوفیبریلار و کلاژن را ایجاد می‌کند. از پاپائین و بروملین برای تولید سس‌های مختلف و ژامبون خشک شده نیز استفاده می‌شود (Feijoo-Siota and Villa, 2011).

[223] *Ficus carica*

۱-۱۳- صنعت آبجو و مشروب سازی

در این صنعت از پروتئازها برای استخراج پروتئین‌ها از موادی مانند مالت و جو و همچنین جهت بدست آوردن مقدار مناسبی از مواد مغذی مانند نیتروژن استفاده می‌شود. در صنعت آبجو و مشروب سازی از پروتئازهای پاپائین، بروملین و فیسین برای بدست آوردن خواص کلوئیدی خوب در دماهای پایین استفاده می‌شود، در حال حاضر، به دلیل رایج بودن استفاده از آبجوهای بدون مواد افزودنی در برخی کشورهای اروپایی، پروتئازها چندان مورد استفاده قرار نمی‌گیرند (Naveed et al., 2021).

۱-۱۴- صنعت شستشو

از پروتئازهای گیاهی بطور گسترده‌ای در مواد شوینده و پاک کننده استفاده می‌شود (حدود ۳۰ درصد)؛ این پروتئازها در مقابل حرارت و pH بالا مقاوم هستند و موجب کاهش زباله‌های سمی می‌شوند. هم اکنون ۵۰ سال است که از پروتئازها در این صنعت استفاده می‌شود. به عنوان مثال از پروتئاز اسپیلوسما در پاک کردن لکه خون استفاده می‌شود. این آنزیم نه تنها باعث از بین رفتن لکه خون می‌شود بلکه اجزای دیگری همچون پروتئین‌های ترشح شده از بدن و مواد غذایی پروتئینی مانند تخم مرغ، گوشت، ماهی و شیر را هم از بین می‌برد. آنزیم‌هایی که در صنعت شستشو استفاده می‌شوند باید شامل خواصی همچون پایداری و فعال بودن در حین شستشو و پایداری مناسب در دمای بالا و pH های قلیایی باشند (Suleria et al., 2019). فعالیت پروتئازها برای ازبین بردن لکه‌های سخت به این صورت است که مولکول‌های پروتئینی بزرگ را با مکانیسم قیچی مانند خود به هزاران قطعه هیدرولیز کرده و لکه روی لباس را از بین می‌برند (Naveed et al., 2021).

۱-۱۵- صنعت چرم

استفاده از روش‌های سنتی برای حذف مو و چسبیدن ناخواسته مواد شیمیایی به لایه زیرجلدی دارای برخی پیامدهای منفی است که از جمله می‌توان به آزاد شدن برخی گازهای سمی و مضر اشاره کرد که موجب خفگی می‌شوند. پروتئازهای گیاهی هم اکنون در صنعت چرم‌سازی جایگزین روش‌های شیمیایی شده‌اند. این آنزیم‌ها موجب کاهش آلودگی و افزایش کیفیت چرم می‌شوند. از مواد شیمیایی می‌توان به سدیم سولفید و سدیم هیدروکسید اشاره کرده که توسط پروتئازهای قلیایی جایگزین شده است(Gurumallesh et al., 2019).

۱-۱۶- کاربردهای دارویی و درمانی

آنزیم‌ها جزء اهداف اصلی در طراحی دارو و درمان بیماری‌ها هستند که ازجمله می‌توان به پروتئازها اشاره کرد. پروتئازهای گیاهی به‌طور وسیعی در درمان زخم، سرطان، اختلالات گوارشی و بیماری‌های عفونی دخالت دارند. به طور مثال آنزیم پاپائین در درمان ادم، سینوزیت آلرژیک، سندروم روده تحریک پذیر، عدم تحمل به گلوتن و پوسیدگی نقش دارد و همچنین دارای فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی نیز می‌باشد. آنزیم‌های بروملین و پاپائین فعالیت ضد توموری نیز از خود نشان داده‌اند که با مهار NFκB/AMPK و سایر پروتئین های پیامرسان پایین دست مانند ERK، AKT و Stat3 روی تکثیر، تهاجم و مهاجرت تومور تاثیر می‌گذارند (Silva-López and Gonçalves, 2019).

۱-۱۷- فعالیت ضد التهابی

امروزه ثابت شده است که جلوگیری از التهاب مزمن می‌تواند از بروز سرطان و پیشرفت آن جلوگیری کند چرا که التهاب در ایجاد سرطان در طی ترانسفورماسیون سلولی، تکثیر، رگ زایی، تهاجم و متاستاز نقش دارد. آنزیم بروملین سطح بیان آنزیم سیکلواکسیژناز۲ و پروستاگلاندین E2 را در رده سلول میکروگلیال موش و منوسایتیک لوسمی انسان کاهش می‌دهد و از این طریق میزان التهاب و بروز سرطان کاهش پیدا می‌کند. بروملین سیستم ایمنی را برای پاسخ‌های سریع به استرس‌های سلولی فعال می‌کند همینطور میزان ترشح واسطه‌های التهابی مانند IL-1β، IL-6 و TNF-α را هنگامی که سلول‌های ایمنی در شرایط التهاب طی فرایند تولید بیش از حد سایتوکاین‌ها تحریک می‌شوند را کاهش می‌دهد (Rathnavelu et al., 2016). طبق برخی مطالعات انجام شده بروملین با کاهش التهاب در سیستم تنفسی (از طریق جلوگیری از ورود لکوسیت‌ها و ائوزینوفیل‌ها به ریه و راه‌های هوایی) عملکرد تنفسی را بهبود می‌بخشد و در نهایت مانع گسترش برونشیت و سندروم دیسترس تنفسی[۲۲۴] (RDS) می‌شود. علاوه بر این نشان داده شده است که آنزیم بروملین دارای اثرات ضد درد می باشد و به طور مداوم برای درمان آرتروز، دردهای عضلانی، درد اپیزیوتومی و درد پرینه کاربرد دارد (Owoyele et al., 2020). پاپائین دارای اثرات ضد التهاب و ضد درد بدون عوارض جانبی روی علائم آلرژیک حاد مانند دندان درد و سردرد می‌باشد (Olmoss, 2012). همچنین کاهش اثرات جانبی التهابی مربوط به رادیوتراپی (موکوزیت و واکنش پوستی) در مبتلایان به سرطان سر و گردن برای این آنزیم گزارش شده است (Pandey et al., 2016). پاپائین، بروملین و فیسین به عنوان داروهای ضدالتهابی برای جایگزینی گلوکوکورتیکوئیدها و ضد روماتیسم غیراستروئیدی استفاده شده‌اند (Feijoo-Siota and Villa, 2011).

۱-۱۸- فعالیت ضد سرطان

طبق مطالعات انجام شده، بروملین یک ضد سرطان بالقوه می‌باشد زیرا با دخالت در آغاز آپوپتوز در سلول‌های سرطان پستان باعث مرگ آن‌ها شده و از رشد سلول‌های سرطان پستان جلوگیری می‌کند و همینطور باعث افزایش سمیت سلول‌های مونوسیتیک در بیماران مبتلا به سرطان پستان می‌شود. در سرطان ملانوما و اپیدرموئید بروملین نه تنها موجب سرکوب متاستاز سلول‌های سرطانی ملانوما و آپوپتوز می‌شود بلکه میزان تکثیر سلول‌های سرطانی و بیان سیکلواکسیژناز۲ را نیز کاهش می‌دهد (Chakraborty et al., 2021).

۱-۱۹- فعالیت ضد ویروسی و میکروبی

علائم عصبی در بیماری COVID-19 شامل سردرد، تب و خستگی می‌باشد که بروملین با مهار پروستاگلاندین E2 و کینین‌ها این علائم را بهبود می‌بخشد. علاوه براین با هدایت تعادل به سمت تولید آنتی اکسیدان‌ها نسبت به اکسیدان‌ها، تخریب بافتی را در این بیماری محدود می‌کند (Sayıner et al.). بروملین اثرات بالقوه‌ای را در پیشگیری عفونت ناشی از باکتری انتروتوکسیژنیک اشرشیا کلی نشان داده است بطوری‌که مانع رشد باکتری‌های روده‌ای مانند ویبریو کلرا[۲۲۵] و ای‌کلی شده است. همچنین گزارش شده است که بروملین دارای اثر سینرژیک با آنتی بیوتیک‌ها می باشد. علاوه براین با استفاده از آنزیم بروملین بیماری پوستی Pityriasis Lichenoides Chronica درمان شده است (Arefin et al., 2020).

[224] Respiratory distress syndrome
[225] *Vibrio cholera*

۲. نتیجه گیری

امروزه صـــدها پروتئاز مختلف در موجودات زنده شـــناســـایی شـــده‌اند که همه آن‌ها دارای قابلیت هیدرولیز پیوندهای پپتیدی در پروتئین‌ها هستند. با این حال، پروتئازها از نظر ویژگی سوبسترا، pH و دمای بهینه و سایر پارامترهایی که خواص آنها را منحصر به فرد می‌کند، متفاوت هستند. پروتئازهای گیاهی به دلیل فعالیت در طیف وسیعی از دما، pH و عملکرد روی سوبستراهای مختلف توجه بیوتکنولوژیست‌ها را در سراسر جهان به خود جلب کرده‌اند. در سال‌های اخیر پروتئازهای گیاهی جدیدی شناسایی شده‌اند که خواص امیدوارکننده‌ای را برای کاربردشان نشان می‌دهند. تاکنون، پاپائین، بروملین و فیسین در سطح صنعتی جزء پروتئازهای گیاهی شناخته شده هستند. این آنزیم‌های هیدرولیتیک به طور موثر در صنایع مختلف از قبیل صنایع غذایی، شوینده و دارویی استفاده می‌شوند. با توجه به این ویژگی‌های خاص، پروتئازها یک کلاس نوظهور از آنزیم‌ها هستند که کاربردهای پزشکی متنوعی دارند. همچنین نیاز مبرمی به شناسایی منابع جدید برای پروتئازهای کارآمد، پایدار و قابل استفاده مجدد برای کاربردهای صنعتی متنوع وجود دارد.

منابع

Abebe, B., & Emire, S. (2020). Manufacture of fresh cheese using east African Calotropis procera leaves extract crude enzyme as milk coagulant. Food Science & Nutrition, 8(9), 4831-4842 .

Afsharnezhad, M., Shahangian, S. S., Salehi, M., & Sariri, R. (2019). Effect of Organic Solvents and Osmolytes on the Activity and Stability of the Protease Purified from Ficus johannis. Modares Journal of Biotechnology, 10(4), 535-543 .

Afsharnezhad, M., Shahangian, S. S., & Sariri, R. (2019). A novel milk-clotting cysteine protease from Ficus johannis: Purification and characterization. International journal of biological macromolecules, 121, 173-182 .

Agboola, S., Chen, S., & Zhao, J. (2004). Formation of bitter peptides during ripening of ovine milk cheese made with different coagulants. Le Lait, 84(6), 567-578 .

Ahmadi, S., Salehi, M., & Ausi, S. (2021). Kinetic and thermodynamic study of aspartic protease extracted from Withania coagulans. International Dairy Journal, 116, 104960 .

Aider, M. (2021). Potential applications of ficin in the production of traditional cheeses and protein hydrolysates. JDS Communications. doi:10.3168/jdsc.2020-0073

AREFIN, P., HABIB, M. S., AREFIN, A., & AREFIN, M. S. (2020). A review of clinical uses of Bromelain and concerned purification methods to obtain its pharmacological effects efficiently. International Journal of Pharmaceutical Research (1.(

Arshad, Z. I. M., Amid, A., Yusof, F., Jaswir, I., Ahmad, K., & Loke, S. P. (2014). Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. Applied microbiology and biotechnology, 98(17), 7283-7297 .

Asif-Ullah, M., Kim, K.-S., & Yu, Y. G. (2006). Purification and characterization of a serine protease from Cucumis trigonus Roxburghi. Phytochemistry, 67(9), 870-875 .

Blow, D. M. (1976). Structure and mechanism of chymotrypsin. Accounts of chemical research, 9(4), 145-152 .

Butts, C. T., Zhang, X., Kelly, J. E., Roskamp, K. W., Unhelkar, M. H., Freites, J. A., Martin, R. W. (2016). Sequence comparison, molecular modeling, and network analysis predict structural diversity in cysteine proteases from the Cape sundew, Drosera capensis. Computational and structural biotechnology journal, 14, 271-282 .

Chakraborty, A. J., Mitra, S., Tallei, T. E., Tareq, A. M., Nainu, F., Cicia, D., Capasso, R. (2021). Bromelain a potential bioactive compound: a comprehensive overview from a pharmacological perspective. Life, 11(4), 317 .

D'Ipólito Sebastián, M. G. G., Rocío, T. F., & Virginia, T. C. (2018). An Overview of Plant Proteolytic Enzymes. Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes, 1 .

Darabi, M., & Seddigh, S. (2015). Bioinformatic characterization of aspartic protease (AP) enzyme in seed plants. Plant systematics and evolution, 301(10), 2399-2417 .

Domsalla, A., & Melzig, M. F. (2008). Occurrence and properties of proteases in plant latices. Planta medica, 74(07), 699-711 .

Dunn, B. M. (2002). Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. Chemical reviews, 102(12), 4431-4458 .

Feijoo-Siota, L., & Villa, T. G. (2011). Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. Food and Bioprocess Technology, 4(6), 1066-1088 .

Figueiredo, L., Santos, R. B., & Figueiredo, A. (2021). Defense and offense strategies: the role of aspartic proteases in plant–pathogen interactions. Biology, 10(2), 75 .

Folgado, A., & Abranches, R. (2020). Plant Aspartic Proteases for Industrial Applications: Thistle Get Better. Plants, 9(2), 147. doi:10.3390/plants9020147

Freitas, A., Baleeiro, F., Fonseca, R., Neto, V. B., Pinto, G., & Farinas, C. (2015). Bioprocess development to add value to canola cake used as substrate for proteolytic enzyme production. Food and Bioproducts Processing, 95, 173-182 .

González-Velázquez, D. A., Mazorra-Manzano, M. A., Martínez-Porchas, M., Huerta-Ocampo, J. A., Vallejo-Córdoba, B., Mora-Cortes, W. G., Ramírez-Suarez, J. C. (2021). Exploring the milk-clotting and proteolytic activities in different tissues of Vallesia glabra: a new source of plant proteolytic enzymes. Applied biochemistry and biotechnology, 193(2), 389-404 .

Gurumallesh, P., Alagu, K., Ramakrishnan, B., & Muthusamy, S. (2019). A systematic reconsideration on proteases. International journal of biological macromolecules, 128, 254-267 .

Ikram, A., Ambreen, S., Tahseen, A., Azhar, A., Tariq, K., Liaqat, T., Nasir, N. Meat Tenderization through Plant Proteases-A Mini Review .

Kazemipour, N., Salehi Inchebron, M., Valizadeh, J., & Sepehrimanesh, M. (2017). Clotting characteristics of milk by Withania coagulans: Proteomic and biochemical study. International Journal of Food Properties, 20(6), 1290-1301 .

Khan, F. (2013). New microbial proteases in leather and detergent industries. Innov Res Chem, 1(1), 1-6.

Abebe, B., & Emire, S. (2020). Manufacture of fresh cheese using east African Calotropis procera leaves extract crude enzyme as milk coagulant. Food Science & Nutrition, 8(9), 4831-4842 .

Afsharnezhad, M., Shahangian, S. S., Salehi, M., & Sariri, R. (2019). Effect of Organic Solvents and Osmolytes on the Activity and Stability of the Protease Purified from Ficus johannis. Modares Journal of Biotechnology, 10(4), 535-543 .

Afsharnezhad, M., Shahangian, S. S., & Sariri, R. (2019). A novel milk-clotting cysteine protease from Ficus johannis: Purification and characterization. International journal of biological macromolecules, 121, 173-182 .

Agboola, S., Chen, S., & Zhao, J. (2004). Formation of bitter peptides during ripening of ovine milk cheese made with different coagulants. Le Lait, 84(6), 567-578 .

Ahmadi, S., Salehi, M., & Ausi, S. (2021). Kinetic and thermodynamic study of aspartic protease extracted from Withania coagulans. International Dairy Journal, 116, 104960 .

Aider, M. (2021). Potential applications of ficin in the production of traditional cheeses and protein hydrolysates. JDS Communications. doi:10.3168/jdsc.2020-0073

AREFIN, P., HABIB, M. S., AREFIN, A., & AREFIN, M. S. (2020). A review of clinical uses of Bromelain and concerned purification methods to obtain its pharmacological effects efficiently. International Journal of Pharmaceutical Research (1.(

Arshad, Z. I. M., Amid, A., Yusof, F., Jaswir, I., Ahmad, K., & Loke, S. P. (2014). Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. Applied microbiology and biotechnology, 98(17), 7283-7297 .

Asif-Ullah, M., Kim, K.-S., & Yu, Y. G. (2006). Purification and characterization of a serine protease from Cucumis trigonus Roxburghi. Phytochemistry, 67(9), 870-875 .

Blow, D. M. (1976). Structure and mechanism of chymotrypsin. Accounts of chemical research, 9(4), 145-152 .

Butts, C. T., Zhang, X., Kelly, J. E., Roskamp, K. W., Unhelkar, M. H., Freites, J. A., Martin, R. W. (2016). Sequence comparison, molecular modeling, and network analysis predict structural diversity in cysteine proteases from the Cape sundew, Drosera capensis. Computational and structural biotechnology journal, 14, 271-282 .

Chakraborty, A. J., Mitra, S., Tallei, T. E., Tareq, A. M., Nainu, F., Cicia, D., Capasso, R. (2021). Bromelain a potential bioactive compound: a comprehensive overview from a pharmacological perspective. Life, 11(4), 317 .

D'Ipólito Sebastián, M. G. G., Rocío, T. F., & Virginia, T. C. (2018). An Overview of Plant Proteolytic Enzymes. Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes, 1 .

Darabi, M., & Seddigh, S. (2015). Bioinformatic characterization of aspartic protease (AP) enzyme in seed plants. Plant systematics and evolution, 301(10), 2399-2417 .

Domsalla, A., & Melzig, M. F. (2008). Occurrence and properties of proteases in plant latices. Planta medica, 74(07), 699-711 .

Dunn, B. M. (2002). Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. Chemical reviews, 102(12), 4431-4458 .

Feijoo-Siota, L., & Villa, T. G. (2011). Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. Food and Bioprocess Technology, 4(6), 1066-1088 .

Figueiredo, L., Santos, R. B., & Figueiredo, A. (2021). Defense and offense strategies: the role of aspartic proteases in plant–pathogen interactions. Biology, 10(2), 75 .

Folgado, A., & Abranches, R. (2020). Plant Aspartic Proteases for Industrial Applications: Thistle Get Better. Plants, 9(2), 147. doi:10.3390/plants9020147

Freitas, A., Baleeiro, F., Fonseca, R., Neto, V. B., Pinto, G., & Farinas, C. (2015). Bioprocess development to add value to canola cake used as substrate for proteolytic enzyme production. Food and Bioproducts Processing, 95, 173-182 .

González-Velázquez, D. A., Mazorra-Manzano, M. A., Martínez-Porchas, M., Huerta-Ocampo, J. A., Vallejo-Córdoba, B., Mora-Cortes, W. G., Ramírez-Suarez, J. C. (2021). Exploring the milk-clotting and proteolytic activities in different tissues of Vallesia glabra: a new source of plant proteolytic enzymes. Applied biochemistry and biotechnology, 193(2), 389-404 .

Gurumallesh, P., Alagu, K., Ramakrishnan, B., & Muthusamy, S. (2019). A systematic reconsideration on proteases. International journal of biological macromolecules, 128, 254-267 .

Ikram, A., Ambreen, S., Tahseen, A., Azhar, A., Tariq, K., Liaqat, T., Nasir, N. Meat Tenderization through Plant Proteases-A Mini Review .

Kazemipour, N., Salehi Inchebron, M., Valizadeh, J., & Sepehrimanesh, M. (2017). Clotting characteristics of milk by Withania coagulans: Proteomic and biochemical study. International Journal of Food Properties, 20(6), 1290-1301 .

Khan, F. (2013). New microbial proteases in leather and detergent industries. Innov Res Chem, 1(1), 1-6 .

Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. Current opinion in biotechnology, 13(4), 345-351 .

Kumar, S. (2020). Biotechnology Bioscience.

Madhusankha, G., & Thilakarathna, R. (2020). Meat tenderization mechanism and the impact of plant exogenous proteases: A review. Arabian Journal of Chemistry, 102967 .

Masi, C., Gemechu, G., & Tafesse, M. (2021). Isolation, Screening, Characterization and Identification of Alkaline Protease Producing Bacteria from Leather Industry Effluent .

Mazorra-Manzano, M., Ramírez-Suarez, J., & Yada, R. (2018). Plant proteases for bioactive peptides release: A review. Critical reviews in food science and nutrition, 58(13), 2147-2163 .

Mishra, S. S., Ray, R. C., Rosell, C. M., & Panda, D.(2017) .Microbial enzymes in food applications: history of progress. In Microbial enzyme technology in food applications (pp. 3-18): CRC Press.

Moro, L. P., Cabral, H., Okamoto, D. N., Hirata, I., Juliano, M. A., Juliano, L., & Bonilla-Rodriguez, G. O. (2013). Characterization, subsite mapping and N-terminal sequence of miliin, a serine-protease isolated from the latex of Euphorbia milii. Process Biochemistry, 48(4), 633-637 .

Naveed, M., Nadeem, F., Mehmood, T., Bilal, M., Anwar, Z., & Amjad, F. (2021). Protease—a versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: an updated review. Catalysis Letters, 151(2), 307-323 .

Nitu, T., & Sukhwinder, K. (2019). Plant proteases: sources, production methods and various commercial applications. Agriways, 7(1), 50-57 .

Olmoss, A. (2012). papain, a plant enzyme of biological impoetance, American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 8(2), 99-104 .

Owoyele, V., Bakare, A., & Ologe, M. (2020). Bromelain: A Review on its Potential as a Therapy for the Management of Covid-19. Nigerian Journal of Physiological Sciences, 35(1), 10-19 .

Pais, M. S., da Conceicao Calixto, F., Planta, R., & Planta, K. (2006). Production by yeasts of aspartic proteinases from plant origin with sheep's, cow's, goat's milk, etc. clotting and proteolytic activity. In: Google Patents.

Pandey, S., Cabot, P. J., Shaw, P. N., & Hewavitharana, A. K. (2016). Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of Carica papaya. Journal of Immunotoxicology, 13(4), 590-602.

Rathnavelu, V., Alitheen, N. B., Sohila, S., Kanagesan, S., & Ramesh, R. (2016). Potential role of bromelain in clinical and therapeutic applications. Biomedical reports, 5(3), 283-288 .

Rawlings, N., Barrett, A., & Bateman, A. (2010). MEROPS: the peptidase database. Nucleic 656 Acids Res. 38. D227–D233, 657.

Reis, P. J., & Malcata, F. X. (2011). Current state of Portuguese dairy products from ovine and caprine milks. Small Ruminant Research, 101(1-3), 122-133 .

Roca, M., Messer, B., Hilvert, D., & Warshel, A. (2008). On the relationship between folding and chemical landscapes in enzyme catalysis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(37), 13877-13882 .

Sabalza, M., Christou, P., & Capell, T. (2014). Recombinant plant-derived pharmaceutical proteins: current technical and economic bottlenecks. Biotechnology letters, 36(12), 2367-2379 .

Salas, C. E., Gomes, M. T., Hernandez, M., & Lopes, M. T. (2008). Plant cysteine proteinases: evaluation of the pharmacological activity. Phytochemistry, 69(12), 2263-2269 .

Salehi, M., Aghamaali, M., Hasansajedi, R., Asghari, S., & Jorjani, E. (2019). Effect of Metal Ions on Activity, Stability, and Structure of Purified Aspartic Protease from Paneerbad. Modares Journal of Biotechnology, 10(1), 53-60 .

Salehi, M., Aghamaali, M. R., Sajedi, R. H., Asghari, S. M., & Jorjani, E. (2017). Purification and characterization of a milk-clotting aspartic protease from Withania coagulans fruit. International journal of biological macromolecules . 98(1), 847-854.

Sayıner, S., Velioğlu-Öğünç, A., & Özer, A. Bromelain: A potential therapeutic application in SARS-CoV-2 infected patients .

Schall, V. n. T., Vasconcellos, M. c. C., Rocha, R. S., Souza, C. l. P., & Mendes, N. M. (2001). The control of the schistosome-transmitting snail Biomphalaria glabrata by the plant Molluscicide Euphorbia splendens var. hislopii (syn milli Des. Moul): a longitudinal field study in an endemic area in Brazil. Acta tropica, 79(2), 165-170 .

Sebastián, D. I., Guevara, M. G., Rocío, T. F., & Virginia, T. C. (2018). An overview of plant Proteolytic enzymes. Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes, 1-19 .

Silva-López, R., & Gonçalves, R. (2019). Therapeutic proteases from plants: biopharmaceuticals with multiple applications. J Appl Biotech Bioeng, 6, 101-109 .

Silva, G. M. d. S., Costa, J. S. d., Freire, J. O., Santos, L. S., & Bonomo, R. C. F. (2021). Artichoke leaf extracts: Proteolytic activity, coagulant and HPLC analysis. Ciência e Agrotecnologia, 4, 5.

Simões, I., & Faro, C. (2004). Structure and function of plant aspartic proteinases. European journal of biochemistry, 271(11), 2067-2075 .

Singh, M. K., & Bindhu, O. (2020). Plant latex: a rich source of haemostatic proteases. In Herbal Medicine in India (pp. 143-153): Springer.

Singhal, P., Nigam, V., & Vidyarthi, A. (2012). Studies on production, characterization and applications of microbial alkaline proteases. International Journal of Advanced Biotechnology and Research, 3(3), 653-669 .

Sjögren, L. L., Stanne, T. M., Zheng, B., Sutinen, S., & Clarke, A. K. (2006). Structural and functional insights into the chloroplast ATP-dependent Clp protease in Arabidopsis. The Plant Cell, 18(10), 2635-2649 .

Song, P., Cheng, L., Tian, K., Zhang, M., Mchunu, N. P., Niu, D., Wang, Z.-X. (2020). Biochemical characterization of two new Aspergillus niger aspartic proteases. 3 Biotech, 10(7), 1-9 .

Suleria, H. A. R., Goyal, M. R., & Butt, M. S. (2019). Phytochemicals from Medicinal Plants: Scope, Applications, and Potential Health Claims: CRC Press.

Sulistyaningtyas, A., Baldivia, A., Mukaromah, A., Safitri, R., Pamaya, D., Lestari, D., Mony, N. (2021). Food-grade protease producing bacteria isolated from Indonesian soybean tempe gembus and red oncom after prolonged fermentation. Paper presented at the IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.

Tavano, O. L., Berenguer-Murcia, A., Secundo, F., & Fernandez-Lafuente, R. (2018). Biotechnological applications of proteases in food technology. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 17(2), 412-436 .

Tomar, R., Kumar, R., & Jagannadham, M. (2008). A stable serine protease, wrightin, from the latex of the plant Wrightia tinctoria (Roxb.) R. Br.: purification and biochemical properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(4), 1479-1487 .

Van der Hoorn, R. A. (2008). Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. Annu. Rev. Plant Biol., 59, 191-223 .

van der Hoorn, R. A., & Klemenčič, M. (2021). Plant proteases: from molecular mechanisms to functions in development and immunity. In: Oxford University Press UK.

van der Hoorn, R. A., & Rivas, S. (2018). Unravelling the mode of action of plant proteases. New Phytologist, 218(3), 879-881 .

Veloorvalappil, N. J., Robinson, B. S., Selvanesan, P., Sasidharan, S., Kizhakkepawothail, N. U., Sreedharan, S., Sailas, B. (2013). Versatility of microbial proteases. Advances in enzyme research, 2013 .

Investigation of NEAT1 lncRNA gene expression in tumor and healthy tumor margins of patients with ovarian cancer

Amin Moqadami[1]; Mohammad Khalaj-Kondori[1*]

1- Department of Animal Biology, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran

**Corresponding Author Email address: khalaj49@gmail.com*

Abstract

Long non-coding RNAs (lncRNAs) have recently emerged as effective regulatory agents in biological processes as well as in the formation of tumors. In recent years, much evidence has shown the role of lncRNAs as tumor oncogenes or inhibitors in tumorigenesis. It is important to focus on these lncRNAs and their role in pathogenesis in ovarian cancer. The NEAT1 gene is one of the most important lncRNAs in genomic data that regulates various cancers. NEAT1 is a major target for estrogen receptors and affects the expression of these receptors. Recently, levels of NEAT1 have been reported in a variety of human cancers, including leukemia, colorectal cancer, glioma, hepatocellular carcinoma, lung cancer, breast cancer, and prostate cancer. In this study, samples of 30 tumor tissues of ovarian cancer and 30 healthy marginal tissues of patients with ovarian cancer were collected from Al-Zahra Hospital in Tabriz. RNA of the samples was extracted using RNXplus solution. The quality and quantity of the extracted RNAs were determined using gel electrophoresis and a NanoDrop device. The cDNA was obtained by the Reverse Transcriptase enzyme (Thermo Fisher Scientific). Real-time PCR was used to quantify the expression of NEAT1 transcripts in comparison with the GAPDH gene as an internal control. From the ratio of the threshold cycle of the gene of interest to the GAPDH gene, the relative expression of the gene of interest was obtained from the $2^{-\Delta Ct}$ method. Comparison of the mean expression of NEAT1 gene in ovarian cancer tumor samples and healthy marginal samples showed an increase in NEAT1 gene expression in ovarian cancer tumor tissue compared to healthy tumor margin tissue but this increase was not statistically significant (P-value = 0.2). Researches with more samples, the investigation of molecular mechanisms of NEAT1 in ovarian cancer, and the study of other effects of the molecular mechanisms of NEAT1 in ovarian cancer, and the study of other effective lncRNAs in ovarian cancer can help event and treat this disease.

Keywords: Transcriptase Enzyme, Threshold Cycle, GAPDH Gene, Relative Expression

بررسی بیان ژن lncRNA NEAT1 در بافت های توموری و سالم حاشیه توموری بیماران مبتلا به سرطان تخمدان

امین مقدمی[۱]؛ محمد خلج کندری[۲*]

۱-دانشجوی دکترای ژنتیک مولکولی، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز

۲- دانشیار ژنتیک مولکولی ، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز

*khalaj49@gmail.com **

چکیده

RNAهای بلند غیر کدکننده (lnc RNAs) به تازگی به عنوان عوامل موثر تنظیم کننده در فرایند های زیستی و همچنین در ایجاد تومورها شناخته شده‌اند. در سال‌های اخیر شواهد بسیاری نقش lncRNA ها به عنوان انکوژن یا مهارکننده تومور در تومورزایی را نشان می دهد. متمرکز شدن بر روی lncRNA ها و نقش انها در بیماری زایی در سرطان تخمدان امری مهم است. ژن NEAT1 یکی از مهم‌ترین lncRNA ها ست که نقش تنظیم کننده در سرطان های مختلف دارد.NEAT1 به عنوان یک هدف اصلی برای گیرنده های استروژنی است و در بیان این گیرنده ها تاثیر می‌گذارد. به تازگی سطوح بیانی از NEAT1 در انواع مختلفی از سرطان های مختلف انسانی از جمله لوسمی، سرطان کولورکتال،گلیوم، هپاتوسلولارکارسینوما، سرطان ریه، سرطان پستان و سرطان پروستات گزارش شده است. در این مطالعه نمونه های ۳۰ بافت توموری سرطان تخمدان و ۳۰ بافت حاشیه‌ی سالم از بیماران مبتلا به سرطان تخمدان از بیمارستان الزهرا تبریز جمع آوری شد. RNA نمونه ها به کمک محلول Trizol استخراج شد. کیفیت و کمیت RNA های استخراج شده با استفاده از ژل الکتروفورز و دستگاه نانودراپ مشخص گردید. ساخت cDNA توسط انزیم رونوشت بردار معکوس (Reverse Transcriptase) شرکت Thermo Fisher صورت گرفت. برای بررسی کمی میزان بیان رونوشت های NEAT1، در مقایسه با کنترل داخلی GAPDH از Real Time PCR استفاده گردید. از نسبت سیکل استانه ژن مورد نظر بر ژن GAPDH، مقدار بیان نسبی ژن مورد نظر را از روش $2^{-\Delta Ct}$ به دست آمد. مقایسه میانگین میزان بیان ژن NEAT1 در نمونه های توموری سرطان تخمدان و نمونه های حاشیه‌ی توموری سالم، افزایش بیان ژن NEAT1 در بافت توموری سرطان تخمدان در مقایسه با بافت حاشیه‌ی توموری سالم نشان داد اما این افزایش از نظر آماری معنی دار نبود ($P_{value} = 0.2$). تحقیق با تعداد نمونه های بیشتر، بررسی مکانیسم های مولکولی NEAT1 در سرطان تخمدان و بررسی سایر lncRNAهای تاثیرگذار در سرطان تخمدان می‌تواند کمک شایانی به پیشرفت در زمینه‌ی تشخیص زود هنگام سرطان تخمدان و انجام تمهیدات لازم برای پیشگیری و درمان این بیماری کند.

واژگان کلیدی: آنزیم رونوشت بردار معکوس، سیکل آستانه، ژن GADPH ، بیان نسبی

۱.مقدمه

سـرطان در نتیجه تقسـیم غیر قابل کنترل سـلول ها بوجود می اید که ناشـی از اثرات عوامل محیطی و اختلالات ژنتیکی اسـت. ۴ دسـته از ژن های کلیدی که در هدایت سـلول های سـرطانی نقش دارند شـامل انکوژن ها،ژن های مهار کننده توموری،ژن های ترمیم کننده DNA و ژن های مرگ برنامه ریزی شده هستند. سرطان امروزه یکی از شایع ترین و مهلک ترین بیماری ها است. آمارنشـان می دهد که سـرطان به نوعی بیش از ۱/۳ جمعیت را گرفتار می کند،علت بیش از ۲۰ درصـد مرگ ها اسـت و در کشـور های پیشرفته بیش از ۱۰درصد کل هزینه مراقبت های پزشکی را به خود اختصاص می دهد (Vogelstein and Kinzler, 2004).

تخمدان در زنان عامل ایجاد تخمک می باشـد.تخمدان منبع اصـلی هورمون زنانه اسـتروژن و پروژسـترون نیز می باشـد.هرکدام از تخمدان ها در یک طرف رحم و در ناحیه لگن خاصـره [۲۲۶]قرار می گیرد. سـرطان تخمدان هفتمین سـرطان رایج و هشـتمین علت مرگ ناشی از سرطان در بین زنان است این سرطان در میان سرطان های زنان به قدری کشنده است که تخمین زده می شود در سراسر جهان سالیانه بیش از ۱۴۰۰۰۰ مرگ را در پی خواهد داشت. به دلیل تشخیص دیر هنگام،از جمله کشنده ترین نوع سرطان های زنان محسـوب می شـود و معمولا در این موارد وقتی تشـخیص داده می شـود که بیماری به مراحل پیشـرفته رسـیده اسـت و عمدتا غیر قابل درمان می باشـدانواع مختلفی از سـرطان در تخمدان ممکن اسـت بوجود اید ولی شـایع ترین فرم تومورهای بدخیم تخمدانی از نوع اپیتلیال می باشـد(Jemal et al., 2011). از جمله عوامل خطر و نکاتی که ممکن اسـت احتمال سـرطان را در زنان بالاتر ببرد می توان به افزایش سـن در زنان اشـاره کرد،به طوری که پس از یائسـگی احتمال ابتلا به سـرطان های زنان و از جمله ی انها سـرطان تخمدان بالا می رود(Koshiyama et al., 2014). خطر اینکه یک زن در طول عمر خود به سـرطان تخمدان مبتلا شـود ۱/۵-۱ درصد و مرگ ناشی از ان تقریبا ۵۰ درصد است.ارتباط معکوس سرطان تخمدان با دفعات بارداری و زایمان گزارش شده در حالیکه ارتباط ان با نازایی مسـتقیم اسـت.هم چنین بلوغ زودرس و یائسـگی دیررس خطر ابتلا به سـرطان تخمدان را افزایش می دهد(Chen et al., 2003). سـرطان تخمدان با اینکه حدود ۴ درصـد از کل سـرطان های مربوط به جامعه زنان را تشـکیل می دهد ولی هشـتمین علت مرگ ومیر ناشی از بدخیمی در زنان است.در امریکا،تقریبا ۲۲۲۸۰ مورد جدید و ۱۵۵۰۰مرگ ناشی از سرطان تخمدان در سال ۲۰۱۲ پیش بینی شده است(Siegel et al).

RNAهای غیرکدکننده[۲۲۷] گروه جدیدی از ژن های شناخته شده در ژنوم انسان هستند که در تنظیم فرایند های مختلف زیستی نقش دارند.هم چنین اخیرا به نقش این RNAها در بیماری های پیچیده انسانی از جمله سرطان و بیماری های عصبی توجه زیادی شـده اسـت.طی سـال های اخیر و با چندین طرح غربال گری مختلف، شـمار شـگفت اوری از ژن های ncRNAها شـناسـایی شـده اند(Mitchell Guttman et al., 2009, Eddy, 2002). این RNAها که توالی انها منجر به تولید پروتئین نمی شود اصطلاحا RNAی غیر کدکننده یا non-coding (ncRNA) می‌نامند. در مجموع یک الی دو درصـد از کل ژنوم انسـان به RNAهای کد کننده و تا ۹۰ درصـد ان به RNAهای غیرکدکننده رونویسـی می شـوند(Hattori, 2005). lncRNAها تنظیم کننده های کلیدی در تغییرشـکل به سمت سرطان و پیشرفت آن هستند، با چشم- اندازهایی به سوی کاربرد این مولکول ها به عنوان اهداف تشخیصی و درمانی همراه

[226] Pelvis
[227] ncRNAs

شده است.شمار lncRNAهایی که به عنوان مارکرهای زیستی در تشخیص و پیش آگهی کاربرد دارند، هرساله در حال افزایش است و برخی از آنها برای استفاده بالینی مورد تایید قرار گرفته اند(Wutz, 2011).

NEAT1 یکی از مهمترین lncRNAهای تنظیم کننده در داده های ژنومیکی اخیر است که به عنوان تنظیم کننده در سرطان های مختلف عمل می کند(Zhen et al., 2016, Chakravarty et al., 2014). NEAT1 از لوکوس تیپ ۱ نئوپلازی اندوکرین متعدد سندروم تومور خانوادگی رونویسی شده و جایگاه اش بر روی کروموزوم ۱۱ قرار گرفته است.این ژن دارای ۲ ایزوفرم(NEAT1-1(MENε و(NEAT1-2(MENβ می‌باشد که از پروموتر یکسان رونویسی می شوند و تفاوت شان در پردازش های انتهای ′۳شان است (West et al., 2014). فراوانی رونوشت NEAT1-1 بیشتر بوده و تقریبا ۳/۷kb طول داشته و پلی ادنیله شده است هر دو NEAT1-1 و NEAT1-2 در ساختارهای هسته ای به نام Paraspeckle ها موجود هستند. مطالعات نشان دادند که lncRNA NEAT1 ابتدا از فیبروبلاست ها و لنفوسیت های انسانی شناسایی شد(Dong et al., 2015) و به عنوان ساختار ضروری در تشکیل وحفظ ساختار های هسته ای به نام Paraspeckle ها نقش دارند(Bond and Fox, 2009) به تازگی سطوحی از NEAT1 در انواع مختلفی از سرطان های انسانی از جمله لوسمی،سرطان کولورکتال،گلیوم،هپاتوسلولار کارسینوما،سرطان ریه،سرطان پستان و سرطان پروستات گزارش شده است(Mizutani et al., 2012). lncRNA NEAT1 به عنوان یک هدف اصلی برای گیرنده های استروژنی است و در بیان این گیرنده ها تاثیر می گذارد،به این صورت که در بیماری مانند سرطان پروستات lncRNA NEAT1 باعث افزایش بیان گیرنده های استروژنی می گردد.(Yu et al., 2012). بیان بالای NEAT1 در سرطان تخمدان به واسطه پروتئین متصل شونده به RNA به نام HUR است که سطح پایدار NEAT1 را افزایش می دهد،در مقابل RNA کوچک غیر کد کننده به نام miR-124-3p، به طور مستقیم NEAT1 را مورد هدف قرار داده و بیان اش را در سرطان تخمدان کاهش می دهد.با در نظر گرفتن هر دو،بیان NEAT1 توسط ۲ تنظیم کننده،HUR و miR-124-3p کنترل می شود(Chai et al., 2016).

۲.مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه گیری

نمونه ها که شامل ۳۰ نمونه بافت توموری سرطان تخمدان و ۳۰ نمونه بافت حاشیه سالم بود توسط جراح متخصص زنان و زایمان از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان الزهرای تبریز تهیه شدند و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و به آزمایشگاه منتقل شده و تا زمان استخراج RNA در فریزر منفی ۸۰ درجه نگهداری شد.

۲-۲- استخراج RNA، سنتز cDNA، qRT-PCR

RNA کل با استفاده از محلول RNX Plus (Cinnagen ، تهران، ایران) بر اساس پروتکل سازنده جدا شد. DNaseI (GeneAll، سئول، کره) برای از بین بردن آلودگی DNA استفاده شد. نانودراپ (Thermo Fisher Scientific Nanodrop 2000، CA، USA) و الکتروفورز ژل آگارز ۲٪ (v/w) به ترتیب برای ارزیابی کمیت و کیفیت نمونه‌های RNA استفاده شد. برای ساخت cDNA ابتدا ۱میکرولیتر DNase I، ۱/۳۲ میکرولیتر بافر DNase I، معادل ۸۰۰ نانوگرم RNA و اب در میکروتیوب ریخته شد و مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت. ۱ میکرولیتر EDTA اضافه شد و مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی گراد در دستگاه قرار گرفت. ۰/۵ میکرولیتر Oligo dT ، ۰/۵ میکرولیتر Random Hexamer ، ۰/۵ میکرولیتر انزیم RT و بافر RT ریخته شده و در دمای ۳۷درجه سانتی گراد به مدت ۲۵ دقیقه نگهداری شد. و به منظور غیر فعال سازی انزیم رونوشت بردار معکوس، به مدت ۵ثانیه در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد در دستگاه قرار گرفت. جهت طراحی پرایمر از نرم افزار Gene Runner

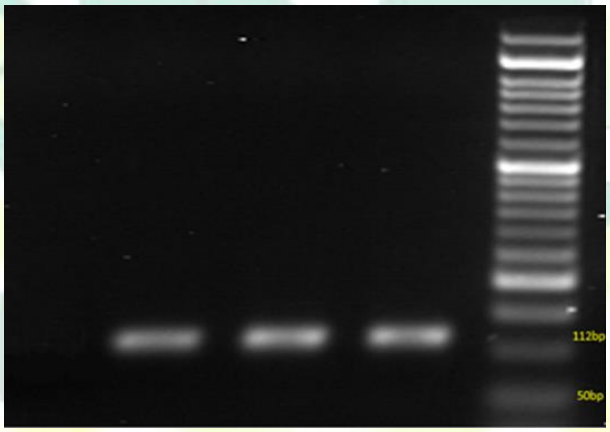
استفاده شد. برای ژن NEAT1 پرایمر فوروارد بصورت F:CTGCCTTCTTGTGCGTTTCT و پرایمر ریورس بصورت R:GACCAACTTGTACCCTCCCA و برای ژن کنترل داخلی GAPDH پرایمرها بصورت فوروارد F:GAGAAGTATGACAACAGCCTC و ریورس بصورت R:TGAGTCCTTCCACGATAC طراحی شد. دستگاه Real Time PCR (شرکت ABA) بمنظور اندازه گیری کمی واکنش زنجیره ای پلیمراز استفاده شد. برای هر دو ژن NEAT1 و ژن GAPDH: Master Mix SYBR Green (شرکت آمپلیکون) ۵ میکرولیتر، پرایمر F ۰/۱۲ میکرولیتر، پرایمر R ۰/۱۲میکرولیتر، cDNA ۴میکرولیتر (رقت ۱/۱۰۰)، آب ۰/۷۶ میکرولیتر در حجم نهایی ۱۰میکرولیتر استفاده گردید. آستانه چرخه (Ct) اندازه گیری شد و تفاوت بین بیان NEAT1 و GAPDH به عنوان ΔCt تعریف شد. برای تعیین تفاوت بیان بین NEAT1 و GAPDH، مقدار $^{-\Delta Ct}$ ۲ برای هر نمونه در تومور و نمونه‌های غیر توموری محاسبه شد. همه ی مراحل سه بار تکرار شد.

۳. نتایج و بحث

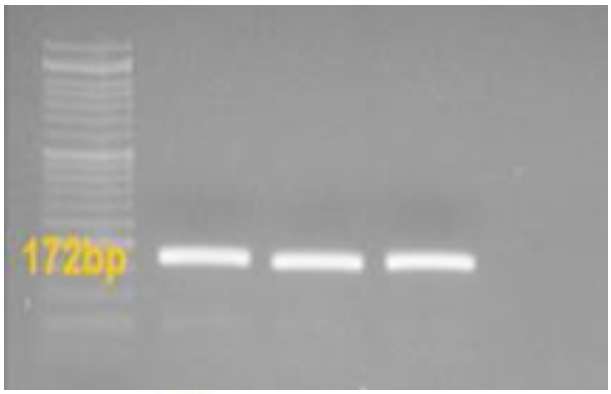
۳-۱- نتایج مربوط به PCR

جهت تعیین دمای بهینه برای اتصال پرایمر ها،ژن های NEAT1 و GAPDH توسط پرایمر های اختصاصی خود تکثیر یافته و محصولات واکنش PCR بر روی ژل اگارز ۲ درصد مشاهده شدند. شکل ۱ الکتروفورز محصول PCR ژن GAPDH و شکل ۲ محصول PCR ژن NEAT1 را نشان می دهد.

.



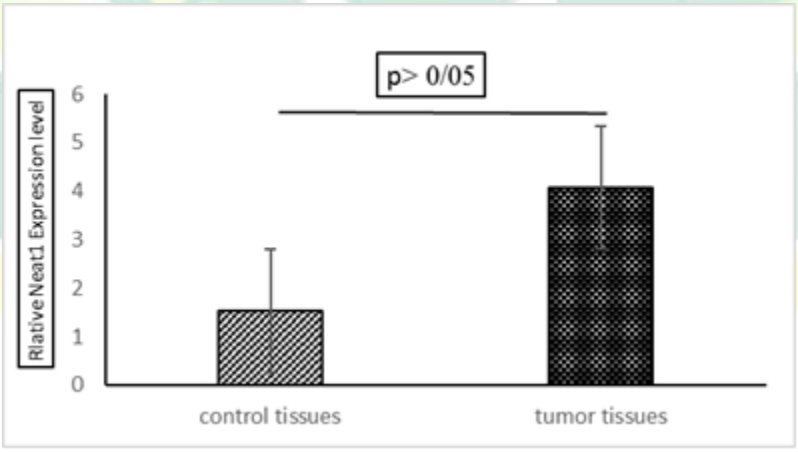
شکل۱: محصول ۱۱۲ جفت بازی ژن GAPDH



شکل۲: محصول جفت بازی ژن NEAT1

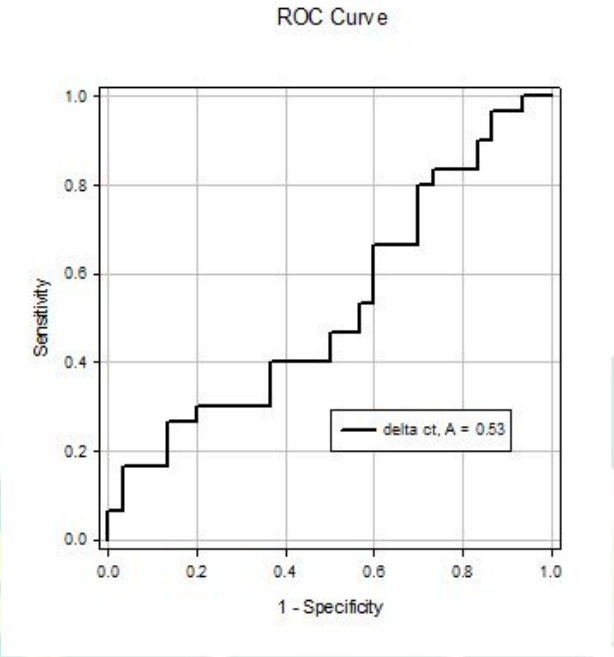
۲-۳-نتایج واکنش Real Time PCR

واکنش Real time PCR بر روی نمونه های توموری و حاشیه توموری انجام شد. از GAPDH به عنوان کنترل داخلی جهت نرمال سازی استفاده شد و میزان بیان نسبی در نمونه های توموری و حاشیه توموری با هم مقایسه شدند. نتایج حاصل نشان داد که بیان NEAT1 در نمونه های توموری در مقایسه با حاشیه توموری بالاست اما این افزایش از لحاظ آماری معنی دار نبود (p value=0.2)(شکل ۳).



شکل۳: مقایسه میانگین میزان بیان ژن NEAT1 در نمونه های توموری و حاشیه توموری

همچنین منحنی ROC توسط نرم افزار سیگما پلات (شکل ۴) رسم شد و حساسیت به اختصاصیت آن به عنوان بیومارکر مورد ارزیابی قرار گرفت که در این نمودار چون مساحت زیر نمودار A=0.53 است و کمتر از 0.7 می‌باشد لذا ژن مورد نظر به عنوان بیومارکر محسوب نمی‌شود.



شکل۴: منحنی ROC حاصل از نرم افزار سیگما پلات

۳-۳- بحث

با وجود پیشرفت در جراحی و شیمی درمانی میزان بقای کلی در سرطان تخمدان کم است ،میزان بقای ۵ساله بیماران با سرطان تخمدان پیشرفته فقط ۲۵ تا ۳۵ درصد است و پیش اگهی به دلیل تشخیص دیر هنگام معمولا خیلی ضعیف است.بیش از ۷۰درصد بیماران تشخیص داده شده با این سرطان به مرحله اخر رسیده اند که سرطان به خارج از تخمدان گسترش یافته است و دلیل دیگر برای این میزان بالای مرگ و میر نبود یک روش تشخیصی موثر در مراحل اولیه سرطان تخمدان است، بنابراین فهمیدن مکانیسم مولکولی دخیل در ایجاد سرطان تخمدان برای پیشگیری،تشخیص و درمان سرطان تخمدان نیاز است.(Jemal et al., 2011)

RNAهای بلند غیر کدکننده به تازگی به عنوان عوامل موثر تنظیم کننده در فرایند های زیستی و همچنین در ایجاد تومورها ظاهر شده اند. در سال های اخیر شواهد بسیاری نقش lncRNAها به عنوان انکوژن یا مهارکننده تومور در تومورزایی را نشان می دهد.متمرکز شدن بر روی این lncRNAها و نقش انها در بیماری زایی در سرطان تخمدان امری مهم است(Washietl et al., 2005). به تازگی مطالعات زیادی نشان می دهند که NEAT1 نقش مهمی در پیشرفت تومور ایفا می کند.(West et al., 2014)

Guo و همکارانش نشان دادند که NEAT1 نقش محوری در تومورژنزیس و متاستاز کارسینوم هپاتوسلولار دارد.(Guo et al., 2015) مطالعه ای که توسط Yanling Ma و همکارانش در رابطه با بیان lncRNA NEAT1 در ادنوکارسینومای معده افزایش می یابد، NEAT1 ممکن است پیشرفت ادنوکارسینومای معده را از طریق افزایش رشد تومور تحت تاثیر قرار می دهد.(Ma et al., 2016) با دانستن طبیعت عملکردی NEAT1 در سرطان های مختلف ما تصمیم گرفتیم تا نقش اش را در سرطان تخمدان بررسی کنیم.
و با مطالعات انجام شده به این نتیجه رسیدیم که بیان NEAT1 در بافت توموری سرطان تخمدان در مقایسه با بافت حاشیه توموری سالم افزایش دارد اما این افزایش معنی دار نبود.

۴. نتیجه‌گیری

بیان lncRNA NEAT1 در بافت توموری سرطان تخمدان در مقایسه با بافت حاشیه توموری سالم افزایش داشت اما چون این افزایش بیان در این مطالعه معنی دار نبود نمی توان با استناد به این مطالعه آن را به عنوان بیومارکر برای تشخیص و پیش اگهی سرطان تخمدان معرفی کرد.

منابع

BOND, C. S. and FOX, A. H. 2009. Paraspeckles: nuclear bodies built on long noncoding RNA. *The Journal of cell biology*, 186**,** 637-644.
CHAI, Y., LIU, J., ZHANG, Z. and LIU, L. 2016. HuR-regulated lncRNA NEAT1 stability in tumorigenesis and progression of ovarian cancer. *Cancer medicine*, 5**,** 1588-1598.
CHAKRAVARTY, D., SBONER, A., NAIR, S. S., GIANNOPOULOU, E., LI, R., HENNIG, S., MOSQUERA, J. M., PAUWELS, J., PARK, K. and KOSSAI, M. 2014. The oestrogen receptor alpha-regulated lncRNA NEAT1 is a critical modulator of prostate cancer. *Nature communications*, 5.
CHEN, V. W., RUIZ, B., KILLEEN, J. L., COTÉ, T. R., WU, X. C., CORREA, C. N. and HOWE, H. L. 2003. Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer*, 97**,** 2631-2642.
DONG, Y., LIANG, G., YUAN, B., YANG, C., GAO, R. and ZHOU, X. 2015. MALAT1 promotes the proliferation and metastasis of osteosarcoma cells by activating the PI3K/Akt pathway. *Tumor Biology*, 36**,** 1477-1486.
EDDY, S. R. 2002. Computational genomics of noncoding RNA genes. *Cell*, 109**,** 137-14.۰
GUO, S., CHEN, W., LUO, Y., REN, F., ZHONG, T., RONG, M., DANG, Y., FENG, Z. and CHEN, G. 2015. Clinical implication of long non-coding RNA NEAT1 expression in hepatocellular carcinoma patients. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8**,** 5395.
HATTORI, M. 2005. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Tanpakushitsu kakusan koso. Protein, nucleic acid, enzyme*, 50**,** 162-168.
JEMAL, A., BRAY, F., CENTER, M. M., FERLAY, J., WARD, E. and FORMAN, D. 2011. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61**,** 69-90.
KOSHIYAMA, M., MATSUMURA, N. and KONISHI, I. 2014. Recent concepts of ovarian carcinogenesis: type I and type II. *BioMed research international*, 2014.
MA, Y., LIU, L., YAN, F., WEI, W., DENG, J. and SUN, J. 2016. Enhanced expression of long non-coding RNA NEAT1 is associated with the progression of gastric adenocarcinomas. *World journal of surgical oncology*, 14**,** 41.
MITCHELL GUTTMAN, I. A., GARBER, M., FRENCH, C., LIN, M. F., FELDSER, D., HUARTE, M ,.ZUK, O., CAREY, B. W., CASSADY, J. P. and CABILI, M. N. 2009. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature*, 458**,** 223.

MIZUTANI, R., WAKAMATSU, A., TANAKA, N., YOSHIDA, H., TOCHIGI, N., SUZUKI, Y ,.OONISHI, T., TANI, H., TANO, K. and IJIRI, K. 2012. Identification and characterization of novel genotoxic stress-inducible nuclear long noncoding RNAs in mammalian cells. *PLoS One,* 7**,** e34949.

SIEGEL, R., WARD, E., BRAWLEY, O. and JEMAL, A. Cancer statistics, 2011: the impact of 405 eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA,* 406**,** 212-36.

VOGELSTEIN, B. and KINZLER, K. W. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine,* 10**,** 789.

WASHIETL, S., HOFACKER, I. L., LUKASSER, M., HÜTTENHOFER, A. and STADLER, P. F. 2005. Mapping of conserved RNA secondary structures predicts thousands of functional noncoding RNAs in the human genome. *Nature biotechnology,* 23**,** 1383.

WEST, J. A., DAVIS, C. P., SUNWOO, H., SIMON, M. D., SADREYEV, R. I., WANG, P. I., TOLSTORUKOV, M. Y. and KINGSTON, R. E. 2014. The long noncoding RNAs NEAT1 and MALAT1 bind active chromatin sites. *Molecular cell,* 55**,** 791-802.

WUTZ, A. 2011. Gene silencing in X-chromosome inactivation: advances in understanding facultative heterochromatin formation. *Nature Reviews Genetics,* 12**,** 542-553.

YU, G., YAO, W., WANG, J., MA, X., XIAO, W., LI, H., XIA, D., YANG, Y., DENG, K. and XIAO, H. 2012. LncRNAs expression signatures of renal clear cell carcinoma revealed by microarray. *PloS one,* 7**,** e42377.

ZHEN, L., YUN-HUI, L., HONG-YU, D., JUN, M. and YI-LONG, Y. 2016. Long noncoding RNA NEAT1 promotes glioma pathogenesis by regulating miR-449b-5p/c-Met axis. *Tumor Biology,* 37**,** 673-683.

Key signaling pathways in ovarian cancer

Ahmad Sabouri [1] *; Dr. Sohrab Boozarpour [2]; Dr. Moein Farshchian [3] Mina Lashkarboloki [4]

1- Master student of Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavous University
2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavous University
3- Stem Cell and Regenerative Medicine Research Group, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Khorasan Razavi Branch, Mashhad
4- Ph. D student, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University
*Ahmadsaburi76@gmail.com

Abstract

Messaging systems allow cells to feel integrated internally and externally, creating well-coordinated responses to processes such as growth, proliferation, differentiation, and survival. The development of cancer involves a series of changes, such as changes in the signaling, metabolic pathways, etc., that enable cells to escape self-regulatory mechanisms that generally prevent the survival of abnormally proliferating cells. Various stimuli such as cytokines, viruses, G protein-coupled receptor ligands, and oncogenes play a regulatory role in many cancers by activating the MAPK / ERK terminal pathway. The MAPK / ERK messenger pathway is not only involved in the regulation of cellular biological functions, such as cell proliferation, cell differentiation, cell cycle regulation, cellular apoptosis, and tissue formation, but is also associated with tumor formation. The PI3K / AKT / mTOR messenger pathway plays a vital role in regulating cell survival, growth, proliferation, and metabolism. PI3K / AKT / mTOR pathway abnormalities are very common in most human cancers compared to other major messenger pathways. Failure to configure the main components of this messenger path will activate other downstream messenger paths associated with oncogenes. The Wnt / β-catenin messenger pathway plays an important role in ovarian cancer by regulating ovarian stem cells. In 16 to 54% of cases of endometrioid ovarian cancer, a mutation is found in the CTNNB1 (β-catenin) gene.
Further understanding of the key messenger pathways in ovarian cancer cells can lead to targeted treatment and early diagnosis.

Keywords: Cell death, Cell proliferation, Messenger pathway, Ovarian cancer

مسیرهای پیام رسان کلیدی در سرطان تخمدان

احمد صبوری[۱*]؛ سهراب بوذرپور[۲]؛ معین فرشچیان[۳] مینا لشکربلوکی[۴]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس
۲- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه گنبد کاووس
۳- گروه تحقیقات سلول های بنیادی و پزشکی بازساختی، مرکز آموزشی، فرهنگی و تحقیقاتی دانشگاهی (ACECR)، واحد خراسان رضوی، مشهد
۴-دانشجوی دکترای ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

Ahmadsaburi76@gmail.com *

چکیده

سیستم‌های پیام‌رسان به سلول‌ها این امکان را می‌دهد تا محیط داخلی و خارجی خود را به‌صورت یکپارچه احساس کنند و پاسخ‌های مناسب هماهنگ شده‌ای مانند فرآیندهایی همچون رشد، تکثیر، تمایز و بقا را ایجاد نمایند. توسعه سرطان شامل تغییرات متوالی از قبیل تغییر در مسیرهای پیام رسانی، متابولیکی و ... است که سلول‌ها را قادر می‌سازد تا از مکانیسم‌های خودتنظیمی که به‌طورکلی مانع بقای سلول‌های در حال تکثیر غیرطبیعی می شوند، فرار کنند.

محرک‌های مختلفی مانند سیتوکین ها، ویروس‌ها، لیگاندهای گیرنده جفت شده با پروتئین G و آنکوژن ها با فعال کردن مسیر پیان رسانی MAPK/ ERK نقش تنظیمی در بسیاری از سرطان ها ایفا می‌کنند. مسیر پیام‌رسان MAPK/ ERK نه‌تنها در تنظیم عملکردهای بیولوژیکی سلولی، مانند تکثیر سلولی، تمایز سلولی، تنظیم چرخه سلولی، آپوپتوز سلولی و تشکیل بافت نقش دارد، بلکه با تشکیل تومور نیز مرتبط است.

مسیر پیام‌رسان PI3K/AKT/mTOR نقش حیاتی در تنظیم بقا، رشد، تکثیر و متابولیسم سلولی دارد. ناهنجاری‌های مسیر PI3K/AKT/mTOR در مقایسه با سایر مسیرهای اصلی پیام‌رسان در اکثر سرطان‌های انسانی بسیار رایج است. عدم تنظیم اجزای اصلی این مسیر پیام‌رسان باعث فعال شدن سایر مسیرهای پیام‌رسان پایین‌دست مرتبط با آنکوژن ها می‌شود.

مسیر پیام‌رسان Wnt/β-catenin با تنظیم سلول‌های بنیادی تخمدان، نقش مهمی در سرطان تخمدان دارد. بطوریکه در ۱۶ تا ۵۴ درصد موارد سرطان تخمدان آندومتریوئید جهش در ژن CTNNB1 (β-کاتنین) یافت می‌شود.

درک بیشتر از مسیرهای پیام رسان کلیدی در سلول های سرطانی تخمدان می تواند به روند درمان هدفمند و تشخیص های زودهنگام منجر شود.

واژگان: مرگ سلولی، تکثیر سلولی، مسیر پیام رسان، سرطان تخمدان

۱. مقدمه

سیستم‌های پیام‌رسان به سلول‌ها این امکان را می‌دهد تا محیط داخلی و خارجی خود را به‌صورت یکپارچه احساس کنند و پاسخ‌های مناسب هماهنگ شده‌ای مانند فرآیندهایی همچون رشد، تکثیر، تمایز و بقا را ایجاد کنند. توسعه سرطان شامل تغییرات متوالی همانند تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی است که سلول‌ها را قادر می‌سازد با تغییر مکانیسم‌ها و مسیرهای پیام‌رسان متنوع، شرایط تکثیر و بقای غیرطبیعی این سلول ها را فراهم کند. اگرچه سلول‌های سرطانی از نظر منشأ و نوع سلول یکسان نیستند، اما اکثر سلول‌های سرطانی، ویژگی‌های مشترک زیادی دارند (Hanahan & Weinberg, 2011). درک بیشتر از مسیرهای پیام رسان کلیدی در سلول های سرطانی تخمدان می تواند به روند درمان هدفمند و تشخیص های زودهنگام منجر شود. (wu *et al*., 2020).

۱-۱-مسیر پیام‌رسان MAPK/ERK

مسیر پیام‌رسان MAPK/ ERK نه‌تنها در تنظیم عملکردهای بیولوژیکی سلولی، مانند تکثیر سلولی، تمایز سلولی، تنظیم چرخه سلولی، آپوپتوز سلولی و تشکیل بافت نقش دارد، بلکه با تشکیل تومور نیز مرتبط است (Rubinfeld & Seger, 2005). افزایش بیان ERK در تومورهای مختلف انسانی مانند سرطان تخمدان (OC)، روده بزرگ، سینه و ریه مشاهده شده است (Tang *et al*., 2017). اندازه گیری سطح بیان MAPK1 و ERK در بافت‌های سرطان تخمدان نشان از افزایش این فاکتور ها در مقایسه با بافت‌های طبیعی مجاور دارد (Guo et al., 2020b). همچنین مشخص گردید که فعال شدن مسیر پیام‌رسان MAPK/ ERK باعث افزایش تکثیرشده و اثر ضد آپوپتوز دارد، شبیه به عملکرد VEGF ناشی از هیپوکسی که می‌تواند با فعال کردن مسیر پیام‌رسان MAPK/ ERK آپوپتوز سلول‌ها را مهار کند (Thomas & Kim, 2008). مسیر پیام رسان MAPK/ ERK با تأثیرگذاری بر فعالیت پروتئین‌های تنظیم‌کننده چرخه سلولی پایین‌دست، پروتئین‌های مرتبط با آپوپتوز و سایر مولکول‌های مؤثر، مانند سیکلین D1 تکثیر را افزایش و آپوپتوز را مهار می‌کند (Kim et al., 2011). مشاهده شده است که بیان بیش از حد پروتئین SPARCL1 در سرطان تخمدان با مهار مسیر پیام‌رسان MEK/ERK، کاهش می‌یابد و از تکثیر و مهاجرت سلول‌های سرطانی تخمدان جلوگیری می‌کند (Ma *et al*., 2018). آنتی ژن سطحی CD147 در سلول های سرطان تخمدان با فسفوریلاسیون Sp1 در T453 و T739 از طریق مسیرهای PI3K/AKT و MAPK/ERK موجب مسدود شدن حلقه بازخورد مثبت Sp1-CD147 شده و بدین ترتیب توانایی تهاجمی سلول‌های سرطان تخمدان انسان (ho8910) را کاهش می‌دهد (Zhao *et al*., 2015). همچنین ثابت شد که آنتی ژن توموری مزوتلین[۲۲۸] بیان MMP-7 را از طریق مسیر پیام رسان MAPK/ERK، مسیرهای ERK2/1، AKT و JNK تنظیم می‌کند که قدرت تهاجمی سلول‌های سرطان تخمدان را افزایش می‌دهد (Hilliard, 2018).

۱-۲- مسیر پیام‌رسان PI3K/AKT/mTOR

مسیر پیام‌رسان PI3K/AKT/mTOR نقش حیاتی در تنظیم بقای سلولی، رشد، تکثیر، رگ زایی و متابولیسم دارد (Carnero *et al*., 2008). ناهنجاری‌های مسیر PI3K/AKT/mTOR در مقایسه با سایر مسیرهای اصلی پیام‌رسان در اکثر سرطان‌های انسانی بسیار رایج است و عدم تنظیم اجزای اصلی این مسیر پیام‌رسان باعث فعال شدن سایر مسیرهای

[228] Mesothelin

پیام‌رسان آنکوژنی پایین‌دست می‌شود (Hennessy *et al*., 2005). نقش آنکوژنیک مسیر پیام‌رسان PI3K/AKT/mTOR در OC[229] پیچیده است و از طریق انحرافات مختلف در مسیر و تغییرات مختلف در چندین ورودی، مسیر پیام‌رسان PI3K/AKT/mTOR نقش برجسته‌ای در تومورزایی OC و مقاومت در برابر شیمی‌درمانی و پرتودرمانی ایفا می‌کند (Gasparri *et al*., 2017). فعال‌سازی نابجای مسیر پیام‌رسان PI3K/AKT/mTOR به دلیل تقویت یا جهش در PIK3CA، PIK3R، تقویت یا جهش در ایزو فرم‌های AKT و از دست دادن PTEN به دلیل حذف‌های هموزیگوت (LOH) یا جهش‌های غیرفعال کننده در OC یافت شده است (Dobbin & Landen, 2013). تغییرات ژنومی در PIK3CA در بیش از ۲۰ درصد موارد OC یافت می‌شود، PIK3CA جهش‌یافته می‌تواند به‌عنوان یک آنکوژن در OC عمل کند همچنین از میان ۱۶۷ سرطان اپیتلیال تخمدان، ۵۱ مورد (۳۰.۵٪) تقویت یا جهش سوماتیک را در PIK3CA نشان دادند. جهش در PIK3CA در سلول شفاف تخمدان (۲۰٪) و کارسینوم آندومتریوئید (۲۰٪) در مقایسه با کارسینوم سروزی (۲.۳٪) شایع بود که نشان‌دهنده بروز جهش بر اساس زیرگروه‌های بافتی است (Campbell *et al*., 2004).AKT یکی از شاه‌راه‌های حیاتی مسیر پیام‌رسان PI3K است که مستعد جهش در سه ایزو فرم AKT (AKT1، AKT2 و AKT3) می باشد که تقریباً در ۳ تا ۵ درصد از انواع مختلف سرطان شناسایی‌شده است (Yi & Lauring, ۲۰۱۶). افزایش AKT2 در نمونه‌های تومور OC در ۱۳ درصد تومورهای اولیه تخمدان و در ۱۸.۲٪ کارسینوم‌های با درجه بالا گزارش‌شده است (Nakayama *et al*., 2006). اگرچه جهش‌های AKT3 در OC نادر است، ولی گزارشات حاکی از آن است که AKT3 همراه با AKT2/1 در افزایش رشد و تکثیر OC دخیل است (Hanrahan *et al*., 2012).

۱-۳- مسیر پیام‌رسان Wnt/b catenin

مسیر پیام‌رسان Wnt/β-catenin که وظیفه تنظیم خودنوزایی را در طیف وسیعی از سلول‌های بنیادی به عهده دارد، نقش مهمی در سرطان تخمدان ایفا می‌کند. جهش‌های CTNNB1 (β-کاتنین) در ۱۶ تا ۵۴ درصد موارد سرطان تخمدان آندومتریوئید یافت می‌شود. به همین ترتیب، تغییرات ژنتیکی در سایر اعضای مسیر پیام‌رسان Wnt، مانند APC، AXIN1 و AXIN2 نیز در این هیستوتایپ سرطان تخمدان شناسایی‌شده است (Arend *et al*., 2013). در یک مدل شرطی موش که APC آن دچار تغییر شده است، فعال شدن مسیر پیام رسانی Wnt/β در اندام‌های مشتق شده از مجرای مولر منجر به تشکیل تومورهای آندومتریوئید در مجرای تخمک که یادآور هیستوتایپ مربوطه در انسان است می‌شود. علاوه بر سرطان تخمدان آندومتریوئید، جهش در ژن CTNNB1 نیز در موارد نادر سرطان تخمدان مخاطی گزارش شده است (Lee et al., 2015a) همچنین، هر دو جهش CTNNB1 و APC نیز در تومورهای استرومایی میکروکیستیک غیراپیتلیالی (MSTs[230]) تخمدان شناسایی‌شده‌اند (Deng *et al*., 2020). بر این اساس، افزایش بروز MSTs نیز در بین بیماران مبتلابه پولیپوز آدنوماتوز خانوادگی (FAP) به دلیل جهش‌های ژرمینال در APC گزارش‌شده است (Lee *et al*., 2015b) . داده‌های الگوی بیان، فعال شدن مکرر مسیر پیام رسانی Wnt را در سرطان تخمدان به‌طور گسترده تائید کرده است. به‌طور خاص، تجزیه و تحلیل رونوشت سلول‌های سرطانی تخمدان مشتق از آسیت ها و ماکروفاژهای مرتبط با تومور (TAMs) نشان داده است که لیگاندهای Wnt معمولی و غیرمعمولی در سلول‌های تومور بیان می‌شوند، درحالی‌که LRP و FZD برای سلول‌های تومور و TAM مشترک هستند (Reinartz *et al*., 2016). آنکوژن (jerky)

[229] ovarian cancer
[230] Non-epithelial microcystic stromal tumor

JRKدر ۱۵ درصد سرطان‌های تخمدان در ارتباط با افزایش بیان ژن‌های هدف Wnt بیان می‌شود. JRK مستقیماً با کمپلکس رونویسی β-کاتنین تعامل دارد، در نتیجه کمپلکس β-کاتنین/TCF را تثبیت می‌کند و در نهایت منجر به افزایش فعالیت رونویسی β-کاتنین و تکثیر سلولی می‌شود. مطابق با این، کاهش JRK در رده‌های سلولی سرطان بیان ژن‌های هدف β-کاتنین را سرکوب کرده و تکثیر سلولی را کاهش می دهد (Pangon *et al.*, 2016). اخیراً، RNAهای غیر کد کننده (ncRNAs) به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های مهم مرتبط با مسر پیام رسان Wnt در سرطان تخمدان شناخته‌شده‌اند. همچنین با استفاده از مدل‌های موش ارتوتوپی سرطان تخمدان، نشان داده شد که β-کاتنین با کنترل اندوریبونوکلئاز دایسر[231] که جزء کلیدی از ماشین‌های پردازش microRNA (miR) است نقش مهمی در تشکیل متاستاز دارد. β -کاتنین مستقیماً دایسر را هدف قرار می‌دهد و در نتیجه چندین miRNA ازجمله خانواده miR-29 که از تنظیم‌کننده های منفی EMT[232] شناخته می‌شوند را کاهش می‌دهد. خاموش کردن β-کاتنین یا بیان بیش از حد دایسر یا miR-29 در سلول‌های سرطان تخمدان متاستاتیک ظرفیت مهاجرت آن‌ها را کاهش می دهد (To *et al.*, 2017).

۱-۴- مسیر پیام‌رسان NFκB

فعال شدن مسیر پیام‌رسان NF-kB در OC باعث افزایش تهاجم به سلول‌های زایا و مقاومت به شیمی درمانی می‌شود. NF-κBs گروهی از فاکتورهای رونویسی هستند که شامل RelA/p65، c-Rel، RelB، p50 (NF-kB 1) و p52 (NF-kB 2)، می باشند که با تخریب انتخابی در پروتئازوم از p105 و p100 ایجاد می‌شوند (Zeligs *et al.*, 2016). رونویسی NF-κB پس از تخریب پروتئین‌های مهارکننده IκB توسط فسفوریلاسیون توسط IKKs فعال می‌شود و امکان جابجایی به هسته با زیر واحدهای مسیر پیام‌رسان RelA/p65 (متداول) یا RelB (غیرمتداول) را فراهم می‌کند (Park & Hong, 2016). با توجه به عملکرد حیاتی IKK ها در فعال‌سازی پیام‌رسان NF-kB، IKK ها به‌عنوان هدفی بازدارنده برای جلوگیری از جابجایی هسته‌ای زیر واحدهای NF-kB برای فعالیت رونویسی موردبررسی قرارگرفته‌اند. در سرطان تخمدان، IKKβ رشد مستقل از تکیه گاه[233]، تکثیر و تهاجم سلول‌های OC را تقویت می‌کند (Hernandez *et al.*, 2010). فعالیت NF-kB در سلول‌های OC باعث مقاومت در برابر عوامل استرس‌زا مانند استرس اکسیداتیو می‌شود که این امر در طول پیشرفت بیماری و متاستاز باعث بقای مستقل از تکیه‌گاه سلول می‌شود. مهار فعالیت NF-kB در رده‌های سلولی OC کشت‌شده به‌طور قابل‌توجهی رشد مستقل از تکیه‌گاه را مهار می نماید (Diaz Osterman *et al.*, 2019). ریز محیط سرطان تخمدان از این نظر منحصربه‌فرد است که به‌غیراز سلول‌های تومور، برای افزایش متاستاز و مهار فعالیت ایمنی، انواع سلول‌های متعدد دیگر نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (Worzfeld *et al.*, 2017).

مولفه‌های عوامل التهابی و سرکوب‌کننده سیستم ایمنی که توسط فعالیت NF-kB در سلول‌های سرطانی کنترل می‌شوند در محیط OC وجود دارند. سلول‌های OC با ترشح سیتوکین‌های سرکوب‌کننده ایمنی فنوتیپ‌های محرک سرطانی شدن را در

[231] DICER
[232] Epithelial-to-Mesenchymal Transition
[233] Anchor

ماکروفاژهای مرتبط با تومور (TAMs) ارتقا می‌دهند و بدین ترتیب به ترشح سیتوکین‌های مهارکننده ایمنی ، افزایش بقا، گسترش CSC[234] ، متاستاز و فعال‌سازی NF-kB در سلول‌های OC کمک می‌کنند (Browning *et al*., 2018). هدف قرار دادن NF-kB در OC برای از بین بردن جمعیت CSC مطلوب است، اما استراتژی‌های فعلی محدود به مهار IKKs است. تحقیقات بیشتری برای تشریح مسیرها و شناسایی استراتژی‌هایی برای تعدیل NF-kB و کاهش متاستاز و عود تومور موردنیاز است (Harrington & Annunziata, 2019).

۲.سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از سرکار خانم ها زینب درزی و سارا چیتگران که در انجام برخی از مراحل مطالعه همکاری داشتند، صمیمانه سپاسگزارند.

منابع

Arend, R. C., Londoño-Joshi, A. I., Straughn, J. M., & Buchsbaum, D. J. (2013). The Wnt/β-catenin pathway in ovarian cancer: a review. *Gynecologic Oncology*, *131*(3), 772–779. https://doi.org/10.1016/J.YGYNO.2013.09.034

Browning, L., Patel, M. R., Horvath, E. B., Tawara, K., & Jorcyk, C. L. (2018). IL-6 and ovarian cancer: inflammatory cytokines in promotion of metastasis. *Cancer Management and Research*, *10*, 6685–6693. https://doi.org/10.2147/CMAR.S179189

Campbell, I. G., Russell, S. E., Choong, D. Y. H., Montgomery, K. G., Ciavarella, M. L., Hooi, C. S. F., Cristiano, B. E., Pearson, R. B., & Phillips, W. A. (2004). Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Research*, *64*(21), 7678–7681. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2933

Carnero, A., Blanco-Aparicio, C., Renner, O., Link, W., & Leal, J. (2008). The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Current Cancer Drug Targets*, *8*(3), 187–198. https://doi.org/10.2174/156800908784293659

Dai, F., Zhang, Y., & Chen, Y. (2014). Involvement of miR-29b signaling in the sensitivity to chemotherapy in patients with ovarian carcinoma. *Human Pathology*, *45*(6), 1285–1293. https://doi.org/10.1016/J.HUMPATH.2014.02.008

Deng, L., Feng, D., Liang, J., Luo, J., & Ling, B. (2020). Ovarian Microcystic Stromal Tumor: A Case Report and Literature Review. *Frontiers in Medicine*, *7*, 58. https://doi.org/10.3389/FMED.2020.00058

Diaz Osterman, C. J., Ozmadenci, D., Kleinschmidt, E. G., Taylor, K. N., Barrie, A. M., Jiang, S., Bean, L. M., Sulzmaier, F. J., Jean, C., Tancioni, I., Anderson, K., Uryu, S., Cordasco, E. A., Li, J., Lei Chen, X., Fu, G., Ojalill, M., Rappu, P., Heino, J., … Schlaepfer, D. D. (2019). FAK activity sustains intrinsic and acquired ovarian cancer resistance to platinum chemotherapy. *ELife*, *8*. https://doi.org/10.7554/eLife.47327

[234] Cancer stem cell

Dobbin, Z. C., & Landen, C. N. (2013). The importance of the PI3K/AKT/MTOR pathway in the progression of ovarian cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(4), 8213–8227. https://doi.org/10.3390/IJMS14048213

Gasparri, M. L., Bardhi, E., Ruscito, I., Papadia, A., Farooqi, A. A., Marchetti, C., Bogani, G., Ceccacci, I., Mueller, M. D., & Benedetti Panici, P. (2017). PI3K/AKT/mTOR Pathway in Ovarian Cancer Treatment: Are We on the Right Track? *Geburtshilfe Und Frauenheilkunde*, *77*(10), 1095–1103. https://doi.org/10.1055/S-0043-118907

Guo, Y., Pan, W., Liu, S., Shen, Z., Xu, Y., & Hu, L. (2020a). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *19*(3). https://doi.org/10.3892/ETM.2020.8454

Guo, Y., Pan, W., Liu, S., Shen, Z., Xu, Y., & Hu, L. (2020b). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *19*(3). https://doi.org/10.3892/ETM.2020.8454

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013

Hanrahan, A. J., Schultz, N., Westfal, M. L., Sakr, R. A., Giri, D. D., Scarperi, S., Janikariman, M., Olvera, N., Stevens, E. v., She, Q. B., Aghajanian, C., King, T. A., de Stanchina, E., Spriggs, D. R., Heguy, A., Taylor, B. S., Sander, C., Rosen, N., Levine, D. A., & Solit, D. B. (2012). Genomic complexity and AKT dependence in serous ovarian cancer. *Cancer Discovery*, *2*(1), 57–67. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0170

Harrington, B. S., & Annunziata, C. M. (2019). NF-κB Signaling in Ovarian Cancer. *Cancers*, *11*(8). https://doi.org/10.3390/CANCERS11081182

Henderson, J. T., Webber, E. M., & Sawaya, G. F. (2018). Screening for ovarian cancer updated evidence report and systematic review for the US preventive services task force. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *319*(6), 595–606. https://doi.org/10.1001/jama.2017.21421

Hennessy, B. T., Smith, D. L., Ram, P. T., Lu, Y., & Mills, G. B. (2005). Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *4*(12), 988–1004. https://doi.org/10.1038/NRD1902

Hernandez, L., Hsu, S. C., Davidson, B., Birrer, M. J., Kohn, E. C., & Annunziata, C. M. (2010). Activation of NF-kappaB signaling by inhibitor of NF-kappaB kinase beta increases aggressiveness of ovarian cancer. *Cancer Research*, *70*(10), 4005–4014. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3912

Hilliard, T. S. (2018). The Impact of Mesothelin in the Ovarian Cancer Tumor Microenvironment. *Cancers*, *10*(9). https://doi.org/10.3390/CANCERS10090277

Kim, J. Y., Lee, S. G., Chung, J. Y., Kim, Y. J., Park, J. E., Koh, H., Han, M. S., Park, Y. C., Yoo, Y. H., & Kim, J. M. (2011). Ellipticine induces apoptosis in human endometrial cancer cells: the potential involvement of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinases. *Toxicology*, *289*(2–3), 91–102. https://doi.org/10.1016/J.TOX.2011.07.014

Lee, S. H., Koh, Y. W., Roh, H. J., Cha, H. J., & Kwon, Y. S. (2015a). Ovarian microcystic stromal tumor: A novel extracolonic tumor in familial adenomatous polyposis. *Genes, Chromosomes & Cancer*, *54*(6), 353–360. https://doi.org/10.1002/GCC.22233

Lee, S. H., Koh, Y. W., Roh, H. J., Cha, H. J., & Kwon, Y. S. (2015b). Ovarian microcystic stromal tumor: A novel extracolonic tumor in familial adenomatous polyposis. *Genes, Chromosomes & Cancer*, *54*(6), 353–360. https://doi.org/10.1002/GCC.22233

Ma, Y., Xu, Y., & Li, L. (2018). SPARCL1 suppresses the proliferation and migration of human ovarian cancer cells via the MEK/ERK signaling. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *16*(4), 3195. https://doi.org/10.3892/ETM.2018.6575

Nakayama, K., Nakayama, N., Kurman, R. J., Cope, L., Pohl, G., Samuels, Y., Velculescu, V. E., Wang, T. L., & Shih, I. M. (2006). Sequence mutations and amplification of PIK3CA and AKT2 genes in purified ovarian serous neoplasms. *Cancer Biology and Therapy*, *5*(7), 779–785. https://doi.org/10.4161/CBT.5.7.2751

Pangon, L., Ng, I., Giry-Laterriere, M., Currey, N., Morgan, A., Benthani, F., Tran, P. N., Al-Sohaily, S., Segelov, E., Parker, B. L., Cowley, M. J., Wright, D. C., St Heaps, L., Carey, L., Rooman, I., & Kohonen-Corish, M. R. J. (2016). JRK is a positive regulator of β-catenin transcriptional activity commonly overexpressed in colon, breast and ovarian cancer. *Oncogene*, *35*(22), 2834–2841. https://doi.org/10.1038/ONC.2015.347

Park, M. H., & Hong, J. T. (2016). Roles of NF-κB in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. *Cells*, *5*(2). https://doi.org/10.3390/CELLS5020015

Reinartz, S., Finkernagel, F., Adhikary, T., Rohnalter, V., Schumann, T., Schober, Y., Nockher, W. A., Nist, A., Stiewe, T., Jansen, J. M., Wagner, U., Müller-Brüsselbach, S., & Müller, R. (2016). A transcriptome-based global map of signaling pathways in the ovarian cancer microenvironment associated with clinical outcome. *Genome Biology*, *17*(1), 108. https://doi.org/10.1186/S13059-016-0956-6

Rubinfeld, H., & Seger, R. (2005). The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Molecular Biotechnology*, *31*(2), 151–174. https://doi.org/10.1385/MB:31:2:151

Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. (n.d.). Retrieved January 8, 2022, from https://seer.cancer.gov/

Tang, Q., Wu, J. J., Zheng, F., Chen, Y. Q., & Hann, S. S. (2017). Emodin Increases Expression of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 1 through Activation of MEK/ERK/AMPKα and Interaction of PPARγ and Sp1 in Lung Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry : International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, *41*(1), 339–357. https://doi.org/10.1159/000456281

Thomas, R., & Kim, M. H. (2008). HIF-1α: A key survival factor for serum-deprived prostate cancer cells. *The Prostate*, *68*(13), 1405. https://doi.org/10.1002/PROS.20808

To, S. K. Y., Mak, A. S. C., Eva Fung, Y. M., Che, C. M., Li, S. S., Deng, W., Ru, B., Zhang, J., & Wong, A. S. T. (2017). β-catenin downregulates Dicer to promote ovarian cancer metastasis. *Oncogene*, *36*(43), 5927–5938. https://doi.org/10.1038/ONC.2017.185

Wang, Y., Hewitt, S. M., Liu, S., Zhou, X., Zhu, H., Zhou, C., Zhang, G., Quan, L., Bai, J., & Xu, N. (2006). Tissue microarray analysis of human FRAT1 expression and its correlation with the subcellular localisation of β-catenin in ovarian tumours. *British Journal of Cancer*, *94*(5), 686. https://doi.org/10.1038/SJ.BJC.6602988

Worzfeld, T., von Strandmann, E. P., Huber, M., Adhikary, T., Wagner, U., Reinartz, S., & Müller, R. (2017). The Unique Molecular and Cellular Microenvironment of Ovarian Cancer. *Frontiers in Oncology*, *7*(FEB). https://doi.org/10.3389/FONC.2017.00024

Wu, Y., Xia, L., Guo, Q., Zhu, J., Deng, Y., & Wu, X. (2020). Identification of Chemoresistance-Associated Key Genes and Pathways in High-Grade Serous Ovarian Cancer by Bioinformatics Analyses. *Cancer management and research*, *12*, 5213–5223. https://doi.org/10.2147/CMAR.S251622

Yi, K. H., & Lauring, J. (2016). Recurrent AKT mutations in human cancers: functional consequences and effects on drug sensitivity. *Oncotarget*, *7*(4), 4241–4251. https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.6648

Zeligs, K. P., Neuman, M. K., & Annunziata, C. M. (2016). Molecular Pathways: The Balance between Cancer and the Immune System Challenges the Therapeutic Specificity of Targeting Nuclear Factor-κB Signaling for Cancer Treatment. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *22*(17), 4302–4308. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1374

Zhao, J., Ye, W., Wu, J., Liu, L., Yang, L., Gao, L., Chen, B., Zhang, F., Yang, H., & Li, Y. (2015). Sp1-CD147 positive feedback loop promotes the invasion ability of ovarian cancer. *Oncology Reports*, *34*(1), 67–76. https://doi.org/10.3892/OR.2015.3999/HTML

Introduction of key genes in different stages of ovarian cancer using RNA-Seq data

Ahmad Sabouri [1] *; Sohrab Boozarpour [2]; Moein Farshchian [3] Mina Lashkarboloki [4]

1- Master student of Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavous University
2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavous University
3- Stem Cell and Regenerative Medicine Research Group, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Khorasan Razavi Branch, Mashhad
4- Ph. D student, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University

Ahmadsaburi76@gmail.com

Abstract

Ovarian cancer is often referred to as the silent killer and is not diagnosed until it is advanced because of its vague symptoms. In fact, more than 70% of people with ovarian cancer are diagnosed with stage III or IV. The latest research shows that the survival rate of ovarian cancer after 5 years is 47.4%. RNA-Seq is a relatively new method used to quantify the expression of genes and to identify transcripts in large data in different conditions of cells, tissues, or organisms, and is an important approach to decision-making in molecular physiology. Creates a cell. Understanding the key networks and genes in different stages of ovarian cancer can raise our awareness of ovarian cancer and help provide targeted treatment processes. In this study, RNA-seq data were downloaded from GEO database and then initial analyzes were performed on Ubuntu operating system using sratoolkit, trimmomatic, hisat2, samtools and htseq-count software. Data outputs were analyzed in R software (with software package such as DEseq2). The results of data analysis with respect to significant differences in gene expression at the level of $p < 0.05$ indicate key coding genes in advanced and early stages of ovarian cancer. Based on the expression ratio of genes with log fold change and p-value, RPS18 and IFITM3 genes were selected as overexpression genes and LRRTM2 and MEIOC genes were selected as comorbid genes.

Keywords: Ovarian cancer, coding proteins, overexpressed and underdeveloped genes

معرفی ژن های کلیدی در مراحل مختلف سرطان تخمدان با استفاده از داده های RNA-Seq

احمد صبوری[۱*]؛ سهراب بوذرپور[۲]؛ معین فرشچیان[۳] مینا لشکربلوکی[۴]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس
۲- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه گنبد کاووس
۳- گروه تحقیقات سلول های بنیادی و پزشکی بازساختی، مرکز آموزشی، فرهنگی و تحقیقاتی دانشگاهی (ACECR)، واحد خراسان رضوی، مشهد
۴-دانشجوی دکترای ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

Ahmadsaburi76@gmail.com *

چکیده

سرطان تخمدان اغلب به‌عنوان قاتل خاموش شناخته می‌شود و تا زمانی که در مراحل پیشرفته نباشد به دلیل علائم مبهم آن تشخیص داده نمی‌شود. در حقیقت، بیش از ۷۰ درصد مبتلایان به سرطان‌ها تخمدان در مرحله III یا IV شناسایی می شوند. جدیدترین تحقیقات میزان زنده ماندن سرطان تخمدان پس از ۵ سال را ۴۷.۴ درصد اعلام کرده است. RNA-Seq روش نسبتاً جدیدی است که برای تعیین کمیت بیان ژن ها و شناسایی ترانسکریپتوم ها در داده های وسیع در شرایط متفاوت سلول ها، بافت ها یا ارگانیسم ها مورد استفاده قرار می گیرد و رویکرد مهمی را برای تصمیم‌گیری در مورد فیزیولوژی مولکولی سلول ایجاد می‌کند. شناخت شبکه ها و ژن های کلیدی در مراحل مختلف سرطان تخمدان می تواند آگاهی ما را از سرطان تخمدان بالا برده و به ارایه روندهای درمان هدفمند کمک نماید. در این پژوهش داده‌های RNA-seq از پایگاه اطلاعاتی GEO بارگیری شد سپس با استفاده از نرم‌افزاری‌های samtools, hisat2, trimmomatic, sratoolkit و htseq-count آنالیزهای اولیه در سیستم عامل اوبونتو انجام پذیرفت. خروجی داده‌ها در نرم‌افزارهای R (با بسته نرم افزاری مانند DEseq2) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها با توجه به تفاوت معنی داری بیان ژن ها در سطح $p<0.05$ نشان‌دهنده ژن‌های کدکننده کلیدی در مراحل پیشرفته و اولیه سرطان تخمدان می باشد. بر اساس نسبت بیان ژن‌ها با شاخصه log fold change و p-value ژن‌های RPS18 و IFITM3 به عنوان ژن‌های بیش‌بیان و ژن‌های LRRTM2 و MEIOC به عنوان ژن‌های کم‌بیان انتخاب شدند.

واژگان کلیدی: سرطان تخمدان ، پروتئین کدینگ ، ژن بیش بیان و کم بیان

۱.مقدمه

سرطان تخمدان با حدود ۲۴۰،۰۰۰ مورد جدید به عنوان هفتمین سرطان شایع در سراسر جهان معرفی شده است (National Cancer Institute. 2018). سرطان تخمدان پس از سرطان پستان در زنان بالای ۴۰ سال، به‌ویژه در کشورهای توسعه‌یافته، دومین بدخیمی شایع است (Vargas. 2014). سرطان تخمدان پنجمین سرطان کشنده در زنان می باشد(Siegel *et al.*, 2021). OC یک بیماری مزمن و پیچیده است که در یک سری تغییرات مولکولی در ژنوم، ترنسکریپتوم، پروتئوم و... نقش دارد. ترانسکریپتوم شامل RNA های غیر کد کننده (lncRNA ها و microRNA ها) و RNA های کد کننده (mRNA ها) است. mRNA ها پلی برای پیوند ژنوم با پروتئوم هستند و lncRNA ها رونویسی و ترجمه ژن های مرتبط با بیماری های مختلف از جمله سرطان را تنظیم می کنند. بیومارکرهای الگوهای مبتنی بر ترانسکریپتوم نقش مهمی در مراقبت از OC دارند (Lu & Zhan .2018). تغییر بیان ژن ها یکی از نشانه های اولیه از تغییرات مولکولی و ایجاد انواع سرطان ها می باشد. ژن هایی که افزایش بیان در این سلول ها نشان می دهند به عنوان آنکوژن و ژن های با بیان کم تر به سرکوبگرهای تومور معروف می باشند. لذا درک بهتر از تغییرات بیان ژن ها در مراحل مختلف سرطان می تواند شناخت بهتری از روندهای فعال در مراحل مختلف سرطان ارایه کند(Chien & Poole. 2017).

۲.مواد و روش ها

ما در این مطالعه ۱۳۲ داده از نمونه های مراحل پیشرفته و ابتدایی سرطان تخمدان از پایگاه داده‌ای GEO با کد GSE101108 و GSE143897 بارگیری کردیم که حاصل توالی یابی total RNA بودند. سپس سایر مراحل آنالیز داده‌ها در سرور مجازی با سیستم عامل اوبونتو انجام شد.

۲-۱-دریافت داده‌های مناسب

ابتدا داده‌های RNA-seq از پایگاه داده‌ای GEO (NCBI) با استفاده از نرم‌افزار SRA toolkit به‌صورت فایل های جدا گانه رفت و برگشت به فرمت FASTQ بارگیری شد.

۲-۲- بررسی کیفیت داده‌ها

داده‌های بارگیری شده با نرم‌افزار FastQC با عملکردهایی مانند Per Basic Statistics base GC ,Per Base Sequence, Quality contenr و...تعیین کیفیت شدند.

۲-۳-حذف خوانش های اضافه

بعد از تعیین کیفیت داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار trimmomatic-0.39 قسمت‌های باکیفیت کم برش خوردند و همچنین توالی‌هایی با طول خوانش کمتر از حد معینی که تعیین کردیم برش خوردند.

۲-۴- هم‌ردیفی داده ها با ژنوم مرجع انسانی

با استفاده از نرم‌افزار hisat2 که از قبل ژنوم انسانی مرجع را برای آن تعریف کرده بودیم توالی‌های داده‌های ما با ژنوم انسانی هم‌ردیف شدند و خروجی ما یک فایل sam با حجم بالابود.

۲-۵- تبدیل فرمت داده‌ها به bam

با استفاده از نرم‌افزار samtools فایل sam ما در قالب فایل bam با حجمی به مراتب کمتر مرتب آماده شد.

۲-۶-دریافت میزان بیان هر یک از نمونه ها (count)

نرم‌افزار htseq-count با GTF، mRNA تعریف‌شده فایل‌های آنالیز شده در فرمت count به ما داد.

۲-۷- آنالیز در R

فایل‌های count حاصله با استفاده از بسته های نرم افزاری موجود در نرم‌افزار R آنالیز و برسی شدند.

و با استفاده از پلات‌ها و نمودارهای حاصله از نرم‌افزار R، ژن هاانتخاب شدند.

برای اطمینان از انتخاب ژن‌هایی با تفاوت بیان معنی‌دار بیان ژن ها را در جدول Excel که در طی آنالیز R ساخته‌شده است و نشان‌دهنده بیان هر ژن در نمونه‌های موجود است را برسی می‌کنیم.

۲-۸-نمودار PCA

تجزیه‌وتحلیل مؤلفه اصلی یا PCA، یک روش کاهش ابعاد است که اغلب برای کاهش ابعاد مجموعه داده‌های بزرگ، با تبدیل مجموعه بزرگی از متغیرها به یک مجموعه کوچک‌تر که همچنان حاوی بیشتر اطلاعات مجموعه بزرگ است، استفاده می‌شود.

۲-۹-ماتریس فاصله

ماتریس فاصله، توزیع کلی نمونه‌ها و فاصله بین نمونه‌ها را نشان می‌دهد همچنین ازاین نمودار می‌توان برای شناسایی نمونه های پرت بهره برد.

۲-۱۰-نمودار آتشفشانی

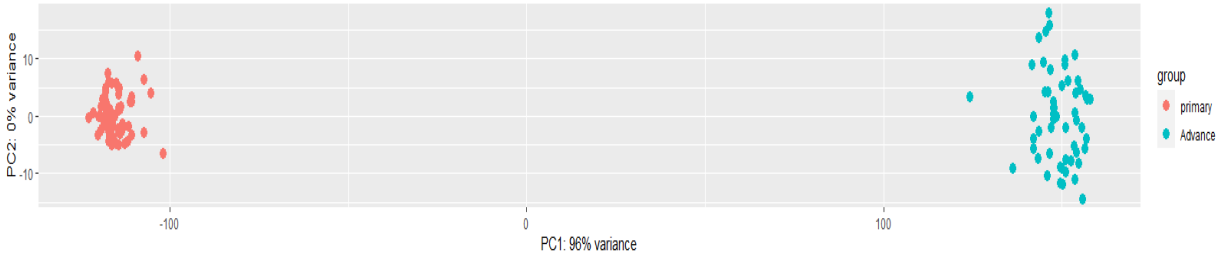
نمودار آتشفشان خلاصه‌ای از نتایج یک تجزیه و تحلیل است که در آن هر نقطه مربوط به یک رونوشت است، این نمودارها تجسم مناسبی از اثربخشی مطالعه و مکان کنترل‌ها ارائه می‌دهند. در حالت ایده آل، کنترل‌های منفی باید نزدیک به 0 باشند، درحالی‌که کنترل‌های مثبت باید به‌خوبی از 0 در هر دو محور فاصله داشته باشند.

۲-۱۱-برسی بیان در جدول res dadta

برای اطمینان از انتخاب ژن‌هایی با تفاوت بیان معنی‌دار بیان ژن هارا در جدول Excel که در طی آنالیز R ساخته‌شده است و نشان‌دهنده بیان هر ژن در نمونه‌های موجود است را برسی می‌کنیم.

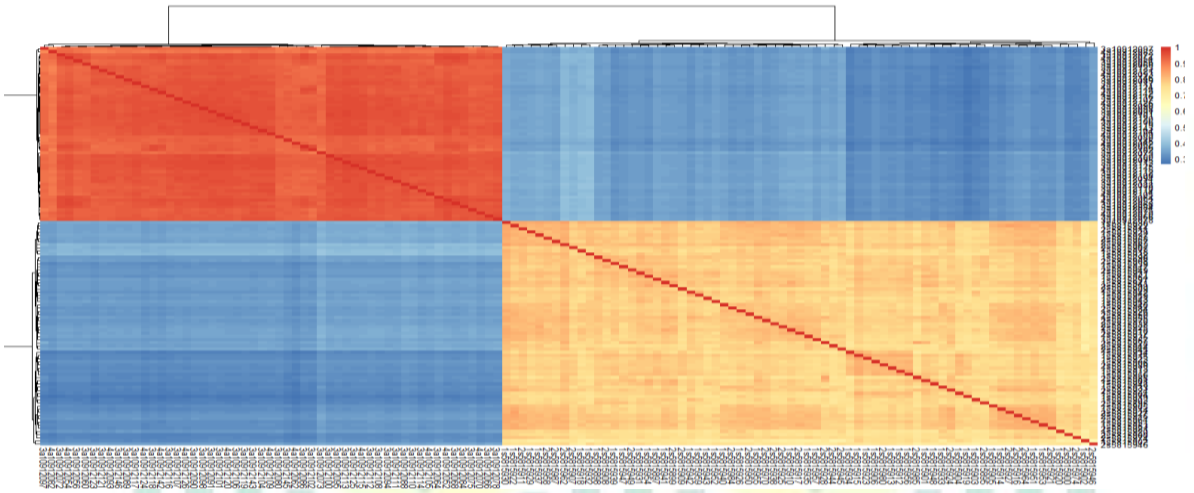
۳.نتایج وبحث

برای برسی بیشتر داده‌ها از لحاظ اینکه داده‌های مراحل اولیه و پیشرفته سرطان تخمدان به‌درستی انتخاب‌شده‌اند و برای مشخص کردن داده‌های پرت که نباید مورد تجزیه و تحلیل قرار بگیرند از نمودار PCA استفاده کردیم و همان‌طور که در (شکل ۱) مشاهده می‌شود داده‌های مراحل اولیه و پیشرفته فاصله قابل قبولی از هم دارند (pc1) و همچنین داده‌های هرکدام از گروه‌ها نزدیک به هم (pc2) و مشابه هم هستند و داده پرت مشاهده نمی‌شود.



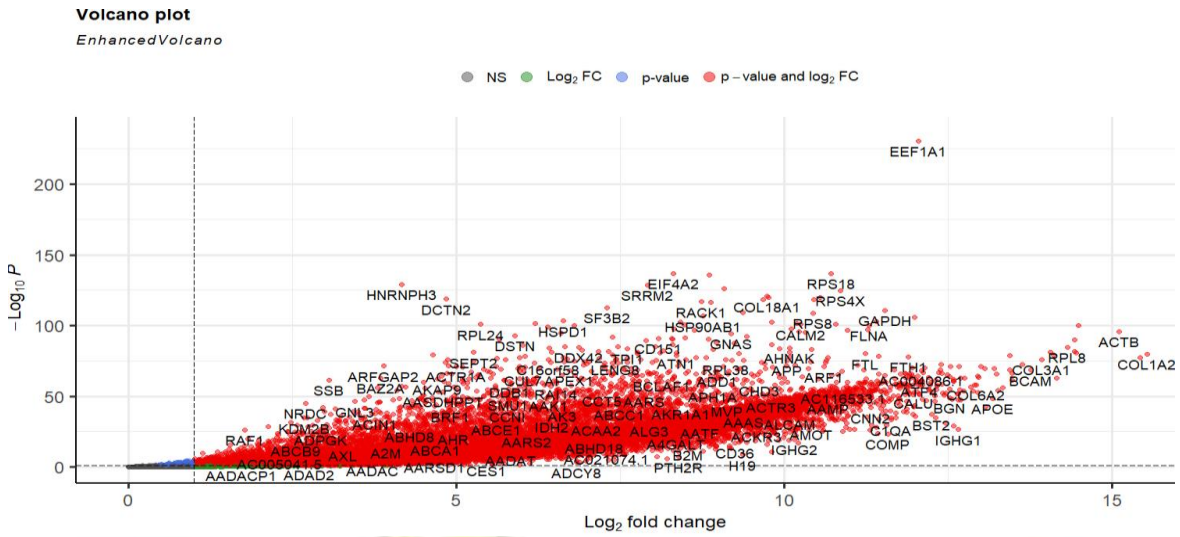
شکل ۱ : نمودار PCA مراحل اولیه و پیشرفته سرطان تخمدان

برای مشاهده و برسی فاصله بین نمونه‌ها و پراکنش درست داده‌ها نمودار ماتریس فاصله‌ای استفاده کردیم و همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود داده‌های مراحل اولیه و پیشرفته تداخلی باهم نداشته و ماتریس قابل قبولی تشکیل داده‌اند.



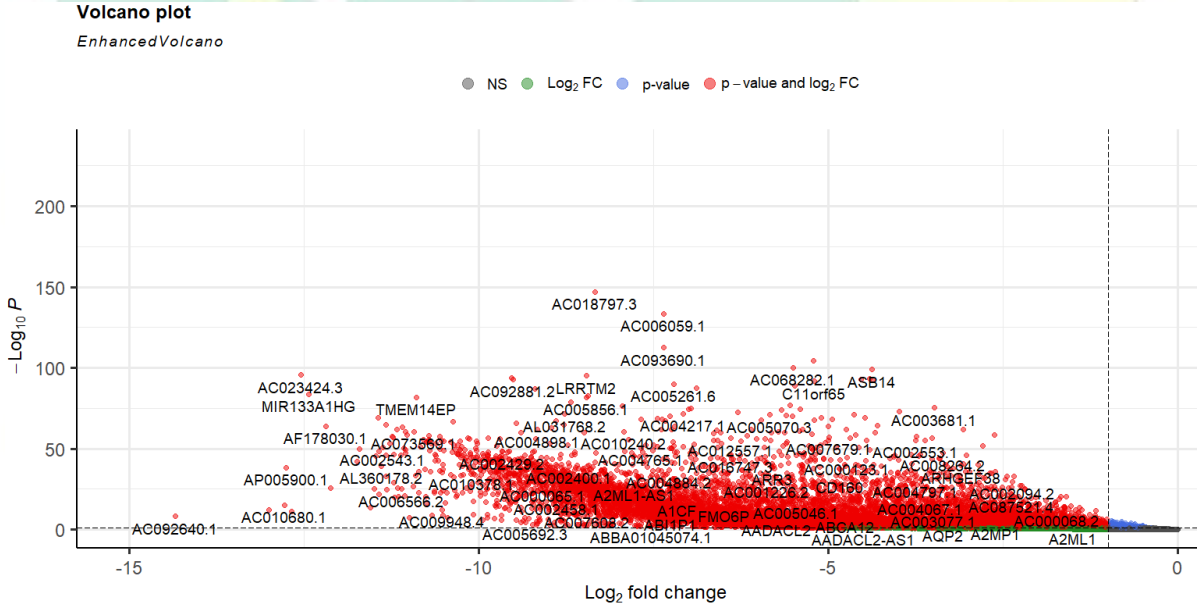
شکل ۲: ماتریس فاصله‌ای مراحل اولیه و پیشرفته سرطان تخمدان

ما برای انتخاب ژن‌هایی که بیان متفاوت و معنی‌داری داشتند از نمودار آتشفشانی استفاده کردیم و ۲ ژن با افزایش بیان در مرحله پیشرفته نسبت به مرحله اولیه انتخاب شد (شکل ۳و ۵). همچنین ۲ ژن که با کاهش بیان در مرحله پیشرفته نسبت به مرحله اولیه همراه بودند (شکل ۴و ۵) انتخاب شدند و نمودار بیان ژن‌ها انتخاب‌شده در داده های count مورد برسی قرار گرفتند.



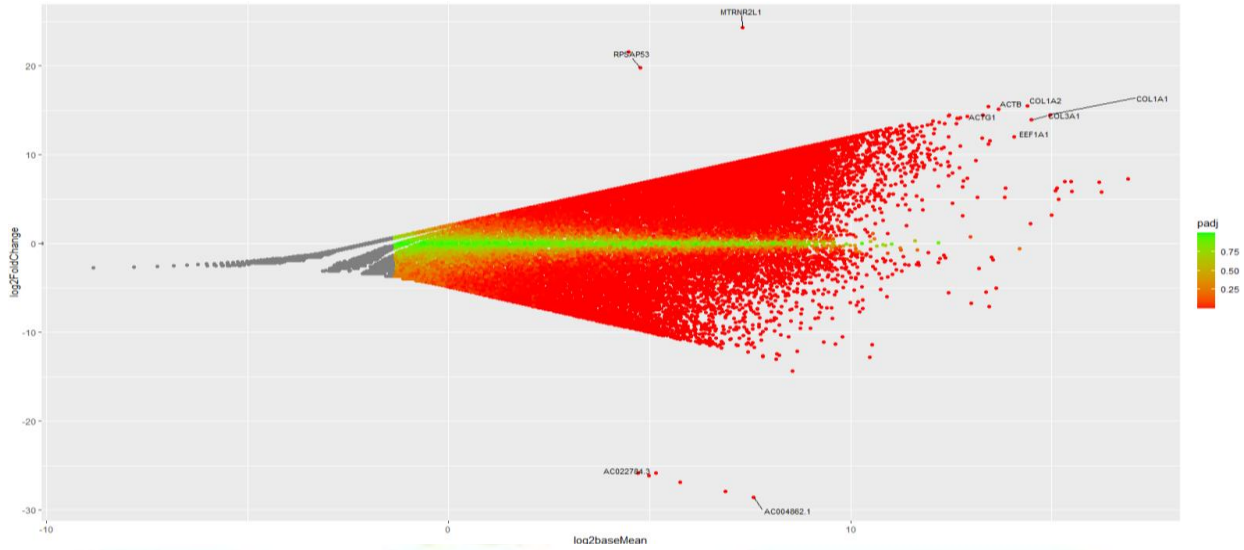
شکل ۳: نمودار آتشفشانی

محور X در شکل ۳ نشان‌دهنده،log2 fold change ژن‌هایی که افزایش بیان دارند و محور Y شامل log p-value آن ها می‌باشد.



شکل ۴: نمودار آتشفشانی

محور X در شکل ۴ نشان‌دهنده،log2 fold change ژن‌هایی که کاهش بیان دارند و محور Y شامل log p-value آن ها می‌باشد.



شکل ۵: نمودار پراکنش ژن‌ها بر اساس میانگین بیان و نسبت بیان ژن‌ها

بر اساس نسبت بیان ژن‌ها با شاخصه log fold change و p-value ، ژن‌های جدول (۱) به عنوان ژن های کم بیان و بیش بیان مراحل مختلف سرطان تخمدان معرفی می شوند.

جدول ۱: ژن‌های انتخاب‌شده با افزایش و کاهش بیان

		اسم ژن	میانگین بیان در مرحله اولیه	میانگین بیان در مرحله پیشرفته	P-valu
بیش بیان	۱	RPS18	۷	5800	۰
	۲	IFITM3	6	5300	۰
کم بیان	۱	LRRTM2	۷۰۰	۴	۰
	۲	MEIOC	۲۵۰	۴۰	۳.۹۹E-۱۲۶

در این مطالعه، آنالیزهای DEseq2 با استفاده از R با مجموعه داده OC انجام شد که حاوی داده‌های بیان ژن از مراحل اولیه و پیشرفته OC بود. سپس با رسم نمودار های مختلف با استفاده از دیگر پکیج های R، ۲ ژن که در مرحله پیشرفته افزایش بیان

داشتند با در نظر گرفتن log fold change و log base mean و برسی نمودار بیان ژن ها در نمونه های موجود انتخاب شدند (جدول ۱) همچنین ۲ ژن که دچار کاهش بیان در مرحله پیشرفته سرطان تخمدان شده بودند با در نظر گرفتن log fold change و base log mean و با برسی نمودار بیان این ژن ها انتخاب شدند (جدول ۱). که می‌توانند کاندید جدیدی از ژن های مهم و تاثیر گذار در مراحل پیشرفته و اولیه سرطان تخمدان باشند.

۴.نتیجه گیری

lncRNAs وmRNAs ها را میتوان به عنوان تنظیم کننده های مهم فرایندهای بیولوژیکی، به ویژه در توسعه بیماری ها از جمله سرطان درنظر گرفت (Kim & Do. ۲۰۱۸). بیان غیر طبیعی برخی از ژن‌ها منجر به بروز بیماری به ویژه سرطان و مقاومت در برابر بیماری می شود (Fernandes *et al*. 2019). به عنوان مثال ژن KIF20A روی کروموزوم q31.2۵ انسان قرار دارد و با اتصال به میکروتوبول ها، هیدرولیز ATP برای تولید انرژی مکانیکی و تداخل با میتوز سلولی، نقش مهمی در تومورزایی و توسعه دارد.همچنین BUBlB ، به عنوان یکی از پروتئین های مهم در مکان های تشخیص میتوزی، یک پروتئین کیناز چند دامنه ای است که به تنش سانترومر پاسخ می دهد. مشخص شده است که BUBlB در سرطان کلیه و پستان بیش از حد بیان می شود و جهش و بیان بیش از حد آن ارتباط نزدیکی با بی ثباتی کروموزومی دارد. و ثابت شد که BUBlB با پیش آگهی سرطان تخمدان مرتبط است و می تواند به عنوان پیش بینی کننده بقای کلی ضعیف و بقای بدون پیشرفت بیماران سرطان تخمدان استفاده شود (Zhang & Sun *et al*.2019).

درمطالعه ای ارتباط بین بیان PSAT1 و بروز، توسعه و پیش آگهی سرطان تخمدان بیشتر توسط ایمونوهیستوشیمی تأیید شد. بیان PSAT1 می تواند به عنوان یک نشانگر پیش آگهی برای ارائه یک هدف بالقوه برای تشخیص و درمان سرطان تخمدان استفاده شود (Zhang *et al*.2019).

بیان بیش از حد، CCNB1، UBE2C، CDK1، CEP55 و FOXM1 در تومورهای درجه تایید شد. علاوه بر این، ژن‌های FOXM1، CDC20 و CCNB1 بیشترین تغییرات را داشتند. که این ژن ها ارتباط نزدیکی با فرآیند جهش BRCA1/2 OC دارند. همچنین زنان مبتلا به جهش BRCA1 یا BRCA2 بسیار مستعد ابتلا به OC هستند که اکثریت گروه را تشکیل می دهد(Tang *et al*. 2020)

در مطالعه حاضر به تجزیه و تحلیل بیانmRNA های افراد مبتلا به سرطان تخمدان در مراحل اولیه و پیشرفته پرداخته شده است تا سطح بیان این ژن ها و ارتباط آن با مراحل مختلف سرطان تخمدان آشکار شود.و در انتها ژن‌های RPS18 و IFITM3 به عنوان ژن‌های بیش‌بیان و ژن‌های LRRTM2 و MEIOC به عنوان ژن‌های کم‌بیان انتخاب شدند.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از سرکار خانم ها زینب درزی و سارا چیتگران که در انجام برخی از مراحل مطالعه همکاری داشتند، صمیمانه سپاسگزارند.

منابع

Do, H., & Kim, W. (2018). Roles of Oncogenic Long Non-coding RNAs in Cancer Development. Genomics Inform, 16(4), e18. https://doi.org/10.5808/GI.2018.16.4.e18

Fernandes, J. C., Acuña, S. M., Aoki, J. I., Floeter-Winter, L. M., & Muxel, S. M. (2019). Long non-coding RNAs in the regulation of gene expression: physiology and disease. Non-coding RNA, 5(1), 17 .

Lu, M., & Zhan, X. (2018). The crucial role of multiomic approach in cancer research and clinically relevant outcomes. EPMA Journal, 9(1), 77-102. doi:10.1007/s13167-018-0128-8

National Cancer Institute.(2018). Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. Cancer stat facts: ovarian cancer. Available at: https://seer.cancer.gov/statfacts/ html/ovary.html.

Ovarian Cancer Research Alliance. (2018).About Ovarian Cancer. https://ocrahope.org/patients/about-ovarian-cancer/

Tang, W., Li, J., Chang, X., Jia, L., Tang, Q., Wang, Y., Zheng, Y., Sun, L., & Feng, Z. (2020). Construction of a novel prognostic-predicting model correlated to ovarian cancer. Bioscience reports, 40(8), BSR20201261. https://doi.org/10.1042/BSR20201261

Vargas A. N. (2014). Natural history of ovarian cancer. Ecancermedicalscience, 8, 465.

Webb, P. M., Green, A. C., & Jordan, S. J. (2017). Trends in hormone use and ovarian cancer incidence in US white and Australian women: implications for the future. Cancer causes & control : CCC, 28(5), 365–370.

Chien, J., & Poole, E. M. (2017). Ovarian Cancer Prevention, Screening, and Early Detection: Report From the 11th Biennial Ovarian Cancer Research Symposium. International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society, 27(9S Suppl 5), S20–S22.

Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 71(1), 7–33. https://doi.org/10.3322/CAAC.21654

Zhang, L., Sun, L., Zhang, B., & Chen, L. (2019). Identification of Differentially Expressed Genes (DEGs) Relevant to Prognosis of Ovarian Cancer by Use of Integrated Bioinformatics Analysis and Validation by Immunohistochemistry Assay. Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research, 25, 9902–9912. https://doi.org/10.12659/MSM.921661

Zheng, M.-J., Li, X., Hu, Y.-X., Dong, H., Gou, R., Nie, X., . . . Lin, B. (2019). Identification of molecular marker associated with ovarian cancer prognosis using bioinformatics analysis and experiments. 234(7), 11023-11036. doi:https://doi.org/10.1002/jcp.27926

Investigation of cell cycle pathway gene expression in breast cancer data using Reactome database

Zeinab Darzi [1] *; Sohrab Boozarpour [2]; Moein Farshchian [3], Shaaban Ghalandarayeshi [4], Mina Lashkarboloki [5]

1- Master student of Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavous University

2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavous University

3- Stem Cell and Regenerative Medicine Research Group, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Khorasan Razavi Branch, Mashhad

4- Assistant Professor, Department of Mathematics and Statistics, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavous University

5- Ph. D student, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University

* *Zeinab.darzii@gmail.com*

Abstract

Breast cancer is the most common cancer in women. It can spread to distant organs such as the brain, lungs, bones and liver. Early detection can increase survival to some extent. Today, high-throughput genomic approaches can simultaneously examine the diversity of thousands of DNA sequences, mRNA transcripts, and peptides and metabolites, and provide a comprehensive overview of cellular processes. Identifying cancer-related genes To diagnose these diseases is a common task in gene expression research. 90 data, including 18 normal samples and 72 cancer samples, were initially downloaded from the NCBI SRA database. Then, to clean the data from contamination, trimatic software was used and the data count file was checked with R software. The purpose of this step is to investigate DEGs or differences in gene expression in samples. After deleting 33 overlapping data by GSEA software, gene enrichment was performed based on reactome database and gene expression in three gene sets REACTOME_CELL_CYCLE_CHECKPOINTS, REACTOME_CELL_CYCLE_MITOTIC and REACTOME_CELL_CYCLE were identified. They enriched these paths in a negative way and pushed the chart down.

Keywords: GSEA, WGCNA, RNAseq, Breast Cancer

بررسی بیان ژن های مسیرهای چرخه سلولی در داده های سرطان پستان با استفاده از پایگاه داده Reactome

زینب درزی[۱*]؛ سهراب بوذرپور[۲]؛ معین فرشچیان[۳]، شعبان قلندر آیشی[۴] ، مینا لشکربلوکی[۵]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس

۲- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه گنبد کاووس

۳- گروه تحقیقات سلول های بنیادی و پزشکی بازساختی، مرکز آموزشی، فرهنگی و تحقیقاتی دانشگاهی ACECR، واحد خراسان رضوی، مشهد

۴- استادیار گروه ریاضی و آمار، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه گنبد کاووس

۵- دانشجوی دکترای ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

* *ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: Zeinab.darzii@gmail.com*

چکیده

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان می‌باشد. این بیماری توانایی انتقال به اندام‌های دوردستی چون مغز، ریه، استخوان و کبد را دارد. تشخیص به موقع تا حدی می‌تواند میزان زنده ماندن را افزایش دهد. امروزه رویکردهای ژنومی high-throughput می‌تواند به طور همزمان تنوع در هزاران توالی DNA، رونوشت های mRNA و پپتیدها و متابولیت ها را بررسی کرده و نگاه جامعی از فرآیندهای سلولی ارائه می دهد. شناسایی ژن‌های مرتبط با سرطان برای تشخیص این بیماری‌ها کاری رایج در تحقیقات بیان ژن می‌باشد ۹۰ داده شامل ۱۸ نمونه نرمال و ۷۲ نمونه سرطانی در مرحله اولیه از پایگاه داده NCBI بخش SRA دانلود شد. سپس برای پاک کردن داده ها از آلودگی ها از نرم افزار تریموماتیک استفاده شد و فایل count داده ها با نرم افزار R بررسی گردید. هدف از این مرحله بررسی DEGs یا تفاوت بیان ژن‌ها در نمونه‌ها است. پس از حذف ۳۳ داده همپوشان توسط نرم افزار GSEA غنی سازی ژن ها براساس پایگاه داده reactome انجام شد و بیان ژن ها در سه مجموعه ژنی REACTOME_CELL_CYCLE_CHECKPOINTS، REACTOME_CELL_CYCLE_MITOTIC و REACTOME_CELL_CYCLE مقایسه شدند و مهمترین ژن های موثر در تغییر این مسیرها مشخص شدند که با افزایش بیان خود باعث غنی شدن این مسیرها به صورت منفی شدند و نمودار را به سمت پایین هدایت کردند.

واژگان کلیدی: GSEA، WGCNA، RNAseq، سرطان پستان

۱. مقدمه

شایع‌ترین سرطان زنان در جهان سرطان پستان[۲۳۵] می‌باشد. در سال ۲۰۱۷ در آمریکا چیزی معادل ۲۵۲۷۱۰ نفر مبتلا به سرطان پستان گزارش شده‌است که این رقم ۳۰ درصد از کل موارد سرطان‌های جدید را در این سال تشکیل می‌دهد(Rebecca, Kimberly et al. 2017). سرطان پستان یکی از بیماری‌هایی است که امروزه توسط رویکردهای ژنومی high-throughput مورد بررسی قرار می‌گیرد(Sims, Ong et al. 2006). این روش‌ها می‌تواند به طور همزمان تنوع در هزاران توالی DNA، رونوشت های mRNA و پپتیدها و متابولیت ها را بررسی کرده و نگاه جامعی از فرآیندهای سلولی ارائه می دهد(Howell, Sims et al. 2005). در این روش ها برای اثبات یا رد یک فرضیه سطح یک ژن یا پروتئین اندازه گیری می شود(Clarke, Ressom et al. 2008).

شناسایی ژن‌های مرتبط با سرطان برای تشخیص این بیماری‌ها کاری رایج در تحقیقات بیان ژن می‌باشد. برای به دست آوردن مجموعه‌های ژنی کوچکی که می‌توانند عملکرد پیش بینی کننده خوبی داشته باشند لازم است ژن‌های مرتبط شناسایی و باقی ژن‌ها حذف شوند(Lei 2021). کمی‌سازی DNA، RNA و پروتئین و آنالیز آنها منجر به ایجاد لیستی طولانی از ژن‌ها می‌شود، روش Pathway enrichment analysis روشی استاندارد برای بررسی این لیست بزرگ از ژن‌هاست. در این روش این لیست بزرگ ژن‌ها در لیستی کوچکتر خلاصه می‌شود و مسیر را به آسانی قابل تفسیر می‌کند(Reimand, Isserlin et al. 2019). مسیرهای مشخص شده در ژنهای کلاستر شده در بالای لیست رتبه بندی امتیاز بالاتری دارند نسبت به ژنهایی که به طور تصادفی در لیست رتبه بندی قرار گرفته‌اند(Reimand, Isserlin et al. 2019).

GSEA یک روش threshold-free است که ژن‌ها را براساس تفاوت بیان و امتیازات دیگر بدون فیلتر قبلی آنالیز می‌کند. این روش زمانی توصیه می‌شود که برای همه یا اکثر ژن‌های موجود در ژنوم رتبه بندی وجود دارد(Reimand, Isserlin et al. 2019). این روش برای تعیین تفاوت معنی داری یا همخوانی بین دو حالت بیولوژیکی استفاده می‌شود (Lei 2021).

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱-جست و جوی داده‌های RNAseq

ابتدا برای جست‌وجوی داده‌های ایده‌آل از پایگاه داده NCBI بخش SRA استفاده شد. داده‌های سرطانی و نرمال از این پایگاه دانلود شد برای دانلود داده‌های مورد نظر از کلید واژه breast cancer استفاده شد. ۹۰ داده شامل ۱۸ نمونه نرمال و ۷۲ نمونه سرطان اولیه پستان دانلود شد.

۲-۲-دانلود داده‌ها از سایت NCBI و آماده سازی اولیه

دانلود داده‌ها و انجام آنالیزهای اولیه در سیستم عامل اوبونتو نسخه Ubuntu 20.04.1 LTS و سرور مجازی لینوکس استفاده شد. دانلود داده‌های مورد نظر با فرمت fastq با استفاده از نرم‌افزار fastq-dump انجام شد.

[235] Breast Cancer

۲-۳-پاکسازی داده‌ها از آلودگی‌ها با استفاده از نرم افزار Trimmomatic

در این مرحله داده با استفاده از نرم افزار تریموماتیک نسخه Trimmomatic-0.39 نصب شده بر روی سرور مجازی به نوعی از آلودگی‌ها پاکسازی شدند.

۲-۴-استفاده از نرم افزار hisat2

در مرحله چهارم از نرم‌افزار hisat2 استفاده شد، hisat2 برنامه‌ای با رویکرد هم ترازی برای نقشه خوانش‌های توالی نسل بعد می‌باشد این داده‌ها ممکن است داده‌های توالی یابی از کل ژنوم، ترانسکریپتوم و یا توالی اگزوم باشد که با یک ژنوم مرجع واحد مقایسه می‌شود.

۲-۵-استفاده از نرم افزار samtools

فایل sam حاصل از مرحله قبل در این مرحله توسط نرم افزاری به نام samtools به فایل bam تبدیل شد.

۲-۶-استفاده از نرم افزار htseq-count

در این مرحله با استفاده از نرم‌افزار htseq-count و یک فایل gtf، تعداد ژن‌های بیان شده در داده‌ها در فایلی با پسوند count شمارش و ثبت شد.

۲-۷-بررسی داده‌ها در نرم افزار R

پس از انجام تمامی مراحل بخش اول برای بررسی میزان بیان ژن از نرم افزار R استفاده شد. هدف از این مرحله بررسی DEGs یا تفاوت بیان ژن‌ها در نمونه‌ها است. در این مرحله از پکیج‌های tidyverse، DESeq2 ، gplots استفاده شد و با رسم پلات‌ها ۳۳ داده به دلیل همپوشانی با سایر داده‌ها حذف شدند. در انتهای این مرحله لیستی از ژن‌ها را به دست آورده که میزان بیان آن در هر نمونه مشخص شده‌است.

۲-۸-بررسی داده‌ها در نرم‌افزار GSEA

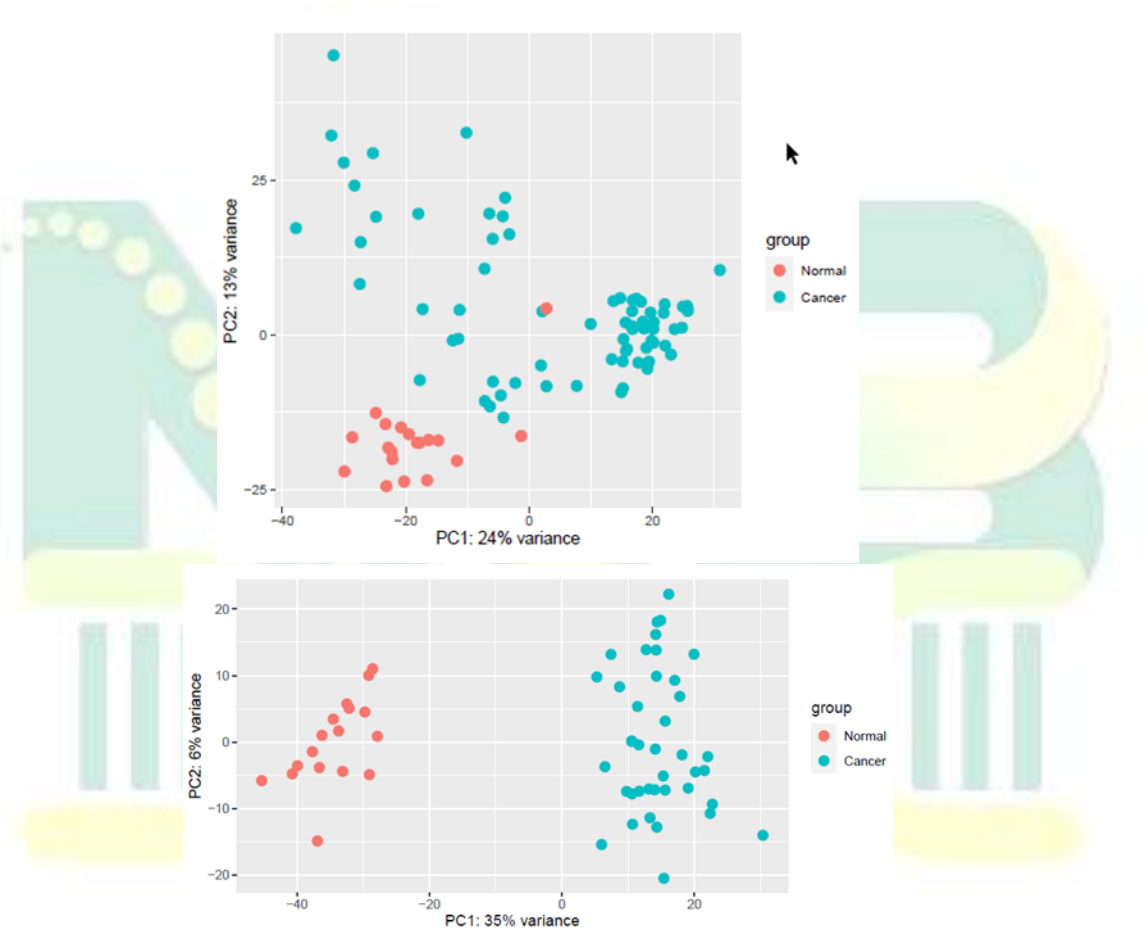
یکی از نرم افزارهای مهم برای تجزیه و تحلیل غنی سازی مسیر GSEA می‌باشد که با استفاده از یک آزمون مبتنی بر جایگشت لیست‌های ژنی رتبه بندی شده را آنالیز می‌کند. این نرم افزار فایلی که حاوی رتبه بندی ژن‌هاست و از مرحله قبل به دست آمده را دریافت می‌کند و پس از انجام آنالیز تعدادی پلات و اطلاعات را در اختیار ما قرار داد که در بخش نتایج به تفسیر این اطلاعات می‌پردازیم.

۳. نتایج و بحث

۳-۱-ویژگی نمونه‌ها

نمونه‌های مورد نظر از پایگاه داده NCBI بخش SRA دانلود شد. ۹۰ داده از این مطالعه که توسط دانشگاه Sichuan University در این سایت ثبت شد شامل ۱۸ نمونه بافت نرمال و ۷۲ نمونه بافت سرطان اولیه پستان از نوع TNBC دانلود شد. این نمونه‌ها از نوع TRANSCRIPTOMIC می‌باشند، که توسط دستگاه Illumina HiSeq X Ten توالی یابی شدند.

در این مرحله از پکیج‌های tidyverse، DESeq2، gplots استفاده شد و با رسم پلات‌ها ۳۳ داده به دلیل همپوشانی با سایر داده‌ها حذف شدند. در انتهای این مرحله لیستی از ژن‌ها را به دست آورده که میزان بیان آن در هر نمونه مشخص شده‌است (شکل ۱).

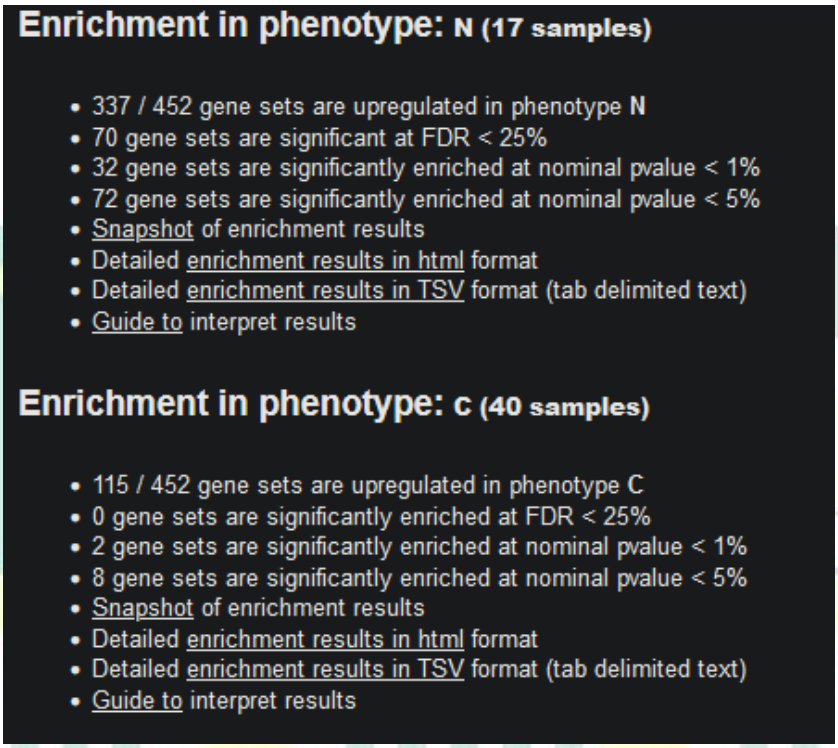


شکل ۵: پراکندگی داده های سرطانی و نرمال، a) پلات PCA پیش از حذف برخی داده ها b) پلات PCA پس از حذف برخی داده ها

لیست ژن‌های حاصل از مرحله قبل در این مرحله ورودی ما برای نرم افزار GSEA می‌باشد. هدف از انجام این مرحله این است که ببینیم ژن‌های ما در کدام بخش از مسیرهای بیولوژیکی ایفای نقش می‌کنند. برای بررسی این داده ها در این بخش از gene set های reactome موجود در بخش MSigDB[۲۳۶] در این نرم افزار استفاده شد(c2.cp.reactome.v7.4.symbols.gmt).

[236] Molecular Signatures Database

در شکل۱ نتایج غنی سازی داده ها بر اساس مجموعه های ژنی پایگاه داده reactome را مشاهده می کنید. در گروه نرمال ما از میان ۴۵۲ مجموعه ژنی این پایگاه ۳۳۷ مجموعه ژن و از گروه سرطانی ۱۱۵ مجموعه ژن افزایش بیان داشتند و ۷۰ مجموعه ژن از نرمال ها دارای FDR<25% می‌باشد و هیچ مجموعه ژنی از گروه سرطانی به طور معنی دار در این بخش غنی نشده اند. FDR[237] یعنی اگر چهار بار این آزمایش تکرار شود به احتمال یک چهارم ممکن است نتیجه مثبت کاذب باشد. در خط بعد nominal pvalue < 1% را داریم که در واقع همان pvalue ، adj نشده می‌باشد و نرمال ها ۳۲ مجموعه ژن و سرطانی ها ۲ مجموعه ژن غنی شده در این بخش را دارند.

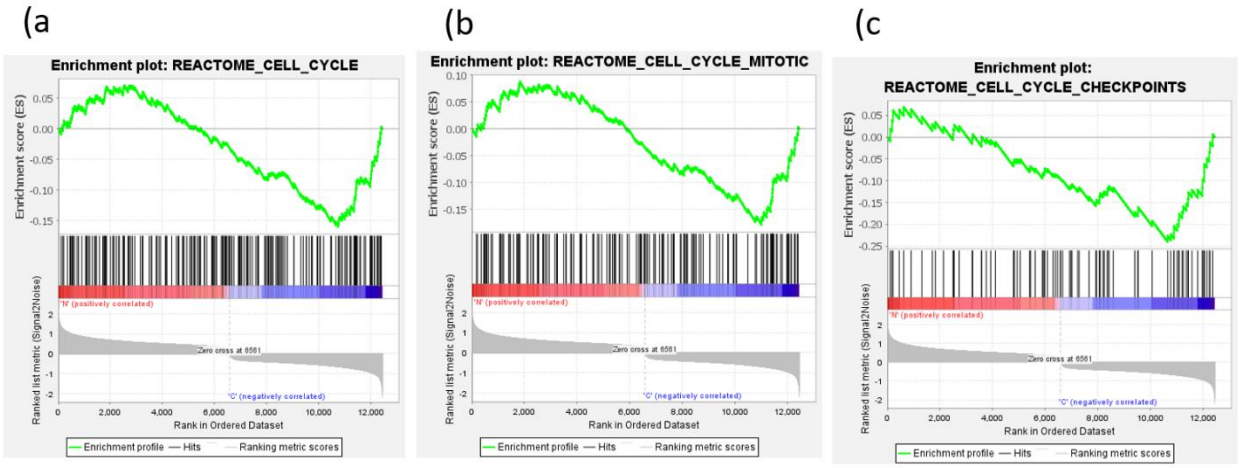


شکل ۶: نتایج غنی سازی داده ها بر اساس مجموعه های ژنی پایگاه داده reactome

از قسمت snapshot نتایج غنی سازی توسط نرم افزار را به صورت نمودار می‌توانیم دریافت کنیم. در این بخش ۲۰ نمودار برتر مربوط به آنالیز به نمایش گذاشته می‌شود. این نمودار بر اساس امتیاز غنی سازی که نرم افزار به هریک از ژن‌های بیان شده داده است کشیده می‌شود، خطوط سیاه رنگ بیانگر ژن‌هاست، با افزایش بیان هر ژن در این مجموعه ژن نمودار به سمت بالا و با کاهش بیان نمودار به سمت پایین متمایل می‌شود. ژنی که بیشترین بیان را دارد Log fold change مثبت تری دارد و به سمت رنگ قرمز می‌رود و ژنی که بیان کمتر دارد Log fold change منفی تر می‌شود و در سمت رنگ آبی قرار می‌گیرد. در انتهای نمودار یک بخش امتیازدهی وجود دارد و نشان دهنده آن است که ژن‌هایی که در سمت چپ و راست قرار می‌گیرند وزن بیشتری نسبت به ژن‌های قرار گرفته در ناحیه وسط نمودار دارند. از ژنی که بیشترین ES را دارد به سمت چپ در زیر نمودار سبزرنگ بیانگر ژن‌هایی است که

[237] false discovery rate

بیشترین تاثیر را در این gene set دارند. در این قسمت پلات هایی که مربوط به مسیرهای مورد نظرمان هستند را بررسی می کنیم. در شکل ۲ داده‌های ما با مجموعه ژن REACTOME_CELL_CYCLE_CHECKPOINTS، REACTOME_CELL_CYCLE_MITOTIC و REACTOME_CELL_CYCLE_CHECKPOINTS مقایسه شدند و همانطور که می‌بینید نمودار سبز رنگ بیشتر به سمت پایین تر از عدد صفر متمایل شده اما برخی ژن ها نیز نمودار را به طور مثبت غنی کردند. این نشان دهنده این است که ژن های مشخص شده که مربوط به این مجموعه ژنی هستند در قسمت قرمز رنگ با افزایش بیان خود باعث می شوند مجموعه ژن به طور مثبت غنی شود ولی ژن هایی که در بخش آبی قرار می گیرند سبب می شوند که این مجموعه ژن به طور منفی غنی شود و نمودار به سمت پایین متمایل شود. پس می توان نتیجه گرفت که برخی ژن ها با افزایش بیان و برخی دیگر با کاهش بیان بر تغییر روند این مسیرها موثر هستند. در جدول های ۲، ۳ و ۴، پنج ژن core که در تغییرات این مسیر نقش به سزایی داشتند را مشاهده می کنیم. ژن های معرفی شده می توانند در تحقیقات بعدی بیشتر بررسی شوند تا نقش آن ها در بروز یا تاثیر بر سرطان TNBC مشخص شود.



شکل ۲: Enrichment plot . a) مجموعه ژنی REACTOME_CELL_CYCLE ، b)
REACTOME_CELL_CYCLE_MITOTIC ،c) REACTOME_CELL_CYCLE_CHECKPOINTS

جدول ۳: ژن های core موثر در مسیر REACTOME_CELL_CYCLE

	SYMBOL	TITLE	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
۱	DSCC۱	na	۱۰۷۴۳	-۰.۶۵۴	-۰.۱۵۴۵	Yes
۲	POLR۲E	na	۱۰۷۵۴	-۰.۶۵۵	-۰.۱۵۰۰	Yes
۳	MCM۷	na	۱۰۷۶۷	-۰.۶۵۷	-۰.۱۴۵۶	Yes

۴	FEN۱	na	۱۰۸۱۱	-۰.۶۶۲	-۰.۱۴۳۷	Yes
۵	RHNO۱	na	۱۰۸۸۵	-۰.۶۷۳	-۰.۱۴۴۲	Yes

جدول ۴: ژن های core موثر در مسیر REACTOME_CELL_CYCLE_MITOTIC

	SYMBOL	TITLE	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
۱	FBXO۵	na	۱۰۹۹۴	-۰.۶۹۰	-۰.۱۷۱۰	Yes
۲	ANAPC۱۰	na	۱۱۰۰۸	-۰.۶۹۲	-۰.۱۶۴۹	Yes
۳	ANAPC۱۱	na	۱۱۰۶۷	-۰.۷۰۲	-۰.۱۶۲۳	Yes
۴	RFC۵	na	۱۱۰۸۰	-۰.۷۰۵	-۰.۱۵۵۹	Yes
۵	GINS۳	na	۱۱۱۹۲	-۰.۷۲۵	-۰.۱۵۷۴	Yes

جدول ۵: ژن های core موثر در مسیر REACTOME_CELL_CYCLE_CHECKPOINTS

	SYMBOL	TITLE	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
۱	TP۵۳BP۱	na	۱۰۶۴۵	-۰.۶۳۹	-۰.۲۲۶۵	Yes
۲	MCM۷	na	۱۰۷۶۷	-۰.۶۵۷	-۰.۲۲۲۷	Yes
۳	RHNO۱	na	۱۰۸۸۵	-۰.۶۷۳	-۰.۲۱۸۳	Yes
۴	ABRAXAS۱	na	۱۰۸۸۶	-۰.۶۷۴	-۰.۲۰۴۳	Yes
۵	ANAPC۱۰	na	۱۱۰۰۸	-۰.۶۹۲	-۰.۱۹۹۸	Yes

۴. نتیجه‌گیری

سرطان پستان یکی از شایع ترین بیماری زنان در جهان است که سالانه بسیاری از افراد را به کام مرگ می کشاند و نیاز است به لحاظ ژنتیکی مورد توجه بیشتری قرار گیرد. در این مطالعه سه مسیر مرتبط با چرخه سلولی مورد بررسی قرار گرفت و با هم مقایسه شد. مهمترین ژن های موثر در تغییر این مسیرها مشخص شدند که به طور میانگین در نمونه های سرطانی بررسی شده در این مطالعه با افزایش بیان خود باعث غنی شدن این مسیرها به صورت منفی شدند و نمودار را به سمت پایین هدایت کردند. از جمله ژن های تاثیرگذار در این مسیرها ژن های DSCC1، POLR2E، MCM7، FEN1، RHNO1 در مسیر REACTOME_CELL_CYCLE، ژن های FBXO5، ANAPC10، ANAPC11، RFC5 و GINS3 در مسیر REACTOME_CELL_CYCLE_MITOTIC و ژن های TP53BP1، MCM7، RHNO1، ABRAXAS1 و ANAPC10 در مسیر REACTOME_CELL_CYCLE_CHECKPOINTS هستند.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از جناب آقای احمد صبوری، سرکار خانم سارا چیتگران و جناب آقای سعید خاتمی که در انجام برخی از مراحل مطالعه همکاری داشتند، صمیمانه سپاسگزارند.

منابع

6. Clarke, R., H. W. Ressom, A. Wang, J. Xuan, M. C. Liu, E. A. Gehan and Y. Wang (2008). "The properties of high-dimensional data spaces: implications for exploring gene and protein expression data." Nature reviews cancer **8**(1): 37-49.
7. Howell, A., A. H. Sims ,K. R. Ong, M. N. Harvie, D. G. R. Evans and R. B. Clarke (2005). "Mechanisms of disease: prediction and prevention of breast cancer—cellular and molecular interactions." Nature Clinical Practice Oncology **2**(12): 635-646.
8. Lei, T. (2021). "GSEA–SDBE: A Gene Selection Method for Breast Cancer Classification Based on GSEA and Random Forest Based Dimension Reduction." International Journal of Early Childhood Special Education (INT-JECSE) **30**(2): 420.
9. Rebecca, S., D. M. Kimberly and J. Ahmedin (2017). "Cancer statistics." Ca Cancer J Clin **67**(27): 7-30.
10. Reimand, J., R. Isserlin, V. Voisin, M. Kucera, C. Tannus-Lopes, A. Rostamianfar, L. Wadi, M. Meyer, J. Wong and C. Xu (2019). "Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g: Profiler, GSEA ,Cytoscape and EnrichmentMap." Nature protocols **14**(2): 482-517.
11. Sims, A. H., K. R. Ong, R. B. Clarke and A. Howell (2006). "High-throughput genomic technology in research and clinical management of breast cancer. Exploiting the potential of gene expression profiling: is it ready for the clinic?" Breast Cancer Research **8**(5): 1-7.

Bioinformatics study of MAPK gene in different plants

Shahram ghasemi [1] , Leila Ahangar [2] and Ashkan Shariffi[1]

1-MS. Of Biotechnology. Department of Plant Production, Faculty of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gonbad Kavous University
2-Assistant Professor. Department of Plant Production, Faculty of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gonbad Kavous University

Abstract

MAPKs belong to the kinase group, which are specific for the amino acids serine, threonine and tyrosine. These proteins control cellular responses to various events within the plant. In order to study the MAPK gene, genomic sequences in several different plant (apples, corn, etc.) were extracted from the NCBI site and analyzed. The results of allignment indicated the similarity of the sequence of this gene in the studied plants. The length of proteins of MAPK is about 586-306 amino acids and the length of nucleotides is between 1212-2014 bp. The study of phylogenetic tree related to the protein sequence of these plants indicates that *Malus hupehensis* and *Lilium regale* plants are in one group, *Glycine max* and *Morus alba var. multicaulis voucher YU71-1* in another group and other plants in another separate group.

Keywords: MAPK, cellular response, stress, proteins

مطالعه بیوانفورماتیکی ژن MAPK در گیاهان مختلف

Bioinformatic study of MAPK gene in different plants

شهرام قاسمی[1*]، لیلا آهنگر[2] و اشکان شریفی[1]

۱- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس

۲- استادیار بخش تولیدات گیاهی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس

چکیده

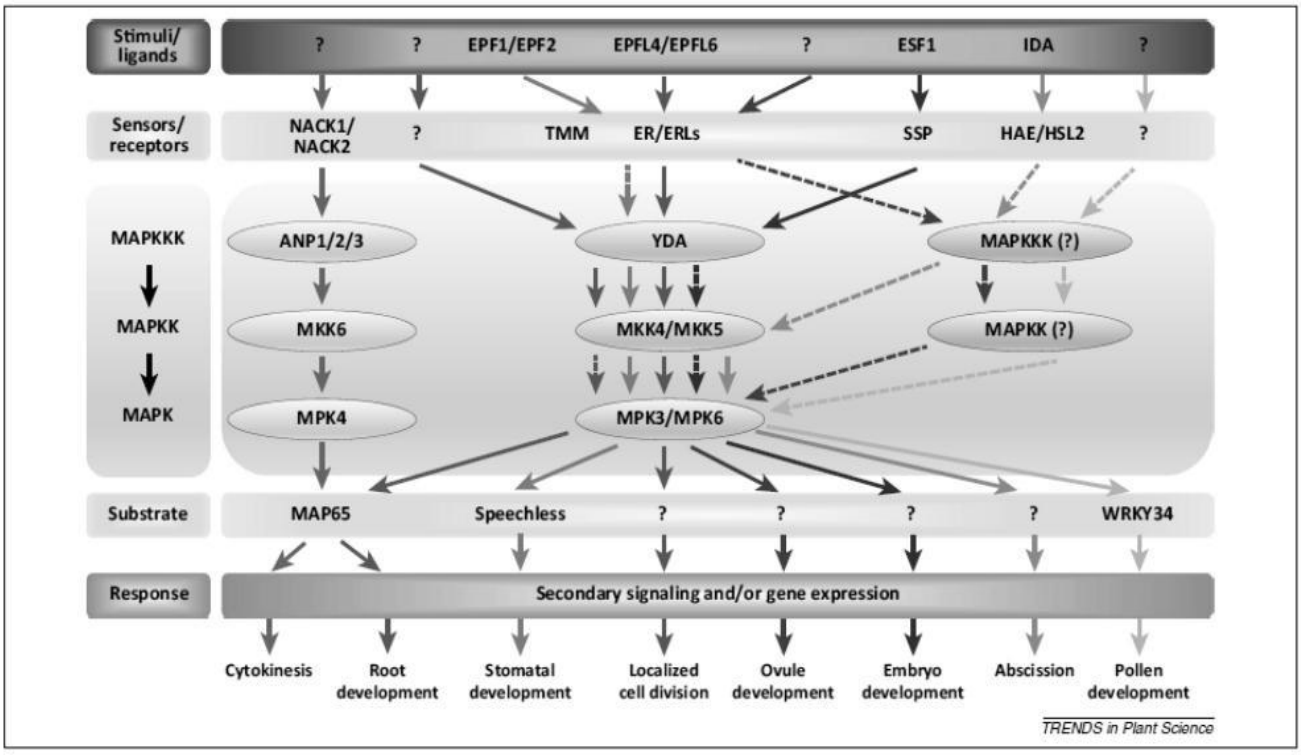
*MAPK*ها متعلق به گروه کیناز هستند که خاص اسیدهای آمینه سرین، ترئونین و تیروزین هستند. این پروتئین ها پاسخ های سلولی به رویدادهای مختلف درون گیاه را مدیریت می کند. به منظور بررسی و مطالعه این ژن، توالی ژنومی در چندین نمونه گیاهی مختلف (سیب، ذرت و ...) از سایت NCBI استخراج و مورد بررسی قرار گرفت. نتایج هم پوشانی حاکی از تشابه توالی این ژن در نمونه های مورد بررسی بود. طول پروتئین های این ژن در گیاهان مورد بررسی در این تحقیق، حدود ۵۸۶-۳۰۶ اسید امینه می باشد و طول نوکلئوتید ها مابین ۲۰۱۴-۱۱۲۸ می باشد. بررسی درخت فیلوژنتیکی مربوط به توالی پروتئین این گیاهان حاکی از قرار گرفتن گیاهان گیاهان *Malus hupehensis* و *Lilium regale* در یک گروه، *Glycine max* و *Morus alba var. multicaulis voucher YU71-1* در گروه دیگر و نهایتا سایر گیاهان در گروه جداگانه‌ی دیگری قرار گرفتند.

کلمات کلیدی: MAPK، پاسخ سلولی، تنش، پروتئین‌های آبشاری

۱.مقدمه

Mitogen-activated protein kinase پروتئین‌هایی هستند که از اسیدهای آمینه سرین، ترئونین و تیروزین به دست می‌آیند. *MAPK*ها متعلق به گروه کیناز (CMGC CDK/*MAPK*/GSK3/CLK) هستند. مسیر پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن‌ها نقش مهمی به عنوان واسطه در تعدادی از وقایع فیزیولوژی سلول میزبان، از جمله رونویسی ژن، میتوز، حرکت، چسبندگی، متابولیسم ، آپوپتوز و کارگردانی پاسخ‌های سلولی به آرایه‌های متنوع از محرک، مانند استرس اسمزی، شوک حرارتی و سایتوکاین‌های پیش التهابی نقش دارند. آبشارهای *MAPK*، سیگنالینگ بسیار محافظت شده در یوکاریوت‌ها هستند. هر آبشار *MAPK*، از مجموعه سه پروتئین کیناز تشکیل شده است که به صورت متوالی عمل می‌کنند.. در آرابیدوپسیس، *MAPK*۲۰، *MAPK*۱۰ و تقریباً *MAPK*KK۶۰ وجود دارد(کریستینا و همکاران ۲۰۱۰). مطالعات اولیه روی MAPKهای گیاهی، بر سه MAPK آرابیدوبسیس (یعنی MAPK3، MAPK6، MAPK4) و ارتولوگ‌های آن‌ها در سایر گونه‌های گیاهی متمرکز شدند، زیرا می‌توان فعالیت آن‌ها را به راحتی با استفاده از آزمون‌های فعالیت کیناز در طول پاسخ ایمنی و استرس گیاه شناسایی کرد. مطالعات ژنتیکی معکوس، همراه با نجات شرطی ، بسیاری از عملکردهای کلیدی اجزای MAPK رشد و توسعه گیاه را نشان داده‌اند (شکل۱). نقطه اوج رخدادهای بیولوژیک در وهله اول به وسیله چهار خانواده فرعی *MAPK* شامل کیناز تنظیم شده با سیگنال خارج سلولی (ERK1/2)، کیناز -NH2

terminal، (JNKI, -2, -3) کیناز P38 (a,B,y, s) و *MAPK* های بزرگ (BMK یا ERK5 انجام می گیرد (جانسون و لاپادیت، ۲۰۰۲). فعال شدن *MAPK*s نیازمند فسفریلاسیون دوگانه بخش اصلی Thr-W-Tyr در حلقه تنظیمی است. رخدادهای معمولی که منجر به این فسفوریلاسیون میشوند: سه لایه آبشاری به خوبی حفاظت شده هستند که در آن کیناز *MAPK*- کیناز (*MAPK*KK، *MAPK*3K، MEKK یا MKKK) باعث فعال شدن *MAPK* کیناز می‌شود (*MAPK*K، MAP2K و MEK) که آن نیز به نوبه خود باعث فعال شدن *MAPK* از طریق فسفریلاسیون دنبال وار می‌گردد (کامنیسیج و همکاران، ۲۰۰۰). این فعال شدن متعارف آبشارها به تقویت سیگنال، مدولاسیون و اختصاصی بودن در پاسخ به تحریک های مختلف اجازه می‌دهد (فرل و تریپینگ، ۱۹۹۶). از این رو مسیر ERK1/2 عمدتاً پاسخگوی تحریکات به وسیله عوامل رشدی است (فری و اولسن ، ۲۰۰۳). در حالی که JNK و P38 به دلیل القای خود توسط عوامل استرس‌زای فیزیکی، شیمیایی و فیزیولوژیک (همانند UV، فشار اکسایشی، شوک اسمزی، عفونت و سایتوکنین‌ها) در مجموع به نام *MAPK*s های فعال شده با استرس (SAPKs) نامیده می شوند (باقری و همکاران ،۲۰۱۵.، روز و همکاران ۲۰۱۰).



شکل۱: نمودار نشان دهنده کیناز پروتئین‌های MAPK3، MAPK6 وMAPK4 فعال شده با میتوژن در آرابیدوپسیس

۲.مواد و روش ها

این مطالعه از توالی ژن های گیاهان مختلف از جمله سیب، توت سفید، یونجه، ریحان، سویا و ... استفاده گردید. لذا توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه ژن MAPK در بانک ژنی NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) بازیابی شد. اسامی برخی گیاهان، طول ژن، طول

پروتئین و شماره دستیابی آنها در جدول ۱ اشاره گردیده است. جهت هم ردیفی توالی ها از نرم افزار BioEdit ورژن ۷، جهت دستیابی به توالی پروتئین از سایت EXPASY و جهت ترسیم درخت فیلوژنتیکی از سایت UniPort استفاده شد. از سایت آنلاین TMHMM جهت رسم گراف های پروتئین برای گیاه سیب به عنوان گیاه مدل استفاده شد.

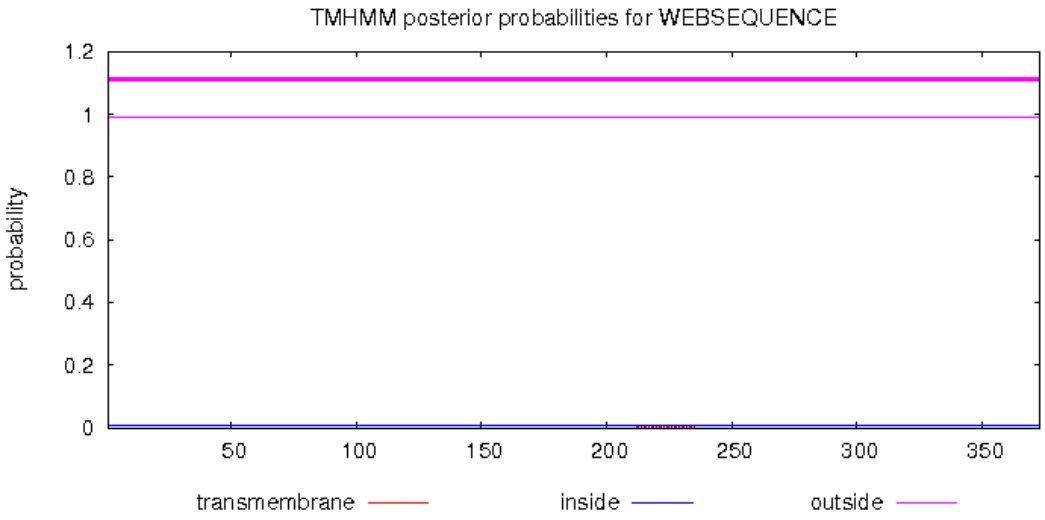
جدول۱: توالی و نام برخی گیاهان حاوی ژن MAPK

نام گیاه	طول ژن	طول پروتئین	شماره دستیابی در NCBI
Malus hupehensis	۱۸۶۲	۳۷۳	EF427897.1
Hypsizygus marmoreus	۱۲۹۳	۳۸۸	KF705537.1
Polyporus umbellatus	۱۲۹۳	۳۸۶	JX035916.1
Glycine max	۱۷۶۱	۵۸۶	EU848491.1
Malus x domestica	۱۶۴۵	۳۶۷	GU139792.1
Malus x domestica	۱۴۱۳	۳۹۴	GU139791.1
Medicago sativa	۱۴۹۵	۳۰۶	EU280318.1
Ocimum basilicum	۱۴۳۵	۳۹۰	KR136345.1
Morus alba var. multicaulis voucher YU71-1	۲۰۱۴	۵۸۴	KJ690936.1
Lilium regale	۱۱۲۸	۳۷۵	KC136342.1

۳.نتایج و بحث

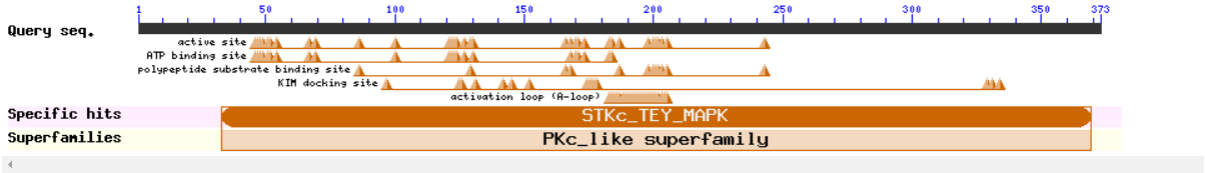
در این تحقیق گونه گیاهی سیب به عنوان منبع اصلی توالی ژن MAPK مورد بررسی قرار گرفت. طول پروتئین های این ژن در گیاه سیب ۳۷۳ اسید امینه می باشد. نتایج هم ردیفی توالی نوکلئوتیدی ۱۰ گیاه حاوی ژن MAPK با استفاده از نرم افزار BioEdit حاکی از آن بود که توالی الل‌ها حدود ۷۰ درصد به‌هم شبیه بودند. در بین آنها، گیاهان Hypsizygus marmoreus و Polyporus umbellatus بیشترین شباهت به هم را نسبت به سایر گیاهان نشان دادند، همچنین گیاهان Glycine max و Morus alba var.

multicaulis voucher YU71-1 خود به صورت مستقل قرار گرفتند و دارای بیشترین فاصله با بقیه گیاهان بودند. ارزیابی پروتئینی نشان داد که پروتئین MAPK فاقد ناحیه تراغشایی است که در شکل ۱، نشان داده شده است.



شکل ۱: گراف رسم شده توسط TMHMM

بررسی دامین پروتئین نشان داد (شکل ۲) که پروتئین MAPK از چهار دامین با طول کلی ۳۴۰ اسید امینه تشکیل شده است.



شکل ۲: گراف رسم شده توسط سایت ncbi و قسمت CDD مربوط به دامین گیاه آرابیداپسیس حاوی ژن MAPK

نتایج حاصل از درخت فیلوژنتیکی بیانگر آن بود که گیاهان Malus hupehensis و Lilium regale دارای بیشترین شباهت به یکدیگر و گیاه مدل بودند در حالی که گیاهان Glycine max و *YU71-1* multicaulis voucher Morus alba var. نسبت به گیاه مدل در گروه دیگر و با فاصله بیشتری قرار گرفتند (شکل-۳). نتایج حاصل از فاصله ژنتیکی (جدول-۲) نیز تایید کننده‌ی نتایج فیلوژنتیکی بود.

جدول ۲: فاصله ژنتیکی MAPK در ده گیاه مورد بررسی. ۱. Malus hupehensis، ۲. Hypsizygus marmoreus، ۳. Polyporus umbellatus، ۴. Glycine max، ۵. Malus x domestica، ۶. Malus x domestica، ۷. Medicago sativa، ۸. Ocimum basilicum، ۹. YU71-1 multicaulis voucher Morus alba var. و ۱۰. Lilium regale

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹
۲	۰.۶۷۸								
۳	۰.۶۴۹	۰.۲۶۶							
۴	۰.۶۹۰	۰.۷۶۴	۰.۷۷۶						
۵	۰.۳۹۳	۰.۷۳۸	۰.۶۶۶	۰.۶۴۴					
۶	۰.۴۳۹	۰.۶۰۶	۰.۶۴۹	۰.۶۰۶	۰.۴۴۱				
۷	۰.۹۳۲	۱.۰۱۳	۱.۰۲۸	۱.۰۲۹	۰.۹۳۰	۰.۸۹۸			
۸	۰.۳۹۶	۰.۶۵۲	۰.۶۵۱	۰.۵۹۳	۰.۴۵۸	۰.۲۵۴	۰.۹۰۹		
۹	۰.۶۸۰	۰.۷۶۱	۰.۷۲۶	۰.۲۸۴	۰.۶۲۹	۰.۶۴۸	۰.۹۸۷	۰.۵۷۶	
۱۰	۰.۲۳۳	۰.۶۵۱	۰.۶۴۹	۰.۶۶۰	۰.۳۸۰	۰.۴۴۰	۰.۹۱۱	۰.۴۲۲	۰.۶۷۴



شکل ۳: درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده به کمک سایت Mega 5 برای ده گیاه مورد بررسی

منابع

Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases Science. 2002 Dec; 298(5600): 1911-2. doi: 10.1126/science. 1072682.

Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T, Biesterfeldt J, Augustine ML, Calabro A Jr, et al. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. J Clin Invest. 2000 Aug; 106(3): 349-60.

Cristina, M.S. *et al*. 2010. Mitogenactivated protein kinase signaling in plants. Annu. Rev. Plant Biol. 61, 621–649.

Ferrell JE Jr. Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs. Trends Biochem Sci. 1996 Dec; 21(12): 460-6.

Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. Annu Rev Physiol. 2003; 65: 45-79. doi: 10.1146/ annurev.physiol.65.092101.142243.

Rose BA, Force T, Wang Y. Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heartbreaking tale. Physiol Rev. 2010 Oct; 90(4): 1507-46. doi: 10.1152/physrev.00054.2009.

Baghaiee B, Nakhostin-Roohi B, Siahkuhian M, Bolboli L. [Effect of oxidative stress and exercise-induced adaptations]. J Gorgan Univ Med Sci. 2015; 17(2): 1-15. [Article in Persian].

The association between chemerin rs17173608 polymorphism with susceptibility to type 2 - diabetes in the population of the east of Golestan province

Maede Fekri Abras[1*]; Sohrab Boozarpour[2]; Alireza Khanahmadi[3]; Shaaban Ghalandarayeshi[4]
1- Student, Biology, Basic Sciences & Engineering, Gonbad Kavous University
2- Assistant Professor, Biology, Basic Sciences & Engineering, Gonbad Kavous University
3- Assistant Professor, Animal Science, Agriculture & Natural Resources, Gonbad Kavous University
4- Assistant Professor, Statistics, Basic Sciences & Engineering, Gonbad Kavous University
**Corresponding Author Email address: Maede.fekri@gmail.com*

Abstract

With regard to lifestyle changes and increasing obesity and overweight in communities around the world, including Iran, there is an increasing trend in diabetes. The World Health Organization predicts that the number of adults over the age of 20 with diabetes is expected to reach 300 million by 2025, and that this number is projected to reach at least 693 million by 2045. According to the statistics of 4 to 6 percent of the population of Iran with diabetes, it is estimated that there are at least 120,000 diabetic patients in Golestan province, of which 30,000 are diabetics with acute problems and 20,000 are patients with diabetes higher than 126.
White adipose tissue is known as a dynamic endocrine glands which is capable of producing and releasing several bioactive polypeptides called adipokines. Type 2 diabetes is a metabolic inflammatory disorder characterized by chronic hyperglycemia and changes in circulating adipokines. Chemerin has recently been identified as a new high level-expression adipokine in adipose tissue of obese individuals and T2DM with potential insulin-sensitive properties. Obesity is defined as the overgrowth of adipose tissue. Thus, adipokines may play an important role in the development of obesity-related diseases such as insulin resistance, inflammation, hypertension, cardiovascular risk, and metabolic disorders.This study was performed on obesity-specific adipokine and its role in type 2 diabetes and insulin resistance in the population of the east of Golestan province. In this study, 200 diabetics and 200 normal individuals ranging in age from 30 to 60 years with equal numbers of men and women were studied.
First of all, DNA extraction was performed by manually salting out method and using a DNA extraction kit. After designing the primers, adipokine chemerin rs17173608 T/G polymorphism was detected by polymerase chain reaction (Tetra-PRIMER-ARMS-PCR) and the allele bond was examined by agarose gel electrophoresis. The results were analyzed by SPSS software.
The results showed that, the frequency of TT genotype in normal and patient groups was zero and 96.5%, respectively. In addition, TG genotype was seen in about 31% and 43% of diabetics and normal individuals, respectively. Finally, the GG mutant genotype was observed in about 70% of diabetic individuals. Also, about 8% of the normal group had the GG genotype.
In this study, carriers of the TG /GG genotype of the chemerin gene showed an increased incidence of type 2 diabetes compared to the TT genotype. The results showed that the G allele of chemerin rs17173608 increases the risk of diabetes in the population of the east of Golestan province compared to the T allele.

Keywords: Diabetes, Fasting blood sugar, Tetra-arms-PCR, polymorphism, Chemerin

مطالعه ارتباط پلی‌مورفیسم‌های rs۱۷۱۷۳۶۰۸ ژن chemerin با استعداد ابتلا به دیابت نوع ۲ در جمعیت شرق استان گلستان

مائده فکری آبرس[۱*]؛ سهراب بوذرپور[۲]؛ علیرضا خان احمدی[۳] ؛ شعبان قلندرآیشی [۴]

۱- دانشجو، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، دانشگاه گنبدکاووس

۲- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، دانشگاه گنبدکاووس

۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس

۴- استادیار، گروه آمار، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، دانشگاه گنبدکاووس

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: Maede.fekri@gmail.com

چکیده

با توجه به تغییر سبک زندگی و افزایش چاقی و اضافه وزن در سطح جوامع در سراسر جهان ازجمله ایران روند افزایشی ابتلا به دیابت وجود دارد. با پیش بینی سازمان بهداشت جهانی انتظار می‌رود که تعداد افراد بزرگسال بالای ۲۰ سال دیابتی در سال ۲۰۲۵ میلادی به ۳۰۰ میلیون نفر برسد و پیش بینی می‌شود این تعداد برای سال ۲۰۴۵ حداقل به ۶۹۳ میلیون نفر برسد. مطابق آمار ابتلای ۴ تا ۶ درصدی جمعیت ایران به دیابت، پیش‌بینی می‌شود حداقل ۱۲۰ هزار بیمار دیابتی در استان گلستان وجود دارد که از این تعداد ۳۰ هزار بیمار دیابتی با مشکلات حاد و ۲۰ هزار بیمار با قند بالای ۱۲۶ هستند.بافت چربی سفید به عنوان یک اندام غدد درون ریز پویا شناخته می‌شود که قادر به تولید و انتشار چندین پلی پپتید فعال زیستی به نام آدیپوکین می باشد. دیابت نوع ۲ یک اختلال پیش التهابی متابولیک است که با هیپرگلیسمی مزمن و تغییر در آدیپوکین‌های در گردش مشخص می‌شود. کمرین (Chemerin) به عنوان آدیپوکین جدید با بیان بالا در بافت چربی افراد چاق ومبتلا به دیابت نوع دو با خواص بالقوه حساس کننده به انسولین شناسایی شده است. چاقی به عنوان رشد بیش از حد بافت چربی تعریف می‌شود. به این ترتیب، احتمالاً آدیپوکین‌ها می‌توانند نقش مهمی در ایجاد بیماری‌های مرتبط با چاقی از جمله مقاومت به انسولین، التهاب، فشار خون بالا، خطر قلبی عروقی و اختلالات متابولیک ایفا کنند.این بررسی بر روی آدیپوکین خاص چاقی و نقش آن در دیابت نوع ۲ و ارتباط آن با چاقی در جمعیت شرق استان گلستان انجام شد. در این مطالعه، بر روی ۲۰۰ فرد دیابتی و ۲۰۰ فرد نرمال در رده سنی ۳۰تا۶۰ سال با تعداد برابر زن و مرد در هر دو گروه تحقیق و بررسی صورت گرفت.در ابتدا استخراج DNA به روش دستی رسوب نمکی و استفاده از کیت آماده استخراج DNA انجام شد. پس از طراحی پرایمرها، پلی مورفیسم rs17173608 T/G آدیپوکاین کمرین توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز (Tetra-primer-arms-pcr) گسترش پیدا کرده و باند الل ها توسط الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. نتایج مشاهده شده توسط نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.بررسی ها نشان داد که در این پژوهش فراوانی ژنوتیپ TT در گروه بیمار صفر و نرمال۹۶/۵درصد می باشد. ژنوتیپ TG نزدیک به۳۱ درصد در افراد دیابتی و حدود ۴۳ درصد در افراد نرمال مشاهده شد.

درنهایت ژنوتیپ جهش یافته GG در بین افراد دیابتی نزدیک به ۷۰ درصد افراد را شامل شد همچنین از گروه نرمال حدود ۸ درصد افراد دارای ژنوتیپ GG بودند. در این پژوهش ناقلین ژنوتیپ TG/GG ژن کمرین نسبت به ژنوتیپ TT افزایش ابتلا به دیابت نوع ۲ را نشان دادند $P<0.05$. در مقابل پلیمورفیسم rs17173608 هیچ گونه رابطه معناداری را با چاقی و اضافه وزن نشان نداد $P>0.05$.نتایج حاصل از این تحقیق نشان دادند که آلل G کمرین rs17173608 در مقایسه با آلل T خطر ابتلا به دیابت را در جمعیت شرق استان گلستان افزایش می‌دهد.

واژگان کلیدی: دیابت، قند خون ناشتا ، Tetra-arms-PCR، پلی‌مورفیسم، کمرین

۱.مقدمه

دیابت به عنوان یکی از بیماری‌های مزمن نسبتاً شایع در جهان به طور گوناگونی تمام نژادها را درگیر می‌سازد. بروز دیابت در بسیاری از جوامع به ویژه در کشورهای صنعتی و در حال توسعه روند رو به افزایشی دارد. در حال حاضر۴۶۳ میلیون نفر در دنیا مبتلا به دیابت هستند. طبق آمار رسمی سازمان جهانی بهداشت هفتمین علت مرگ و میر در سال ۲۰۳۰ مربوط به دیابت می‌باشد که در این میان بیشترین رشد در منطقه خاورمیانه با حدود ۹۷٪ ابتلا خواهد بود (Ogurtsova et al., 2017). پیش بینی می شود ایران تا سال ۲۰۳۰ به عنوان یکی از پر شیوع ترین مناطق جهان در زمینه دیابت تبدیل خواهد شد و درصد شیوع از ۶/۱ به ۹/۳ درصد برای دیابت آشکار و از ۹/۷ به ۱۲/۴ درصد برای اختلال در تحمل گلوکز خواهد رسید (Jafari-Adli et al., 2014).

بیش از ۱۰۰ واریانت ژنتیکی با خطر ابتلا به دیابت نوع ۲ و چاقی ارتباط دارند که طی مطالعات بسیاری در جمعیت ها و نژادهای مختلف بررسی شده است. از دلایل اصلی دیابت و مقاومت به انسولین می توان به چاقی اشاره کرد. بافت چربی به عنوان یک انبار انرژی، عضو غدد درون ریز فعال می باشد. انواع مختلفی از پروتئین ها را ترشح می کند که به عنوان (آدیپوکاین) شناخته می‌شوند. این آدیپوکاین ها در تنظیم متابولیسم گلوکز و لیپید، هموستاز انرژی، حساسیت به انسولین و ... عملکرد دارند.

۱-۲-آدیپوکاین ها در دیابت

دیابت نوع دو شامل اختلالات ناهمگونی است که با درجات مختلفی از مقاومت به انسولین در بافت های بدن و اختلال در ترشح انسولین و ناکافی بودن آن به دلیل عملکرد نادرست سلول های پانکراس و افزایش تولید گلوکز مشخص می شود (Adu, Mzileni, and Mogale, 2014). اغلب بیماران مبتلا به این نوع از دیابت از چاقی رنج برده و چاقی خود موجب درجاتی از مقاومت به انسولین می شود (Pillon et al., 2021).

مقاومت به انسولین ممکن است با کم کردن وزن و یا درمان دارویی هایپرگلایسمی بهبود یابد ولی به ندرت در حد نرمال می‌ماند. خطر شروع این نوع از دیابت با بالا رفتن سن، چاقی، و فقدان فعالیت فیزیکی افزایش می‌یابد. در خانم‌ها با سابقه دیابت بارداری و افراد با فشار خون بالا یا دیس لیپیدمی، بیشتر بروز می‌کند (Sun, Luo, and Zhou, 2021; Wang, Huang, et al., 2021) رخداد

دیابت نوع۲ تحت گروه‌های مختلف نژادی تفاوت دارد و اغلب با استعداد ژنتیکی ارتباط دارد که این ارتباط درمقایسه با نوع خودایمن دیابت تیپ ۱ بیشتر است. تحقیقات نشان دادند که ژنتیک این نوع دیابت پیچیده است و به خوبی مشخص نشده است (Li et al., 2021).

چاقی با مجموعه‌ای از مشکلات سلامتی در جمعیت بزرگسال و کودکان مرتبط است. درک پاتوژنز چاقی و عواقب متابولیکی آن در دهه‌های گذشته به سرعت پیشرفت کرده است. آدیپوکین‌ها به اندام‌های دارای اهمیت متابولیک از جمله مغز، کبد، ماهیچه های اسکلتی و سیستم ایمنی سیگنال می‌دهند و در نتیجه هموستاز فشار خون، متابولیسم لیپید و گلوکز را تعدیل می‌کنند. (Steppan et al., 2001; Kershaw and Flier, 2004).

کمرین به عنوان آدیپوکین جدید با بیان بالا در بافت چربی افراد چاق و T2DM و دارای ویژگی های بالقوه حساس به انسولین شناخته شده است علاوه بر این، کمرین برای تمایز سلول های چربی طبیعی بسیار مهم است و بیان ژن‌های چربی درگیر در هموستاز گلوکز و لیپید مانند انتقال دهنده گلوکز-۴، اسید چرب سنتاز و آدیپونکتین را از طریق گیرنده خود CMKLR1[۲۳۸] تعدیل می‌کند (Rabe et al., 2008).

بوزاگلو و همکاران (Ernst and Sinal, 2010) نشان دادند که در افراد عادی، سطوح کمرین به طور قابل توجهی با BMI، تری‌گلیسیرید و فشار خون ارتباط دارد. اختلال در ژن کمرین با عدم تحمل گلوکز و کاهش ترشح انسولین تحریک شده با گلوکز و همچنین کاهش جذب گلوکز از ماهیچه های اسکلتی و بافت چربی سفید همراه است. با این حال مطالعات بیشتری برای تعیین نقش فیزیولوژیکی کمرین در متابولیسم گلوکز و شناسایی بافت‌های هدف کمرین و همچنین مسیرهای انتقال سیگنال مربوطه مورد نیاز است.

بر اساس مطالعات محققان التهاب ناشی از چاقی نقش تعیین کننده ای در ترشح بسیاری از آدیپوکین ها از جمله کمرین لپتین، فاکتور نکروز تومور آلفا، اینترلوکین (IL) و اسیدهای چرب آزاد (FFA) دارد (Orci et al., 2004)دارد. این مولکول ها ممکن است مقاومت به انسولین را از طریق مسیرهای متعدد ارتقا دهند (Vázquez-Vela, Torres, and Tovar, 2008; Coppari and Bjørbæk, 2012) و در نهایت منجر به هیپرگلیسمی و دیابت T2 شوند.

مطالعه ای توسط وایگرت و همکاران (Weigert et al., 2010) گزارش داد که سطوح کمرین در گردش در دیابت T2 و افراد چاق مشابه بود اما در هر دو گروه در مقایسه افراد با وزن طبیعی به طور قابل توجهی افزایش یافت. مطالعه ای توسط شرر و همکاران (Scherer et al., 2011) گزارش داد که مقاومت به انسولین در لیپوژنز چربی و ترشح ضد لیپولیز تحریک شده توسط انسولین با افزایش ترشح کمرین ارتباط دارد.

۱-۳- اهمیت بررسی پلی مورفیسم rs17173608

[238] Chemerin Chemokine-Like Receptor 1

پلی مورفیسم ها می توانند برای ردیابی به ارث رسیدن ژن‌های بیماری در درون خانواده‌ها مورد استفاده قرار گیرند. مطالعات آینده تلاش خواهند کرد تا ژن‌های مرتبط با بیماری‌های پیچیده مثل بیماری‌های قلبی، دیابت و سرطان را شناسایی کنند (Abdelhamid and Zaafan, 2019).

پلی مورفیسم rs17173608 کمرین (T/G) در اینترون۳ است، مطالعات نشان می دهد که این چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNPs) احتمالاً فقط بر بیان ژن تأثیر گذاشته و بر عملکرد محصول ژنی تاثیری ندارد (Hasanvand et al., 2018).

عبد الحمید و زافان (Abdelhamid and Zaafan, 2019) در مطالعه ای نشان دادند که ژنوتیپ ترکیبی (TG + GG) و الل G در پلی مورفیسم rs17173608 کمرین چند شکلی با افزایش خطر T2DM در جمعیت مصر ارتباط دارد.

در این زمینه مطالعه ارزیابی همبستگی بین پلی مورفیسم کمرین rs17173608 و ارزیابی تأثیر این چندشکلی بر خطر دیابت نوع ۲، اضافه وزن و چاقی در نمونه ای از جمعیت شمال استان گلستان بررسی گردید. این مطالعه بر روی ۲۰۰ بیمار مبتلا به T2DM و ۲۰۰ فرد سالم انجام شده است.

۲. مواد و روش‌ها

در این پژوهش از ۲۰۰ فرد با ابتلای قطعی به دیابت و ۲۰۰ فرد نرمال شاهد در آزمایشگاه مهرگان گنبد کاووس نمونه برداری انجام گرفت. استخراج DNA به روش دستی رسوب نمکی و کیت استخراج DNA مربوط به شرکت سیناکلون صورت گرفت.پس از استخراج DNA برای تکثیر ژن در ناحیه پلی مورفیسم مربوطه پس از طراحی پرایمرها (Abdelhamid and Zaafan, 2019) از روش Tetra_arms PCR استفاده شد. در روش Tetra-arms از دو پرایمر مخصوص الل جهش یافته و دو پرایمر مخصوص الل وحشی استفاده شد. به همین جهت تکثیر یک قطعه توسط پرایمر مخصوص الل جهش یافته وجود جهش در الل را اثبات می کند، همچنین تکثیر شدن یک قطعه توسط پرایمر مخصوص الل وحشی به معنای عدم وجود جهش در آن توالی می‌باشد. لذا می‌توان گفت که از نکات مهم در این روش طراحی پرایمر است که باید با دقت طراحی شود.

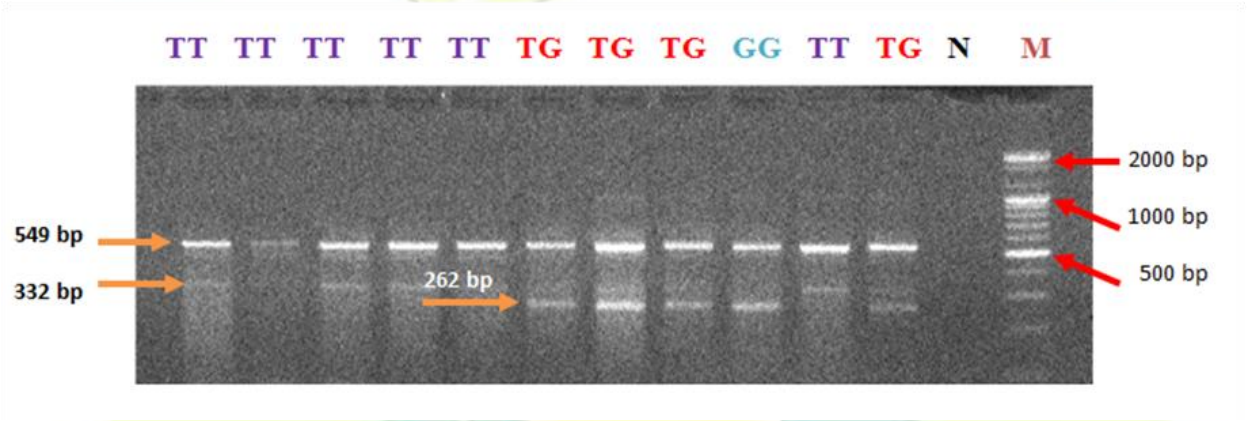
جدول ۱: پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش

توالی	پرایمر
۵'-ATTGCTATAGTCCAGTGCCCTTCG-۳'	پرایمر رفت داخلی (الل G)
۵'-CCAGTTCCCTCTGTCGGCTTAA-۳'	پرایمر برگشت داخلی (الل T)
۵'-GTCAGACCCATGCAGTTTTCAAAC-۳'	پرایمر رفت خارجی
۵'-GAGTTCCTCTCTCAAGCATCAGGG-۳'	پرایمر برگشت خارجی

روش Tetra-ARMs PCR روش پیشـــرفته‌تر ARMs-PCR می‌باشـــد، که در این روش (Tetra-ARMs PCR) طراحی پرایمرها به گونه‌ای صـــورت می‌پذیرد که بتوان دو واکنش PCR با پرایمر مختص الل وحشـــی و پرایمر مختص الل موتانت را هم زمان در یک واکنش PCR بررسی نمود.

در این واکنش دمای واسـرشـتگی اولیه ۹۵ درجه سـانتی گراد در مدت ۵ دقیقه در یک مرحله تنظیم شـد. پس از آن ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه برای واسـرشـتگی،۳۰ ثانیه در دمای ۶۲ درجه برای اتصـال و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه برای گسـترش DNA در ۳۰ سیکل در نظر گرفته شد. مرحله آخر در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه تنظیم گردید (Abdelhamid and Zaafan, 2019).

به منظور مشاهده باند های تکثیر یافته در PCR از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. طول باند های مشاهده شده پلی مورفیسـم rs17173608 ژن کمرین که مشـاهده گردید به این صـورت بود ۲۶۲ نوکلئوتید مربوط به الل G ۳۲۲ نوکلئوتید برای به الل T و ۵۴۹ نوکلئوتید مربوط به پرایمرهای خارجی که در همه نمونه ها مشاهده شد.



تصویر ۱: باندهای مشاهده شده در ژل آگارز ۱/۵ درصد

۳- نتایج و بحث

بر اساس نتایج مشاهده شده در الکتروفورز ژل آگارز ژنوتیپ نمونه ها در اکسل یاداشت شد و برای بررسی‌های آماری توسط نرم افزار SPSS و تست مربع کای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تا مشخص شود در کدام موارد اختلاف معنادار وجود دارد. از دیدگاه آماری داده‌هایی که اختلاف معناداری دارند که P-value آنها کمتر از ۰/۰۵ است.

۳-۱-بررسی فراوانی و معنی داری ژنوتیپ های پلی مورفیسم rs۱۷۱۷۳۶۰۸ کمرین در بروز و یا عدم بروز بیماری دیابت

در ابتدا فراوانی هر یک از ژنوتیپ ها را محاسبه می کنیم. بر اساس داده ها در بین افراد دیابتی فقط ژنوتیپ های TG و GG مشاهده گردید. طبق آزمون مربع کای P=0 و کمتر از ۰/۰۵ می باشد، در نتیجه تفاوت معنا داری بین فراوانی ژنوتیپ ها در افراد دیابتی و نرمال وجود دارد. و ژنوتیپ وحشی TT در بین افراد دیابتی مشاهده نشده است.

جدول ۲: درصد فراوانی ژنوتیپ در بین نمونه‌ها

			genotype			Total
			GG	TG	TT	
groupe	patient	Count	139	61	0	200
		% within groupe	69.5%	30.5%	.0%	100.0%
	Normal	Count	17	86	96	199
		% within groupe	8.5%	43.2%	48.2%	100.0%
Total		Count	156	147	96	399
		% within groupe	39.1%	36.8%	24.1%	100.0%

جدول ۳: پارامترهای بدست آمده از تست مربع کای برای درصد فراوانی ژنوتیپ

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	1.957E2	2	.000
Likelihood Ratio	246.174	2	.000
Linear-by-Linear Association	194.832	1	.000
N of Valid Cases	399		

با توجه به میزان p-value بدست امده (۰/۰۰۰) چون این مقدار کمتر از ۰/۰۵ است بنابراین اختلاف مشاهده شده برای متغییر ژنوتیپ‌ها بین دو گروه نرمال و بیمار معنی دار می باشد.

۳-۲- بررسی فراوانی و معنی داری آلل های پلی مورفیسم rs۱۷۱۷۳۶۰۸ کمرین در بروز و یا عدم بروز بیماری دیابت

بعد از محاسبه درصد فراوانی ژنوتیپ ها این بار فراوانی آلل های T و G را محاسبه می کنیم. طبق جدول زیر فراوانی آلل وحشی T نسبت به آلل جهش یافته G در بین افراد نرمال بیشتر می باشد و با توجه به جدول آزمون مربع کای چون P=۰ و کمتر از ۰/۰۵ می باشد نشان می دهد به طور معنا داری آلل G در افراد دیابتی بیشتر است

جدول ۴: جدول فراوانی و درصد آلل های rs۱۷۱۷۳۶۰۸ کمرین

			group		
			diabet	normal	Total
allele	G	Count	339	121	460
		% within group	84.8%	30.3%	57.5%
	T	Count	61	279	340
		% within group	15.3%	69.8%	42.5%
Total		Count	400	400	800
		% within group	100.0%	100.0%	100.0%

جدول ۵: پارامترهای بدست آمده از تست مربع کای فراوانی آلل هایrs۱۷۱۷۳۶۰۸

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	195.978[a]	2	.000
Likelihood Ratio	246.495	2	.000
Linear-by-Linear Association	195.083	1	.000
N of Valid Cases	400		

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 48.00.

۳-۳ بررسی فراوانی آلل های rs17173608 بر اساس BMI بیماران دیابتی

برای بررسی ارتباط این پلی مورفیسم با چاقی و اضافه وزن در افراد دیابتی، فراوانی هر یک از آلل ها را در سه کلاس BMIمحاسبه میکنیم. بر اساس جدول زیر و محاسبه آزمون مربع کای هیچ رابطه معناداری بین آلل G و T بین افراد دیابتی با BMI وجود ندارد.

جدول ۶: جدول فراوانی آلل های rs17173608 بر اساس BMI بیماران دیابتی

			Allele		
			G	T	Total
BMI	BMI <25	Count	24	6	30
		% within Allele	7.1%	9.8%	7.5%
	25< BMI <30	Count	166	28	194
		% within Allele	49.0%	45.9%	48.5%
	BMI >30	Count	149	27	176
		% within Allele	44.0%	44.3%	44.0%
Total		Count	339	61	400
		% within Allele	100.0%	100.0%	100.0%

جدول۷: آزمون مربع کای برای آلل های rs17173608 بر اساس BMI بیماران دیابتی

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	.625[a]	2	.732
Likelihood Ratio	.588	2	.745
Linear-by-Linear Association	.081	1	.776
N of Valid Cases	400		

a. 1 cells (16.7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4.58.

۳-۴- بررسی فراوانی آلل های rs17173608 بر اساس BMI افراد نرمال

در نهایت فراوانی آلل های G و T در بین افراد نرمال محاسبه گردید و با آزمون مربع کای مشخص شد هیچ رابطه معناداری بین آلل جهش یافته G و آلل نرمال T بین افراد نرمال با BMI وجود ندارد.

جدول۸: جدول فراوانی آلل های rs۱۷۱۷۳۶۰۸ بر اساس BMI افراد نرمال

			Allele		Total
			G	T	
BMI	BMI<25	Count	79	171	250
		% within Allele	65.3%	61.3%	62.5%
	25<BMI<30	Count	36	94	130
		% within Allele	29.8%	33.7%	32.5%
	BMI>30	Count	6	14	20
		% within Allele	5.0%	5.0%	5.0%
	Total	Count	121	279	400
		% within Allele	100.0%	100.0%	100.0%

جدول۹: آزمون مربع کای برای آلل های rs۱۷۱۷۳۶۰۸ بر اساس BMI افراد نرمال

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	.620[a]	2	.734
Likelihood Ratio	.625	2	.732
Linear-by-Linear Association	.403	1	.526
N of Valid Cases	400		

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 6.05.

۴. نتیجه‌گیری

کمرین یک پروتئین چند عملکردی است که با تعدیل GLUT4، اسید چرب سنتاز، از طریق گیرنده خود CMKLR1 بر بیان ژن های چربی و چربی زایی و هموستاز گلوکز در سلول های چربی تأثیر می گذارد. افزایش سطح کمرین در انسان به عنوان نشانگر التهاب، سندرم متابولیک و چاقی در نظر گرفته می شود (McLaughlin et al., ۲۰۰۷).

مطالعه ای توسط لی و همکاران در سال (۲۰۱۳) صورت گرفت نشان داد که سطوح کمرین با مقاومت به انسولین در ابتدا و همچنین پس از مداخله در سبک زندگی مرتبط است همچنین در این بررسی نشان داده شد که سطوح پلاسمایی کمرین در بیماران مبتلا به دیابت T2 بالاتر از گروه کنترل است و محققان به این نتیجه رسیدند که ارتباط بالقوه ای بین کمرین و پاتوژنز مقاومت به انسولین، چاقی و سندرم متابولیک وجود دارد (Lee et al., ۲۰۱۳). غلظت کمرین در بیماران مبتلا به دیابت T2 مسن بالا بود و مستقل از مدت بیماری و BMI ظاهر شد، که نشان می‌دهد اختلال عملکرد سلول‌های چربی با افزایش سن افزایش می‌یابد (Syed Ikmal et al., ۲۰۱۳).

در مطالعه ای که در جمعیت مصر پیرامون ارتباط پلی مورفیسم rs17173608 و سطح سرمی کمرین در دیابت نوع ۲ انجام گرفت (Abdelhamid and Zaafan, 2019) نتایج نشان دادند که ژنوتیپ TG/GG و الل G پلی‌مورفیسم rs17173608 در ژن کمرین فراوانی قابل‌توجهی را در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل دارد. افراد دارای ژنوتیپ TG/GG در مقایسه با ژنوتیپ TT در معرض خطر ابتلا به دیابت ۲ بودند.

در این مطالعه هم که در استان گلستان انجام شده است به مستقل بودن BMI و پلی مورفیسم کمرین اشاره می کند. این نتیجه می تواند به دلیل اختلاط قومیت های مختلف در نمونه های گرفته شده باشد. وجود قومیت های فارس، ترک، کرد، ترکمن، سیستانی و بلوچ و ... سبب شده است که در این جمعیت با یک ژن و پلی مورفیسم منحصر به فرد مواجه نباشیم.

همچنین شرایط محیطی، آب و هوا، سبک زندگی و نوع تغذیه می تواند نتایج متفاوتی را با دیگر جمعیت ها در سایر نقاط جهان رقم زند.

براساس نتایج حاصل از این پژوهش، بالا بودن ژنوتیپ TG/GG در افراد دیابتی نسبت به ژنوتیپ TT در افراد نرمال تفاوت آماری معنی داری را نشان داد. همچنین بیان شد که الل G با افزایش ابتلا به دیابت نوع ۲ همراه می باشد. داده های بدست آمده در این پژوهش با مطالعات قبلی پیرامون پلی مورفیسم rs17173608 مطابقت دارد.

منابع

Abdelhamid, Amr M, and Mai A Zaafan. 2019. "Association of chemerin rs17173608 and vaspin rs2236242 polymorphisms with type two diabetes mellitus and its impact on their corresponding serum levels in Egyptian population." In.: ideas.

Amos, Alison F, Daniel J McCarty, and Paul Zimmet. 1997. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010, Diabetic medicine, 14: S7-S85.

Cho, NH1, JE Shaw, Suvi Karuranga, Y da Huang, JD da Rocha Fernandes, AW Ohlrogge, and B Malanda. 2018. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045, Diabetes research and clinical practice, 138: 271-81.

Coppari, Roberto, and Christian Bjørbæk. 2012. Leptin revisited: its mechanism of action and potential for treating diabetes, Nature reviews Drug discovery, 11: 692-708.

Ernst, Matthew C, and Christopher J Sinal. 2010. Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity, Trends in Endocrinology & Metabolism, 21: 660-67.
Hasanvand, Zahra, Abdorrahim Sadeghi, Mohammad Reza Rezvanfar, Mohammad Taghi Goodarzi, Golzar Rahmannezhad, and Farideh Jalali Mashayekhi. 2018. Association between chemerin rs17173608 and rs4721 gene polymorphisms and gestational diabetes mellitus in Iranian pregnant women, Gene, 649: 87-92.
Jafari-Adli, Shahrzad, Zahra Jouyandeh, Mostafa Qorbani, Ahmadreza Soroush, Bagher Larijani, and Shirin Hasani-Ranjbar. 2014. Prevalence of obesity and overweight in adults and children in Iran; a systematic review, Journal of Diabetes & Metabolic Disorders, 13: 1-10.
Kershaw, Erin E, and Jeffrey S Flier. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 89: 2548-56
Lee, Mi Kyung, Sang Hui Chu, Duk Chul Lee, Ki Yong An, Ji-Hye Park, Dong Il Kim, Jiyoung Kim, Sunghyun Hong, Jee Aee Im, and Ji Won Lee. 2013. The association between chemerin and homeostasis assessment of insulin resistance at baseline and after weight reduction via lifestyle modifications in young obese adults, Clinica chimica acta, 421: 109-15.
McLaughlin, T, A Sherman, P Tsao, O Gonzalez, G Yee, C Lamendola, GM Reaven, and SW Cushman. 2007. Enhanced proportion of small adipose cells in insulin-resistant vs insulin-sensitive obese individuals implicates impaired adipogenesis, Diabetologia, 50: 1707-15.
Ogurtsova, Katherine, JD da Rocha Fernandes, Y Huang, Ute Linnenkamp ,L Guariguata, Nam H Cho, David Cavan, JE Shaw, and LE Makaroff. 2017. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040, Diabetes research and clinical practice, 128: 40-50.
Orci, Lelio, William S Cook, Mariella Ravazzola, May-yun Wang, Byung-Hyun Park, Roberto Montesano, and Roger H Unger. 2004. Rapid transformation of white adipocytes into fat-oxidizing machines, Proceedings of the National academy of sciences, 101: 2058-63.
Rabe, Katja, Michael Lehrke, Klaus G Parhofer, and Uli C Broedl. 2008. Adipokines and insulin resistance, Molecular medicine, 14: 741-51.
Scherer, Thomas, James O'Hare, Kelly Diggs-Andrews, Martina Schweiger, Bob Cheng, Claudia Lindtner, Elizabeth Zielinski, Prashant Vempati, Kai Su, and Shveta Dighe. 2011. Brain insulin controls adipose tissue lipolysis and lipogenesis, Cell metabolism, 13: 183-94.
Steppan, Claire M, Shannon T Bailey, Savitha Bhat, Elizabeth J Brown, Ronadip R Banerjee, Christopher M Wright, Hiralben R Patel, Rexford S Ahima, and Mitchell A Lazar. 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes, Nature, 409: 307-12.
Syed Ikmal, Sharifah Intan Qhadijah, Hasniza Zaman Huri, Shireene Ratna Vethakkan, and Wan Azman Wan Ahmad. 2013. Potential biomarkers of insulin resistance and atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus patients with coronary artery disease, International Journal of Endocrinology, 2013.
Vázquez-Vela, Maria Eugenia Frigolet, Nimbe Torres, and Armando R Tovar. 2008. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity, Archives of medical research, 39: 715-28.
Weigert, Johanna, Markus Neumeier, Josef Wanninger, Michael Filarsky, Sabrina Bauer, Reiner Wiest, Stefan Farkas, Marcus N Scherer, Andreas Schäffler, and Charalampos Aslanidis. 2010. Systemic chemerin is related to inflammation rather than obesity in type 2 diabetes, Clinical endocrinology, 72: 342-48.

Evaluation of the cytotoxic and apoptotic effects of the gum of Barijeh on SW480 cell

Parisa Bahavar, Majid Tafrihi*

1- M.Sc. student, Molecular & Cell Biology Research Lab, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Mazandaran, Iran
2- Assistant professor, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of basic sciences . .University of Mazandaran, Babolsar, Mazandaran, Iran

E-mail: m.tafrihi@umz.ac.ir

Abstract

Plant-derived chemicals have been used as medicinal agents for hundreds of years. Plant extracts or plant-derived chemicals have anti-cancer potentials. *Ferula gummosa* is an Iranian endemic plant that its gum is used in traditional medicine to treat various diseases. The aim of this study was to investigate the anti-cancer effects of the gum of this plant on SW-480 cell line. In this study, SW-480 colorectal cancer cells were treated with different concentrations of the gum for 48 hours. The results of the MTT assay showed that the gum inhibited the proliferation of SW-480 cells (IC50 = 1.8 µg / ml). Also, microscopic observations showed that treatment of SW-480 cells with concentrations close to IC_{50} caused nuclear condensation in treated SW-480 cells. The results of DNA fragmentation test showed that treatment of SW-480 cells with concentrations close to IC_{50} or higher of the gum causes smear in genomic DNA electrophoretic pattern. In general, the results of this study showed that *F. gummosa* gum due to its different composition and cytotoxic effects can be a good option for future studies in the field of anticancer drugs.

Keywords: Barijeh, Cytotoxicity, Apoptosis, SW-480 cell line, Colorectal cancer

بررسی اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوتیک صمغ گیاه باریجه بر رده سلولی SW-480

پریسا بهاور[۱]- مجید تفریحی[۲*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم، دانشگاه مازندران
۲- استادیار ، دانشکده علوم، دانشگاه مازندران

m.tafrihi@umz.ac.ir

چکیده

از مواد شیمیایی مشتق شده از گیاهان به مدت صدها سال است که به عنوان عوامل دارویی استفاده می‌شود. عصاره‌های خام یا مواد شیمیایی گیاهی به دست آمده از برخی گیاهان دارای خواص ضد سرطانی بالقوه هستند. گیاه باریجه (Ferula gummosa) گونه‌ی اندمیک ایران است که در طب سنتی از صمغ این گیاه برای درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات ضد سرطانی گیاه باریجه روی رده‌ی سلولی SW-480 است. در این مطالعه سلول‌های سرطان کولورکتال SW-480 با غلظت‌های مختلف صمغ گیاه باریجه به مدت 48 ساعت تیمار شدند. نتایج آزمایش MTT نشان داد که صمغ گیاه باریجه حیات سلول‌های SW-480 را به طور بالقوه مهار می‌کند (IC_{50}=1.8 µg/ml). همچنین مشاهدات میکروسکوپی نشان داد، تیمار سلواهای SW-480 با غلظت‌های نزدیک به IC50 موجب فشرده شدن هسته سلول‌های SW-480 می‌شود. نتایج آزمایش DNA fragmentation نشان داد تیمار سلول‌های SW-480 با غلظت‌های نزدیک به IC_{50} و یا بیشتر صمغ موجب ایجاد الگوی Smear در حرکت الکتروفورزی DNA ژنومیک می‌شود. بطور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که صمغ گیاه F. gummosa به دلیل داشتن ترکیبات مختلف و اثرات سیتوتوکسیک می‌تواند گزینه مناسبی برای مطالعات آینده در زمینه داروهای ضد سرطان باشد.

واژگان کلیدی: Ferula gummosa، کشندگی سلولی، آپوپتوز، سرطان کولورکتال

۱.مقدمه

سرطان یکی از دلایل اصلی مرگ و میر در دنیا می‌باشد که بعد از حوادث ترافیکی و بیماری‌های قلبی-عروقی به عنوان سومین علت مرگ در بین مردم ایران شناخته شده است (Roshandel et al., 2014). سرطان کولورکتال با شیوع 8-6 نفر در هر صد هزار نفر، چهارمین نوع شایع و یک پنجم کل موارد سرطان در سراسر دنیا می‌باشد. شواهد نشان می‌دهد که این بیماری قابل پیشگیری بوده و بروز موارد سرطان کولورکتال در ایران در مقایسه با کشورهای غربی، پایین‌تر و به عنوان پنجمین سرطان در مردان و سومین در زنان مطرح است (Roudbari et al., 2015). عوامل مختلفی در ایجاد سرطان کولورکتال نقش دارند که از جمله می‌توان به کم تحرکی، چاقی، سیگار کشیدن، مصرف زیاد الکل، پیری، سابقه خانوادگی و رژیم‌های پرچرب بدون فیبر، دیابت و بیماری‌های التهابی روده اشاره کرد (Benson et al., 2011). در مطالعات اخیر ثابت شده است که شیوع این بیماری در گروه‌های نژادی مختلف متفاوت است. در حال حاضر درمان قطعی برای این بیماری شناخته نشده است ولی از درمان ترکیبی جراحی و شیمی درمانی، پرتودرمانی، ایمونوتراپی و ژن‌تراپی برای درمان سرطان به کار گرفته می‌شود ولی هر یک از روش‌های گفته شده در بالا محدودیت‌ها و عوارض مختلفی دارند (Mendelsohn, 2002; Baselga, 2006). امروزه گیاهان دارویی در درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می

گیرند. با توجه به فعالیت بالای ضد سرطانی گیاهان دارویی، امروزه امکان کاربرد اینگونه داروها در پیشگیری سرطان بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

جنس *Ferula* متعلق به خانواده‌ی Apiaceae است که بیش از 180 گونه مختلف از آن شناسایی شده است که 30 گونه‌ی آن بومی ایران است (Jalali et al., 2012). گونه‌های مختلف *Ferula* دارای ترکیبات شیمیایی مختلفی نظیر اوراپتن، گالبانیک اسید، فروتینین و ترکیبات گوگردی بسیاری هستند و از قدیم الایام در طب سنتی مورد توجه بوده و در درمان سرماخوردگی، آسم، وبا، اسهال و دردهای شکمی تجویز می‌شود (Mahboubi et al., 2016).

Ferula gummosa با نام انگلیسی Galbanum و با نام فارسی باریجه، گیاه بومی مناطق شرقی، مرکزی و غرب ایران است (Ghasemi et al., 2005). این گیاه دارویی به دلیل داشتن ترکیبات ترپنوییدی، کومارین و استر و اسید در صنایع نظامی و بهداشتی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین صمغ (رزین) این گیاه دارای خواص ضد میکروبی، ضد التهابی و ضد تشنجی است (Mandegary et al., 2004). *F. gummosa* دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و اثرات ضدتوموری بسیاری تا به امروز از آن گزارش شده است (Sayyah et al., 2002). از آنجاییکه تاکنون مطالعه ای در مورد اثرات ضد سرطانی گیاه *F. gummosa* صورت نگرفته، این مطالعه به بررسی اثرات کشندگی صمغ این گیاه بر سلول‌های سرطانی کولورکتال (SW-480) انجام شده است.

۲.مواد و روش‌ها

۲-۱-تهیه صمغ

صمغ گیاه باریجه با کمک افراد ماهر بومی تهیه، و به آزمایشگاه منتقل گردید. مقدار 20 میلی‌گرم از صمغ در یک میلی‌لیتر اتانول خالص حل شد تا غلظت 20 میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر (20mg/ml) از عصاره بدست آید. در تمام آزمایشاتی که سلول‌ها با عصاره‌ی گیاه تیمار شدند، از این غلظت برای تهیه غلظت‌های کمتر، استفاده شد.

۲-۲-بررسی میزان کشندگی صمغ با روش MTT

سلول‌های SW-480 در محیط RPMI-1640 حاوی 10% سرم جنین گاوی (FBS) و یک درصد استرپتومایسین-پنی سیلین در انکوباتور CO_2 کشت داده شد. برای انجام آزمایش MTT، در هر چاهک از پلیت 96 خانه، تعداد 8×10^3 سلول کشت داده شد. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم 70 درصد، با غلظت‌های 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 5 میکروگرم بر میلی‌لیتر از صمغ *F. gummosa* به مدت 48 ساعت تیمار شدند. سپس محتوای چاهک را تخلیه کرده و 100 میکرولیتر از محلول MTT (0.5 mg/ml) به چاهک‌ها اضافه گردید، بعد از گذشت 3 ساعت، 100 میکرولیتر DMSO به منظور حل کردن کریستال‌های فورمازان جایگزین محتویات چاهک‌ها شد و بعد از 15 دقیقه میزان رنگ تولید شده توسط دستگاه الایزا در طول موج 590 نانومتر خوانده شد. این آزمایش سه بار تکرار شد و در پایان برای محاسبه‌ی IC_{50} از نرم افزار Graph Pad Prism Ver. 8. 4. 3 استفاده شد.

۲-۳-آزمایش رنگ آمیزی هسته با آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید (AO/EtBr)

در هر چاهک از پلیت 6 خانه حاوی لامل‌های پوشیده شده با ژلاتین، تعداد 10^4 سلول SW-480 کاشته شد. پس از اینکه سلول‌ها به تراکم 70 درصد رسیدند با غلظت‌های 0.5, 1, 2, 3 میکروگرم بر میلی‌لیتراز صمغ *F. gummosa* به مدت 48 ساعت تیمار شدند. سپس سلول‌ها با محلول سرد استون- متانول به مدت 15 دقیقه در دمای 20- درجه سانتی‌گراد فیکس شدند. در نهایت، 10 میکرولیتر از محلول حاوی 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر آکریدین اورنج و 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید روی لام‌های میکروسکوپی قرار داده شد و لامل‌های حامل سلول‌ها روی رنگ قرار داده شدند. پس از 30 دقیقه انکوباسیون، لام ها دو بار با PBS شسته و در

معرض هوا قرار گرفته تا خشک شوند. سپس با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت سلول‌ها مشاهده شدند و با یک دوربین دیجیتال معمولی عکس‌برداری انجام شد.

۲-۴-بررسی اثرات صمغ بر سلول‌های سرطانی SW-480 به روش DNA fragmentation

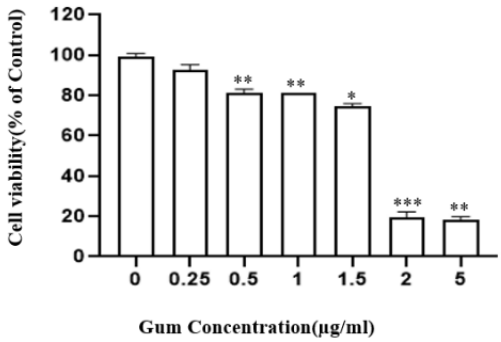
جهت بررسی بیشتر اثرات کشندگی سلولی صمغ گیاه *F. gummosa* بر سلول‌های SW-480 از روش DNA fragmentation یا DNA laddering استفاده شد. بدین منظور در هر چاهک از پلیت 6 خانه 10^4 سلول کاشته شد. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم 70 درصد، سلول‌ها با غلظت‌های 0.5, 1, 2, 3 میکروگرم بر میلی‌لیتر صمغ *F. gummosa* به مدت 48 ساعت تیمار شدند. سپس سلول‌ها با استفاده از EDTA/تریپسین 5% جمع‌آوری و به مدت 5 دقیقه با دور 1800 سانتریفیوژ شدند. با استفاده از روش Salting out، از سلول‌ها DNA ژنومیک استخراج شد. سپس به ترتیب 400 میکرولیتر بافر لیزکننده، 5 میکرولیتر SDS، 20% ، 15 میکرولیتر از Proteinase K به رسوب سلولی اضافه شد و به مدت 24 ساعت در دمای 50 درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. در ادامه به سلول‌ها 15 میکرولیتر RNase افزوده و به مدت 1 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس با دور 12000 به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ شد. برای حذف لیپیدها و پروتئین‌ها از فنل/کلروفرم/ایزوآمیل الکل (1 :24 :25) استفاده شد. سپس DNA موجود در مایع رویی با استفاده از اتانول به مدت 2 ساعت در دمای 20- درجه سانتی‌گراد ته‌نشین شد و به مدت 3 دقیقه با دور 12000 سانتریفیوز شد. رسوب ایجاد شده در 15 میکرولیتر آب مقطر حل شد و 8 میکرولیتر از آن به همراه 2 میکرولیتر DNA Loading بر روی ژل آگارز 1% بارگذاری و به مدت 1 ساعت تحت ولتاژ 65 ولت الکتروفورز گردید.

۲-۵-تجزیه و تحلیل آماری

تمام آزمایشات مربوط به سنجش حیات سلول‌ها و آزمایش ترمیم زخم حداقل سه بار تکرار شد و در نهایت، معنا دار بودن داده‌های مربوط به این آزمایشات با استفاده از آزمون t و نرم افزار Graph Pad Prism Ver. 8. 4. 3 مورد بررسی قرار گرفت. سطح معناداری نیز $P< 0.05$ در نظر گرفته شد.

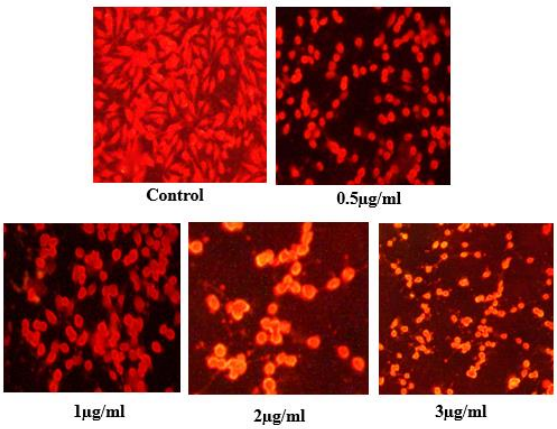
۳.نتایج و بحث

در این مطالعه، اثر کشندگی سلولی صمغ گیاه بومی ایرانی F. gummosa روی قابلیت زنده‌مانی رده‌ی سلولی SW-480 بررسی شد. تیمار سلول‌های SW-480 با غلظت‌های مختلف صمغ F. gummosa کاهش رشد وابسته به دوز را نشان داد. نتایج این آزمایش مشخص کرد که صمغ *F. gummosa* در غلظت‌های بالای 5 میکروگرم بر میلی‌لیتر منجر به کشته شدن بیش از 80% سلول‌های SW-480 شده است. بر اساس نتایج آزمایش MTT، میزان IC_{50} صمغ گیاه باریجه روی سلولهای SW-480، حدود 1.8 میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد (شکل1).



شکل۱: تاثیر صمغ بر زنده‌مانی سول‌های SW-480. داده‌های نشان داده شده میانگین سه تکرار مستقل ± انحراف استاندارد می‌باشد. (P<0.05: * و P<0.01: **)

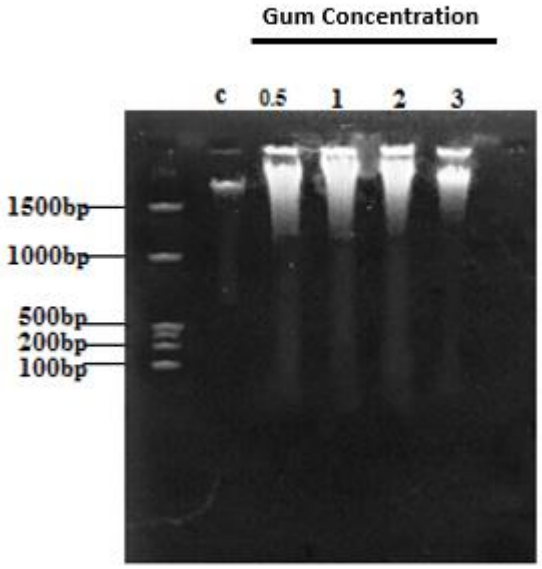
از آزمایش رنگ‌آمیزی هسته توسط آکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید (AO / EB) برای بررسی تاثیر اثرات کشندگی سلولی صمغ گیاه F. gummosa بر سلول‌های SW-480 بر وضعیت هسته و کروماتین سلول‌های SW-480 استفاده شد. همانطور که در شکل2 مشاهده می‌شود، هسته سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های نزدیک به IC50 و بالاتر صمغ گیاه F. gummosa، متراکم‌تر بوده ولی در سلول‌های کنترل (تیمار نشده) هسته سلولی کاملا طبیعی و به حالت غیرمتراکم می‌باشد (شکل2).



شکل۲: رنگ‌آمیزی هسته سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف صمغ گیاه F. gummosa و سلول‌های کنترل. در سلول‌های تیمار شده با غلظت های 1، 2 و 3 صمغ، هسته سلولی به صورت متراکم و قطعه قطعه شده دیده می‌شود، درحالیکه در سلول‌های کنترل و سلول-های تیمار شده با غلظت‌های پایین‌تر، هسته به حالت طبیعی و یکدست دیده می‌شود.

همچنین برای بررسی بیشتر اثرات کشندگی صمغ بر سلول‌های SW-480 از آزمایش DNA ladder استفاده شد. نتایج این آزمایش نشان داد تیمار سلول‌ها با غلظت‌های نزدیک به IC_{50} و بیشتر صمغ موجب قطعه قطعه شدن DNA ژنومیک سلول‌ها شده و الگوی

الکتروفورزی DNA این سلول‌ها به صورت اسمیر بود و شدت اسمیر با افزایش غلظت صمغ، افزایش یافت در حالیکه در سلول‌های کنترل (تیمار نشده) DNA ژنومیک تقریبا دست نخورده و سالم بود و بصورت یک باند مشخص در بالای ژل باقی ماند (شکل3).



شکل۳: تصویر DNA استخراج شده از رده سلولی SW-480 و بارگذاری آن روی ژل آگارز 1%. الگوی حرکت الکتروفورزی DNA ژنومیک سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف صمغ بصورت اسمیر می باشد در حالیکه در سلول‌های کنترل این الگو دیده نمی‌شود.

سرطان بیماری است که در آن سلول‌های غیرطبیعی بدن بدون کنترل تقسیم می‌شوند و از طریق خون و دستگاه لنفاوی می‌توانند به سایر بافت‌ها تهاجم داشته باشند. روش‌های درمانی مختلفی جهت مهار و یا درمان سرطان استفاده شده است که هر کدام عوارض جانبی متعددی برای بیمار دارند. با این حال روش‌های رایج در درمان سرطان سبب دست‌یابی به پیشرفت‌هایی در این زمینه شده است و استراتژی درمان‌های اخیر نیاز به تحقیقات بیشتر در محصولات طبیعی داشته که سبب تولید داروهای مؤثری در درمان سرطان گردیده است (Hasmah et al., 2010).

خواص دارویی شناخته شده برخی گیاهان و خاصیت ضد توموری آنها می‌تواند رویکرد مثبتی در درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله سرطان باشد. از این رو مطالعات مختلفی روی پتانسیل مهاری عصاره گیاهان بر سلول‌های سرطانی مختلف صورت گرفته است. این مطالعات نشان داده که ترکیبات طبیعی موجود در عصاره گیاهان، اثرات ضد سرطانی قابل توجهی نشان می‌دهند (Sak K., 2012).

قرایی و همکاران اثرات ضد تکثیری و القای آپوپتوز عصاره اتانولی گیاه باریجه را در غلظت های 70-10 میکروگرم بر میلی‌لیتر بر رده‌ی سلولی AGS بررسی کردند و نتایج نشان داد که عصاره باریجه در رفتاری وابسته به غلظت، تکثیر سلول‌های رده‌ی AGS را کاهش می‌دهد (Gharaei et al., 2013).

میرزاآقایی و همکاران رشد سلول و اثرات سمیت سلولی غلظت‌های مختلف از عصاره اتانولی F. gummosa را روی سلول‌های HUVEC مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که این عصاره اثری مهاری بر روی آنژیوژنز دارد (Mirzaaghaei et al., 2014).

۴.نتیجه گیری

مطالعه حاضر شواهدی را ارائه می‌دهد که صمغ گیاه Ferula gummosa اثرات مهاری خوبی روی تکثیر و مهاجرت سلول‌های سرطانی SW-480 دارد و این اثرات مهاری بصورت وابسته به دوز است. در مجموع نتایج این مقاله نشان می‌دهد که گیاه F. gummosa احتمالا می‌تواند به عنوان یک کاندید مناسب برای مطالعات بعدی جهت مهار سلول‌های سرطانی دستگاه گوارش مورد توجه قرار گیرد. به طور قطع آزمایش‌های بیشتری برای یافتن مکانیسم‌های مولکولی این تاثیرات گیاه F. gummosa مورد نیاز است.

منابع:

Baselga J. 2006. Epidermal growth factor receptor pathway inhibitors. *Update on cancer therapeutics*, *1*(3): 299-310.

Benson A. B., Arnoletti J. P., Bekaii-Saab T., Chan E., Chen Y. J., Choti M. A., ... and Willett C. 2011. Colon cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, *9*(11): 1238-1290.

Gharaei R., Akrami H., Heidari S., Asadi M. H. and Jalili A. 2013. The suppression effect of Ferula gummosa Boiss. extracts on cell proliferation through apoptosis induction in gastric cancer cell line. *European Journal of Integrative Medicine*, *5*(3): 241-247.

Ghasemi Y., Faridi P., Mehregan I. and Mohagheghzadeh A. 2005. Ferula gummosa fruits: an aromatic antimicrobial agent. *Chemistry of natural compounds*, *41*(3): 311-314.

Jalali H. T., Petronilho S., Villaverde J. J., Coimbra M. A., Domingues M. R. M., Ebrahimian Z. J., ... and Rocha S. M. 2012. Deeper insight into the monoterpenic composition of Ferula gummosa oleo-gum-resin from Iran. *Industrial Crops and Products*, *36*(1): 500-507.

Mahboubi M. 2016. Ferula gummosa, a traditional medicine with novel applications. *Journal of dietary supplements*, *13*(6): 700-718.

Mandegary A., Sayyah M. and Heidari M. R. 2004. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of the seed and root extracts of Ferula gummosa Boiss in mice and rats. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, *12*(2): 58-62.

Mendelsohn J. 2002. Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *Journal of clinical oncology*, *20*(18): 1s-13s.

Mirzaaghaei S., Akrami H., Asadi M. H. and Mahdiuni H. 2014. Ferula gummosa Boiss flower and leaf extracts inhibit angiogenesis in vitro. *Indian journal of câncer*, *51*(4): 615.

Roshandel G., Ghanbari-Motlagh A., Partovipour E., Salavati F., Hasanpour-Heidari, S., Mohammadi G., ... and Malekzadeh R. 2019. Cancer incidence in Iran in 2014: results of the Iranian National Population-based Cancer Registry. *Cancer epidemiology*, *61*: 50-58.

Roudbari M., Abbasi Asl M., Barfei F., Gohari M. R. and Khodabakhshi R. 2015. Survival analysis of colorectal cancer patients and its prognostic factors using cox regression. *Razi Journal of Medical Sciences*, *22*(130): 21-28.

Sak K. 2012. Chemotherapy and dietary phytochemical agents. *Chemotherapy research and practice*, *2012*.

Sayyah M., Mandgary A. and Kamalinejad M. 2002. Evaluation of the anticonvulsant activity of the seed acetone extract of Ferula gummosa Boiss. against seizures induced by pentylenetetrazole and electroconvulsive shock in mice. *Journal of ethnopharmacology*, *82*(2-3): 105-109.

Zeinali Z., Hemmati K., Mazandarani M. and Asghari J. 2014. Autecology, ethnopharmacology,phytochemistry and antioxidant activity of Ferula Gummesa Boiss. In different regions of Razavi Khorasan Province, Ecophytochemical Journal of Medical Plants, 1(4): 11-22.

Polymorphism of Myostatin Gene Exon 3 Polymorphism in Kurdi Sheep by PCR-RFLP Method

F. Rayeji*[2391], S. Hassani[2], M. Najafi[3]

[1-] M.Sc. Student of Animal Breeding and Genetics, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

[2-] Profrssor of Animal Breeding and Genetics, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

[3-] Assistant Professor of Animal Breeding and Genetics, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

*Corresponding author: fatemeh25december@gmail.com

Abstract:

Myostatin or growth and differentiation factor 8 (GDF8) has been identified as the factor causing a phenotype known as double muscling in which a series of mutations render the gene inactive, and therefore, unable to regulate muscle fiber deposition. Myostatin or growth and differentiation factor 8 (GDF8) has been identified as the factor causing a phenotype known as double muscling in which a series of mutations render the gene inactive, and therefore, unable to regulate muscle fiber deposition. In the present study, blood samples were taken randomly from 139 Kurdi sheep in North Khorasan and then DNA extraction was performed using an optimized salting method. A 388 bp fragment from the exon 3 region of the myostatin gene was amplified using a specific primer pair by polymerase chain reaction (PCR). In order to detect different allelic forms at myostatin locus, the HaeIII restriction enzyme was used by PCR -RFLP. The results of genotype determination showed that there were no different allelic forms in this population and only one genotype was observed. Given the importance of this issue and previous reports of polymorphism in sheep, it is likely that this polymorphic gene is present in other areas and needs further investigation in future studies.

Keyword: Polymorphism, Myostatin Gene, PCR-RFLP, Kurdi sheep

بررسی چندشکلی ناحیه اگزون سه ژن میوستاتین در گوسفند کردی با استفاده از روش PCR-RFLP

فاطمه رایجی یانسری*[۱]، سعید حسنی[۲]، مجتبی نجفی[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک و اصلاح دام و طیور، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲. استاد گروه ژنتیک و اصلاح دام و طیور دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۳. استادیار گروه ژنتیک و اصلاح دام و طیور دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

*آدرس ایمیل مکاتبه کننده: E-mail: fatemeh25december@gmail.com

چکیده

ژن میوستاتین یا عامل ۸ رشد و تمایز (GDF8) به عنوان عامل ایجاد کننده ماهیچه مضاعف شناخته شده است، که در آن مجموعه ای از جهش‌های غیر فعال کننده ژن رخ می‌دهند. در گاو، جهش های غیر فعال کننده در این ژن منجر به تولید فنوتیپ ماهیچه مضاعف می‌شود. در پژوهش حاضر خون‌گیری به طور تصادفی از تعداد ۱۳۹ راس گوسفند کردی خراسان شمالی انجام و سپس استخراج DNA با استفاده از روش نمکی بهینه یافته صورت گرفت. یک قطعه ۳۸۸ جفت بازی از ناحیه اگزون ۳ ژن میواستاتین با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی توسط واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) تکثیر شد. به منظور ردیابی شکل‌های متفاوت آللی در جایگاه میواستاتین از آنزیم محدودالاثر *HaeIII* با روش PCR-RFLP استفاده شد. نتایج تعیین ژنوتیپ نشان داد که فرم های مختلف آللی در این ناحیه در گوسفندان مورد پژوهش وجود ندارد و تنها یک ژنوتیپ مشاهده شد. با توجه به اهمیت این موضوع و گزارشات قبلی مبنی بر وجود چند شکلی در گوسفند، احتمالا در نواحی دیگر این ژن چند شکلی موجود می باشد که نیاز به بررسی‌های بیشتر در مطالعات آتی دارد.

واژه‌های کلیدی: چندشکلی، ژن میوستاتین، PCR-RFLP، گوسفند کردی

۱. مقدمه

گوسفند به عنوان یکی از نخستین دام‌های اهلی در حدود ۹۰۰۰ سال پیش در مناطق عراق و ایران امروزی (Zeder, 1999) برای تولید گوشت اهلی شد (Chessa et al ., 2009) . در حال حاضر، هدف از پرورش گوسفند در ایران تولید گوشت می‌باشد، لذا افزایش تولید در این بخش نیازمند اقداماتی نظیر اصلاح نژاد و همچنین راهکارهای کوتاه مدت نظیر بهبود شرایط بهداشتی و تغذیه‌ای می‌باشد (خالداری، ۱۳۹۰). شناخت جنبه‌های ژنتیکی و ژن‌های عمده تأثیرگذار بر تولید گوشت مورد توجه محققان ژنتیک و اصلاح نژاد قرار گرفته است (مسعودی و همکاران،۱۳۸۴). روش‌های متعددی جهت افزایش تولید گوشت در دام‌ها به خصوص در گاو و گوسفند وجود دارد که انتخاب دام‌های برتر از نظر ژنتیکی، یکی از مهمترین ها است. رشد چشمگیر در توسعه مطالعات بیولوژیکی و به ویژه ژنتیک مولکولی، تعیین توالی نوکلئوتیدها و شناسایی مستقیم ژن‌ها روی اکثر گونه‌های دامی، تمایل محققین در انجام مطالعات مولکولی در سطح DNA را افزایش داده است. یکی از ژن‌های شناسایی شده جهت افزایش رشد، تولید گوشت و بهبود کیفیت لاشه، ژن میوستاتین[240] (ماهیچه مضاعف) است (Timoty et al.,1997).

اولین اسناد و نوشته‌ها درباره ماهیچه مضاعف در گاو به دهه ۱۸۰۷ میلادی برمی‌گردد (Kobolak et al., 2002). مطالعات مولکولی ژن میوستاتین نشان داد چندشکلی در بین دام‌ها وجود دارد (مسعودی و همکاران،۱۳۸۴). میوستاتین مهار کننده رشد ماهیچه اسکلیتی می‌باشد و اگر جهشی در ژن کد کننده میوستاتین اتفاق افتد باعث تغییر نقش مهاری آن و افزایش عضله می‌شود (Jahnson et al., 2005; Fahrankrug et al., 1999) ژن میوستاتین یا عامل ۸ رشد و تمایز (GDF8241) عضوی از خانواده TGFβ۲۴۲ می‌باشد که به عنوان ژن کاندید برای صفت ماهیچه مضاعف در نژادهای مختلف دام و طیور و حتی انسان شناخته شده است (GU et al., 2003). ژن میوستاتین گوسفندی در ناحیه سانترومری کروموزوم شماره دو قرار دارد، دارای سه اگزون، دو اینترون و ۳۷۶ آمینواسید می‌باشد که به عنوان یک واسطه بیان ژن در کنترل شکل فیبری ماهیچه نقش داشته و در صورتی که در آن جهشی رخ ندهد با جلوگیری از تکثیر میوبلاست‌ها، رشد عضلانی را متوقف می‌کند (فرهادیان و همکاران، ۲۰۱۱). حیواناتی که خصوصیت ماهیچه مضاعف دارند، میزان چربی کمتر داشته و گوشت آن‌ها برای سلامتی مفیدتر است(DeSmet et al., 2000). علی‌رغم آنچه گفته شد ماهیچه مضاعف ارتباطی با دو برابر شدن ماهیچه ندارد اما به نسبت یک افزایش در تعداد فیبرهای ماهیچه‌ای (هیپرپلازی) و طویل شدن فیبرها (هایپرتروفی) را ایجاد می‌کنند. در گاوهای ماهیچه مضاعف تعداد فیبرهای ماهیچه‌ای در زمان تولد دو برابر گاوهای عادی است (Gerrard et al., 1991). تا به حال مطالعاتی در زمینه بررسی چند شکلی در گونه ها و نژادهای مختلفی صورت گرفته که می توان به بررسی چند شکلی اگزون ۳ ژن میوستاتین و رابطه آن با نرخ دوقلوزایی در نژاد بز مرخز با روش PCR-RFLP اشاره کرد که در این مطالعه، سه ژنوتیپ یدست آمد و گزارش شد که صفت دوقلوزایی به طور معنی داری تحت تأثیر ژنوتیپ ژن میوستاتین قرار میگیرد (خانی و همکاران،۱۳۹۳). علی رغم بررسی های صورت گرفته در نژادهای مختلف، تاکنون پژوهشی روی گوسفندان کردی خراسان شمالی انجام نشده است لذا با توجه به اینکه گوسفند کردی خراسان شمالی یکی از نژادهای گوسفند دنبه‌دار ایران است، که هدف اصلی پرورش آن افزایش بازده تولید گوشت است، هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی چندشکلی ژن میوستاتین و ارتباط آن با صفات وزن بدن در این نژاد بود.

[240] - Myostatin
[241] - Growth Differentiation Factor-8
[242] - Transforming Growth Factor- β

۲. مواد و روش

جهت استخراج DNA مقدار ۳ میلی‌لیتر خون از سیاهرگ وداج ۱۳۹ راس از گوسفندان نژاد کردی به طور تصادفی و با استفاده از لوله خلاءدار حاوی ماده ضد انعقاد EDTA تهیه شده و با استفاده از فلاسک حاوی یخ به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی دانشکده علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شد و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگه‌داری شد. استخراج DNA از نمونه‌های خون به روش استخراج نمکی بهینه یافته انجام شد. دو روش معمول برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، روش اسپکتوفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز می‌باشد (طباطبایی یزدی و همکاران، ۱۳۸۶). در این پژوهش نمونه‌های DNA با غلظت‌های متفاوت همراه با یک خط کش مولکولی روی ژل آگارز ۱درصد الکتروفورز شدند.

جهت انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز۲۴۳ از کیت (PCR Master Mix kit شرکت ویراژن آکام) در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر و یک جفت پرایمر با توالی زیر که با استفاده از نرم افزار Oligo 7 طراحی شده، استفاده شد.

جدول ۱:آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر قطعه ۳۸۸جفت بازی از اگزون ۳ ژن میوستاتین

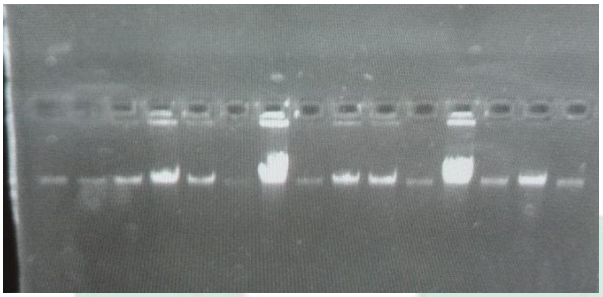
قطعه مورد نظر	توالی	نام پرایمر
۳۸۸جفت باز	5-GGAGAGATTTTGGGCTTGATTGTGA-3	MSTN- Forward
	5-TGTTGAGGGGAAGACCTTCTGTGTT-3	MSTN- Reverse

واکنش زنجیره ای پلیمراز با برنامه حرارتی زیر در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. واسرشت سازی اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد، انجام ۳۶ سیکل با واسرشت سازی DNA طی۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر بهDNA طی ۳۰ ثانیه و ۶۲ درجه سانتی‌گراد و بسط آغازگر طی ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط انتهایی ۵ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. به منظور مشاهده محصولات PCR از روش الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد، این کار جهت تایید تکثیر قطعه مورد نظر و کیفیت و کمیت قطعه تولیدی ضروری است. برای این منظور با قرار دادن ۴ میکرولیتر از نمونه محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد با ولتاژ ۶۴ ولت به مدت ۳۶ دقیقه الکتروفورز شد. رنگ آمیزی ژل با Safe stain انجام شد و با قرار دادن ژل در زیر نور UV قطعه تکثیر شده به صورت یک باند مجزا مشاهده و ارزیابی شدند. جهت تعیین چند شکلی در نمونه‌ها، محصولات PCRبه کمک آنزیم برشی HaeIII به مدت ۷-۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد هضم آنزیمی قرار گرفتند برای مشاهده قطعات هضم شده از ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۶۵ به مدت ۳۶ دقیقه استفاده شد.

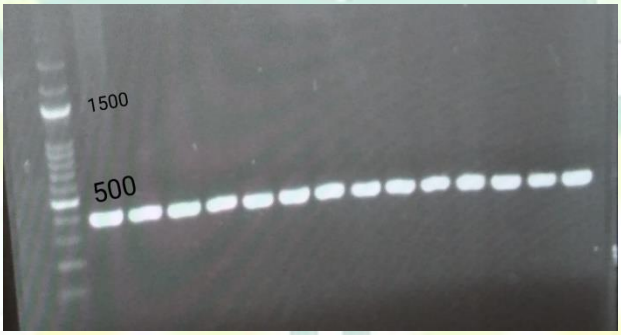
243 - Polymerase chain reaction

۳. نتایج و بحث

استفاده از روش استخراج نمکی جهت استخراج DNA از نمونه خون برتری خوبی را از لحاظ کمیت و کیفیت و صرف زمان لازم در استحصال DNA نشان داد. کیفیت مناسب DNA روی ژل آگارز یک درصد در شکل ۱ قابل مشاهده است. تکثیر قطعه ۳۸۸ جفت‌بازی از ژن میوستاتین به کمک واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به خوبی صورت گرفت و در نتیجه استفاده از برنامه حرارتی مناسب، آغازگرهای اختصاصی و شرایط خوب آزمایشگاهی که فراهم شد قطعه ۳۸۸ جفت‌بازی بدون قطعات غیر اختصاصی بدست آمد (شکل۲).

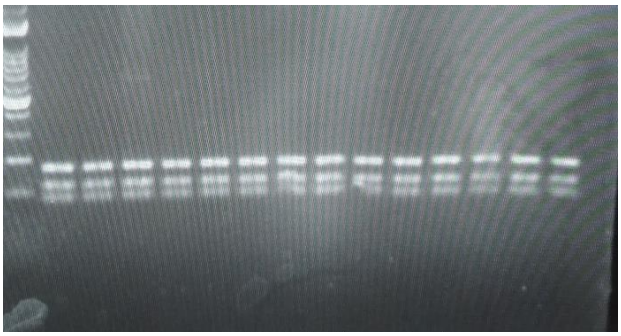


شکل ۱: DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۰/۱ درصد



شکل ۲: نتایج الکتروفورز محصولات PCR ژن میوستاتین روی ژل آگارز ۱ درصد

پس از هضم محصول PCR توسط آنزیم *HaeIII* محصولات هضم روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید. این آنزیم در دو جایگاه (در نوکلئوتیدهای ۱۲۳ و ۲۱۷ قطعه تکثیری) قابلیت هضم قطعه تکثیری را داشت و پس از هضم آنزیمی نمونه ها، قطعات ۲۰۳، ۱۲۳ و ۹۴ جفت بازی نمایان گردید (شکل۳) و تنها یک ژنوتیپ مشاهده گردید. از آنجایی که فقط یک ژنوتیپ مشاهده شد این جایگاه مونومورف (تک شکل) می‌باشد.



شکل۳: نتایج الکتروفورز محصولات PCR ژن میوستاتین روی ژل آگارز ۱/۵٪

۴. نتیجه گیری

در بررسی‌های صورت گرفته روی نژادهای ایرانی، در جایگاه ژن میوستاتین چندشکلی قابل توجهی مشاهده نشده است. مطالعه صورت گرفته در قطعه اگزون ۳ ژن میوستاتین نژادهای زل و ماکویی، که با استفاده از روش PCR-RFLP و آنزیم برشی BSHF1 مشخص کرد که هر دو جمعیت در جایگاه یک شکلی هستند که همسو با نتایج پژوهش حاضر می باشد (مرادی، ۱۳۸۸). هم‌چنین، در مطالعه دیگر که با استفاده از روش و آنزیم برشی مشابه با این بررسی روی نژاد سنجابی و زل انجام شد، به ترتیب کمتر از ۳ و ۲ درصد از نمونه‌ها در جایگاه این ژن دارای آلل جهش یافته بودند و سطح پایینی از چندشکلی در این جایگاه مشاهده شد (صوفی و همکاران، ۱۳۸۸ ; دهنوی و همکاران، ۱۳۸۹). نتایج بررسی‌ها در خصوص سایر نشخوارکنندگان نیز وجود چندشکلی در ژن میوستاتین و ارتباط آن با صفات عملکردی رشد را ثابت می‌کند. مطالعه صورت گرفته در بزهای نژاد Boer مشخص کرد که در ناحیه UTR'5 از اگزون شماره ۱ این نژاد دو جهش وجود دارد. افراد حامل آلل جهش یافته دارای سرعت رشد بیشتر و عملکرد بهتری نسبت به افراد نرمال هستند (Zhang et al., 2011). در مطالعه انجام شده روی نژاد تکسل که یک نژاد گوشتی اروپایی است، با استفاده از تکنیک توالی‌یابی، فروانی بالایی از آلل جهش یافته در جایگاه ژن میوستاتین این نژاد مشاهده شد. به طوریکه تقریباً نیمی از نمونه‌ها حامل آلل جهش یافته بودند. در این مطالعه نامبرده با استفاده از نور ماورائ بنفش و سی تی اسکن اجزائ لاشه تفکیک و طبقه‌بندی شدند و ارتباط معنی‌داری بین وجود این آلل و صفات لاشه و وزن بدن مشاهده شد (Masri et al., 2011).

عدم مشاهده چند شکلی گله گوسفندان کردی در این جایگاه ژنی می‌تواند مربوط به شرایط بسته و سطح محدود پرورش این نژاد، تعداد کم نمونه ها باشد. انجام تلاقی‌ها در یک جمعیت بسته و افزایش درون آمیزی در این جمعیت باعث افزایش همخونی شده است. از این رو احتمالا بیشتر جایگاه‌های ژنی در این جمعیت برای یک آلل خاص به صورت تک شکل وجود دارند.

سپاسگزاری

از مسئولین و پرسنل محترم ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند کردی خراسان شمالی واقع در شهرستان شیروان مخصوصا آقای مهندس حمید کاظمیان رئیس مرکز اصلاح بدلیل همکاری صمیمانه قدردانی می‌نمایم.

منابع

دهنوی، ا.، م. آهنی آذری، س. حسنی، م.ر. نصیری، م. مهاجر و ع.ر.خان احمدی. ۱۹۸۳. بررسی پلی‌مورفیسم ژن میوستاتین-GDF) (۸ درگوسفند زل با استفاده ازروش RFLP-PCR. چهارمین کنگره علوم دامی، ۳۰-۲۹ شهریور، پردیس کشاورزی دانشگاه تهران (کرج.)

زارع، ج و میرحسینی، س ض(۱۳۹۲) بررسی چند شکلی ژن میوستاتین در گوسفند نژاد قره گل با استفاده از نشانگر PCR-RFLP . مجله ژنتیک نوین (۱) ۸: ۱۱۱-۱۱۶.

صوفی، ب.، شجاعیان، ک.، محمدآبادی، م.، باغی زاده، ا. و فراستی س. ۱۳۸۸. چندشکلی ژن میوستاتین در گوسفند نژاد سنجابی با استفاده از نشانگر PCR-RFLP، مجله پژوهش های علوم دامی، جلد۹، شماره ۱، ص ۸۹-۸۱.

مرادی شهربابک، ح. ۱۳۸۸ .ارتباط چند شکلی ژن‌های کالپاستاتین، میوستاتین، لپتین و پتاسیم با صفات مهم اقتصادی، متابولیت های خونی وصفات لاشه درگوسفندان ماکویی و زل. پایانامه دکتری، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه تهران.

مسعودی، ع.، ح. عمرانی.، ع. عباسی.، ا. نجاتی جوارمی.، خ. فرهنگ.، س. اسماعیل خانیان.، و م. ضیایی . ۱۳۸۴ .استفاده از تکنیر PCR -SSCPجهت بررسی چند شکلی‌های ژن میوستاتین و ارتباط آن با صفات تولیدی در گوسفند بلوچی . چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران. ص ۱۹-۱.

DeSmet SD, Webb EC, Claeys E, Uytterhaegen L .۲۰۰۰.Effect of dietary energy and protein levels on fatty acid composition of intramuscular. fat in double-muscled Belgian Blue bulls. Meat Science ۵۶: ۷۳-۹۰

Fahrankrug SC, Casas E, Keel JW, Smith TDL. **۱۹۹۹**.Direct Genotyping of the Double- muscling locus (mh) in piedmotese and Belgain Blue cattle by fluorescent PCR. Journal of Animal Science ۷۷.; ۲۰۲۸-۲۰۳۰.

Farhadian, M., Hashemi, A., Mardani, k., Darvish zadeh, R. and Ranjbary, M., ۲۰۱۱. Allelic polymorphism of Makoei sheep myostatin gene identified by polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism African Journal of Biotechnology ۱۰(۵۰), pp: ۱۰۰۸۳-۱۰۰۸۶ .

Gerrard DE, Thrasher KH, Grant AL, Lemenager RP. ۱۹۹۱. Serum- induced myoblast proliferation and gene expression during development of double muscled and normal cattele. Journal of Animal Science ۶۹: (Suppl. ۱)۳۱۷.

Gu Zh L, Zhu D H, Li N, Li H, Deng X M, Wu Ch X .۲۰۰۳. The single nucleotide polymorphisms of the chicken myostatin gene are associated with skeletal muscle and adipose growth. Science China (Chin Life Science) ۳۳: ۲۷۳–۲۸۰.

Jahnson PL, Mcewant JC, Dodds KG, Purchas RW. ۲۰۰۵. A directed search in the region of GDF۸ for quantitative trait loci affecting carcass trait in Texel sheep. Journal of Animal Science.; ۸۳:۱۹۸۸-۲۰۰۰.

Kobolak, J., and E. Gocza. ۲۰۰۲. The role of the myostatin protein in meat quality. A review. Arch. Tierz. Dummest prf, ۴۵ : ۱۵۹-۱۷۰.

Masri, A.Y., Lambe, NR., Macfarlane, JM., Brotherstone, S., Haresign, W., Bünger, L. ۲۰۱۱ Evaluating the effects of a single copy of a mutation in the myostatin gene (c.*۱۲۳۲ G>A) on carcass traits in crossbred lambs. Meat Science ۸۷:۴۱۲-۴۱۸.

Timoty, P.L., N. L. Lopez-Corrales., S. M. Kappes., and T. S. Sonstegard. ۱۹۹۷. Myostatin Maps to The interval containing the bovine Mh Locus. Mammalian Genome. ۸:۷۴۲-۷۴۴.

Zhang, G., Ding, F., Wang, J., Dai, G., Xie, K., Zhang, L., Wang, W. and Zhou, S. ۲۰۱۱. Polymorphism in exons of the myostatin gene and its relationship with body weight traits in the Bian chicken. Biochemical Genetics. ۴۹:۹-۱۹.

Polymorphism of Myostatin Gene Exon 3 in Kordi Sheep by PCR-SSCP Method

F. Rayeji*[1,2,4], S. Hassani[2], M. Najafi[3]

[1-] M.Sc. Student of Animal Breeding and Genetics, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

[2-] Profrssor of Animal Breeding and Genetics, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

[3-] Assistant Professor of Animal Breeding and Genetics, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

**Corresponding author: fatemeh25december@gmail.com*

Abstract

Myostatin or growth and differentiation factor 8, which is abundant in species, affects the development and maturation of skeletal muscle. Myostatin inhibits skeletal muscle growth and mutations in its coding region change its inhibitory role and increase muscle. This study was performed to investigate the Dragon mutation of exon three of myostatin gene in 139 Kurdish sheep. After DNA extraction by modified salting out method, a 388 bp fragment of exon three of the myostatin gene was amplified by a polymerase chain reaction. Single-strand spatial polymorphism (PCR SSCP) was used to determine the genotype of the samples. Also, gel staining was performed by silver nitrate method. The results of the study on exon 3 did not show polymorphism of myostatin in Kurdi and is not a suitable marker in genetic continuity studies and selection based on marker information. Other sites of myostatin or other genes should be studied in future.

Keyword: Polymorphism, Myostatin Gene, PCR-SSCP, Kordi sheep

بررسی چندشکلی ناحیه اگزون سه ژن میوستاتین با روش PCR-SSCP در گوسفندان نژاد کردی

فاطمه رایجی یانسری*[۱]، سعید حسنی[۲]، مجتبی نجفی[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک و اصلاح دام و طیور، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲. استاد گروه ژنتیک و اصلاح دام و طیور دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۳. استادیار گروه ژنتیک و اصلاح دام و طیور دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

*آدرس ایمیل مکاتبه کننده: E-mail: fatemeh25december@gmail.com

چکیده

ژن میوستاتین یا فاکتور ۸ رشد و تمایز، که به میزان زیادی در بین گونه‌ها وجود دارد روی توسعه و بلوغ ماهیچه‌های اسکلتی اثر می‌گذارد. میوستاتین مهارکننده رشد ماهیچه‌های اسکلتی بوده و جهش در ناحیه کدکننده آن باعث تغییر نقش مهاری آن و افزایش عضله می‌شود. این تحقیق به منظور بررسی جهش دراگزون سه ژن میوستاتین در ۱۳۹ رأس گوسفند نژاد کردی انجام شد. بعد از استخراج DNA از نمونه ها با استفاده از روش نمکی بهینه یافته، قطعه ۳۸۸ جفت‌بازی از اگزون سه ژن میوستاتین به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی مراز تکثیر شد. از تفاوت چندشکلی فضایی تک رشته‌ها (PCR-SSCP) برای تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها، استفاده شد. همچنین رنگ آمیزی ژل به روش نیترات نقره انجام شد. نتایج مطالعه روی اگزون ۳ جایگاه میوستاتین در نژاد کردی چندشکلی نشان نداد و نشانگر مناسب در مطالعات پیوستگی ژنتیکی و انتخاب به واسطه اطلاعات نشانگر محسوب نمی‌گردد و می‌بایست در مطالعات آینده مکان‌های دیگری از جایگاه میوستاتین یا سایر ژن‌ها بررسی گردند.

کلمات کلیدی: چندشکلی، ژن میوستاتین، PCR-SSCP، گوسفند کردی

۱. مقدمه

شناخت جنبه‌های ژنتیکی و ژن‌های عمده تاثیرگذار بر تولید گوشت اخیرا مورد توجه محققان ژنتیک و اصلاح نژاد قرار گرفته است. استفاده از اطلاعات ژنومیک به عنوان یک ابزار در برنامه‌های اصلاح نژاد استفاده شد (Veerkamp and Beerda, 2007) که عمده تلاش‌ها در جهت شناسایی ژن‌های عمده تاثیرگذار بر صفات مهم اقتصادی و بررسی میزان تنوع در جایگاه‌های فوق بوده تا امکان توجیه تنوع ژنتیکی و فنوتیپی بین افراد فراهم شود. مطالعات برای یافتن ژن‌های به وجود آورنده عضله مضاعف در گاوهای گوشتی منجر به کشف ژن میوستاتین شد، که به عنوان ژن کاندیدا برای صفت تولید گوشت بررسی و نقش آن در نژادهای مختلف دام و طیور و حتی انسان مشخص شد. ژن میواستاتین که فاکتور ۸ رشد و تمایز (GDF-8[۲۴۵]) نامیده می‌شود، عضوی از خانواده بزرگ تغییردهنده رشد پستانداران TGF-β می‌باشد و در توسعه ماهیچه اسکلتی بزرگسالان نقش دارد(Masumi et al., 2002) . ژن میوستاتین در گاو و گوسفند روی کروموزوم ۲ واقع شده است (Timoty et al., 1997). میواستاتین مهارکننده رشد ماهیچه‌های اسکلتی بوده و جهش در ناحیه کدکننده آن باعث تغییر نقش مهاری آن و افزایش عضله می‌شود (Johnson et al., 2009). مطالعات نشان داده است که گاوهای با ماهیچه مضاعف، ۲۰ ٪ حجم ماهیچه بیشتر به همراه چربی و استخوان کمتر دارند(Tay et al., 2004). میوستاتین از طریق هایپرپلازی و هایپرتروفی بر حجم ماهیچه اسکلتی تاثیر گذار است. هایپرپلازی عضلانی به افزایش در تعداد فیبرهای ماهیچه‌ای اطلاق می‌شود در حالی‌که هایپرتروفی عضلانی به افزایش در حجم فیبرهای عضلانی مربوط می‌شود (Weiner, 2009). علی‌رغم آنچه گفته شد ماهیچه مضاعف ارتباطی با دو برابر شدن ماهیچه‌ها ندارد (Sofi et al., 2010). حیوانات با فنوتیپ ماهیچه مضاعف دارای اندام‌های خلفی به صورت گرد و برجسته هستند و دارای درصد استخوان و چربی کمتر و ماهیچه بیشتری هستند و نسبت قسمت‌های ارزشمند گوشت در آنها بیشتر است (Arthur et al., 1988). این ویژگی‌ها به طور زیادی منطبق با استانداردهای سلامتی است (Smet et al., 2000). هدف از انجام پژوهش حاضر، تعیین چندشکلی موجود در جایگاه اگزون سه ژن میوستاتین گوسفند نژاد کردی با روش PCR-SSCP بود

۲. مواد و روش

جهت انجام پژوهش حاضر، تعداد ۱۳۹ راس گوسفندان کردی خراسان شمالی ایستگاه اصلاح نژاد گوسفند کردی شهرستان شیروان، به طور تصادفی انتخاب و خونگیری از سیاهرگ گردنی انجام شد جهت استخراج DNA مقدار ۳ میلی‌لیتر خون از سیاهرگ وداج ۱۳۹ راس از گوسفندان نژاد کردی به طور تصادفی (از نظر جنس، سن و تیپ تولد) و با استفاده از لوله خلاءدار حاوی ماده ضد انعقاد EDTA تهیه شد و به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی دانشکده علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شد و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگه‌داری شد. استخراج DNA از نمونه‌های خون به روش استخراج نمکی بهینه یافته انجام شد. دو روش معمول برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، روش اسپکتوفتومتری و الکتروفورز بر ژل آگارز می‌باشد (طباطبایی

[245] - Growth differentiation factor -8

یزدی و همکاران، ۱۳۸۶). در این تحقیق نمونه‌های DNA با غلظت‌های متفاوت همراه با یک خط کش مولکولی (cat.no: S-5092) روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند. ژل بوسیله Safe stain رنگ‌آمیزی گردید و تحت نور ماورای بنفش مورد بررسی قرار گرفت.

جهت انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز[۲۴۶] از کیت (PCR Master Mix kit شرکت ویراژن آکام) در حجم نهایی ۱۵میکرولیتر و یک جفت پرایمر با توالی زیر که با استفاده از نرم افزار Oligo 7 طراحی شده، استفاده شد.

جدول ۱:آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر قطعه ۳۸۸جفت بازی از اگزون ۳ ژن میوستاتین

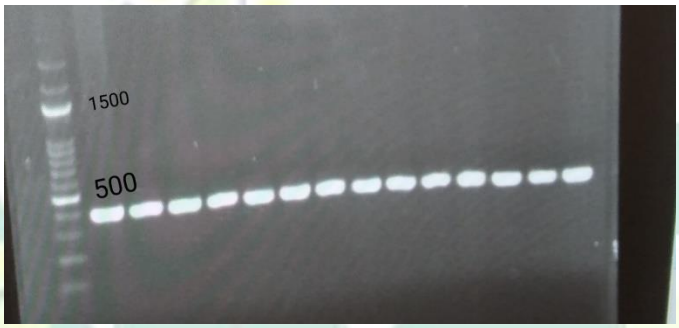
قطعه مورد نظر	توالی	نام پرایمر
۳۸۸جفت باز	5-GGAGAGATTTTGGGCTTGATTGTGA-3	MSTN- Forward
	5-TGTTGAGGGGAAGACCTTCTGTGTT-3	MSTN- Reverse

واکنش زنجیره ای پلیمراز با برنامه حرارتی زیر در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. واسرشت سازی اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد، انجام ۳۶ سیکل با واسرشت سازی DNA طی ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به DNA طی ۳۰ ثانیه و ۶۲ درجه سانتی‌گراد و بسط آغازگر طی ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط انتهایی ۵ دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد صورت گرفت. به منظور مشاهده محصولات PCR از روش الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد، این کار جهت تایید تکثیر قطعه مورد نظر و کیفیت و کمیت قطعه تولیدی ضروری است. برای این منظور با قرار دادن ۴ میکرولیتر از نمونه محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد با ولتاژ ۶۴ ولت به مدت ۳۶ دقیقه الکتروفورز شد. رنگ آمیزی ژل با Safe stain انجام شد و با قرار دادن ژل در زیر نورUV قطعه تکثیر شده به صورت یک باند مجزا مشاهده و ارزیابی شدند. به منظور آنالیز چند شکلی ساختار تک رشته‌ای، ۱۰ میکرولیتر از بافر SSCP[۲۴۷]، ۴ میکرولیتر محصول PCR و در مجموع ۱۴ میکرولیتر از این مخلوط اضافه شد. نمونه‌ها در ۹۶ درجه سانتی‌گراد برای ۸ دقیقه واسرشت‌سازی شدند و بر روی یخ سرد شده و تمام حجم حاصل بر روی ژل پلی اکریل‌آمید ۳۹ درصد با بافر TBE ۱X الکتروفورز شدند .ژل‌ها در ولتاژ ۲۴۰ به مدت ۲۲ ساعت در سیستم آنزیمی قرار گرفتند پس از اتمام الکتروفورز ژل‌ها از دستگاه خارج و بوسیله نیترات نقره رنگ آمیزی شدند.

۳. نتایج و بحث

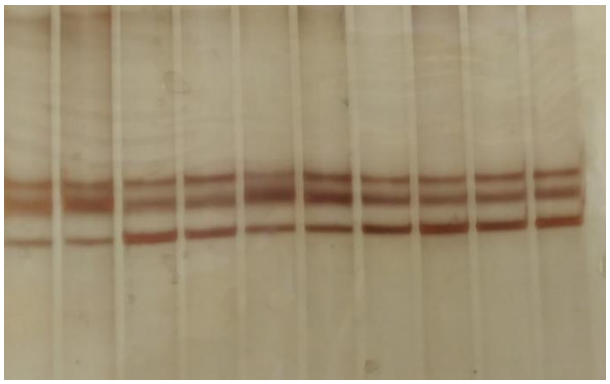
[246] - Polymerase chain reaction
[247] - Single Strand Conformation Polymorphism

ارزیابی کمیت و کیفیت محصولات به دست آمده از استخراج DNA ، با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و رنگ آمیزی با safe stain صورت گرفت. وجود باندهای شارپ و بدون اسمیر و با کیفیت بالا مشخص کرد که عمل استخراج DNA به خوبی انجام شده است. با استفاده از یک جفت آغازگرهای اختصاصی طی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، قطعه ۳۸۸ جفت بازی از اگزون ۳ ژن میوستاتین تکثیر گردید که به منظور تایید تکثیر قطعه مورد نظر، محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد مورد ارزیابی قرار گرفتند. مشاهده تنها یک باند ۳۸۸ جفت بازی نشان دهنده تکثیر درست قطعه انتخاب شده از اگزون شماره سه ژن میوستاتین و صحت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بود (شکل۱).



شکل۱: محصولات PCR ژن میوستاتین (قطعه۳۸۸ جفت‌بازی)

روش SSCP برای شناسایی تنوع در قطعه تکثیر شده استفاده گردید. روش SSCP روش موثری در شناسایی تنوع توالی تکثیر شده می‌باشد (Orita et al., 1989). اساس این روش ، حرکت DNA از میان ژل اکریل آمید غیردناتوره است که براساس شکل فضایی که عامل تعیین کننده در حرکت تک رشته‌ها بر روی ژل می‌باشد، انجام می‌گیرد. بنابراین وجود حتی یک جهش نقطه‌ای در سرتاسر قطعه تکثیری، سبب تفاوت حرکت روی ژل شده و قابل مشاهده است (Bonifácio et al., 2001). نتایج حاصل از SSCP و رنگ آمیزی ژل پلی اکریل آمید نشان داد که تنها یک الگوی باندی وجود دارد و در این جایگاه مونومورف هستند (شکل۲).



شکل۲: الگوی ژنوتیپی اگزون ۳ ژن میوستاتین در گوسفند نژاد کردی

مطالعه انجام گرفته در نژاد قره گل در جایگاه ژن میواستاتین هیچ جهشی در اگزون ۳ ژن نشان نداد (Wheeler et al., 2001). نتیجه بررسی چندشکلی جایگاه ژن میواستاتین در نژادهای ماکویی و زل فاقد تنوع گزارش گردید (Moradi, 2009) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.) بررسی چندشکلی جایگاه میوستاتین در نژاد گوسفند تکسل، آلل جهش‌یافته و مطلوب این ژن دارای فراوانی بالایی است و تقریباً به شکل ثابت درآمده است (Hadjipavlou et al., 2008). مطالعه ای با عنوان شناسایی چندشکلی ژن میوستاتین و آنالیز ارتباط آن با صفات رشد در بز بوئر انجام شد و نتایج نشان داد که دو چند شکلی در اگزون یک و سه ژن میوستاتین وجود دارد (Wang et al., 2011) . بزهای دارای ژنوتیپ هتروزیگوت دارای عملکرد رشد بالاتر و وزن تولد بالاتری بودند (Zhang et al., 2012) مشاهده چندشکلی ژن میوستاتین بیان کننده تأثیر این ژن بر روی صفات رشد و وزن بدن بود و به دلیل وجود ارتباط معنی دار بین چندشکلی مشاهده شده و صفات رشد میتوان از این ژن به عنوان یک نشانگر مولکولی در بررسی ها و مطالعات اصلاح نژادی در آینده استفاده کرد (Sanjari et al., 2018). ارتباط پلی مورفیسم ژن میوستاتین با صفات رشد در گوسفند نژاد بلوچی با روش PCR-SSCP ، سه الگوی P2، P1و P۳ برای اینترون یک ژن میوستاتین را نشان داد که ژنوتیپ الگوی P۱ دارای وزن بدن سنگین‌تر و ارزش اصلاحی بیشتر برای صفت وزن از شیرگیری بود، لذا اینترون یک ژن میوستاتین میتواند به عنوان یکنشانگر ژنتیکی برای اصلاح نژاد در گوسفند بلوچی استفاده شود(Ansary et al., 2011).

هر چند مطالعه جایگاه‌های ژنی می‌تواند دقت انتخاب و سرعت پیشرفت ژنتیکی را افزایش دهند، اما نتایج مطالعه روی اگزون ۳ جایگاه میوستاتین در نژاد کردی چندشکلی نشان نداد و نشانگر مناسب در مطالعات پیوستگی ژنتیکی و انتخاب به واسطه اطلاعات نشانگر محسوب نمی‌گردد و می‌بایست در مطالعات آینده مکان‌های دیگری از جایگاه میوستاتین یا سایر ژن‌ها بررسی گردند.

سپاسگزاری

از مسئولین و پرسنل محترم ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند کردی خراسان شمالی واقع در شهرستان شیروان به خصوص آقای مهندس حمید کاظمیان مدیر ایستگاه به دلیل همکاری در جمع‌آوری نمونه‌ها صمیمانه قدردانی می‌نمایم.

منابع

سنجری، ا.، ضیاالدینی، م.، اسدی فوزی، م. و اسمعیلی‌زاده کشکوئیه، ع. ۱۳۹۷. چندشکلی ژن میوستاتین و ارتباط آن با صفات رشد در بزهای کرکی رایینی. تولیدات دامی (۳) ۲۰: ۳۷۳- ۳۶۵.

صوفی، ب.، شجاعیان، ک.، محمدآبادی، م ر.، باغی‌زاده، ا. و فراستی، س (۱۳۸۸). چند شکلی ژن میوستاتین در گوسفند نژاد سنجابی با استفاده از نشانگر RFLP-PCR. مجله پژوهش‌های علوم دامی. (۱)۹ :۸۱ -۸۹..

Ansary, M., Tahmoorespur, M., Nassiry, M. R., Taheri, A. and vafayevaleh, M., ۲۰۱۱. Polymorphism in Intron-۱ of myostatin gene and its association with estimated breeding values of growth traits in Baluchi sheep (Ovis aries). Indian Journal of Animal Science. ۸۱(۸): ۷۵-۰۰.

Arthur, PF., Makarechian, M. and Price, MA (۱۹۸۸) Incidence of dystocia and prenatal calf mortality resulting from reciprocal crossing of double-muscled and normal cattle. Canadian Veterinary Journal. ۲۹: ۱۶۳-۱۶۷.

Bonifácio, C., Santos, I., Belo, C and Cravador, A (۲۰۰۱) Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) analysis of alfas۱-casein, beta-casein and k-casein genes in Charnequeira Portuguese indigenous goat breed. ۳۴: ۳۴۵-۳۵.

Hadjipavlou, G., Matika, O., Clop, A. and Bishop, SC. (۲۰۰۸). Two single nucleotide polymorphisms in the myostatin (GDF۸) gene have significant association with muscle depth of commercial Charollais sheep. Animal Genetics. ۳۹(۴): ۳۴۶-۳۵۳.

Masumi, N., Akihiro, Y., Shinichirou, N., Tsutomu, N., Takashi, Y., Mitsuo, I., Keiji, M., Hideyo, O., Sumihare, N (۲۰۰۲) A missense mutant myostatin causes hyperplasia without hypertrophy in the mouse muscle. Biochemical and Biophysical Recearch Commonications ۲۹۳: ۲۴۷-۲۵۱.

Moradi-ShahrBaback, H. ۲۰۰۹. Association polymorphism of Calpastatin gene, Myostatin, Leptin and Potassium genes with economic important trait, Blood metabolite and carcass traits in Persian Makoui, Lori-Bakhtiari and Zel sheep breed. Thesis, Department of Animal Sciences, Faculty ofAgriculture, Tehran University. Tehran, Iran.

Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T and Hayashi, K (۱۹۸۹) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics. ۵: ۸۷۴.

Smet, SD., Webb, EC., Claeys, E., Uytterhaegen, L. and Demeyer, DI. ۲۰۰۰. Effect of dietary energy and protein levels on fatty acid composition of intramuscular fat in double- muscled Belgian Blue bulls. Meat Science ۵۶: ۷۳-۷۹.

Tay, G.K., Iaschi, S.P.A., Bellinge, R.H.S., Chong and, F.N., Hui., J. ۲۰۰۴. The development of sequence-based-typing of myostatin (GDF-۸) to identify the double muscling phenotype in the goat. Small Rum. Res., ۵۲: ۱-۱۲

Timoty, P.L., Lopez-Corrales, N. L., Kappes, S. M. and. Sonstegard, T. S. ۱۹۹۷. Myostatin Maps to The interval containing the bovine Mh Locus. Mammalian Genome. ۸:۷۴۲-۷۴۴.

Veerkamp, RF., Beerda, B (۲۰۰۷) Genetics and genomics to improve fertility in high producing dairy cows. Theriogenology ۶۸: ۲۶۶-۲۷۳.

Wang JG, An XP, Hou JX, Zhao HB, BaiL L, Wang LX, Liu XQ, Xiao WP, Song YX and Cao BY(۲۰۱۱) Polymorphism identification in the goat mstn gene and association analysis with growth traits Czech. Journal of Animal Science ۵۶: ۵۲۹-۵۳۵

Weiner, G. ۲۰۰۹. The Myostatin gene. Mol. Genet. Vol. ۵: ۹۱-۹۴.

Wheeler, T.L., Shackelford, S. D., Casas, E., Cundiff, L. V. and Koohmavaie, M. ۲۰۰۱. The effects of piedomontese inheritance and myostatine genotype on the palatability oflongissimus thoracis, gluteus medius semimembranosus, and biceps femoris. Journal of animal science. ۷۹: ۳۰۹۶ – ۳۰۷۴.

Zhang, C., Liu, Y., Xu, D., Wen, Q., Li, X., Zhang, W,. and Yang, L. (۲۰۱۲). Polymorphisms of myostatin gene (MSTN) in four goat breeds and their effects on Boer goat growth performance. Molecular Biology Reports. ۳۹(۳): ۳۰۸۱-۳۰۸۷.

The Wonders of the Giant Viruses of the Mimiviridae Family: Their Introduction and Pathogenicity

Matia Sadat Borhani[1*]; Mohammad Javad Rahmati [2]

1- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavous University, Golestan, Iran
2- Bachelor of Science student (BSc) of Cellular and Molecular Biology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavous University, Golestan, Iran

*Corresponding Author: msadat.borhani7@gmail.com; borhani@gonbad.ac.ir

Abstract

The discovery of giant viruses with unique structural and genomic complexities led to a general revision of viruses by researchers. The purpose of this review article is to provide a brief overview of the studies that have been done so far on the amazing world of giant viruses, especially the Mimiviridae family. Acanthamoeba polyphaga mimivirus (APMV) or mimivirus, was observed in 1992 at Bradford Hospital in the United Kingdom and firstly was considered as a bacterium. The huge virions of mimivirus (400-800 nm) can be seen under a light microscope. The 1.2-megabase genome of the mimivirus is DNA, surrounded by a membrane and then by an icosahedral capsid. The proteinous fibrils attached to the capsid are as long as 120 nm, and may be involved in the uptake of the virus into the host cell. The virus replication cycle occurs in the cytoplasm but is probably not completely independent of the nucleus. The mimivirus genome encodes genes, some of which have not been previously reported in databases. Notable genes for this virus include aminoacyl tRNA synthetases, initiation translation factors such as IF-4E and IF-4A, peptide strand release factor (eRF1), topoisomerases, tRNA genes, and chaperones. The presence of many genes in the genome of the mime virus (about 1000 proteins) shook the basis of the theory of the origin of viruses from cells. There are also reports of the possible involvement of mimiviruses in respiratory diseases such as pneumonia, and Keratitis in humans. Further studies on giant viruses, in addition to having great potential for new achievements in the future, can help raise awareness of the evolution, tree of life, the definition of life, and viability of viruses.

Keywords: *Acanthomba*, Girus, Pneumonia, Mimivirus

شگفتی های ویروس‌های غول پیکر خانواده میمی ویریده: معرفی و بیماری زائی آنها

ماتیا سادات برهانی[۱]*؛ محمد جواد رحمتی[۲]

۱- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبدکاووس، گلستان، ایران
۲- دانشجوی کارشناسی زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبدکاووس، گلستان، ایران

*مکاتبه: msadat.borhani7@gmail.com; borhani@gonbad.ac.ir

چکیده

کشف ویروس های غول پیکر با پیچیدگی های ساختاری و ژنومی منحصر به فرد، منجر به تجدید نظر کلی محققان در مورد ویروس ها شد. هدف این مقاله مروری، شرح مختصری از مطالعاتی است که تاکنون در مورد دنیای شگفت انگیز ویروس های غول پیکر مخصوصا خانواده میمی ویریده انجام شده است. آکانتومبا پلی فاگا میمی ویروس یا میمی ویروس اولین بار در سال ۱۹۹۲ در بیمارستان برادفورد انگلستان مشاهده و به عنوان یک باکتری در نظر گرفته شد. ویریون های۸۰۰-۴۰۰ نانومتری میمی ویروس توسط میکروسکوپ نوری قابل مشاهده است. ژنوم ۱/۲ مگابازی میمی ویروس از نوع DNA بوده، توسط غشا و سپس توسط کپسید بیست وجهی احاطه می شود. به کپسید، فیبریل های پروتئینی به طول ۱۲۰ نانومتر متصل است که احتمالا در جذب ویروس به سلول میزبان نقش دارند. چرخه تکثیر ویروس در سیتوپلاسم رخ می دهد اما احتمالا کاملا مستقل از هسته نمی باشد. ژنوم میمی ویروس کد کننده ژن های است که برخی از آن ها قبلا در پایگاه های داده گزارش نشده اند. از ژن های قابل توجه این ویروس می توان به آمینوآسیل tRNA سنتتازها، فاکتورهای ترجمه مانند IF-4E و IF-4A، فاکتور آزادسازی رشته پپتیدی (eRF1)، توپوایزومرآزها، ژن های tRNA و چاپرون ها اشاره داشت. دارا بودن ژن های بسیار در ژنوم میمی ویروس (حدود ۱۰۰۰ پروتئین)، پایه نظریه منشا ویروس ها از سلول ها را متزلزل کرد. همچنین گزارشاتی از احتمال دخیل بودن میمی ویروس ها در بیماری های تنفسی مانند پنمونی و التهاب قرنیه چشم در انسان ها نیز موجود است. مطالعات بیشتر در مورد ویروس های غول پیکر علاوه بر این که پتانسیل بالایی برای دست یابی به دستاورد های نوین در آینده ای نه چندان دور دارد، می تواند در کسب آگاهی نسبت به مسئله تکامل، درخت زندگی، تعریف حیات و زنده بودن ویروس ها کمک کننده باشد.

واژگان کلیدی: *آکانتومبا*، جیروس، پنمونی ، میمی ویروس

۱.مقدمه

ژنوم اغلب ویروس های شناخته شده، پروتئین های محدودی را کد می کنند و تا همین اواخر، ویروس ها به طور کلی به عنوان محصولات جانبی سیستم های سلولی در نظر گرفته می شدند که ارتباط کمی با تکامل حیات برای آنها در نظر گرفته می شد (Mutsafi et al., 2014). تا این که، در سال ۲۰۰۳ ویروس غول پیکری[۲۴۸] به بزرگی ۸۰۰-۴۰۰ نانومتر (قابل مقایسه با مایکوپلاسما)

[248] Giant virus

شناخته شد که دارای ژنومی به بزرگی ۱/۲ مگاباز بوده و حدود ۱۰۰۰ پروتئین مختلف را کد می کرد. محققان دریافتند که برخی از ژن‌های این ویروس هرگز قبلا در ویروس‌ها گزارش نشده است. این ویروس که آکانتومبا پلی‌فاگا میمی‌ویروس[۲۴۹] شناخته می‌شود، مرزهای تعیین شده بین ویروس‌ها و سلول ها را محو کرد و دانشمندان را به تجدید نظر در تعریف ویروس ها و به جستجوی عمیق تر جهان برای یافتن ویروس‌های غول پیکر جدید واداشت (Mutsafi et al., 2014; Colson et al., 2013). این جستجو منجر به کشف ویروس های غول پیکر دیگری مانند مگاویروس[۲۵۰] (۲۰۱۱)، پاندوراویروس[۲۵۱] (۲۰۱۳)، پیتوویروس[۲۵۲] (۲۰۱۴)، توپان ویروس[۲۵۳] (۲۰۱۸) و ... شد. لازم به ذکر است ویروس های غول پیکر که جیروس[۲۵۴] نیز نامیده می شود همگی به شاخه نوکلئوسیتوویریکوتا[۲۵۵]تعلق دارند. شاخه نوکلئوسیتوویریکوتا که به DNA ویروس های بزرگ نوکلئوسیتوپلاسمی (NCLDV[۲۵۶]) نیز معروف است به دلیل این که اعضای آن می توانند هم در هسته و هم در سیتوپلاسم تکثیر کنند، به این نام خوانده شد (Abrahão et al., 2014). در واقع قبل از کشف میمی ویروس، ویروس های خانواده های پاکس ویریده[۲۵۷]، اسفارویریده[۲۵۸]، فیکودناویریده[۲۵۹]، آسکوویریده[۲۶۰] و ایریدوویریده[۲۶۱] به دلیل خصوصیاتی چون دارا بودن DNA بزرگ ژنومی، استقلال نسبی نسبت به میزبان در رونویسی و شباهت چرخه تکثیر که حداقل بخشی از آن در سیتوپلاسم و با تشکیل انکلوزیون بادی ها (گنجیدگی های داخل سلولی) یا کارخانه های ویروسی رخ می دهد، تحت نام کلی NCLDV مطالعه می شدند. از آن جائی که میمی ویروس خصوصیات مشابهی را نشان می داد در شاخه NCLDV قرار گرفت (Legendre et al., 2014).

با شناخته شدن روز افزون ویروس های غول پیکر که فراوانی و تنوع این ویروس ها را برجسته می کند، موضوعاتی که برای مدت طولانی به عنوان غیرقابل حل شناخته می شدند، شامل منشاء ویروس ها، موقعیت آنها در درخت زندگی، مشارکت بالقوه ویروس ها در ایجاد سه سلسله حیات (یعنی باکتری ها، آرکی ها و یوکاریوتها) و نقش احتمالی آنها در تولید هسته های یوکاریوتی دوباره نظر دانشمندان را به خود جلب کرد. از دیگر چالش های مهم دانشمندان تعریف دقیقی از ویروس های غول پیکر است. اگرچه می توان از آستانه های دلخواه برای ترسیم مرز بین ویروس های غول پیکر و سایر ویروس ها استفاده کرد، اما مشخص است که غول پیکر بودن یک ویروس تابع سه مولفه اندازه کپسید، مقدار ژنوم و میزان پروتئین های پیش بینی شده ویروس است. به عنوان مثال، طول ذره ویروسی ابولا ۹۷۰نانومتر و قطر آن ۸۰ نانومتر است، اما به دلیل میزان بسیار کم ماده ژنتیکی آن (۱۹-۱۸ کیلوباز) از ویروس های غول پیکر به شمار نمی آید. همچنین، هرچند برخی محققان مارسِلی ویروس[۲۶۲] را جز ویروس های غول پیکر محسوب می کنند اما به دلیل اندازه ی کوچک ویریون (ویریون ۲۵۰ نانومتری، ژنوم ۳۶۸ کیلوباز) نسبت به سایر ویروس های غول پیکر، برخی دیگر از محققان آن را جزء ویروس های غول پیکر در نظر گرفته نمی گیرند (Brandes and Linial, 2019). در مورد منشا ویروس

[249] *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus (APMV)
[250] Megavirus
[251] Pandoravirus
[252] Pithovirus
[253] Tupanvirus
[254] Girus
[255] Nucleocytoviricota
[256] Nucleocytoplasmic large DNA viruses (NCLDV)
[257] Poxviridae
[258] Asfarviridae
[259] Phycodnaviridae
[260] Ascoviridae
[261] Iridoviridae
[262] Marseillevirus

های غول پیکر نیز بحث های بسیاری وجود دارد. دانشمندان هنوز نمی دانند که آیا ویروس های غول پیکر با به دست آوردن ژن های میزبان خود گسترش یافتند و یا با ازدست دادن برخی از ژن های خود تنزل پیدا کردند (Mutsafi et al., 2014). از طرفی، دارا بودن ژن های بسیار در ویروس های غول پیکر که حتی برخی از آن ها مربوط به متابولیسم بوده و برخی نیز فاقد همولوگ در بقیه ویروس ها می باشند، پایه نظریه منشا ویروس ها از سلول ها را متزلزل کرد. از آنجایی که بعضی از این ژن ها هیچ پروتئینی را کد نمی کنند و بعضی دیگر پروتئین هایی را کد می کنند که در چرخه تکثیر ویروس کاربردی است، ممکن است این ژن ها جز اولین ژن هایی باشند که در تاریخ تکامل بوجود آمده اند (Siew and Fischer, 2003; Moniruzzaman al., 2020). بنابراین، این احتمال وجود دارد که ویروس ها قبل از بوجود آمدن سلول ها شکل گرفته باشند، یا از قطعه ای ژنتیکی (مثلا پلاسمید) که از یک سلول خارج شده و در پی آن توانایی تکثیر در سلول های دیگر را پیدا کرده است نشأت گرفته باشند (Abrahão et al., 2014). با این مقدمه در مورد تعریف ویروس های غول پیکر و منشا احتمالی آن ها، در ادامه به معرفی برخی از مهم ترین ویروس های غول پیکر یعنی میمی ویروس ها پرداخته می شود و خصوصیات این ویروس ها ازقبیل مورفولوژی، ژنوم، سلول های میزبان و چرخه تکثیر آن ها بیان خواهد شد. سپس بیماری‌زایی آن ها نیز مورد بررسی قرار می گیرد.

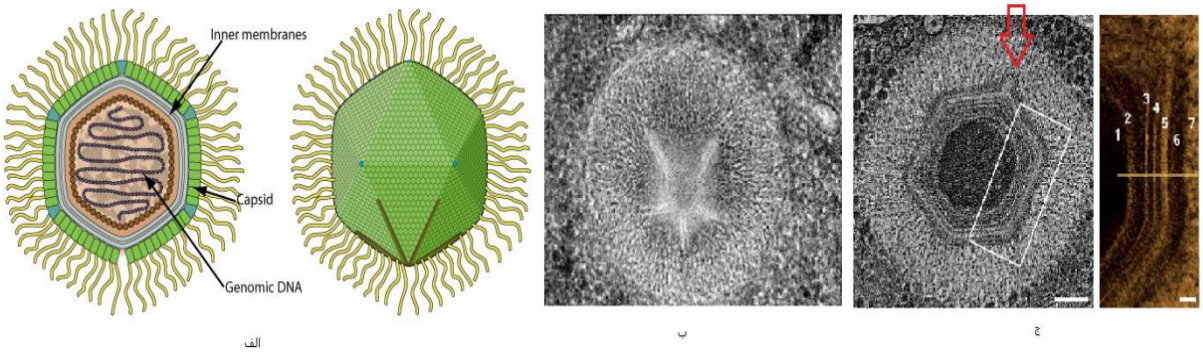
۱-۱- مورفولوژی و ژنوم میمی‌ویروس ها

میمی ویروس، ابتدا در نمونه آب جمع آوری شده از یک برج خنک کننده طی یک شیوع پنمونی در بیمارستان برادفورد انگلستان در سال ۱۹۹۲ دیده شد و تصور می شد که نوعی باکتری گرم مثبت باشد و با نام *بردفوردکوکوس*[۲۶۳] به ثبت رسید. تلاش ها برای جداسازی میکروارگانیسم، تعیین توالی با 16srDNA و مهار رشد با آنتی بیوتیک ها، ماهیت باکتریایی بودن آن را زیرسوال برد و سرانجام پس از توالی یابی آن در سال ۲۰۰۳، مشاهده آن زیر میکروسکوپ الکترونی که ذراتی شبه بیست وجهی را نشان داد، بررسی چرخه تکثیر آن در آمیب و عدم مشاهده آن بعد ورود در میزبان[۲۶۴] که در ویروس ها معمول است، به عنوان یک ویروس در نظر گرفته شد. میمی ویروس اولین عضو خانواده میمی ویریده[۲۶۵] است. نام این ویروس از مخفف عبارت mimicking microbe یعنی تقلید کننده میکروب گرفته شده است (Colson et al., 2013). میزبان این ویروس آمیبی به نام *آکانتومبا پلی‌فاگا* می باشد و به همین دلیل *آکانتومبا پلی‌فاگا* میمی ویروس یا به اختصار میمی ویروس نامیده می شود.

میمی ویروس دارای خصوصیات جالب توجهی است. برای مثال، اندازه این ویروس که بین ۴۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر گزارش شده (بسته به طول فیبریل های پروتئینی) علاوه بر این که امکان مشاهده ویروس را با میکروسکوپ نوری فراهم می کند، منجر به عدم عبور ویروس از فیلترهای ۰/۲۲ میکرونی باکتریایی می شود. از نظر ساختاری، ویریون میمی ویروس از یک بخش مرکزی حاوی ژنوم (۱/۲ مگاباز) که ابتدا توسط غشا و سپس توسط کپسید بیست وجهی احاطه می شود، تشکیل شده است. بنابراین میمی ویروس انولپ خارجی ندارد و غشای داخلی آن نیز احتمالا از شبکه اندوپلاسمی کسب شده است (شکل ۱- الف). کپسید بیست وجهی میمی ویروس به قطر ۵۰۰ نانومتر بوده و با فیبریل‌هایی پروتئینی به طول متوسط ۱۲۰ نانومتر تزئین شده است (شکل ۱- الف و ب). این فیبریل ها احتمالا در جذب ویروسی نقش دارند (Okamoto et al., 2017). همانطور که در شکل ۱-ج مشاهده می شود، در یکی از گوشه های این کپسید، دریچه ای برای خروج مواد داخل کپسید ویروس وجود دارد که دریچه ستاره ای شکل[۲۶۶] گفته می شود. آزاد شدن ژنوم از دریچه ستاره ای شکل، مشابه آن چیزی است که در برخی از باکتریوفاژها دیده می شود (Jeudy et al., 2020).

[263] Bradfordcoccus
[264] Eclipse Phase
[265] Mimiviridae
[266] Stargate

ازآن جائی که ویروس ها معمولا دارای ژن های سنتز کپسید، پپلومرهای اتصال به سلول میزبان و برخی از ژن های مورد نیاز تکثیر خود هستند و از امکانات سلول میزبان برای تکمیل فرآیند سنتز مواد مورد نیاز خود استفاده می کنند، انتظار نمی رود که بیش از ۲۰۰ ژن در ژنوم خود کد کنند (Love, 2018). با این وجود، یکی از خصوصیات منحصر به فرد میمی ویروس این است که ژنوم آن (۱/۲ مگاباز) می تواند حدود ۱۰۰۰ پروتئین مختلف را کد کند. جالب است که برخی از ژن های میمی ویروس کدکننده بعضی از آنزیم هایی است که قادر به سنتز مجموعه های پلی ساکاریدی موجود در لیپوپلی ساکارید و یا پپتیدوگلیکان باکتریایی می باشند. این پلی ساکاریدها، لایه خارجی ذره ویروسی را شکل می دهند که فیبرها در آن ها قرار دارند و ممکن است که به عنوان محرک های فاگوسیتوز عمل کنند. این خصوصیت (ماتریکس پپتیدوگلیکانی که در آن فیبرهای خارجی قرار گرفته اند) مشابه آن چیزی است که در باکتری ها مشاهده می شود.



الف ب ج

شکل ۱: مورفولوژی میمی ویروس. الف) تصویر شماتیک از میمی ویروس که ژنوم DNA، کپسید بیست وجهی و غشای داخلی آن را نشان می دهد. ب) تصویری از میمی ویروس که توسط میکروسکوپ الکترونی گرفته شده است که ساختاری ستاره ای شکل از آن به نمایش می گذارد. ج) نمای داخلی ویروس و لایه های آن که به ترتیب عبارتند از ۱: ژنوم؛ ۲: دیواره بخش مرکزی؛ ۳: غشای داخلی؛ ۴: غشای اضافی دیگر؛ ۵: پوسته کپسیدی داخلی ؛ ۶: پوسته کپسیدی خارجی؛ ۷: فیبریل ها (Mustafi et al., 2014).

به علاوه، برخی از ژن های میمی ویروس قبلا در یوکاریوت ها گزارش شده است. این ژن ها اغلب در ترجمه، ترمیم DNA، حرکت سلولی و بیوژنز غشا نقش دارند. حضور پروتئین های دخیل در ترجمه مانند آمینوآسیل tRNA سنتتازها و فاکتورهای ترجمه مانند فاکتورهای آغازین ترجمه IF-4E (که به کلاهک mRNA متصل می شود) و IF-4A (هلیکاز)، فاکتور آزادسازی رشته پپتیدی (eRF1) نشان می دهد که این ویروس می تواند تا حدی در ترجمه پروتئین از میزبان خود مستقل باشد. این موضوع در تضاد با فرضیات قبلی در مورد ویروس ها است که بیان می کرد ویروس ها برای ترجمه پروتئین های خود کاملا به سلول میزبان وابسته هستند. دیگر ژن های قابل توجه میمی ویروس شامل توپوایزومرآزها، ژن های tRNA و چاپرون ها می باشند (Raoult et al., 2004; Sun et al., 2020).

۱-۲- تاکسونومی میمی‌ویروس ها

از نظر تاکسونومی خانواده میمی ویریده احتمالا به سه زیرخانواده و یک زیرخانواده نیز به ۳ گروه تقسیم بندی می شود (جدول ۱). لازم به ذکر است که در طبقه بندی این ویروس ها هنوز بحث های زیادی وجود دارد و می تواند در آینده تغییرات زیادی داشته باشد.

جدول ۱: طبقه بندی تاکسونومیک خانواده میمی ویریده (Schulz et al., 2017; Claverie and Abergel, 2018).

زیرخانواده	گروه	مثال
مگامیمی ویرینه یا مگاویرینه	A یا گروه میمی ویروس	آکانتومباپلی‌فاگا میمی‌ویروس، ماماویروس[۲۶۷]، لنتیله ویروس[۲۶۸]، هیرودو ویروس[۲۶۹]، کِرون ویروس[۲۷۰]، سامباویروس[۲۷۱] و ....
	B یا گروه مومومویروس	مومومویروس، سعودی مومومویروس[۲۷۲] و...
	C یا گروه کوردو ۱۱ ویروس	کوردو ویروس ۷، کوردوویروس ۱۱، مگاویروس شیلینسیس[۲۷۳]، LBA111
کافه‌تریا ویرینه	-	کافه‌تریا ویروس[۲۷۴]
کلوزنئوویروینه	-	کلوزنئوویروس[۲۷۵]، هوکوویروس[۲۷۶]، کاتوویروس[۲۷۷]، ایندی ویروس[۲۷۸]
طبقه بندی نشده	-	توپان ویروس[۲۷۹]

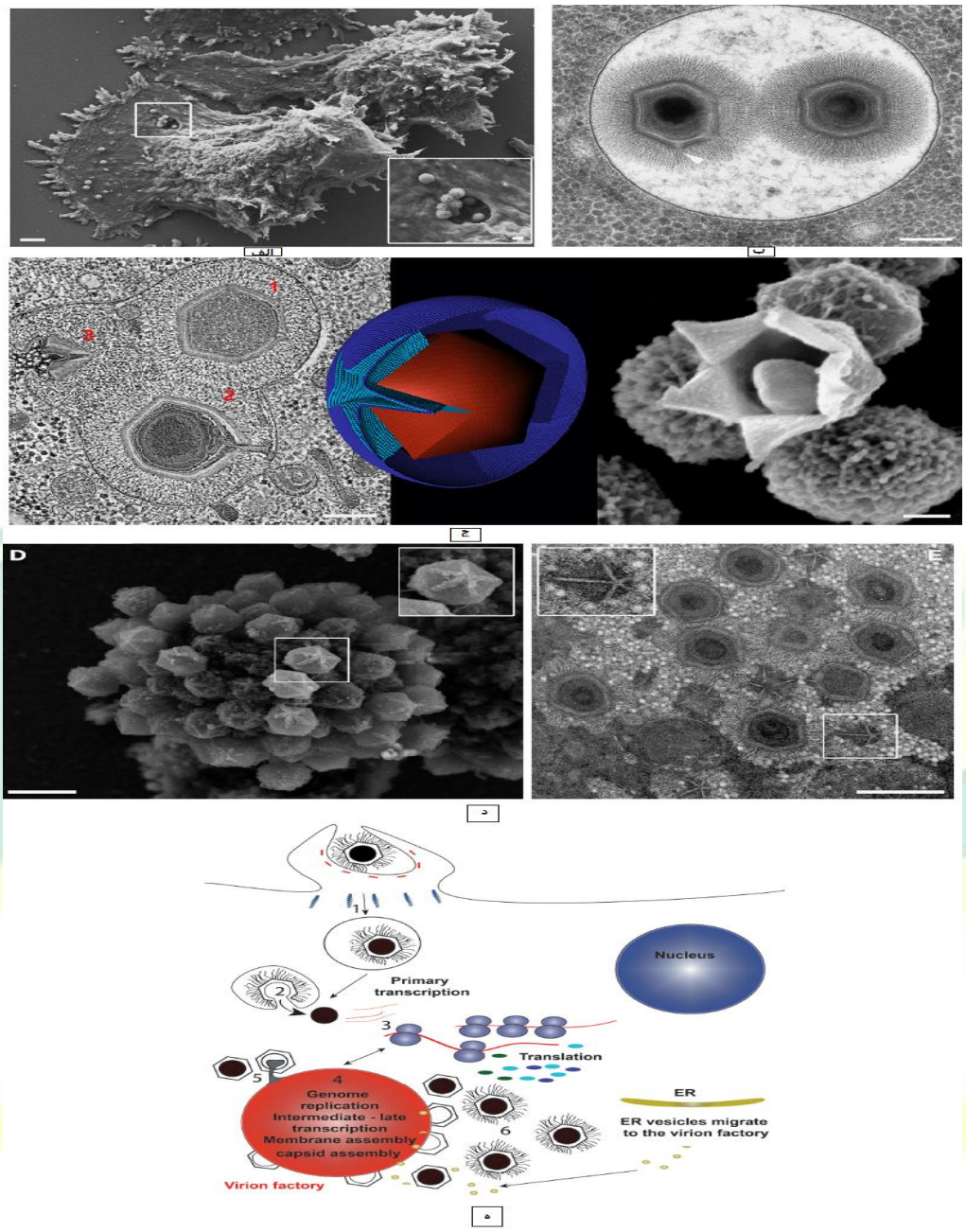
۱-۳- چرخه تکثیر میمی‌ویروس ها

چرخه تکثیر این ویروس با ورود آن به سلول میزبان به صورت فاگوزوم آغاز می شود (شکل ۲- الف). حضور همزمان دو یا چند ویروس در یک فاگوزوم نیز دیده شده است (شکل ۲- ب). سپس دریچه ستاره ای شکل ویروس باز شده و غشای فاگوزوم با غشای داخلی ویروس ادغام می شود و در پی آن راهی را برای خروج بخش مرکزی ویروس که حاوی ژنوم است به سیتوپلاسم ایجاد می کند (شکل ۲-ج). هنوز مکانیسم این عمل مشخص نیست، اما به نظر می آید که لیزوزوم هایی که در تشکیل فاگولیزوزوم نقش دارند، باعث شروع این فرایند می شوند. ایجاد کارخانه ویروسی در میمی ویروس برخلاف پاندوراویروس مستقل از هسته است اما کاملا مستقل از هسته نیست زیرا فاکتورهای هسته ای مورد نیاز تکثیر ژنوم ویروس، ممکن است در این فرآیند نقش داشته باشند. مراکز اولیه تکثیر DNA به هم می پیوندند و به این ترتیب کارخانه های ویروسی شکل می گیرند (شکل ۲-د). همانند ویروس واکسینیا یکی از مراحل تکثیر میمی ویروس، بلعیده شدن مراکز تولید ویروس توسط غشای شبکه اندوپلاسمی است. البته نقش این بلعیده شدن در چرخه تکثیر ویروس به مطالعات بیشتری نیاز دارد. بعد از شروع تکثیر و رونویسی از ژنوم، فرایند ترجمه mRNA های تولیدی به سرعت اتفاق می افتد و DNA آماده می شود تا در کپسیدهای خالی (پروکپسید) قرار گیرد. همچنین زمانی که کارخانه ویروسی در حال تشکیل شدن است، شبکه اندوپلاسمی تغییر زیادی می کند و به مسئول تحویل پروتئین ها و ریبوزوم ها به کارخانه ی ویروسی در قالب ساختار های وزیکولی تبدیل می شود؛ وزیکول ها با ورود به کارخانه ی ویروسی باز شده و پس از

[267] Mamavirus
[268] Lentille virus
[269] Hirudovirus
[270] Kroon virus
[271] Samba virus
[272] Saudi moumouvirus
[273] Megavirus chiliensis
[274] Cafeteriavirus
[275] Klosneuvirus
[276] Hokovirus
[277] Catovirus
[278] Indivirus
[279] Tupanvirus

تحویل مواد داخل خود آماده برای تبدیل شدن به غشای ویروس می شوند. جالب اینجاست که میتوکندری ها به راحتی به خدمت کارخانه های ویروسی در می آیند که نشان می دهد تولید ویروس نیازمند انرژی فراوان است. کارخانه ویروسی به تولید ویروس ادامه می دهد تا زمانی که با لیز شدن سلول آمیب حدود هزار ویروس جدید آزاد شوند. کل چرخه ی ویروسی ۱۰ الی ۱۲ ساعت به طول می انجامد (Mustafi et al., 2014). لازم به ذکر است کارخانه های ویروسی که در آن ها میمی ویروس های جدید تولید می شوند نسبت به دیگر ویروس ها بزرگتر و پیچیده تر هستند. در واقع، کارخانه های ویروسی میمی ویروس، می توانند حجم زیادی از سلول را اشغال کنند. مشاهده این موضوع، بحثی را که باندیا (Bandea) در سال ۱۹۸۳ مطرح کرده بود مبنی بر این که کارخانه های ویروسی به خودی خود ارگانیسم ویروسی محسوب می شوند را برانگیخت. می توان گفت کارخانه های تولید ویریون مشابه آن چیزی است که در برخی از باکتری های داخل سلولی مانند ریکتزیا بوچنرا[۲۸۰] دیده می شود. با وجود این که این باکتری به متابولیسم سلول میزبان وابسته است در زنده بودن آن تردیدی نیست. این در حالی است که زنده بودن ویروس ها همواره مورد تردید محققان قرار گرفته است (Love, 2018).

[280] Rickettsia buchnera



شکل ۲: چرخه تکثیر میمی ویروس. الف) ورود ذرات میمی ویروس با فاگوسیتوز به درون سلول آمیب. ب) قرار گرفتن دو میمی ویروس در یک فاگوزوم. ج) باز شدن دریچه ستاره ای شکل و ورود ژنوم ویروس به درون سیتوپلاسم. د) تشکیل کارخانه های ویروسی درون سیتوپلاسم. ه) نمای شماتیک و کلی از چرخه تکثیر میمی ویروس

۱-۴- بیماری زایی میمی ویروس ها در انسان

آمیب های جنس *آکانتومبا* از میزبان های اصلی ویروس های غول پیکر محسوب شده و به فراوانی در سرتاسرکره زمین و در محیط‌های مختلف از جمله آب و خاک یافت می‌شوند. برای مثال در مطالعه ای در سال ۲۰۰۹ با بررسی ۲۲ نمونه از آب‌های سطحی میادین سطح شهر تهران با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) مشخص شد آلودگی آب‌های تهران به *آکانتامبا* شیوع بالایی دارد (Eftekhar et al., 2009). دلیل توزیع فراوان *آکانتاموبا* درمحیط به دلیل تشکیل کیست های مقاوم آن است که می‌توانند شرایط نامطلوب محیطی از نظر اسمولاریته، دما، شوری و pH را تحمل کنند. این آمیب به راحتی قادر است در آب مقطر، کشت بافت و مایعات بدن پستانداران زنده بماند و در سطوح مخاطی بدن انسان بعد از تروما (ضربه) و تماس با آب آلوده یا استفاده از لنزهای تماسی تلقیح گردد. *آکانتامبا* می‌تواند عامل عفونت های مختلفی در انسان گردد ازجمله می توان به عفونت مزمن سیستم اعصاب مرکزی به‌نام انسفالیت آمیبی گرانولوماتوز[۲۸۱] و نوعی عفونت خطرناک قرنیه چشم به‌نام کراتیت آکانتاموبایی[۲۸۲] اشاره کرد. همچنین می تواند عامل گرانولومای مزمن پوست و استئومیلیت (التهاب استخوان) باشد (Nayeri Chegen et al., 2018). به علاوه، آمیب های *آکانتومبا* که آمیب های فاگوسیتیک می باشند، می توانند بستری برای رشد پاتوژن های باکتریایی انسان مانند *لژیونلا پنموفیلا*[۲۸۳] را فراهم کنند. برای مثال، در مطالعه حسینی دوست و محبتی مبارز (۱۳۷۹) مشخص شد، *لژیونلا*های موجود در نمونه های آب که به علت کم بودن تعداد یا علل دیگر قادر به رشد روی محیط کشت نیستند، با اضافه شدن *آکانتامبا* به سرعت این آمیب را آلوده و در آن تکثیر می کنند و به راحتی قابل تشخیص می گردند (حسینی دوست و محبتی مبارز،۱۳۷۹). علاوه بر بیماری زا بودن آمیب *آکانتومبا* برای انسان، ویروس های غول پیکری که این آمیب را آلوده می کنند نیز می توانند برای انسان بیماری زا باشند. همانطور که ذکر شد میمی ویروس در جریان شیوع پنمونی در بیمارستانی در برادفورد انگلستان در سال ۱۹۹۲ کشف شد. همچنین، در سال ۲۰۰۶، یک تکنسین آزمایشگاه مبتلا به یک عفونت تنفسی با علت ناشناخته شد. تصاویر اشعه ایکس از قفسه سینه این فرد تأیید کرد که بیماری او پنمونی ویروسی است. همچنین تجویز یک هفته ای آموکسی سیلین-کلاوولانیک اسید منجر به بهبود علائم بیمار نگشت. مطالعات سرولوژی از نمونه سرم این فرد نشان داد که در بدن این فرد، آنتی بادی های ضد میمی ویروس تولید شده است. با استفاده بررسی دو نمونه سرم جمع آوری شده قبل و بعد از ابتلا به پنمونی ، با استفاده از ژل الکتروفورز دوبعدی و وسترن بلات مشخص شد که سیستم ایمنی این فرد در کل علیه ۲۳ پروتئین میمی ویروس، از جمله ۴ پروتئین منحصر به فرد آن، آنتی بادی تولید کرده است. این یافته‌ها یک مدل تجربی واقعی از عفونت انسانی توسط میمی ویروس، با واکنش‌پذیری سرولوژیکی و بیماری خاص را نشان می دهد زیرا درمان آنتی بیوتیکی موثر نبود و هیچ عامل بالقوه دیگری نیز برای این بیماری شبیه به پنمونی یافت نشد (Raoult et al., 2006). در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۳ نمونه های تنفسی ۱۹۶ بیمار در کشور تونس بررسی شد. نتایج این تحقیق نشان داد که در یک مورد، عفونت مرتبط با *مگاویروس شیلینسیس* می باشد. این ویروس غول پیکر جدید LBA111 نام گرفت و از ترشحات تنفسی برونکوآلوئولار خانمی ۷۲ ساله مبتلا به پنمونی همراه با تب و سرفه جداسازی شد. تعیین توالی ژنوم ویروس نشان داد که این ویروس ژنومی در حدود ۱/۲۳ مگاباز دارد. همچنین بررسی نمونه سرم این فرد با وسترن بلات دوبعدی نشان داد که در بدن وی علیه ۹ پروتئین اختصاصی LBA111 آنتی بادی تولید شده است (Saadi et al., 2013). همچنین در سال ۲۰۱۱ بررسی قرنیه یک خانم ۱۷ ساله مبتلا به کراتیت هیچ عامل باکتریایی و همچنین آمیب *آکانتومبا* را نشان نداد. با این وجود، بررسی مایع نگه داری لنزهای تماسی وی مشخص کرد که در این نمونه *سودوموناس فلورسنس*[۲۸۴]،

[281] Granulomatous amoebic encephalitis
[282] Acanthamoeba keratitis
[283] *Legionella pneumophila*
[284] *Pseudomonas fluorescens*

استنوتروفوموناس مالتوفیلا[۲۸۵]، *مایکوباکتریوم چلونه*[۲۸۶] و *آکانتومبا پلی فاگا* حضور دارند. از آمیب موجود در نمونه، ویروس غول پیکری به نام لنتیله ویروس به همراه وایروفاژ آن به نام اسپوتینک ۲[۲۸۷] جداسازی شد (Cohen et al., 2011). با توجه به موارد گزارش شده بیماری های مرتبط با ویروس های غول پیکر به نظر می رسد شیوع این ویروس ها در نمونه های انسانی پائین باشد. در حالی که در مطالعه ای در سال ۲۰۱۳، پس از بررسی متاژنومی نمونه های تنفسی، مدفوع و خون انسان های مختلف، مشخص شد ژنوم میمی ویروس در تمامی نمونه های مورد بررسی موجود می باشد. فراوانی توزیع یک ویروس غول پیکر در بدن انسان ها برای محققان شگفت آور بود. دلیل این امر می تواند به این خاطر باشد که شیوع ویروس‌های غول پیکر احتمالاً در مطالعات متاژنومی دست‌کم گرفته می شده است، زیرا اکثر نمونه‌های تجزیه و تحلیل شده در دهه های گذشته، قبل از بررسی های متاژنومیک ویروسی از فیلترهایی با منافذ ۰/۲۲ و ۰/۴۵میکرومتر عبور داده شده اند که می تواند به طور قابل توجهی شناسایی ویروس های غول پیکر را که از فیلترهای باکتریایی عبور نمی کنند، مختل سازد. همچنین از علت های توزیع فراوان ویروس های غول پیکر در بدن انسان ها می توان به میزبان این ویروس اشاره داشت. همانطور که گفته شد کیست های *آکانتومبا* بسیار مقاوم اند و همه جا از جمله منابع آبی و خاکی مختلف یافت می شوند، بنابراین بعید نیست که در بدن انسان به راحتی یافت شوند و انگل های خود را هم به همراه بیاورند (Colson et al., 2013).

۲.بحث و نتیجه گیری

میمی ویروس ویژگی های بسیار جالبی را نشان می دهد که آن را در مرز بین موجودات زنده و غیر زنده قرار می دهد. این ویروس از نظر اندازه ویریون و اندازه ژنومی قابل مقایسه با برخی گونه های باکتریایی مانند Rickettsia conorii و Tropheryma whipplei می باشد. از دیگر خصوصیات جالب توجه میمی ویروس دارا بودن ژن های کد کننده محصولاتی است که قبلا تصور نمی شد توسط ویروس ها کدگذاری شوند. علاوه بر این، میمی ویروس دارای ژن‌هایی است که برای سنتز نوکلئوتید و اسید آمینه به کار می روند. این در حالی است که حتی برخی از باکتری‌های داخل سلولی اجباری فاقد این ژن ها هستند. با این حال، میمی ویروس فاقد هر گونه ژن برای پروتئین های ریبوزومی هستند و این موضوع میمی ویروس را برای ترجمه پروتئین و متابولیسم انرژی به سلول میزبان وابسته می کند. از آنجایی که جد میمی ویروس بسیار قدیمی است و می‌توانست قبل از موجودات سلولی پدید آمده باشد، این ویروس به بحث در مورد منشأ حیات افزوده است. برخی از ژن‌هایی که ویژگی‌های منحصر به فرد میمی ویروس را کد می‌کنند، از جمله ژن‌های کپسید، در انواع ویروس‌هایی که موجودات زنده مختلف را آلوده می‌کنند، حفظ شده‌اند. این موضوع نشان دهد که میمی ویروس یک نوع DNA ویروس است که قبل از موجودات سلولی ظاهر شده و نقش کلیدی در توسعه همه حیات روی زمین داشته است. فرضیه دیگر این است که سه نوع مجزا از DNA ویروس ها وجود داشته که هر کدام در تکامل سه دومین شناخته شده حیات یعنی یوکاریوت ها، آرکی ها و باکتری ها نقش داشته اند. پیشنهاد شده است که میمی ویروس و انواع مشابه آن بقایای "دومین چهارم" حیات هستند. با این وجود، میمی ویروس ویژگی های زیر همچون هموستاز، متابولیسم انرژی، پاسخ به محرک ها و رشد از طریق تقسیم سلولی (به جای تکثیر از طریق مونتاژ اجزای منفرد) که همه این ویژگی ها جزئی از تعاریف متعارف زندگی هستند، را نشان نمی دهد. در مجموع می توان گفت، با کشف ویروس های غول پیکر و بررسی آنها، شکاف بین ویروس ها و موجودات زنده کمتر و تعریف دانشمندان از ویروس ها دستخوش بازبینی شد و نشان داد که گیتی همچنان ناشناخته های فراوانی در انتظار برای

[285] *Stenotrophomonas maltophilia*
[286] *Mycobacterium chelonae*
[287] Sputnik 2

کشف دارد؛ کسی چه می داند، شاید در جایی در زمین ویروسی بزرگ تر از پیتوویروس و پیچیده تر از پاندوراویروس در حال آلوده کردن آمیب ها باشد. در هر صورت، مطالعه این ویروس ها پتانسیل بالایی برای دست یابی به دستاورد های نوین در آینده ای نه چندان دور دارد. از طرفی با بررسی بیشتر این ویروس ها می توان بیشتر نسبت به مسئله تکامل، درخت زندگی و تعریف حیات آگاهی پیدا کرد و در نهایت به پیشرفت علم زیست شناسی و شناخت بیشتر و بهتر نوع بشر نسبت به کارکرد جهان پیرامون خود کمک کرد.

سپاسگزاری

نویسندگان، از تمامی عزیزانی که در تهیه این مقاله کمک کردند، به خصوص خانم عاطفه پسرکلو کمال تشکر را دارند.

منابع

حسینی دوست س. ر.، محبتی مبارز ا. ۱۳۷۹. افزایش رشد *لژیونلا پنوموفیلا* در مجاورت کشت *آکانتامبا*. یاخته: ۵ (۲): ۱۷-۱۳.

Abrahão, J. S., Dornas, F. P., Silva, L. C., Almeida, G. M., Boratto, P. V., Colson, P., ... and Kroon, E. G. 2014. Acanthamoeba polyphaga mimivirus and other giant viruses: an open field to outstanding discoveries. Virology journal, 11(1): 1-12.

Brandes, N., and Linial, M. 2019. Giant Viruses—Big Surprises *(Viruses)*, 11(5).

Claverie, J. M., and Abergel, C. 2018. Mimiviridae: an expanding family of highly diverse large dsDNA viruses infecting a wide phylogenetic range of aquatic eukaryotes. Viruses, 10(9): 506.

Cohen G, Hoffart L, La Scola B, Raoult D, and Drancourt M. 2011. Ameba-associated Keratitis, France. Emerg Infect Dis, 17: 1306–1308.

Colson, P., La Scola, B., and Raoult, D. 2013. Giant Viruses of Amoebae as Potential Human Pathogens *(Intervirology)*, 56(6): 376-385

Eftekhar M, Nazemalhosseini Mojarad E, Haghighi A, Sharifi Sarasiabi K, Nochi Z, and Athari A. 2009. Detection of Acanthamoeba from fresh water using polymerase chain reaction. Research in Medicine, 33 (1):43-46.

Jeudy, S., Bertaux, L., Alempic, J.-M., Lartigue, A., Legendre, M., Belmudes, L., Santini, S., Philippe, N., Beucher, L., Biondi, E. G., Juul, S., Turner, D. J., Couté, Y., Claverie, J.-M., and Abergel, C. 2020. Exploration of the propagation of transpovirons within Mimiviridae reveals a unique example of commensalism in the viral world *(The ISME Journal)*, 14(3): 727-739.

Love, L. G. (2018). Does the discovery of the mimivirus call into question attempts to define life?. Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research, 11: 1-6.

Legendre, M., Bartoli, J., Shmakova, L., Jeudy, S., Labadie, K., Adrait, A., Lescot, M., Poirot, O., Bertaux, L., Bruley, C., Couté, Y., Rivkina, E., Abergel, C., and Claverie, J.-M. 2014. Thirty-thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology *(the National Academy of Sciences)*, 111(11): 4274.

Moniruzzaman, M., Martinez-Gutierrez, C. A., Weinheimer, A. R., and Aylward, F. O. 2020. Dynamic genome evolution and complex virocell metabolism of globally-distributed giant viruses *(Nature Communications)*, 11(1): 1710.

Mutsafi, Y., Fridmann-Sirkis, Y., Milrot, E., Hevroni, L. and Minsky, A. 2014. Infection cycles of large DNA viruses: Emerging themes and underlying questions *(Virology)*, 466-467: 3-14.

Nayeri Chegen T, Ghaffarifar F, Khoshzaban F, and Dalimi Asl A. 2018. Effect of Aqueous Extract of Peganum harmala on Acanthamoeba In Vitro. Qom Univ Med Sci J., 12 (6):20-28 .

Okamoto, K., Miyazaki, N., Song, C., Maia, F. R. N. C., Reddy, H. K. N., Abergel, C., Claverie, J.-M., Hajdu, J., Svenda, M., and Murata, K. 2017. Structural variability and complexity of the giant Pithovirus sibericum particle revealed by high-voltage electron cryo-tomography and energy-filtered electron cryo-microscopy *(Scientific Reports)*, 7(1): 13291.

Raoult, D., Audic, S., Robert, C., Abergel, C., Renesto, P., Ogata, H., La Scola, B., Suzan, M., and Claverie, J. M. 2004. The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus *(Science, N.Y.)*, 306(5700): 1344–1350.

Raoult D, Renesto P, and Brouqui P. 2006. Laboratory infection of a technician by Mimivirus. Ann Intern Med, 144: 702–703.

Saadi H, Pagnier I, Colson P, Kanoun Cherif J, Beji M, Boughalmi M, Azza S, Armstrong N, Robert C, Fournous G, La Scola B, and Raoult D. 2013. First isolation of Mimivirus in a patient with pneumonia. Clin Infect Dis, 57:e127–e134.

Schulz, F., Yutin, N., Ivanova, N. N., Ortega, D. R., Lee, T. K., Vierheilig, J., ... and Woyke, T. 2017. Giant viruses with an expanded complement of translation system components. Science, 356(6333): 82-85.

Siew, N., and Fischer, D. 2003. Twenty Thousand ORFan microbial protein families for the biologist? *(Structure)*, 11: 7-9.

Sun, T.-W., Yang, C.-L., Kao, T.-T., Wang, T.-H., Lai, M.-W., and Ku, C. 2020. Host Range and Coding Potential of Eukaryotic Giant Viruses *(Viruses)*, 12(11).

Assessment of pH effect on solubilization of inclusion body of recombinant Receptor Binding Domain in Spike protein

Maliheh Darvish[1*]; Seyed Omid Ranaei Siadat [2] ; Zahra Mousavi nejad[1]

1- Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran
2- Department Biochemistry, Protein Research Center, Shahid Beheshti University, G.C. Evin, Tehran

** Email: malihehdarvish67@gmail.com*

Abstract

Receptor Binding Domain (RBD) of Spike protein in SARS-CoV-2 is a significant target to defend against covid-19 either by developing vaccines or producing drugs and inhibitors. High expression of recombinant RBD in E.coli leads to intracellular accumulation of protein as inclusion bodies. Solubilization of inclusion bodies is a main bottleneck for efficient recovery of the expressed RBD as bioactive protein. Using conventional methods such as a high concentration of chaotropic solvents to solubilize inclusion body disturbs the secondary structure of RBD and after removing the chaotropic salts, expoture of hydrophobic patches increases tendency of protein aggregation that results in low recovery of bioactive protein. During mild solubilization process which includes low concentration of urea at pH12 , it is expected by protecting of the native-like secondary structures subsequently reducing protein aggregation, yield of recovered bioactive RBD will increase.RBD protein was overexpressed in E.coli as inclusion body. Separating of expressed RBD was done in two steps: first step was cell lysis leading to Inclusion Body isolation from cell debris and second step was solubilization of RBD Inclusion Bodies. To have bioactive form of RBD, mild solubilization at alkaline pH following refolding during purification were performed. Buffers containing 2-6 M urea as chaotropic agent at 8-12 pH were utilized to solubilize isolated Inclusion Bodies after cell lysis. Alkaline pH in IB's renaturation resulted in lower aggregation of RBD protein during refolding and upgraded recovery percent of RBD from inclusion bodies. The efficiency of RBD recovery from inclusion body improved by increasing pH from 8 to 12. The highest recovery percent of protein was about 50%, related to solubilization of inclusion body using 4 mol L^{-1} Urea, pH 12.Mild solubilization methods were developed to protect native-like structures and provide an alternative to high concentration of chaotropes. In this study, the pH-based method to recover recombinant RBD from Inclusion bodies of E.coli has been described. we have demonstrated that Inclusion bodies solubilization using low concentration of denaturant at alkali pH can improve not only the purity of recombinant RBD after solubilization but also the biological activity post protein refolding. Furthermore, pH based solubilization reduced aggregation during refolding of protein.

Keywords: Mild Solubilization, Inclusion Body, Recovery, Aggregation, Chaotropic salts

بررسی اثر pH بر حل شدن انکلوژن‌بادی دامین اتصالی به گیرنده پروتئین spike نوترکیب

ملیحه درویش[1*]؛ سید امید رعنایی سیادت[2]؛ سیده زهرا موسوی‌نژاد[1]

۱- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران
۲- گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات پروتئین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

Email: malihehdarvish67@gmail.com

چکیده

دامین اتصال به گیرنده‌ی (RBD) پروتئین spike در ویروس SARS-CoV-۲ هدف اصلی برای مقابله با بیماری کووید-۱۹ با تولید واکسن یا داروها و مهارکننده‌ها است. بیان بالای RBD نوترکیب در باکتری *E.coli* منجر به تجمع درون سلولی پروتئین به صورت انکلوژن بادی می‌شود. محلول کردن انکلوژن بادی‌ها مرحله‌ی محدودکننده در بدست آوردن بالاترین درصد RBD بیان شده به شکل پروتئین نوترکیب محسوب می‌شود. استفاده از روش‌های متداول از قبیل غلظت بالای حلال‌های کائوتروپیک برای حل کردن انکلوژن بادی‌ها می‌تواند ساختار دوم RBD را بهم بزند و با حذف نمک‌های کائوتروپیک، پچ‌های هیدروفوبی در معرض بیشتری قرار گرفته که منجر به افزایش تمایل پروتئین به ساختار اگریگه می‌شود و درنتیجه آن مقدار ریکاوری پروتئین زیست فعال کاهش می‌یابد. در حین فرایند محلول کردن به صورت ضعیف که حاوی غلظت پایینیتی از اوره در pH ۱۲ است، انتظار می‌رود با جلوگیری از تشکیل ساختارهای ثانویه شبه بومی و به دنبال آن کاهش اگریگیشن پروتئین، یازده ریکاوری RBD افزایش یابد.

پروتئین RBD در باکتری *E.coli* به صورت انکلوژن بادی بیان شد. جداسازی RBD بیان شده در دو مرحله انجام شد: اولین مرحله، شکست سلولی است که منجر به جداسازی انکلوژن بادی از خرده سلولی می‌شود و دومین مرحله محلول سازی انکلوژن بادی RBD است. برای بدست آوردن شکل زیست فعال RBD روش محلول کردن انکلوژن بادی در pH قلیایی و به دنبال آن فولدینگ همزمان با تخلیص انجام شد به این صورت که از بافرهای اوره با غلظت ۲ تا ۶ مولار در pH های ۸ تا ۱۲ استفاده شد. pH قلیایی در رناتوراسیون انکلوژن بادی ها اگریگیشن پروتئین RBD را حین فولدینگ کاهش و درصد ریکاوری RBD از انکلوژن بادی را افزایش می‌دهد. بازدهی ریکاوری پروتئین RBD از حالت انکلوژن بادی با افزایش pH از ۸ تا ۱۲ بهبود یافت به طوری که بالاترین درصد ریکاوری پروتئین حدود ۵۰٪ مربوط به بافر اوره ۴ مولار ، pH ۱۲ است.

روش‌های حل شدن ضعیف انکلوژن بادی برای جلوگیری از تشکیل ساختارهای مشابه ساختار اصلی و به عنوان روش جایگزین غلظت‌های بالای کائوتروپ‌ها مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه روش برپایه pH برای ریکاوری RBD از انکلوژن‌بادی شرح داده شد. این مطالعه نشان داد که حل کردن انکلوژن‌بادی با استفاده از غلظت کم ماده دناتوره کننده در pH قلیایی نه تنها باعث بهبود خلوص RBD نوترکیب می‌شود بلکه فعالیت زیستی پروتئین بعد از فولدینگ مجدد حفظ می‌شود. بعلاوه، حل کردن برپایه pH اگریگیشن را طی فرایند فولدینگ پروتئین کاهش می‌دهد.

واژگان کلیدی: حل شدن ضعیف، انکلوژن بادی، ریکاوری، اگریگیشن، نمک‌های کائوتروپیک

۱.مقدمه

بیان پروتئین نوترکیب در *E.coli*، منجر به تجمع حدواسط‌های پروتئینی به صورت درون سلولی تحت عنوان انکلوژن بادی می‌شود. رناتوراسیون انکلوژن بادی‌های تشکیل شده و تبدیل آن‌ها به فرم زیست فعال پروتئین‌ها، مرحله محدودکننده در ریکاوری محصول نهایی با هزینه به صرفه محسوب می‌شود. بیان پروتئین در دمای بالا، غلظت بالای القاگر و بیان با پروموتور قوی باعث سرعت بالای ترجمه و تشکیل اگریگیت مولکول‌های پروتئینی ناقص فولد شده یا با فولدینگ اشتباه به صورت انکلوژن بادی می‌شود(Cubarsi et al., ۲۰۰۰). برای تولید پروتئین‌های زیست فعال لازم است انکلوژن بادی تحت فرایندهای جداسازی از سلول، حل شدن، فولدینگ مجدد[۲۸۸] و تخلیص قرار بگیرد(A. Singh et al., ۲۰۱۵). در بیشتر مواقع مراحل حل شدن انکلوژن بادی و ریفولدینگ همراه با بازده ریکاوری ضعیفی خواهد بود. با داشتن اطلاعاتی درمورد ساختار و خصوصیات عملکردی پروتئین، می‌توان بازده ریکاوری حل شدن انکلوژن بادی را افزایش داد(Burgess, ۲۰۰۹). در *E.coli* به دلیل اختصاصی بودن اگریگیشن پروتئین، بیشترین محتوای انکلوژن‌بادی‌ها را پروتئین نوترکیب مورد نظر تشکیل می‌دهد. به طور کلی برای حل شدن پروتئین‌های بیان شده به صورت انکلوژن بادی از غلظت‌های بالای نمک‌های کائوتروپیک[۲۸۹] استفاده می‌شود و سپس با حذف این نمک‌ها به حالت native فولد می‌شوند. از جمله اشکالات استفاده ازمولاریته‌ی بالای نمک‌های کائوتروپیک برای حل شدن انکلوژن بادی‌ها، آسیبی است که این ترکیبات به ساختار دوم پروتئین‌ها وارد می‌کنند و پچ‌های هیدروفوبی[۲۹۰] زنجیره پلی پپتیدی در معرض بیشتری قرار گرفته و احتمال شکل‌گیری رسوب[۲۹۱] پروتئینی افزایش می‌یابد و درنتیجه بازده ریکاوری کاهش می‌یابد(Nieba et al., 1997; A. Singh et al., ۲۰۱۵). ویژگی بسیار قابل توجه رسوب‌های پروتئینی در انکلوژن‌بادی‌ها، وجود ساختارهای دوم شبه native[۲۹۲] مربوط به پروتئین بیان شده و اینتراکشن بین مولکولی اختصاصی بین مولکول‌های پروتئین است که باعث شکل‌گیری رسوب پروتئینی می‌شود. انکلوژن‌بادی‌های شکل گرفته در بخش‌های مختلف سلول E.coli قرار گرفته و دارای ساختارهای مشابه هستند، که این موضوع نشان داده است که تشکیل انکلوژن بادی در مرحله آخر مسیر فولدینگ پروتئین صورت می‌گیرد. بنابراین پروتئین‌ها بیشترین ساختار دوم خود را حین تشکیل رسوب تا انکلوژن‌بادی حفظ می‌کنند. اگر فولدینگ مجدد پروتئین از این ساختارهای از قبل تشکیل شده آغاز شود بسیار مطلوبتر از زمانی خواهد بود که از مولکول‌های پروتئین کامل فولد نشده استفاده شود. حل شدن[۲۹۳] انکلوژن بادی‌ها با استفاده از روش‌ها و شرایط ضعیف[۲۹۴] بدون آسیب به ساختار دوم شبه native، منجر به ریکاوری پروتئین نوترکیب با بازده بالا می‌شود. منظور از شرایط خفیف استفاده از عوامل حل کننده ضعیف با غلظت پایین و شرایط pH بازی است. غلظت بالای کائوتروپ‌ها ازقبیل اوره و گوانیدین هیدروکلراید باعث دناتوراسیون کامل این ساختارهای دوم می‌شود و اغلب در طی فرایند فولدینگ مجدد باعث رسوب شدن پروتئین‌ها می‌شود(Surinder M Singh et al., 2008; Surinder Mohan Singh & Panda, ۲۰۰۵).

[288] Refolding
[289] Chaotropic Salts
[290] Hydrophobic patches
[291] Aggregates
[292] Native-like second structure
[293] Solubilization
[294] Mild condition

ریکاوری پروتئین از انکلوژن بادی‌ها از چهار مرحله تشکیل شده است: جداسازی انکلوژن بادی‌ها از سلول؛ حل شدن انکلوژن بادی؛ فولدینگ مجدد پروتئین حل شده؛ و درنهایت تخلیص پروتئین. حل شدن انکلوژن بادی و فولدینگ درست پروتئین حل شده دو مرحله مهم و اساسی در ریکاوری پروتئین زیست فعال محسوب می‌شوند. فولدینگ پروتئین‌های حل شده با ساختارهای شبه native در شرایط خفیف می‌تواند بازده ریکاوری را افزایش دهد(A. Singh et al., ۲۰۱۵).

در این مطالعه برای اثبات این اصل، پروتئین نوترکیب دامین اتصالی به گیرنده[۲۹۵] (RBD) در پروتئین spike ویروس SARS-CoV-۲ بیان شده در *E.coli* به صورت انکلوژن بادی در بافر با pH قلیایی حاوی غلظت غیر دناتوره کننده از اوره به صورت محلول در می‌آید. ویروس SARS-CoV-۲ داری چهار پروتئین ساختاری اصلی شامل گلیکوپروتئین spike (S)، گلیکوپروتئین پوششی (E)، گلیکوپروتئین غشایی (M) و پروتئین نوکلئوکپسید (N) است. پروتئین Spike از سه بخش تشکیل شده است: یک بخش اکتودامین بزرگ، یک بخش درون غشا ترانس‌ممبرن و دم درون‌سلولی کوتاه. بخش اکتودامین شامل زیرواحد S۱ اتصالی به گیرنده و زیرواحد S۲ درون غشایی می‌باشد. دامین اتصالی به گیرنده (RBD) در بخش C-ترمینال زیرواحد S۱ قرار دارد. پروتئین نوترکیب RBD به مقدار زیاد در *E.coli* تولید و بیان می‌شود و به دلیل میزان بیان بالا و نبود سیستم فولدینگ در پروکاریوت‌ها، RBD تولید شده به صورت انکلوژن بادی استخراج می‌شود. در این مطالعه تلاش شده است شرایط بهینه برای حل شدن انکلوژن بادی RBD بیان شده در سویه *E.coli* یافت شود به طوری که بیشترین مقدار ریکاوری پروتئین RBD را نتیجه دهد. به این منظور، در مرحله حل شدن انکلوژن بادی RBD، از یافرهای اوره با غلظت‌های مختلف ۲ تا ۶ مولار و در pH های ۸ تا ۱۲ استفاده شد تا میزان ریکاوری پروتئین در هر شرایط بررسی شود و در نهایت بهترین بافر با بالاترین بازده ریکاوری بدست آید(Li, ۲۰۱۶; Tai et al., ۲۰۲۰; Wang et al., ۲۰۲۰).

۲.مواد و روش‌ها

۲-۱-مواد

در این مطالعه سلول‌های *E.coli* بیان کننده پروتئین نوترکیب RBD به صورت انکلوژن بادی استفاده شد. جزئیات پروتئین، کلون و وکتور استفاده شده در مطالعه‌ی دیگری بیان شده است. اوره از شرکت Carlo-erba، Tris-base و سدیم کلراید از شرکت مرک خریداری شد. سیستم الکتروفورز SDS-PAGE از شرکت BioRad خریداری شد.

۲-۲-آماده‌سازی انکلوژن بادی

بیان پروتئین RBD نوترکیب به شکل انکلوژن بادی در باکتری E.coli در حضور القاگر IPTG انجام شد به این صورت که سازه ژنی طراحی شده وکتور pET28a حاوی ژن RBD با برچسب 6XHis به روش شوک حرارتی به باکتری مستعد E.coli BL21 منتقل شد(Zhao et al., ۲۰۰۵). کلنی‌های باکتری ترنسفورم شده در محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین ۵۰ µg/ml برگزیده شدند. RBD نوترکیب به صورت انکلوژن‌بادی‌هایی طی فرایند کشت بچ با استفاده از باکتری ترنسفورم شده حاوی وکتور نوترکیب در حضور القاگر 1mM IPTG بیان شد. در پی جداسازی رسوب سلولی، سلول‌های باکتری در بافر 50mM Tris-base, 500mM NaCl, 0.5% Triton X-100, pH 8 به صورت سوسپانسیون در آمدند و به روش سونیکاسیون با سیکل‌های ۷ ثانیه پالس، ۳ ثانیه

[295] Receptor Binding Domain

پاس، با قدرت ۲۰۰ وات ۲۰ سیکل و با قدرت ۴۰۰ وات ۴۰ سیکل شکسته شدند. انکلوژن بادی به صورت رسوب بعد از سانتریفیوژ با دور ۹۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در ºC ۴ بدست آمد(He et al., ۲۰۲۱; Zhao et al., ۲۰۰۵).

۲-۳-تخمین کل محتوای پروتئینی انکلوژن بادی

برای این منظور، انکلوژن بادی حاصل به طور کامل در 1M NaOH به مدت ۹۰دقیقه در حمام آب ºC ۸۰ حل شد. سپس نمونه با دور ۱۴۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محتوای کل پروتئین موجود در سوپرناتانت به روش لوری[۲۹۶] تعیین غلظت شد (BSA به عنوان پروتئین استاندارد مورد استفاده قرار گرفت)(Beiroti et al., ۲۰۱۴; Mohammadian et al., ۲۰۱۸).

۲-۴-تخمین مقدار RBD در انکلوژن بادی حاصل

انکلوژن بادی حاصل در بافر اوره ۴ مولار حل و با دور ۱۴۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب و سوپرناتانت با روش SDS-PAGE از جهت خلوص پروتئین RBD مورد بررسی قرار گرفتند و سپس با روش لوری مقدار پروتئین تخمین زده شد. براساس خلوص RBD و مقدار تخمین زده شده کل پروتئین، مقدار RBD در بخش‌های رسوب و سوپرناتانت و درمجموع مقدار RBD در انکلوژن بادی بدست آمد.

۲-۵-حل کردن انکلوژن بادی‌ها

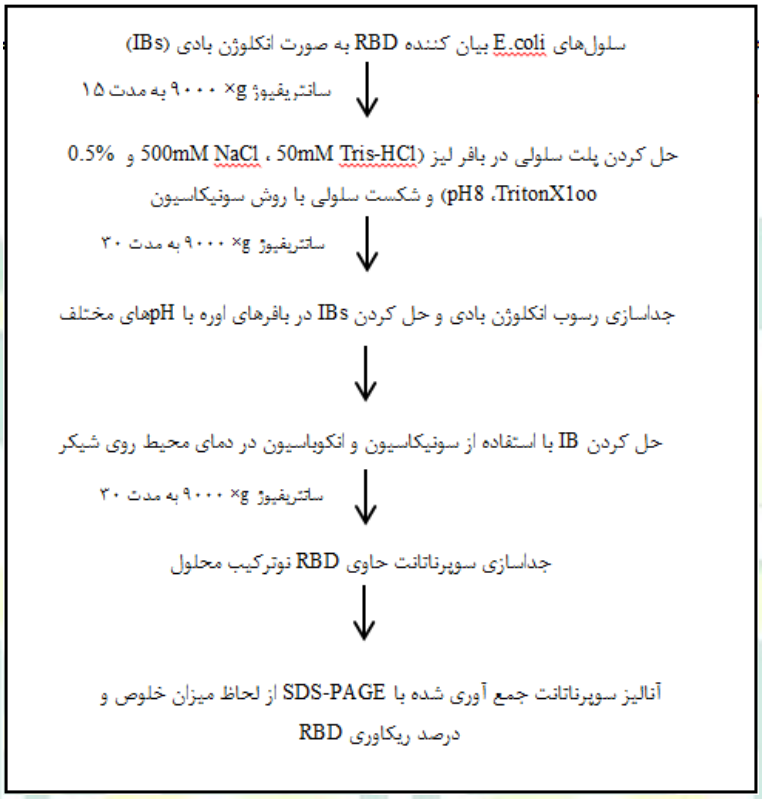
برای این منظور، رسوب انکلوژن بادی بدست آمده را در بافر ۱۰۰mM Tris-base بدون اوره و حاوی اوره با غلظت ۲، ۴و ۶ مولار به نسبت (w/v) ٪۵ حل شد. میزان حل شدن انکلوژن بادی در هرکدام از بافرهای ذکر شده در pH ۸، ۹، ۱۰ و ۱۲ مورد بررسی قرار گرفت. بعد از افزودن هر کدام از بافرها به رسوب انکلوژن بادی، نمونه ها ورتکس شد و به مدت نیم ساعت در دمای محیط با دور ۱۵۰ rpm شیک شدند. بعد از انکوباسیون، نمونه ها با دور ۹۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ºC ۴ سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت بر روی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت و با روش لوری تعیین غلظت شد. بازده ریکاوری RBD محلول از حالت انکلوژن بادی در هرکدام از حالت‌های بافری محاسبه شد(Surinder M Singh et al., ۲۰۰۸).

۳.نتایج و بحث

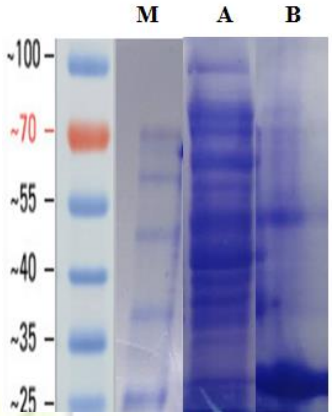
بعد از بیان RBD در سلول‌های *E.coli*، شکست سلولی به روش سونیکاسیون انجام شد تا جداسازی انکلوژن بادی‌ها صورت گیرد. مراحل بدست آوردن انکلوژن بادی در شکل (۱) به طور خلاصه نشان داده شد. پیش از حل کردن انکلوژن بادی‌ها، مقدار پروتئین توتال بیان شده و مقدار انکلوژن بادی اندازه‌گیری شد که به ترتیب ۱۶۰۰ µg/ml و ۷۰۲ بدست آمد. مقدار RBD نوترکیب در انکلوژن بادی بدست آمده ۶۹۲ µg/ml تخمین زده شد که حدود ٪۹۸ کل انکلوژن بادی را تشکیل می‌دهد.

[296] Lowey method

بعد از لیز سلولی و جداسازی سوپرناتانت مرحله اول، حضور پروتئین‌ها در این سوپرناتانت و رسوب انکلوژن بادی روی ژل SDS-PAGE بررسی شد (شکل۲). شکل (۲) نشان می‌دهد که سوپرناتانت مرحله اول شکست سلولی فاقد RBD محلول بوده و سایر پروتئین‌های محلول میزبان باکتریایی در مرحله اول حذف می‌شوند. این درحالی است که با حل کردن مقداری رسوب انکلوژن بادی در بافر نمونه و آنالیز آن روی ژل SDS-PAGE (شکل۲) کاملا مشهود است که RBD درصد زیادی از انکلوژن بادی را تشکیل می‌دهد. انکلوژن بادی‌های حاوی RBD با غلظت‌های مختلف ماده کائوتروپ (اوره) در pH های مختلف تا pH قلیایی حل شد و بازده ریکاوری پروتئین RBD برای هر کدام محاسبه شد.



شکل ۵ : فرایند ریکاوری RBD نوترکیب بیان شده از انکلوژن بادی باکتری *E.coli*



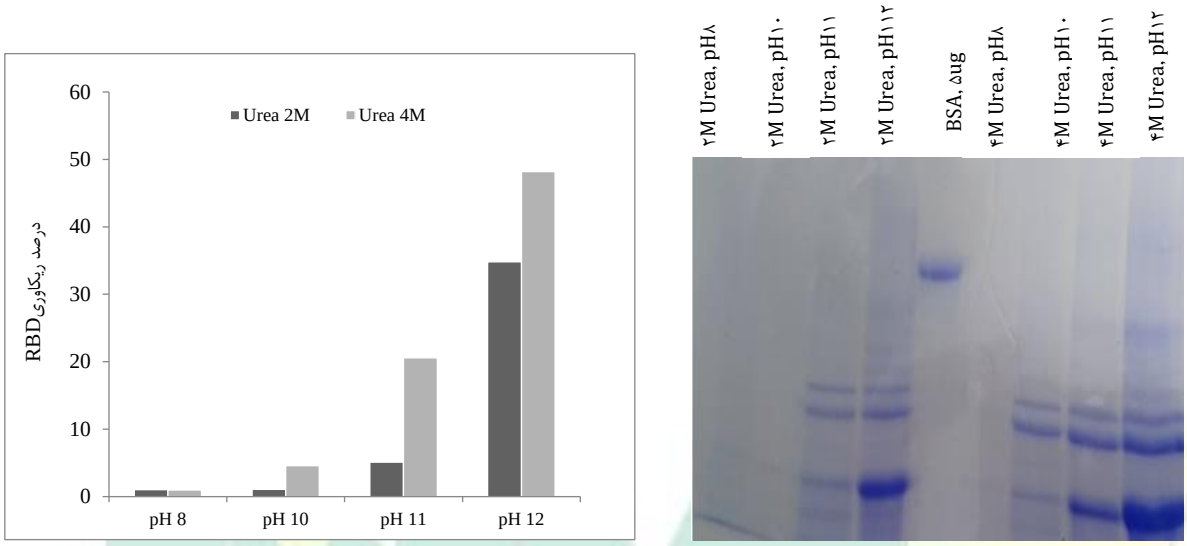
شکل ۶: آنالیز RBD بیان شده در *E.coli*. (M) ماکر پروتئینی؛ (A) سوپرناتانت مرحله اول؛ (B) رسوب انکلوژن بادی حاوی RBD

در بررسی اولیه میزان حل شدن انکلوژن بادی در دو غلظت ۲ و ۴ مولار اوره هر کدام در pHهای ۸، ۹، ۱۰ و ۱۲ باهم مقایسه شدند. میزان خلوص و تعیین مقدار کل پروتئین و پروتئین هدف در جدول (۱) نشان داده شده است. براساس جدول (۱) و شکل(۳)، بیشترین بازده ریکاوری RBD از انکلوژن بادی مربوط به استفاده از بافر اوره با غلظت ۴ مولار در pH ۱۲ بوده است و تاثیر pH قلیایی به وضوح در حل شدن انکلوژن بادی کاملا مشهود است. درمرحله بعد، تاثیر تغییر مقدار عامل کائوتروپیک (اوره) در pH ثابت بررسی شد به این صورت که انکلوژن بادی در دو بافر اوره با غلظت های ۴ و ۶ مولار و هردو در pH ۱۲ حل شد. آنالیز نتیجه روی SDS-PAGE با تعیین مقدار RBD مورد بررسی قرار گرفت (جدول۱ و شکل۴). بازده ریکاوری RBD در دو بافر اوره ۴ و ۶ مولار pH۱۲ تقریبا مشابه بوده است در حالی که میزان خلوص RBD محلول در بافر ۶ مولار بیشتر از بافر ۴ مولار اوره است. همانطور که در شکل (۴) مشخص است pH قلیایی حدود ۱۲ به تنهایی قابلیت حل کردن انکلوژن بادی را ندارد و همراهی عامل کائوتروپیک اوره تا ۴ مولار بازده ریکاوری RBD را بالا می‌برد.

جدول ۲: پارامترهای محاسبه شده در هر کدام از شرایط محلول سازی انکلوژن بادی

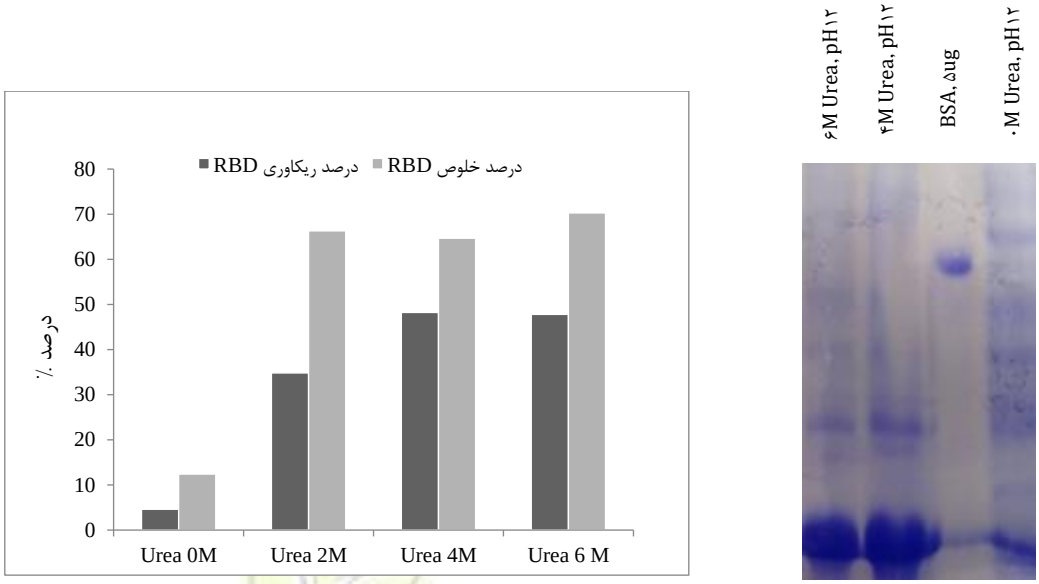
ترکیبات بافر محلول-سازی انکلوژن بادی	میانگین مقدار کل پروتئین در سوپرناتانت (µg/ml)	مقدار RBD نوترکیب در سوپرناتانت (µg/ml)	درصد خلوص RBD نوترکیب در سوپرناتانت (٪)	درصد ریکاوری RBD از انکلوژن بادی (٪)
Urea ۲M, pH ۸	۱۰.۶	۱۰	۹۴.۳	۱.۰۳
Urea ۲M, pH ۱۰	۱۱.۰۳	۱۰.۵	۹۵.۲	۱.۱
Urea ۲M, pH ۱۱	۲۱۷.۶	۴۷.۲	۲۱.۷	۵.۱
Urea ۲M, pH ۱۲	۴۸۴.۴	۳۲۱.۴۲	۶۶.۳	۳۴.۸
Urea ۴M, pH ۸	۹.۹۷	۹.۲۵	۹۲.۸	۱
Urea ۴M, pH ۱۰	۲۲۹.۴	۴۲.۵	۱۸.۵	۴.۶
Urea ۴M, pH ۱۱	۴۰۳.۸	۱۹۰.۱	۴۷.۱	۲۰.۶
Urea ۴M, pH ۱۲	۶۸۷.۴	۴۴۴.۷	۶۴.۷	۴۸.۲
Urea ۶M, pH ۱۲	۶۲۷.۳	۴۴۱.۲	۷۰.۳	۴۷.۸

Urea ۰M, pH ۱۲	۳۴۳.۱	۴۲.۵	۱۲.۴	۴.۶



شکل ۷ : نتایج SDS-PAGE (سمت راست) حل شدن انکلوژن بادی در بافرهای مختلف؛ نمودار درصد ریکاوری RBD در بافر اوره ۴ و ۲ مولار با pH ۸ تا۱۲ (سمت چپ)

به دلیل اینکه حذف اوره در مرحله بعدی می‌تواند مقدار RBD فولد شده را کاهش دهد و همچنین حضور اوره بیشتر، قابلیت دناتوره کردن پروتئین RBD را دارد و حذف آن نیاز به مراحل رفولدینگ با هزینه بیشتر را می‌طلبد، جهت حل کردن انکلوژن بادی RBD استفاده از بافر اوره ۴مولار با pH ۱۲ به عنوان بهینه‌ترین حالت انتخاب شد. برای حل کردن پروتئین RBD ، pH قلیایی همراه با غلظت نسبتا کم اوره به عنوان حل کننده ضعیف با بیشترین بازده ریکاوری برای این نوع انکلوژن بادی محسوب می‌شود.



شکل ۸: نتایج SDS-PAGE حل شدن انکلوژن بادی در بافر اوره ۶ و ۴ مولار (سمت راست). نمودار درصد ریکاوری RBD در بافر اوره ۰، ۲، ۴ و ۶ مولار با pH ۱۲ (سمت چپ)

با اینکه ریکاوری RBD از حالت انکلوژن بادی با استفاده از غلظت بالای اوره (۸ مولار) بیشتر خواهد بود و نسبت به بافر اوره با غلظت کمتر مقدار پروتئین بیشتری به صورت محلول در می‌آید، اطلاعات بدست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که pH بالا همراه با غلظت کمتر اوره می‌تواند روش جایگزین استفاده از عوامل کائوتروپیک برای حل کردن انکلوژن بادی باشد. همچنین این مطالعات نشان داده است که pH قلیایی به تنهایی و بدون حضور عامل کائوتروپیک قادر به حل کردن انکلوژن بادی RBD نخواهد بود. الگوی حل شدن انکلوژن بادی پروتئین‌های مختلف براساس اینتراکشن بونی در رسوب پروتئینی متفاوت خواهد بود.

استراتژی‌های تخلیص RBD از چندین مرحله فرایند می‌تواند به فرایند یک مرحله‌ای و به دنبال آن کاهش هزینه تخلیص بهبود یابد. در این مطالعه به دلیل خلوص نسبتا بالای پروتئین نوترکیب RBD بعد از حل شدن انکلوژن بادی با استفاده از مواد شیمیایی و تغییرات pH، نیاز به مراحل مختلف کروماتوگرافی را کاهش می‌دهد. همچنین استفاده از مواد کائوتروپیک با غلظت کم مراحل و هزینه فولدینگ مجدد پروتئین RBD حل شده را کاهش می‌دهد. در مطالعات انجام شده برای بیان پروتئین RBD در سیستم پروکاریوتی و بدست آوردن RBD محلول از اوره با غلظت ۸ مولار استفاده شده که منجر به فرایندهای پرهزینه حذف اوره و چندین مرحله تخلیص شده است. براساس بررسی‌های ما، تاکنون مطالعه‌ای روی خصوصیات ساختاری پروتئین نوترکیب RBD بعد از حل شدن و خروج از حالت انکلوژن بادی و رفولدینگ آن صورت نگرفته است(Vallejo & Rinas, ۲۰۰۴). در مطالعات بعدی رابطه ساختار RBD و روش‌های حل کردن انکلوژن بادی مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

۴.نتیجه‌گیری

روش‌های کلاسیک برای ریکاوری پروتئین‌های نوترکیب از انکلوژن‌بادی‌های تولید شده در *E.coli* براساس استفاده از ترکیبات دناتوره-کننده با غلظت بالا (از قبیل اوره، گوانیدینیوم هیدروکلراید و دترجنت‌ها) هستند که باعث باز شدن کامل ساختار پروتئین و دناتوره شدن آن‌ها می‌شود. درنتیجه باعث افزایش اگریگه شدن در حین رفولدینگ و کاهش ریکاوری پروتئین می‌شود. بررسی روش‌های حل کردن انکلوژن بادی که باعث حفظ فعالیت زیستی پروتئین نوترکیب، فولدینگ مناسب با هزینه و وقت کم و افزایش ریکاوری

آن بسیار حیاتی است(Khan et al., ۱۹۹۸; Vallejo & Rinas, ۲۰۰۴). در این مطالعه با استفاده از غلظت کم ماده کائوتروپیک و تاثیر pH روی حل کردن انکلوژن‌بادی پروتئین مورد نظر قادر بودیم به بازده بالایی از پروتئین RBD برسیم و درعین حال با بدست آوردن خلوص مناسب RBD بدست آمده مراحل بعدی تخلیص را کاهش دهیم.

به طور کلی محدودیت‌های چشمگیر در فرایندهای مقیاس بالای تولید پروتئین نوترکیب محلول در سیستم پروکاریوتی شامل استفاده از غلظت‌های بالای مواد دناتوره کننده، هزینه بالای این مواد و حذف آن‌ها برای رفولدینگ و همچنین تغییرات غیرقابل برگشت ایجاد شده در ساختار پروتئین می‌باشد. در این مطالعه به اثر pH در محلول سازی انکلوژن‌بادی و کمک به عامل دناتوره کننده اوره برای محلول کردن RBD پرداختیم. این روش می‌تواند کاندید روش مناسب برای افزایش ریکاوری پروتئین‌های هدف زیست فعال از انکلوژن‌بادی‌ها در صنعت بیوتکنولوژی باشد.

سپاسگزاری

ابن مطالعه بخشی از پروژه تولید واکسن نوترکیب برپایه RBD علیه ویروس SARS-CoV-۲ تحت حمایت شرکت پروتئین نوترکیب سبحان می‌باشد. از همکاران محترم در این شرکت به خصوص جناب آقای دکتر سید احسان رعنائی سیادت، مدیرعامل محترم شرکت، جهت همکاری بی وقفه‌شان کمال تشکر را داریم.

منابع

Beiroti, A., Kaveianpour, A., Sepahi, M., Arsalani, F., Tavakoli, P., & Jalalirad, R. (2014). Effect of post-solubilization conditions on the yield and efficiency of recombinant streptokinase purification at large-scale. *PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION*, *June*. https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.06.007

Burgess, R. R. (2009). Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 463, Issue 09). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63017-2

Cubarsi, R., Y, A. V., & Carrio, M. M. (2000). Fine architecture of bacterial inclusion bodies. *FEBS Letters*, *471*, 7–11.

He, Y., Qi, J., & Xiao, L. (2021). Purification and characterization of the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 spike protein from Escherichia coli. *Engineering in Life Sciences*, *21*, 453–460. https://doi.org/10.1002/elsc.202000106

Khan, R. H., Rao, K. B. C. A., Eshwari, A. N. S., Totey, S. M., & Panda, A. K. (1998). Solubilization of Recombinant Ovine Growth Hormone with Retention of Native-like Secondary Structure and Its Refolding from the Inclusion Bodies of Escherichia coli. *Biotechnol. Prog*, *189*(98), 722–728.

Li, F. (2016). Structure , Function , and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Reviews In Advance*, *18*(20), 1–25. https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301

Mohammadian, A., Kaghazian, H., Kavianpour, A., & Jalalirad, R. (2018). Inclusion body proteins solubilization using chemical combinations at low concentrations Alireza. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *93*(6), 1579–1587. https://doi.org/10.1002/j

Nieba, L., Honegger, A., & Krebber, C. (1997). Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable / constant domain interface : improved in vivo folding and physical characterization of an engineered scFv fragment. *Zurich Open Repository and Archive*, *10*, 435–444.

Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). *Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process*. 1–10. https://doi.org/10.1186/s12934-015-0222-8

Singh, Surinder M, Upadhyay, A. K., & Panda, A. K. (2008). *Solubilization at high pH results in improved recovery of proteins from inclusion bodies of E . coli*. *1134*(February), 1126–1134. https://doi.org/10.1002/jctb

Singh, Surinder Mohan, & Panda, A. K. (2005). *Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins*. *99*(4), 303–310. https://doi.org/10.1263/jbb.99.303

Tai, W., He, L., Zhang, X., Pu, J., & Voronin, D. (2020). Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus : implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cellular & Molecular Immunology*, 1–8. https://doi.org/10.1038/s41423-020-0400-4

Vallejo, L. F., & Rinas, U. (2004). Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories*, *12*, 1–12. https://doi.org/10.1186/1475-2859-3-11

Wang, Y., Wang, L., Cao, H., & Liu, C. (2020). SARS - CoV - 2 S1 is superior to the RBD as a COVID - 19 subunit vaccine antigen. *Medical Virology*, *July*, 1–7. https://doi.org/10.1002/jmv.26320

Zhao, J., Zhao, Z., Wang, W., & Gao, X. (2005). Prokaryotic expression , refolding , and purification of fragment 450 – 650 of the spike protein of SARS-coronavirus. *Protein Expression and Purification*, *39*, 169–174. https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.10.004

Isolation and identification of freshwater microalgae in Mazandaran province and measurement of antioxidant activity of chlorophyll and carotenoid pigments

Fatemeh Gholampour Ahangar[1*]; Mojtaba Mohseni[2]; Ehsan Nazifi[3]; Maryam Akhondian[4]

[1]MSc. student in Microbiology, Department of Microbiology, University of Mazandaran, Iran
[2]Associate Professor of Microbiology, Department of Microbiology, University of Mazandaran, Iran
[3]Assistant Professor of Plant Physiology, Department of Plant Sciences, University of Mazandaran, Iran
[4]Assistant Professor of Marine Biology, Department of Marine & Environmental Sciences, University of Mazandaran, Iran

**F.gholampour@stu.umz.ac.ir*

Abstract

Microalgae are unicellular and photosynthetic microorganisms that are able to produce natural and valuable compounds such as carotenoid pigments. These pigments have many applications in a variety of industries due to their various properties, such as free radical inhibition and combatting cancer cells. These natural pigments can be used as suitable alternatives to dyes, food additives and chemical compounds. The aim of this study was to isolate freshwater microalgae from the natural environment, extract their chlorophyll and carotenoid pigments, and measure their antioxidant activity. Freshwater samples were collected from different regions of Mazandaran province and were inoculated in BG-11 and BBM agar medium. The plates were exposed to a temperature of 27˚C, 2500 lux light for 16 hours, and 8 hours of darkness for one week. Among the collected samples, three isolates MGA1, MGH2 and MGA3 of green microalgae were purified. According to their morphological characteristics and with the help of microalgae identification keys, these isolates were identified to be related to Coelastrella, Raphidocelis and Scenedesmus genus. The total pigments of each isolates were extracted using methanol extraction method and the amount was calculated. Then, chlorophyll a and b, carotene, and xanthophyll pigments of each isolate were extracted and their percentage of antioxidant activity was measured by the DPPH method. The results showed that, Coelastrella MGA1, had more carotenoid pigments and more free radical trapping properties than isolates MGA2 and MGA3. Also the results of antioxidant activity for each pigment separately showed that the carotene and xanthophyll pigments were much more active than the chlorophyll pigments. These results indicate that isolated microalgae can be a good candidate for use in various industries such as food and pharmaceutical industries due to their high amount of naturally valuable compounds like carotenoids.

Keywords: Microalgae, antioxidant, chlorophyll, xanthophyll, carotene

جداسازی و شناسایی ریزجلبک‌های آب شیرین استان مازندران و سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید آن‌ها

فاطمه غلامپور آهنگر[۱*]؛ مجتبی محسنی[۲]؛ احسان نظیفی[۳]؛ مریم آخوندیان[۴]

۱- دانشجو کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران
۲- دانشیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران
۳- استادیار فیزیولوژی گیاهی، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران
۴- استادیار زیست شناسی دریا، گروه علوم دریایی و محیطی، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه مازندران

* *F.gholampour@stu.umz.ac.ir*

چکیده

ریزجلبک‌ها، میکروارگانیسم‌های تک سلولی و فتوسنتز کننده هستند که قادر به تولید ترکیباتی طبیعی و با ارزش نظیر رنگدانه‌های کاروتنوئیدی می‌باشند. این رنگدانه‌ها با داشتن خواص مختلف به ویژه فعالیت مهار رادیکال آزاد و مقابله با سلول‌های سرطانی، کاربرد گسترده‌ای در صنایع مختلف دارند. از این رنگدانه‌های طبیعی می‌توان به عنوان جایگزینی مناسب برای رنگ‌ها و افزودنی‌های خوراکی و ترکیبات شیمیایی استفاده کرد. هدف از این پژوهش، جداسازی ریزجلبک‌های آب شیرین از محیط طبیعی، استخراج و سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئیدی بود. نمونه‌های آب شیرین از مناطق مختلف استان مازندران جمع‌آوری و در محیط‌های کشت آگاردار BG-11 و BBM تلقیح شدند. پلیت‌ها به مدت یک هفته در دمای ۲۷°C، نور ۲۵۰۰ لوکس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. از میان نمونه‌های جمع‌آوری شده، سه جدایه MGA1، MGA2 و MGA3 از ریزجلبک‌های سبز خالص‌سازی شدند. این جدایه‌ها با توجه به ویژگی‌های مرفولوژیکی و با کمک کلیدهای شناسایی ریزجلبک‌ها، به ترتیب متعلق به جنس‌های *کوئلاسترلا*، *رافیدوسلیس* و *سندسموس* بودند. رنگدانه‌های تام هر جدایه با روش عصاره‌گیری متانولی استخراج و مقدار آن محاسبه شد. سپس رنگدانه‌های کلروفیل a و b، کاروتن و زانتوفیل هر جدایه استخراج و درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها به روش DPPH سنجیده شد. نتایج نشان داد ریزجلبک *کوئلاسترلا* MGA1 دارای رنگدانه‌های کاروتنوئیدی و همچنین خاصیت به دام‌اندازی رادیکال آزاد بیشتری نسبت به دو جدایه MGA2 و MGA3 بود. همچنین نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی هر رنگدانه به‌صورت مجزا نیز نشان داد که رنگدانه‌های کاروتن و زانتوفیل نسبت به رنگدانه‌های کلروفیل، بسیار فعال‌تر بودند. این نتایج نشان می‌دهد ریزجلبک‌های جداشده به علت دارا بودن مقدار بالای ترکیبات با ارزش طبیعی نظیر کاروتنوئیدها، می‌توانند گزینه مناسبی برای استفاده در صنایع مختلف از جمله صنعت غذایی و دارویی باشند.

واژگان کلیدی: ریزجلبک، آنتی‌اکسیدان، کلروفیل، زانتوفیل، کاروتن

۱. مقدمه

ریزجلبک‌ها گروه متنوعی از موجودات ساده، گیاه مانند و تک سلولی هستند که قادر به مهار انرژی خورشیدی می‌باشند و از طریق مکانیسم فتوسنتز، مقادیر زیادی زیست توده را تولید می‌کنند (Matsunaga et al., 2005). ریزجلبک‌ها، فتوسنتز کننده‌های

اصلی زمین هستند و قادر به تولید رنگدانه‌های مهمی از جمله کلروفیل a، b و c، β-کاروتن، استاگزانتین، زانتوفیل‌ها و فایکوبیلی پروتئین‌ها می‌باشند و به عنوان منبعی از رنگ‌های طبیعی محسوب می‌شوند (Begum et al., 2016). رنگدانه‌های ریزجلبک‌ها به‌طور گسترده‌ای در صنایع مختلف از جمله مواد غذایی، دارویی، آبزی‌پروری و همچنین صنعت آرایشی و بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. علاوه بر این، در آزمایشگاه‌های بالینی-تحقیقاتی نیز به عنوان برچسب‌های موثری برای آنتی بادی‌ها و گیرنده‌ها کاربرد دارند (Santiago-Santos et al., 2004). ریزجلبک‌ها منبعی غنی از ترکیبات با ارزش مانند کاروتنوئیدهای طبیعی هستند که جایگزین مناسبی برای مولکول‌های سنتز شده شیمیایی، که در حال حاضر بر بازار جهانی تسلط دارند می‌باشند (Lafarga et al., 2020). کاروتنوئیدها ترکیباتی لیپوفیلی هستند که معمولا به رنگ‌های زرد، نارنجی یا قرمز وجود دارند و متنوع‌ترین و گسترده‌ترین رنگدانه‌های موجود در طبیعت می‌باشند (Sasso et al., 2012). اگرچه کاروتنوئیدها کاربردهای گسترده‌ای در تولید لوازم آرایشی و بهداشتی، رنگ دهنده‌های غذایی و افزودنی‌های خوراکی دارند، نقش حفاظتی نیز برای انسان فراهم می‌کنند. بسیاری از مطالعات، مزایای بهداشتی کاروتنوئیدها را بررسی کرده‌اند و طبق نتایج، این مزایا معمولا مربوط به فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی آن‌ها می‌باشد (Gong and Bassi, 2016). ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به عنوان روبنده و سرکوب کننده رادیکال‌های آزاد عمل کرده و در سیستم بیولوژیکی، از سلول‌ها در برابر آسیب این رادیکال‌ها حفاظت می‌کنند (Yu et al., 2002; Prior et al., 2005).

طبق پژوهش‌های عثمان و همکاران در سال ۲۰۱۸، رنگدانه‌های کاروتنوئیدی چندین ریزجلبک سبز آب شیرین بررسی شدند. با توجه به نتایج، این ریزجلبک‌های کلروفیت، حاوی محتوی بالایی از کاروتنوئیدهایی از جمله β-کاروتن، لوتئین و β-کریپتوگزانتین بودند (Othman et al., 2018). از پژوهش‌های مشابه داخل کشور نیز می‌توان به بررسی‌های حسن‌سلطان سولقانی و همکاران در سال ۱۳۹۷ اشاره کرد. طبق تحقیقات آن‌ها، میزان کلروفیل‌های a، b و کاروتنوئید تام ریزجلبک‌های جداسازی شده از سواحل بندر ترکمن سنجیده شد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها به روش‌های DPPH[297] و FRAP[298] بررسی شد. طبق نتایج، خاصیت آنتی‌اکسیدانی *آکوتودسموس آبلیکوس*[۲۹۹] بیشتر از *دسمودسموس آرماتوس*[۳۰۰] بود (حسن‌سلطان سولقانی و همکاران، ۱۳۹۷).

اگرچه در ایران پژوهش‌های بسیاری روی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاهان صورت گرفته است، اما بررسی‌ها روی خواص و ترکیبات ریزجلبک‌ها بسیار محدود است. بنابراین، تحقیقات وسیع‌تری جهت بررسی پتانسیل ریزجلبک‌ها در مقابله با رادیکال‌های آزاد و ترکیبات ضد سرطانی و بسیاری ترکیبات با ارزش دیگر، لازم است. در پژوهش حاضر، با توجه به تنوع ریزجلبک‌های آب شیرین در مناطق مختلف استان مازندران، سه جدایه ریزجلبک سبز، جداسازی و خالص گردید و خواص آنتی‌اکسیدانی رنگدانه‌های آن‌ها بررسی شد.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه برداری، خالص‌سازی و شناسایی

نمونه آب شیرین از چند منطقه مختلف استان مازندران شامل بابلرود، سجادرود و تالاب میانکاله، جمع‌آوری شد. حجم ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌ها به‌طور مجزا به پلیت‌های حاوی دو محیط کشت استریل BG-11[301] و BBM[302]، تلقیح شد. پلیت‌ها به مدت ۷ تا ۱۰ روز در دمای ۲۷°C، نور ۲۵۰۰ لوکس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. جهت خالص‌سازی

[297] 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
[298] Ferric reducing antioxidant power
[299] *Acutodesmus obliquus*
[300] *Desmodesmus armatus*
[301] Blue-Green Medium
[302] Bold Basal Medium

ریزجلبک‌ها، کلنی‌های رشد یافته به طور مجزا به محیط‌های کشت مایع BG-11 و BBM منتقل و در شرایط مناسب گرمخانه‌گذاری شدند. سپس نمونه‌های رشد کرده به روش رقیق‌سازی متوالی (رقت‌های 10^{-1}-10^{-8}) رقیق سازی شدند. پنج رقت آخر به پلیت‌های مجزا منتقل و در شرایط مناسب گرمخانه‌گذاری شدند. جهت شناسایی جدایه‌های خالص، ویژگی‌های مرفولوژیکی آن‌ها مطابق کتاب‌های کلید شناسایی ریزجلبک‌ها تطبیق داده شدند.

۲-۲-استخراج و سنجش میزان رنگدانه‌ها

جهت استخراج رنگدانه، به ازای هر گرم بیومس، حجم ۵۰ میلی‌لیتر متانول خالص اضافه و مخلوط شد. پس از ۱۵ دقیقه استراحت در دمای اتاق، به مدت ۲۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک با دمای ۲۵°C قرار گرفت. سپس به مدت پنج دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm، سانتریفوژ شد. جذب نوری مایع رویی حاوی رنگدانه، در طول موج‌های ۶۶۵/۲، ۶۵۲/۴ و ۴۷۰ نانومتر سنجیده و از معادلات زیر برای به‌دست آوردن مقادیر کلروفیل و کاروتنوئید تام (بر حسب میلی‌گرم بر گرم) استفاده شد. (C_a: کلروفیل a؛ C_b: کلروفیل b؛ $C_{(x+c)}$: کاروتنوئید تام؛ V: حجم عصاره متانولی؛ W: وزن تر جدایه)

$$C_a = [16.72A_{665.2} - 9.16A_{652.4}][V/1000W]$$
$$C_b = [34.09A_{652.4} - 15.28A_{665.2}][V/1000W]$$
$$C_{(X+C)} = [(1000A_{470} - 1.63C_a - 104.96C_b)/221][V/1000W]$$

۲-۳-بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها

برای سنجش میزان به دام انداختن رادیکال‌های آزاد و خواص آنتی‌اکسیدانی جدایه‌ها، از روش سنجش رادیکال آزاد DPPH استفاده گردید. حجم یک میلی‌لیتر عصاره استخراج شده به یک میلی‌لیتر محلول ۰/۲ میلی‌مولار DPPH اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. نمونه شاهد شامل یک میلی‌لیتر متانول و یک میلی‌لیتر محلول DPPH بود. جذب نوری عصاره توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد و برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی هر عصاره از معادله زیر استفاده شد. (I: درصد مهار؛ A_0: جذب شاهد؛ A_S: جذب نمونه)

$$\%I=[(A_0-A_S)/A_0]\times 100$$

۲-۴-جداسازی و بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه‌های کلروفیل a و b، کاروتن و زانتوفیل

حجم ۵۰ میلی‌لیتر عصاره استخراج شده به همراه ۵۰ میلی‌لیتر اترنفت و ۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر به دکانتور منتقل شد. بعد از جداسازی دو فاز، محلول زیرین دور ریخته و محلول باقیمانده با ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو داده شد. سپس ۵۰ میلی‌لیتر متانول خالص به آن اضافه گردید. پس از جدا شدن دو فاز، محلول هر لایه به بشر مجزا منتقل شد. سپس حجم ۵۰ میلی‌لیتر از محلول متانولی جداشده مرحله قبل به دکانتور منتقل شد و ۵۰ میلی‌لیتر اتانول همراه با ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر به محتویات دکانتور اضافه شد. محلول زیرین دور ریخته و محلول رویی (حاوی اتانول) به بشر منتقل شد. حجم ۳۰ میلی‌لیتر از هر محلول اتانولی و اترنفتی به طور مجزا به دکانتور منتقل شد. سپس حجم ۱۰ میلی‌لیتر محلول پتاس الکلی به هر دکانتور اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه، حجم ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر به محتویات هر دکانتور اضافه گردید و دو فاز در هر محلول جدا شد. در دکانتور اتانولی، کلروفیل b در بخش آب و زانتوفیل در بخش اتانول قرار گرفت. همچنین در دکانتور اتر نفتی، کلروفیل a در بخش آب و کاروتن در بخش اترنفت قرار گرفت. جهت سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی هر رنگدانه جداسازی شده نیز از روش به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH استفاده گردید.

۳. نتایج و بحث

با کشت نمونه‌های جمع آوری شده از آب شیرین مناطق مختلف در محیط کشت اختصاصی آگاردار BG-11، تعداد ۱۶ کلنی جداسازی شد. به کمک روش رقیق‌سازی متوالی کلنی‌ها، تعداد سه جدایه ریزجلبک سبز خالص‌سازی شده و با اسامی MGA1،

MGA2 و MGA3 نام‌گذاری شدند. شناسایی جدایه‌ها به کمک کلیدهای شناسایی مرفولوژیکی ریزجلبک‌های سبز، انجام شد. این جدایه‌ها به ترتیب متعلق به جنس‌های *کوئلاسترلا*[۳۰۳]، *رافیدوسلیس*[۳۰۴] (*سلنسترم*) و *سندسموس*[۳۰۵] بودند (شکل۱). ویژگی مرفولوژی جدایه‌ها به کمک میکروسکوپ نوری نشان داد جنس *کوئلاسترلا* به صورت سلول‌های نسبتا کوچک، گرد تا بیضی شکل، فاقد هسته مشخص و حاوی یک یا چند واکوئل آشکار بود. سلول‌های جنس *رافیدوسلیس* به صورت تکی، غیر متحرک، هلالی و داسی شکل با خمیدگی زیاد بودند. سلول‌های جنس *سندسموس* غیر متحرک، گرد تا بیضی شکل بوده و به صورت تکی، دوتایی و اغلب چهارتایی به دنبال هم مشاهده شدند.

رنگدانه جدایه‌ها به روش عصاره‌گیری متانولی استخراج و اندازه‌گیری شد. نتایج در جدول ۱ نشان می‌دهد بیشترین مقدار رنگدانه کلروفیل a مربوط به جدایه MGA1 و MGA3 و برابر با ۳٫۲۱ میلی‌گرم در هر گرم وزن تر ریزجلبک بود. بیشترین مقدار رنگدانه کلروفیل b نیز مربوط به جدایه MGA2 و به مقدار ۱٫۱۱ میلی‌گرم بر گرم بود. بیشترین مقدار کاروتنوئید تام نیز مربوط به جدایه MGA1 و برابر با ۱ میلی‌گرم در یک گرم وزن تر بود. پس از جدایه MGA1، بیشترین مقدار کاروتنوئید تام به ترتیب مربوط به جدایه‌های MGA3 و MGA2 و به مقدار ۰٫۹۳ و ۰٫۸۵ میلی‌گرم بر گرم بود. سپس مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره تام جدایه‌ها سنجیده شد (جدول ۱). این نتایج نشان داد عصاره تام هر سه جدایه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوب بود به طوری که بیشترین درصد مهار رادیکال آزاد مربوط به جدایه MGA1 به مقدار ۳۹٫۵۶ درصد بود که نشان دهنده ارتباط مستقیم بین رنگدانه‌های کاروتنوئیدی و میزان مهار رادیکال آزاد بود. همچنین رنگدانه‌های کلروفیل a و b، زانتوفیل و کاروتن به صورت مجزا جداسازی شدند. سپس فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه‌ها به روش DPPH سنجیده شد. نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه‌ها در جدول ۲ خلاصه شده است. نتایج نشان داد که در هر سه جدایه بیشترین درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب مربوط به رنگدانه‌های کاروتن، زانتوفیل، کلروفیل b و کلروفیل a بود.

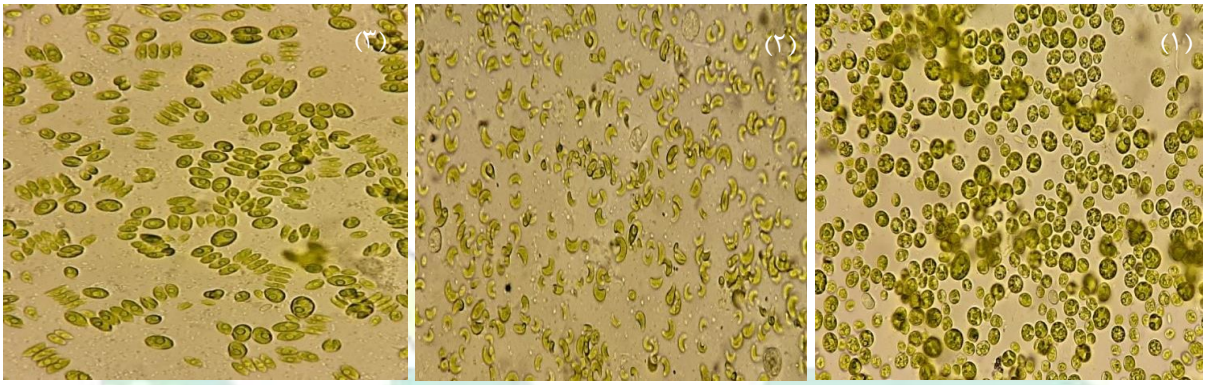
میلر و همکاران در سال ۱۹۹۶، مقایسه‌ای بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و درصد مهار رادیکال آزاد برخی ترکیبات کاروتنوئیدی انجام دادند. طبق نتایج، رنگدانه کاروتن دارای خاصیت مهار رادیکال آزاد بیشتری نسبت به رنگدانه زانتوفیل بود (Miller et al., 1996). همچنین، طی مقایسه‌ای که بین درصد مهار رادیکال چند رنگدانه که توسط پرز-گالوز و همکارانش در سال ۲۰۲۰ انجام شد، رنگدانه کلروفیل b دارای قدرت مهار رادیکال آزاد بیشتری نسبت به کلروفیل a بود (Perez-Galvez et al., 2020). این نتایج با یافته‌های پژوهش حاضر مطابقت دارد.

۴. نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد مقدار کاروتنوئید تام در ریزجلبک *کوئلاسترلا* MGA1، از دو جدایه ریزجلبک دیگر بیشتر بود. همچنین بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره تام هر جدایه نشان داد ریزجلبک MGA1، فعالیت وسیع‌تری در زمینه به دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH دارد. با مقایسه نتایج مهار رادیکال آزاد بین چهار رنگدانه جدایه‌ها، بیشترین اثر آنتی‌اکسیدانی مربوط به دو رنگدانه کاروتنوئیدی شامل کاروتن و زانتوفیل بود. در واقع بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی چهار رنگدانه جدایه‌ها، به ترتیب در کاروتن، زانتوفیل، کلروفیل b و کلروفیل a سنجیده شد. این نتایج نشان داد فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ریزجلبک‌هایی که مقدار بالاتری کاروتنوئید تولید می‌کنند، بیشتر از سایر ریزجلبک‌ها بود. از ریزجلبک‌های جداشده به علت دارا بودن مقدار بالای ترکیبات با ارزش

[303] *Coelastrella*
[304] *Raphidocelis*
[305] *Scenedesmus*

طبیعی همچون کاروتنوئیدها، می‌توان پس از اثبات عدم سمیت، برای استفاده در صنایع مختلف از جمله صنعت غذایی و دارویی پیشنهاد کرد. با توجه به مطالعات بسیار محدود در زمینه ریزجلبک‌ها، لازم است بررسی‌های بیشتری جهت بهره برداری بهینه از ترکیبات با ارزش این منابع طبیعی انجام گیرد.



شکل ۱: تصویر میکروسکوپی جدایه‌های *کوئلاسترلا* MGA1 (۱)، *رافیدوسلیس* MGA2 (۲) و *سندسموس* MGA3 (۳) به کمک میکروسکوپ نوری (X ۴۰).

جدول ۶: مقدار رنگدانه‌ها (بر حسب میلی‌گرم بر گرم) و درصد مهار رادیکال آزاد ریزجلبک‌های جدا شده از آب شیرین مازندران

جدایه	کلروفیل a	کلروفیل b	کاروتنوئید تام	درصد مهار رادیکال
Coelastrella sp. MGA1	۳٫۲۱	۱٫۰۸	۱	۳۹٫۵۶
Raphidocelis sp. MGA2	۳٫۲۱	۱٫۱۱	۰٫۸۵	۳۴٫۰۶
Scenedesmus sp. MGA3	۲٫۸۵	۰٫۶۵	۰٫۹۳	۳۶٫۲۶

جدول ۷: درصد مهار رادیکال آزاد رنگدانه‌های استخراج شده از ریزجلبک‌های جدا شده از آب شیرین مازندران

جدایه	کلروفیل a	کلروفیل b	زانتوفیل	کاروتن
Coelastrella sp. MGA1	۵٫۴۹	۱۳٫۱۸	۳۶٫۲۶	۴۸٫۳۵
Raphidocelis sp. MGA2	۴٫۲۹	۱۴٫۲۸	۲۹٫۶۷	۴۵٫۰۵
Scenedesmus sp. MGA3	۲٫۱۹	۱۲٫۰۸	۳۱٫۸۶	۴۷٫۲۵

منابع

۱. حسن سلطان سولقانی، نوروزی، آموزگار، بخشی خانیکی، غلامرضا بخشی، صدقی، ... و سید ابواحسن. (۱۳۹۷). شناسایی مورفولوژیکی-مولکولی و سنجش کلروفیل a وb و کاروتنوئید تام و فعالیت آنتی اکسیدانی جلبک‌های *Acutodesmus obliquus* و *Desmodesmus armatus*. زیست شناسی کاربردی, ۳۱(۲), ۵۲-۶۴.

2. Gong, M., & Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*, 34(8), 1396-1412.

3. Lafarga, T., Clemente, I., & Garcia-Vaquero, M. (2020). Carotenoids from microalgae. In Carotenoids: Properties, Processing and Applications (pp. 149-187). Academic Press.

4. Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M., & Rice-Evans, C. A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS letters*, *384*(3), 240-242.

5. Othman, R., Noh, N. H., Hatta, F. A. M., & Jamaludin, M. A. (2018). Natural carotenoid pigments of 6 Chlorophyta freshwater green algae species. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, *8*, 1-5.

6. Pérez-Gálvez, A., Viera, I., & Roca, M. (2020). Carotenoids and chlorophylls as antioxidants. *Antioxidants*, *9*(6), 505.

7. Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(10), 4290-4302.

8. Sasso, S., Pohnert, G., Lohr, M., Mittag, M., & Hertweck, C. (2012). Microalgae in the postgenomic era: a blooming reservoir for new natural products. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), 761-785.

9. Yu, L., Perret, J., Davy, B., Wilson, J., & Melby, C. L. (2002). Antioxidant properties of cereal products. *Journal of Food Science*, *67*(7), 2600-2603.

Introduction of molecular combing technique to prepare a physical map of the genome and its applications

Tarinejad AliReza[1*]; Ghavidel Bentolhoda[2]

1- Associate Professor of Biotechnology Department, Faculty of agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

2- PhD Student of Biotechnology Department, Faculty of agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

**Corresponding Author Email address: tarinejad@yahoo.com*

Abstract

Genome mapping is the process of describing a genome in terms of the relative position of genes and other DNA sequences, and refers to marking specific locations for genes or DNA markers on chromosomes. Genomic mapping data helps us to connect large pieces of DNA obtained from sequencing results. There are two main ways to map a genome or map a genome. A: Genetic mapping or gene linkage mapping B: Physical mapping. Both genome mapping methods require a set of markers for mapping and a method for determining the location of markers on the genome. The physical mapping methods that have been developed are able to provide a very high density map. A variety of methods for preparing physical maps of the genome include in situ hybridization with fluorescent materials or FISH (Fluorescent in situ hybridization), Molecular Combing and Gel Stretching, Restriction Mapping, Optical Mapping and STS. The Molecular Combing System (MCS) is an automated, patented instrument that stretches single DNA molecules onto vinyl silane treated glass carriers. Considering the various applications of molecular shoulder techniques such as the diagnosis of genetic and chromosomal abnormalities, genome grouping of various organisms, food safety monitoring, telomere length measurement, the study of genetically related diseases such as cancer and the study of processes in DNA length occurs. This article tries to discuss the advantages and disadvantages of molecular shoulder techniques.

Keywords: Physical map, Multalign, genetic diseases, markers

معرفی تکنیک جدید شانه مولکولی برای تهیه نقشه فیزیکی ژنوم و کاربردهای آن

علیرضا تاری نژاد[1*]؛ بنت‌الهدی قویدل[2]

۱-دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
۲-دانشجوی دکتری گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: tarinejad@yahoo.com

چکیده

نقشه برداری ژنوم فرآیند توصیف یک ژنوم از نظر موقعیت نسبی ژن‌ها و دیگر توالی‌های DNA است و به نشانه‌گذاری مکانهای مشخص ژن‌ها یا نشانگرهای DNA روی کروموزوم‌ها، اطلاق می‌شود. داده های حاصل از نقشه برداری ژنومی به ما کمک می‌کند تا قطعات بزرگی از DNA را که از نتایج توالی‌یابی بدست آمده، به هم متصل نماییم. دو روش اصلی برای تهیه نقشه ژنوم یا نگاشت ژنوم وجود دارد. الف: نقشه برداری ژنتیکی یا نقشه پیوستگی ژن ب: نقشه برداری فیزیکی. هر دو روش نقشه برداری ژنوم به مجموعه ای از نشانگرها برای نقشه برداری و روشی برای تعیین جایگاه نشانگرها روی ژنوم نیاز دارند. روشهای نقشه برداری فیزیکی که توسعه داده شده، قادرند یک نقشه با تراکم خیلی بالا را ارائه دهند. انواع روشهای تهیه نقشه‌های فیزیکی ژنوم شامل هیبریداسیون در محل با مواد فلورسنت یا FISH (Fluorescent In situ Hybridization)، Molecular Combing and Gel Stretching، Restriction Mapping، Optical Mapping و STS می‌باشند. سیستم شانه مولکولی (MCS) یک ابزار خودکار است که مولکول‌های دی ان ای تک رشته‌ای را بر روی حامل‌های شیشه ای تیمار شده با وینیل سیلان (Vinyl Silane) می‌کشد. با توجه به کاربردهای متنوع تکنیک شانه ملکولی از جمله تشخیص ناهنجاری‌های ژنی و کروموزومی، سرهم‌بندی ژنوم موجودات مختلف، پایش ایمنی مواد غذایی، اندازه‌گیری طول تلومر، بررسی بیماری‌های مرتبط با ژنتیک نظیر سرطان و غیره و نیز بررسی فرایندهایی که در طول دی ان ای رخ می‌دهد. در این مقاله سعی می‌شود بر مزایا و معایب تکنیک‌های شانه ملکولی پرداخته شود.

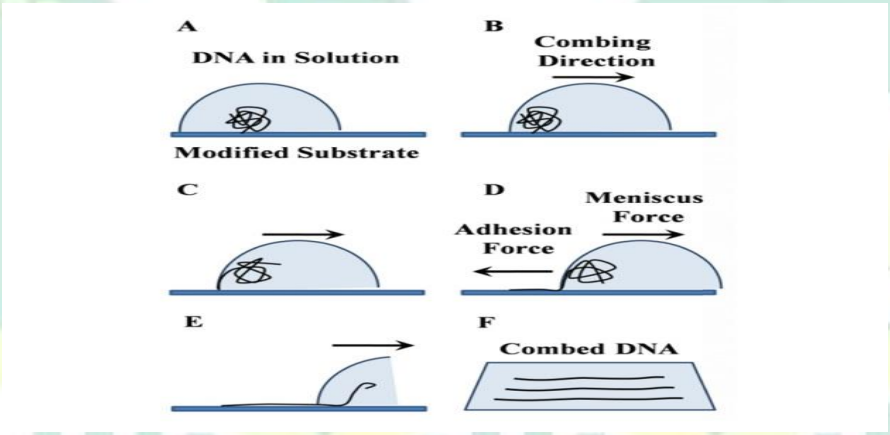
واژگان کلیدی: نقشه فیزیکی، سرهم‌بندی، بیماری‌های ژنتیکی، نشانگر

۱.مقدمه

دستکاری مستقیم و تصویر مولکول‌های DNA تک رشته‌ای با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت، باعث پیشرفت درک خواص فیزیکی و بیولوژیکی DNA شده است. کشش یکنواخت تعداد زیادی از مولکولهای بدست آمده از DNA ژنومی تک رشته‌ای روی سطح جامد، منجر به چندین برنامه مفید به ویژه در ژنتیک مولکولی شده است (Conti et al., 2001). شانه مولکولی یا آنالیز فیبر DNA (Molecular Combing and Gel stretching)، یک روش قدرتمند برای تجسم مکان‌های ژنی و توالی‌های تکراری در ژنوم است.

تجزیه و تحلیل فیبر DNA شامل استخراج DNA از سلولهاست مانند کروماتین پروتئین زدایی شده که در نهایت DNA برهنه باقی می‌ماند و سپس روی اسلاید شیشه‌ای میکروسکوپ کشیده می‌شود. این روش را می‌توان برای تشخیص و اندازه‌گیری توالی‌های ژنومی خاص، با تکنیک FISH ترکیب کرد (Kahl et al., 2020). شانه مولکولی یک فرآیند طبیعی است بیشتر شبیه موهای بلند یک شناگر هنگام بیرون آمدن از استخر که به طرف پایین شانه شده است. بنابراین، اتصال مولکولهای DNA تک‌رشته‌ای توسط یک یا هر دو انتها به سطح با استفاده از شیشه هلالی برای گسترش هر مولکول به صورت یکنواخت و موازی روی سطح صورت می‌گیرد. مزیت این روش قابل اعتماد بودن آن است، زیرا مولکولهای DNA را می‌توان به صورت کنترل شده و یکنواخت روی سطحی کشید و تعداد زیادی ژنوم را می‌توان شانه و تجزیه و تحلیل کرد. بنابراین شمار زیادی از اندازه‌گیری‌های دقیق را می‌توان در یک آزمایش واحد به دست آورد (Conti et al., 2001).

شانه زدن در سه مرحله اصلی انجام می‌شود (شکل ۱): جذب انتهای مولکول‌های DNA مارپیچ شناور به یک بستر، کشش DNA توسط نیروهای کشش سطحی در اثر خاصیت دگرچسبی (Meniscus) در حال عقب‌روی، و به دنبال آن شل شدن DNA رسوب شده روی بستر تا زمانی که کل مولکول DNA کشیده شود (Nazari and Gurevich, 2013).



شکل ۱:نمایش شماتیک مراحل اساسی در شانه مولکولی DNA تحت شرایط خاصی از pH و قدرت یونی. A) DNA از انتها دناتوره می‌شود B) و سپس توسط انتها به سطح جذب می‌شود .C) هنگامی که دگرچسبی متحرک تشکیل می‌شود، D) نیروی چسبندگی بین DNA و سطح بر نیروی دگرچسبی غالب می‌شود E) و در نتیجه، در حالی که نیروی دگرچسبی در امتداد سطح عبور می‌کند DNA پیچ خورده بر روی سطح کشیده (شانه) می‌شود (Nazari and Gurevich, 2013).

۱-۱-مزایا و معایب روش شانه مولکولی

با توجه به سایر روشهای کشش مولکولی DNA غیرپروتئینی، شانه زدن مولکولی مزیت‌هایی دارد:

۱. ضریب کشش ثابت است به این معنی که سیستم یک‌بار و برای همیشه کالیبره می‌شود.

۲. تعداد زیادی از ژنوم‌ها در هر بار می‌توانند شانه شود که امکان تجزیه و تحلیل آماری قابل اعتمادی را فراهم می‌کند (Conti et al., 2001).
۳. کشش همگن DNA توسط شانه مولکولی مستقل از طول الیاف و اندازه مولکول است و همه مولکول‌ها روی صفحه به طور یکسان کشیده می‌شوند که نقشه برداری فیزیکی با وضوح بالا را امکان پذیر می‌کند (Herrick and Bensimon, 1999).
۴. کشیدن الیاف DNA روی سطح منجر به گسترش تقریباً کامل مولکول و بهبود اتصال DNA به سطح می‌شود (Dorfman et al., 2013).
۵. در این تکنیک نیاز به هیچ تغییر شیمیایی نمی‌باشد و مولکول‌ها به طور خود به خود و به صورت یک سیم پیچ و تصادفی به سطح متصل می‌شوند (Herrick and Bensimon, 1999).

۱-۲-عیب اصلی این روش این است که:

در حین استخراج DNA و سایر مراحل کار، استرس مکانیکی وجود دارد و احتمال شکستگی الیاف DNA وجود دارد (Conti et al., ۲۰۰۱).

در حین کشیدگی DNA بر روی سطح، ترکیب DNA-پروتئین بر روی سطوح با بار مثبت، برهمکنش الکترواستاتیک ایجاد می‌شود. چنین نتایج مثبت کاذبی ممکن است مشکلاتی را در هنگام نقشه برداری مجموعه‌های DNA-پروتئین ناشناخته ایجاد کند (Sriram et al., ۲۰۱۴).

۱-۳-پارامترهای اساسی در تکنیک شانه مولکولی

کیفیت DNA: بسته به تحلیلی که باید انجام شود، شکسته شدن DNA می‌تواند یک عامل محدود کننده بخصوص در نقشه برداری ژن یا ژنوم باشد. در نتیجه بهتر است مولکولهای بلندی که اجازه رویت و اندازه‌گیری فاصله‌های طولانی را می‌دهد، در اختیار داشته باشید. برای محافظت DNA از شکستگی مکانیکی پس از رنگ آمیزی، سلول‌ها را در ژل β-agarose. تثبیت نمایید.

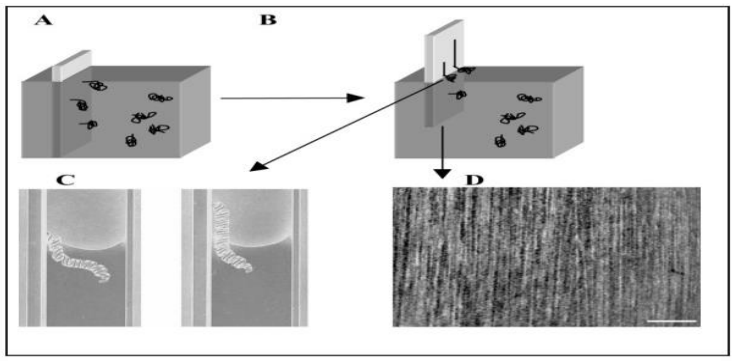
کیفیت سطوح: کارآیی شانه مولکولی بستگی به کیفیت سطوح دارد که باید تمیز، خشک و عاری از هرگونه گرد و غبار باشد. چون از شانه کردن صحیح جلوگیری می‌کنند و آب باقی مانده روی سطوح هم باعث غیرهمگن‌شدن جریان روان شده روی سطوح می‌شود.

pH: اتصال DNA بر روی سطوح بسیار متنوعی با انتخاب دقیق DNA pH انجام می‌شود. سطوح آبگریز شیشه ای پوشیده شده با وینیل، پلی استیرن، پلی دی متیل سیلوکسان یا سطوح آب دوست شیشه ای پوشیده شده با آمینوسیلان‌ها، پلی هیستیدین یا شیشه ساده تمیز شده مناسب می‌باشند و تمام این سطوح رفتار یکسانی مشاهده شده است. در pH پایین مولکولهای DNA به شدت و غیراختصاصی جذب سطح می‌شوند در حالی که در pH بالا، بسیار ضعیف جذب می‌شوند یا اصلا جذب نمی‌شوند. برای اتصال قوی و خوب DNA از طریق انتهای آن به سطح، در سطوح آبگریز بهترین کارایی در pH حدود ۵/۵ حاصل می‌شود.

الیاف DNA: مولکولهای DNA تمایلی به حل شدن در محلول ندارند. محلول DNA می‌تواند ۳۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتیگراد گرم شود تا اختلاط بهتر شود، یا می‌توان آن را چند روز قبل از شانه زدن در ۴ درجه سانتیگراد نگه داشت.

غلظت DNA: وقتی غلظت DNA زیاد باشد باید با استفاده از پروتکل‌های مخصوص آن را رقیق نمود(Conti et al., ۲۰۰۱).

فرآیند شانه کردن مولکول های DNA مارپیچ تصادفی متصل شده بر روی روکش سیلانیزه شده در شکل ۲ نشان داده شده است (Lebofsky and Bensimon, 2003).



شکل ۲: A) مولکول های DNA به صورت مارپیچ تصادفی بر روی روکش سیلانیزه شده متصل شده‌اند. B) سپس روکش با یک سرعت ثابت حذف می‌شود. C) مولکول‌ها به طور یکنواخت توسط نیروی دگرچسبی در حال عقب نشینی کشیده می‌شوند، در عین حال به ورقه متصل می‌مانند. D) آرایه‌ای از هزاران مولکول شانه شده قابل رویت است (Lebofsky and Bensimon, 2003).

۱-۴-کاربرد تکنیک شانه مولکولی

شانه مولکولی شامل شبیه‌سازی موضعی ژن‌های مرتبط با بیماری است. با این حال، شانه مولکولی محدود به مناطقی از ژنوم است که کاوشگرها از قبل در دسترس هستند. از این نظر، شانه مولکولی ممکن است مکملی برای تکنیک‌هایی مانند هیبریداسیون مقایسه‌ای ژنومی یا کاریوتایپینگ طیفی، در شناسایی تغییرات ناشناخته در مکان‌های ژنتیکی مختلف باشد (Herrick and Bensimon, ۱۹۹۹).

شانه مولکولی برای تشخیص بالینی و پایش ایمنی مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Chakraborty et al., ۲۰۱۵).

شانه مولکولی برای بررسی ناهنجاری‌های کروموزومی فاحش و تغییرات توالی‌ها در ژنوم که منجر به بیماری ژنتیکی انسان و سرطان می‌شود،کاربرد موثری دارد (Herrick and Bensimon, ۲۰۰۹).

استفاده از روش شانه مولکولی در بهبود سرهم‌بندی ژنوم قارچ نظیر پنی سیلیوم و ... (Cheeseman, ۲۰۱۳).

اندازه گیری طول تلومر: تلومرها مناطق تکراری DNA هستند که توسط پروتئین‌های اختصاصی به انتهای کروموزومها متصل شده اند. DNA تلومری به تدریج با هر دور تقسیم سلولی از کوتاه می‌شود که منجر به تجمع تلومرهای بسیار ناکارآمد و کوتاه می‌شود که در نهایت باعث پیری سلول می‌شود. به همین دلیل اندازه‌گیری طول تلومر مهم است، چون نشانگر ظرفیت تکثیر یک سلول است (Kahl et al., ۲۰۲۰).

بررسی ساختار DNA در عین حال که نقشه فیزیکی با وضوع بالایی را ارائه می‌دهد، امکان مشاهده فرآیندهایی که در سطح DNA رخ می‌دهد (مانند همانندسازی) را فراهم می‌کند (Lebofsky and Bensimon, ۲۰۰۳).

شانه مولکولی برای تشخیص و اندازه‌گیری ریزحذف‌هایی که به راحتی و با تکنیک‌های دیگر قابل شناسایی نیستند استفاده می‌شود. به عنوان مثال، شناسایی و ارزیابی اندازه ریزحذف‌ها از جمله حذف در ژن دیستروفین با این روش انجام می‌شود (Herrick and Bensimon, ۱۹۹۹).

۲.نتیجه گیری

با توجه به مزایای این سیستم از جمله ضریب کشش ثابت، شانه‌زدن همزمان تعدادی زیادی از ژنوم‌ها در هر بار ، کشش همگن DNA توسط شانه مولکولی با توجه به مستقل بودن از طول الیاف و اندازه مولکول و عدم نیاز به انجام تغییرات شیمیایی روی مولکول‌ها سبب گردیده‌است که نقشه برداری فیزیکی توسط این تکنیک با وضوح بالا امکان پذیر گردد و تشخیص بیماری‌های ژنتیکی، حذف و اضافه روی ژنوم و ناهنجاریهای کروموزومی به راحتی میسر گردد. بویژه این تکنیک هنگامی که با تکنیک FISH همراه می‌شود امکان تجسم مستقیم ساختار ژنومی و تنوع تعداد کپی‌ها و همچنین همپوشانی و شکاف بین توالی‌ها در مجموعه ژنوم را فراهم می‌کند.

منابع

Chakraborty S., Noonan PS., Monserud J. and Schwartz DK. ۲۰۱۵. Structure-specific liquid crystal anchoring induced by the molecular combing of short oligonucleotides. ACS applied materials & interfaces, ۷: ۲۶۸۷۴-۲۶۸۷۹.

Cheeseman K. ۲۰۱۳. Aspects of Penicillium genomics: Molecular combing genome assembly, genetic exchange in food and potential for secondary metabolite productionParis ۱۱.

Conti C., Caburet S., Schurra C. and Bensimon A. ۲۰۰۱. Molecular Combing. Current Protocols in Cytometry, ۱۶: ۸.۱۰.۱۱-۱۸.۱۰.۲۳.

Dorfman KD., King SB., Olson DW., Thomas JD. and Tree DR. ۲۰۱۳. Beyond gel electrophoresis: Microfluidic separations, fluorescence burst analysis, and DNA stretching. Chemical reviews, ۱۱۳: ۲۵۸۴-۲۶۶۷.

Herrick J. and Bensimon A. ۱۹۹۹. Invited review. Imaging of single DNA molecule: applications to high-resolution genomic studies. Chromosome Research, ۷: ۴۰۹-۴۲۳.

Herrick J. and Bensimon A. ۲۰۰۹. Introduction to molecular combing: genomics, DNA replication, and cancer. DNA replication: ۷۱-۱۰۱.

Kahl VF., Allen JA., Nelson CB., Sobinoff AP., Lee M., Kilo T., Vasireddy RS. and Pickett HA. ۲۰۲۰. Telomere length measurement by molecular combing. Frontiers in cell and developmental biology, ۸: ۴۹۳.

Lebofsky R. and Bensimon A. ۲۰۰۳. Single DNA molecule analysis: applications of molecular combing. Briefings in Functional Genomics, ۱: ۳۸۵-۳۹۶.

Nazari ZE. and Gurevich L. ۲۰۱۳. Molecular combing of DNA: methods and applications. Journal of Self-assembly and Molecular Electronics (SAME), ۱: ۱۲۵-۱۴۸.

Sriram K., Yeh J-W., Lin Y-L., Chang Y-R. and Chou C-F. ۲۰۱۴. Direct optical mapping of transcription factor binding sites on field-stretched λ-DNA in nanofluidic devices. Nucleic acids research, ۴۲: e۸۵-e۸۵.

CRISPR / Cas9 system as a tool for genome editing

Tarinejad AliReza*, Hadi Fahimeh

1-Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azerbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

2- PhD Student, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azerbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

*Corresponding auther: tarinejad@yahoo.com

Abstract

Traditionally, the production of new plants with improved or desirable characteristics relies on laborious techniques and time on improvement. Genome editing technologies have led to a new era of genome engineering that enables efficient, accurate and fast engineering of plant genomes. The CRISPR / Cas9 system is a new genome editing tool that is widely used in various organisms, including plants. Using this system allows the production of genomically modified plants without transgenics ("null segregants") in a short time. Genome-editing strategies have evolved over the past three decades, and today there are four programmable types of nucleases: Meganucleases, Zinc Finger Nucleases(ZFN), Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs), and Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR-Cas9). CRISPR-Cas9 system and related technologies in plant engineering not only facilitates molecular modification of crops, but also accelerates advances in basic research.

Keywords: Editing, Off target, Genome, Transgenic

سیستم CRISPR/Cas9 به عنوان ابزاری برای ویرایش ژنوم

علیرضا تاری نژاد[1*] و فهیمه هادی[2]

۱-دانشیار و عضو هیات علمی گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.

۲-دانشجوی دوره دکتری گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.

ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: tarinejad@yahoo.com

چکیده

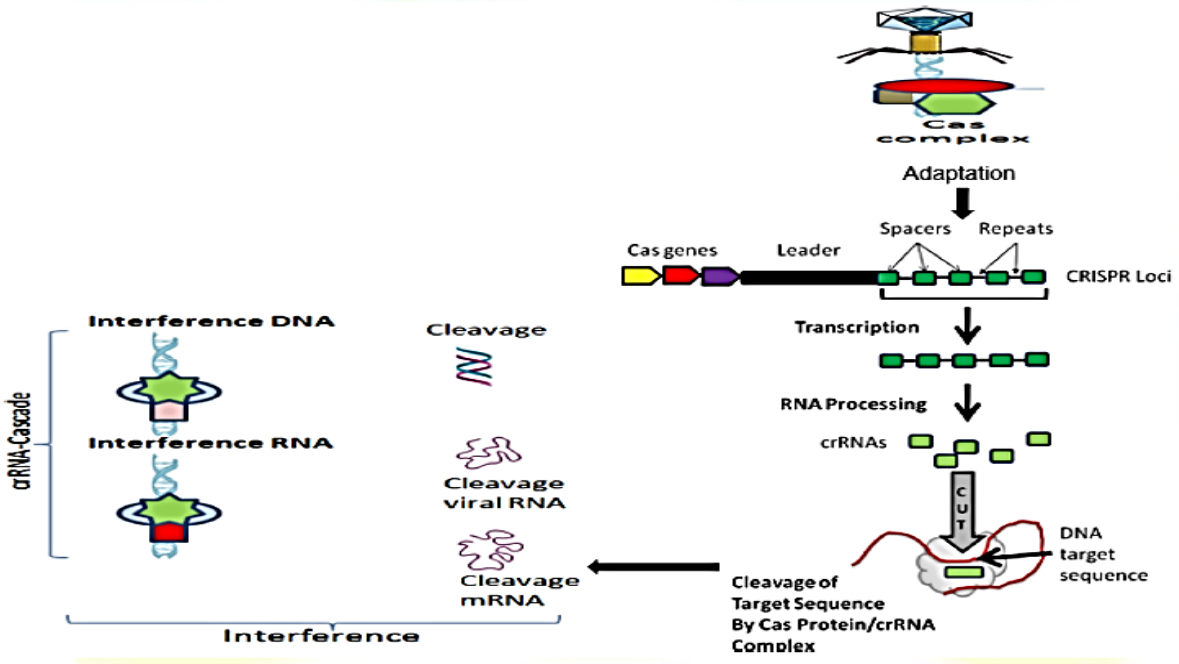
به طور سنتی، تولید گیاهان جدید با ویژگی های بهبود یافته یا مطلوب، بر تکنیک های پرزحمت و زمان بر اصلاح تکیه می‌کند. فن‌آوری‌های ویرایش ژنوم منجر به عصر جدیدی از مهندسی ژنوم شده است که امکان مهندسی مؤثر، دقیق و سریع ژنوم‌های گیاهان را فراهم می‌کند. سیستم CRISPR/Cas9 به عنوان یک ابزار جدید ویرایش ژنوم می‌باشد که به طور گسترده در موجودات مختلف از جمله گیاهان به کار می‌رود. استفاده از این سیستم امکان تولید گیاهان اصلاح شده ژنومی بدون تراریخته ("null segregants") را در مدت زمان کوتاهی فراهم می‌کند. استراتژی‌های ویرایش ژنوم در طول سه دهه گذشته تکامل یافته‌اند، و امروزه، چهار نوع نوکلئاز قابل برنامه‌ریزی در این زمینه موجود است: مگانوکلئازها، نوکلئازهای انگشت روی، نوکلئازهای مؤثر فعال‌کننده رونویسی، و تکرارهای کوتاه پالیندرومیک خوشه‌ای که به طور منظم در فواصل مختلف قرار دارند (سیستمCRISPR -Cas9). استفاده از CRISPR/Cas9 و فناوری‌های مرتبط در مهندسی گیاهان نه تنها اصلاح مولکولی گیاهان زراعی را تسهیل می‌کند، بلکه پیشرفت در تحقیقات پایه را نیز تسریع می‌نمایید.

کلمات کلیدی: ویرایش، خارج از هدف، ژنوم، تراریخته

۱. مقدمه

تولید گیاهان با صفات بهبودیافته باعث اتکای فعلی کشاورزی و صنایع مختلف به منابع گیاهی می‌شود. به طور سنتی اصلاح نباتات از طریق تلاقی و انتخاب انجام می‌شود. با این حال، روش‌های اصلاح سنتی کار و زمان بر هستند. ویرایش ژنوم اجازه می‌دهد تا توالی های DNA خاص را هدف قرار داده و اصلاح کنید. ویرایش ژنوم به مهم‌ترین ابزار بیوتکنولوژیکی تبدیل شده است که باعث رشد دانش بیولوژیکی ما و خود حوزه بیوتکنولوژی با کمک‌های فوق‌العاده‌ای شده است. در طول دهه گذشته، پلتفرم های ویرایش ژنوم در بیش از ۴۵ جنس از گیاهان ایجاد و اعمال شده است (Shan et al., 2020). سیستم CRISPR/Cas جدیدترین پلت فرم در زمینه ویرایش ژنوم است. این سیستم در سال ۲۰۱۳ توسعه یافت و به عنوان نسل سوم ابزارهای ویرایش ژنومی شناخته می شود. تکرارهای پالیندرومیک کوتاه خوشه‌ای با فاصله منظم، که گاهی اوقات «تکرارهای کوتاه با فاصله منظم» نامیده می‌شوند، در دهه ۱۹۸۰ کشف شدند. تحقیقات نشان داد که آنها در بیش از ۴۰ درصد از باکتری‌های توالی‌یابی‌شده و ۹۰ درصد آرکی‌ها یافت می‌شوند. پروتئین‌های Cas که توسط این ژن‌ها کدگذاری می‌شوند، حوزه‌های عملکردی مشابه اندونوکلئازها، هلیکازها، پلیمرازها و پروتئین‌های متصل

شونده به نوکلئوتید را حمل می‌کنند. علاوه بر این، نقش CRISPRs به عنوان سیستم ایمنی سازگار باکتریایی در برابر باکتریوفاژهای مهاجم و غیره و در ترمیم DNA مشخص شده است. بر خلاف دو فناوری قبلی (ZFN و TALEN)، که در آن تشخیص مکان DNA بر اساس تشخیص توالی توسط پروتئین های مصنوعی که نیاز به تعامل بین پروتئین و DNA دارند، تشخیص DNA در سیستم CRISPR/Cas بر اساس فعل و انفعالات RNA-DNA است. سیستم کریسپر مزیت‌های متعددی نسبت به ZFNها و TALENها دارد. اینها شامل طراحی آسان برای هر هدف ژنومی، پیش‌بینی آسان در مورد سایت‌های خارج از هدف، و احتمال اصلاح چندین سایت ژنومی به طور همزمان (مولتی پلکس) است. سیستم‌های CRISPR-Cas متنوع هستند و تاکنون به دو کلاس، شش نوع، و بیش از ۲۰ زیرگروه بر اساس آرایش مکان و ژن‌های Cas طبقه‌بندی شده‌اند(Koonin et al., 2017). نوع‌های I، III، و IV، با کمپلکس های چند پروتئینی افکتور crRNA، سیستم های کلاس ۱ هستند. انواع II، V و VI، با یک کمپلکس موثر پروتئین-crRNA، کلاس ۲ هستند. همه سیستم‌های CRISPR-Cas برای عملکرد به پروتئین‌های Cas و crRNA نیاز دارند، و بیان CRISPR-cas پیش نیازی برای به دست آوردن spacerهای جدید است. crRNA، و کمپلکس های تداخلی crRNA ، ریبونوکلئوپروتئین را برای تخریب توالی هدف گردآوری می‌کند. سیستم CRISPR/Cas9 از هسته Cas9 و RNA تک راهنما (sgRNA) ساخته شده است (شکل ۱).



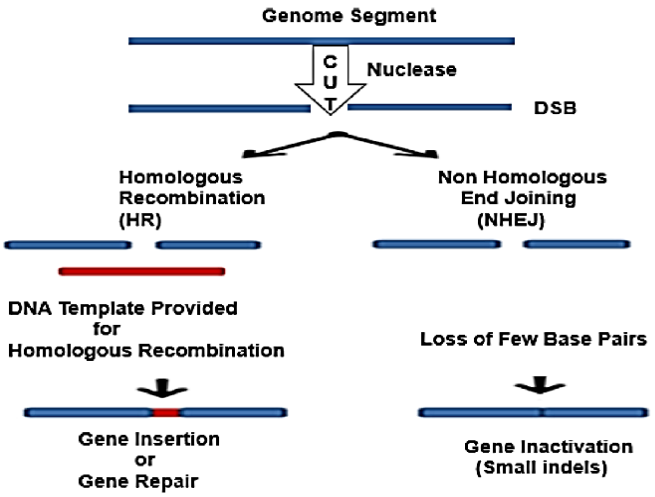
شکل ۱: نمایش شماتیک مکان‌های CRISPR و هدف قرار دادن توالی DNA، که شامل ژن های Cas، یک توالی رهبر و چندین توالی فاصله دهنده مشتق شده از DNA مهندسی شده یا خارجی است که توسط توالی های تکرار مستقیم کوتاه از هم جدا می شوند. سه مرحله اصلی سیستم ایمنی CRISPR-Cas. در مرحله انطباق، پروتئین‌های Cas قطعات خاصی را از DNA خارجی جدا می‌کنند و آن را در توالی تکراری مجاور رهبر در جایگاه CRISPR ادغام می‌کنند. سپس، آرایه‌های CRISPR رونویسی و به crRNA های متعددی پردازش می‌شوند که هر کدام یک توالی فاصله‌دهنده و بخشی از توالی تکرار مجاور را دارند. در نهایت، در مرحله تداخل، crRNA ها در کلاس‌های مختلفی از کمپلکس‌های هدف‌گیری پروتئین جمع‌آوری می‌شوند که توالی‌های منطبق بر عنصر مهاجم یا رونوشت‌های آن‌ها را بازپخش کرده و می‌شکنند و در نتیجه آنها را از بین می‌برند (Khalil 2020).

sgRNA توالی هدف را با جفت شدن با دی ان ای ژنوم تشخیص می‌دهد. باید یک موتیف DNA به نام موتیف مجاور پروتوسپیسر (PAM[306]) بر روی ژنوم وجود داشته باشد. پروتئین Cas نوع وحشی استرپتوکوکوس پیوژنز (SpCas9) که معمولاً مورد استفاده قرار می گیرد، توالی PAM خاص، ’NGG-3-‘ را شناسایی می‌کند، که در آن "N" می تواند هر پایه نوکلئوتیدی باشد .این توالی مستقیماً در پایین دست توالی هدف در DNA ژنومی، روی رشته غیرهدف قرار دارد(Cong et al., 2013). لازم به تاکید است که استفاده از این رویکرد در ویرایش ژنوم یوکاریوت‌ها، تنها به دستکاری توالی کوتاهی از RNA نیاز دارد و نیازی به دستکاری های پیچیده در حوزه پروتئین نیست. این امکان طراحی سریع‌تر و مقرون به صرفه‌تر بخش تشخیص DNA را در مقایسه با فناوری‌های ZFN و TALEN فراهم می‌کند. کاربردهای سیستم‌های CRISPR-Cas9 مانند برنامه‌های ZFN، TALEN و MegaN متغیر است. اما به دلیل سادگی نسبی این سیستم و کارایی زیاد می‌توان آن را برای گونه‌ها و انواع سلول‌های مختلف اعمال کرد (Huo et al., 2019).

۱-۱-ترمیم دی ان ای

با ابزارهای ویرایش ژنوم، از طریق ایجاد برش‌های دو رشته ای در یک ناحیه‌ای شناخته شده از ژنوم و به دنبال آن ترمیم این برش‌ها توسط سازوکارهای نوترکیبی هومولوگ (Homologous Recombination) یا اتصال انتهاهای غیرهومولوگ (Non-Homologous End Joining)، می‌توان تغییرات ژنتیکی مورد نظر را ایجاد کرد. اولین گام مهم در ویرایش ژن زمانی به دست آمد که محققان نشان دادند وقتی بخشی از DNA شامل بازوهای همولوگ در هر دو انتها به سلول وارد می‌شود، می‌تواند از طریق نوترکیبی همولوگ (RH) در ژنوم میزبان ادغام شود و می‌تواند تغییرات مورد نظر را در سلول اعمال کند. استفاده از منابع انسانی به تنهایی در اصلاح ژنتیکی مشکلات و محدودیت‌های زیادی از جمله ادغام ناکارآمد DNA خارجی و ادغام تصادفی در مکان ژنومی نامطلوب ایجاد کرد. در نتیجه، تعداد سلول‌های دارای ژنوم اصلاح‌شده کمتر بوده و مکان‌یابی در میان میلیون‌ها سلول دشوار می‌باشد. بدیهی است که لازم بود روشی ایجاد شود که توسط آن دانشمندان بتوانند بازده را ارتقا دهند. از میان این محدودیت‌ها، پیشرفت زمانی حاصل شد که مشخص شد، در سلول‌های یوکاریوتی، مکانیسم‌های هدف‌گیری ژنی کارآمدتر و دقیق‌تر را می‌توان با القای یک شکست دو رشته‌ای (DSB) در یک ناحیه ژنومی مشخص به دست آورد (Rouet et al., 1994). محققان دریافتند که اگر یک آنزیم محدودکننده DNA مصنوعی به سلول وارد شود، DNA را در مکان‌های شناسایی خاص توالی‌های DNA دو رشته‌ای (dsDNA) برش می‌دهد. بنابراین، هم ترمیم HR و هم ترمیم اتصال انتهایی غیرهمولوگ (NHEJ) را می توان افزایش داد (Cohen-Tannoudji et al., 1998). ابزارهای ویرایش ژن شامل درج، حذف یا جایگزینی برنامه ریزی شده بخش خاصی از ژنوم یک سلول زنده است. اهداف بالقوه ویرایش ژن شامل ترمیم ژن جهش یافته، جایگزینی ژن از دست رفته، تداخل با بیان ژن یا بیان بیش از حد یک ژن طبیعی است. NHEJ روشی مستعد خطا بوده و در آن برش دو رشته‌ای (DSB) از طریق ایجاد حذف و اضافه شدن‌های کوچک[307](Indel) تعمیر می‌شود؛ بنابراین در تحقیقات اکثرا از این سیستم برای ایجاد موتاسیون و غیرفعال سازی ژن استفاده می‌شود. این مسیر وابسته به چرخه سلولی نیست و نیاز به الگو ندارد. HR مسیری دقیق است که در آن مکانیسم تعمیر بر اساس استفاده از یک‌رشته الگو می‌باشد؛ بنابراین از این مسیر عمدتاً برای حذف یا اضافه دقیق بخش‌های هدف ژنوم و یا واردکردن دقیق ژن خارجی به یک محل شناخته‌شده در ژنوم استفاده می‌شود (شکل ۲). HR به یک قالب ترمیمی همسان مثل کروماتید خواهر، نواحی هومولوگ دیگر یا اهدا ترمیم ناهمسان نیاز دارد و اصولا در فاز S/G2 در چرخه سلولی رخ می دهد (طالبی و وحیدی مهرجردی ۱۳۹۸).

[306] protospacer adjacent motif
[16] Insertion and deletion



شکل۲: نتایج ویرایش ژنوم. نوکلئازهای ویرایش کننده ژنوم باعث ایجاد گسست های دو رشته ای (DSB) می شوند. شکستگی ها از دو طریق ترمیم می شوند: با اتصال انتهایی غیر همولوگ (JEHN) در غیاب یک الگوی دهنده یا از طریق نوترکیبی همولوگ (RH) در حضور یک الگوی دهنده. NHEJ تعداد کمی درج یا حذف پایه ایجاد می‌کند که منجر به ایندل یا تغییر قاب می‌شود که باعث اختلال در ژن می شود. در مسیر HR، یک DNA دهنده (یک پلاسمید یا اولیگونوکلئوتید تک رشته ای) می تواند به محل هدف ادغام شود، نوکلئوتیدها را معرفی کند و منجر به درج cDNA یا القای تغییر چارچوب شود و ژن را اصلاح کند (Khalil 2020).

۱-۲-ساختار gRNA و کمپلکس Cas9

هیبرید CrRNA به همراه tracrRNA منجر به تشکیل یک RNA راهنمای شیمر با ساختار سنجاق سری می‌شود. tracrRNA به عنوان داربست برای اتصال آنزیم Cas به توالی هدف عمل می‌کند. اختصاصیت اتصال Cas9 به DNA هدف توسط دو توالی sgRNA که بر اساس مکمل بودن جفت بازها تشخیص می‌دهد و وجود یک protospacer در مجاور موتیف PAM با توالی NGG که در پایین دست ناحیه هدف قرار دارد، تعیین می شود. سنتز crRNA و tracrRNA در مهندسی هدف‌دار ژنوم به صورت یک RNA کایمری تحت عنوان gRNA انجام می‌شود که از طریق ایجاد یک ساختار سنجاق سری عملکرد هر دو RNA را تقلید می‌کند (شکل۳). پروتئین Cas9 و دمین های تشکیل دهنده آن بشرح زیر می‌باشد:

دمین RECI: بزرگترین دمین Cas بوده و در اتصال gRNA دخالت دارد.

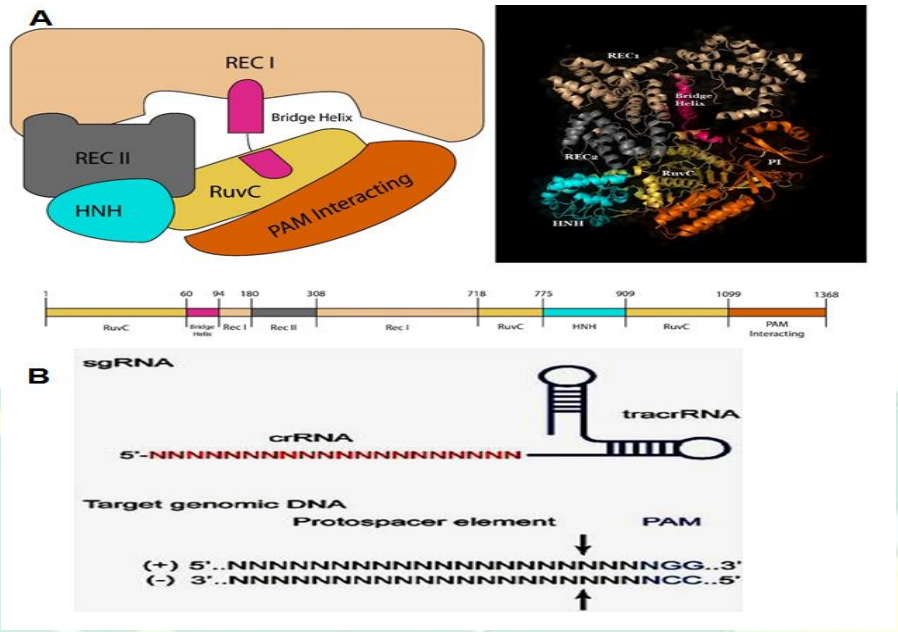
دمین RECII: فعالیت این دمین نامشخص است.

دمین برهمکنش PAM: فعالیت این دمین در شناسایی توالی PAM و اتصال gRNA است.

دمین Bridge-helix: غنی از نوکلئوتیدهای گوانوزین در نگهداری gRNA و امکان ایجاد برش توسط دمین های HNH و RuvC را در موقع هیبریداسیون DNA هدف و gRNA فراهم می‌کند.

در هنگام ایجاد کمپلکس بین Cas9 و gRNA، کنفورماسیون دمین‌های RECII، HNH، RuvC تغییر کرده و کمپلکس فعال Cas9 ایجاد می‌شود. دمین های HNH و RuvC (۴-۳ نوکلئوتید) بالادست توالی PAM را برش می‌دهند. ۱۸-۱۲ نوکلئوتید

بالادست توالی PAM ناحیه seed region نامیده می‌شود که بین توالی DNA هدف و gRNA هیبریداسیون ایجاد می‌شود. اختصاصیت این ناحیه در سیستم CRISPR/Cas9 بسیار حائز اهمیت است. کمپلکس Cas9 با ایجاد برش‌های دو رشته‌ای در DNA ژنومی منجر به ایجاد ویرایش ژنوم در توالی هدف می‌شود.



شکل۳: A) پروتئین Cas9 و دمین‌های تشکیل دهنده آن، برگرفته از سایت https://sites.tufts.edu/crispr/crispr-mechanism/. B) تصویر RNA راهنما که نتیجه اتصال crRNA (۲۰ نوکلئوتید قرمز رنگ) و داربست tracrRNA (آبی رنگ) می‌باشد. توالی DNA هدف که شامل پروتواسپیسر (۲۰ نوکلئوتید مشکی رنگ) و در بالادست عناصر کمکی (NGG و PAM آبی رنگ). فلش‌ها محل شکستگی‌های ایجاد شده توسط اندونوکلئاز Cas9 را نشان می‌دهد.

برای دستیابی CRISPR/Cas9 به وعده‌های خود به عنوان یک روش قدرتمند برای ویرایش ژنوم، اثر خارج از هدف موضوعی ضروری برای مطالعات آینده است. تغییرات ژنتیکی غیر اختصاصی و ناخواسته (اثر خارج از هدف) ناشی از استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 می‌تواند یکی از معایب این ابزار باشد و بایستی از طریق طراحی sgRNA مناسب، اثر خارج از هدف به حداقل کاهش یابد. بنابراین، این نکته برای استفاده در تحقیقات باید مورد توجه قرار گیرد. یک استراتژی برای کاهش فعالیت خارج از هدف، جایگزینی آنزیم Cas9 استرپتوکوک پیوژنز جهش یافته (SpyCas9) برای برش با آنزیم ncas9 است، که یک رشته را از طریق غیرفعال کردن دمین نوکلئاز Ruvc یا HNH برش می‌دهد(Cao et al., 2016).

۱-۳-کاربرد ویرایش ژنوم در گیاهان

توانایی سیستم های انتقال ژن به روش فوق برای هدف قرار دادن و دستکاری ژنوم موجودات زنده برای بسیاری از محققان در سراسر جهان جذاب بوده است. با وجود تمام محدودیت‌ها، علاقه به این فناوری قابلیت های آن را توسعه داده و دامنه کاربرد آن را افزایش داده است. فناوری مهندسی ژنوم/ژن نسبتاً کاربردی است و پتانسیل آن را دارد که به طور موثر و سریع جراحی ژنوم را متحول کند

و به زودی کشاورزی، تغذیه و پزشکی را متحول خواهد کرد. ویرایش ژنوم به ویژه برای متخصصان کشاورزی جذاب بوده است. یکی از اهداف اصلی استفاده از ابزارهای ویرایش ژنوم در گیاهان، تولید واریته‌های گیاهی بهبودیافته با عملکرد بالاتر و افزودن واضح صفات ارزشمند مانند ارزش غذایی بالا، ماندگاری طولانی مدت، تحمل استرس، مقاومت در برابر بیماری و آفات یا حذف صفات نامطلوب است (Abdallah et al., 2015). با این حال، موانع متعدد مربوط به دقت دستکاری‌های ژنتیکی و ناسازگاری گونه‌های میزبان، توسعه بهبود محصول را با مشکل مواجه کرده است(Aglawe et al., 2018). استفاده از نوکلئازهای خاص سایت یکی از تکنیک‌های امیدوارکننده مهم ویرایش ژن است که به غلبه بر محدودیت‌های خاص با هدف قرار دادن مکان مناسب در یک ژن/ژنوم کمک کرد. به نظر می‌رسد استفاده از فناوری‌های ویرایش ژن، از زمان ظهور آن‌ها بی‌پایان بوده است، و چندین پیشرفت در ابزارهای اصلی باعث دقت بیشتر این روش‌ها شده است(Khalil 2020). با انتخاب توالی هدف، بیان ژن را می توان با مهار میزان رونویسی RNA پلیمراز II (polII) یا با مهار اتصال فاکتور سیگما رونویسی را کنترل نمود(Larson et al., 2013).

۱-۴- تولید گیاهان غیرتراریخته با ژنوم ویرایش شده

به دنبال پیشرفت انقلابی ویرایش ژنوم گیاهی با واسطه CRISPR/Cas9، محققان بر روی توسعه رویکردهای کارآمد برای ایجاد گیاهان ویرایش شده با ژنوم بدون تراریخته تمرکز کرده‌اند. حذف تراریخته‌ها به دستیابی به ویرایش دقیق ژنوم کمک می‌کند، که در آن تغییرات غیرضروری در ژنوم ایجاد نمی‌شود. حذف ژن Cas9 از گیاهان ویرایش شده توسط ژنوم نیز از القای جهش در مکان های هدفمند جلوگیری می کند. چندین ابزار و رویکرد، همانطور که بعداً ذکر شد، تا کنون برای کاهش اثرات خارج از هدف ایجاد شده‌اند، اگرچه جهش‌های ناخواسته در مکان‌های خارج از هدف نیز می‌توانند با تلاقی در نسل‌های متوالی در گیاهان حذف شوند. حذف تراریخته‌ها همچنین نگرانی‌ها در مورد گیاهان ویرایش‌شده ژنوم را کاهش می‌دهد.

۲.نتیجه‌گیری

ظهور فناوری های ویرایش ژنوم، مهندسی ژنوم گیاهان را متحول کرده است. به طور خاص، سیستم CRISPR/Cas9 با ارائه رویکرد آسان، کارآمد و دقیق برای ویرایش ژنوم، سرعت پروژه‌های تحقیقاتی را افزایش داده است. علاوه بر این، CRISPR/Cas9 فقط قیچی برای بریدن DNA ژنوم نیست. می تواند یک نوکلئوتید را به نوکلئوتید دیگر تغییر دهد و تغییرات اپی ژنتیکی را در محل مورد نظر تغییر دهد. سیستم‌های جدید CRISPR/Cas در حال رونمایی است و توسعه فناوری‌های جدید به طور مداوم در این زمینه گزارش می‌شوند، و نشان می‌دهد جعبه ابزار CRISPR برای مهندسی گیاهان در آینده نزدیک بیشتر گسترش خواهد یافت.

منابع

مهرداد طالبی و محمد یحیی وحیدی مهرجردی. ۱۳۹۸. مروری بر سیستم نوین ویرایش ژنومی. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد. دوره ۲۷، شماره ۵.

Abdallah NA., Prakash CS and McHughen AG. 2015. Genome editing for crop improvement: challenges and opportunities. GM Crops & Food 6:183-205.
Aglawe SB., Barbadikar KM, Mangrauthia SK and Madhav MS. 2018. New breeding technique "genome editing" for crop improvement: applications, potentials and challenges. 3 Biotech 8:1-20.
Bibikova M., Carroll D, Segal DJ, Trautman JK, Smith J, Kim Y-G and Chandrasegaran S. 2001. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. Molecular and cellular biology 21:289-297.
Cao J., Wu L, Zhang S-M, Lu M, Cheung WK, Cai W, Gale M, Xu Q and Yan Q. 2016. An easy and efficient inducible CRISPR/Cas9 platform with improved specificity for multiple gene targeting. Nucleic acids research 44:e149-e149.
Christian ML., Demorest ZL, Starker CG, Osborn MJ, Nyquist MD, Zhang Y, Carlson DF, Bradley P, Bogdanove AJ and Voytas DF. 2012. Targeting G with TAL effectors: a comparison of activities of TALENs constructed with NN and NK repeat variable di-residues.
Cohen-Tannoudji M., Robine S, Choulika A, Pinto D, El Marjou F, Babinet C, Louvard D and Jaisser F. 1998. I-Sce I-induced gene replacement at a natural locus in embryonic stem cells. Molecular and cellular biology 18:1444-1448.
Cong L., Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W and Marraffini LA. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 339:819-823.
Doudna JA and Charpentier E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science 346.
Gaj T, Sirk SJ, Shui S-l, Liu J. 2016. Genome-editing technologies: principles and applications. Cold Spring Harbor perspectives in biology 8:a023754.
Gupta A., Hall VL, Kok FO, Shin M, McNulty JC, Lawson ND and Wolfe SA. 2013. Targeted chromosomal deletions and inversions in zebrafish. Genome research 23:1008-1017.
Hubbard BP., Badran AH, Zuris JA, Guilinger JP, Davis KM, Chen L, Tsai SQ, Sander JD, Joung JK and Liu DR. 2015. Continuous directed evolution of DNA-binding proteins to improve TALEN specificity. Nature methods 12:939-942.
Huo Z, Tu J., Xu A, Li Y, Wang D, Liu M, Zhou R, Zhu D, Lin Y and Gingold JA. 2019. Generation of a heterozygous p53 R249S mutant human embryonic stem cell line by TALEN-mediated genome editing. Stem cell research 34:101360.
Jaganathan D., Ramasamy K, Sellamuthu G, Jayabalan S and Venkataraman G. 2018. CRISPR for crop improvement: an update review. Frontiers in plant science 9:985.
Jansen R., Embden JDv, Gaastra W and Schouls LM. 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. Molecular microbiology 43:1565-1575.
Jinek M., Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA and Charpentier E. 2012. A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. science 337:816-821.
Khalil AM. 2020. The genome editing revolution. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 18:1-16.
Khan SH. 2019. Genome-editing technologies: concept, pros, and cons of various genome-editing techniques and bioethical concerns for clinical application. Molecular Therapy-Nucleic Acids 16:326-334.
Koonin EV., Makarova KS and Zhang F. 2017. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. Current opinion in microbiology 37:67-78.
Larson MH., Gilbert LA, Wang X, Lim WA, Weissman JS and Qi LS. 2013. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. Nature protocols 8:2180-2196.
Osakabe Y and Osakabe K. 2015. Genome editing with engineered nucleases in plants. Plant and Cell Physiology 56:389-400.
Rouet P., Smih F and Jasin M. 1994. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. Molecular and cellular biology 14:8096-8106.
Shan S., Soltis PS, Soltis DE and Yang B. 2020. Considerations in adapting CRISPR/Cas9 in nongenetic model plant systems. Applications in plant sciences 8:e11314.

Silva G., Poirot L, Galetto R, Smith J, Montoya G, Duchateau P and Pâques F. 2011. Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy. Current gene therapy 11:11-27.
Tu Z., Yang W, Yan S, Yin A, Gao J, Liu X, Zheng Y, Zheng J, Li Z and Yang S. 2017. Promoting Cas9 degradation reduces mosaic mutations in non-human primate embryos. Scientific reports 7:1-11.
Wang H., La Russa M and Qi LS. 2016. CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond. Annual review of biochemistry 85:227-264.
Zhang F., Wen Y and Guo X. 2014. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. Human molecular genetics 23:R40-R46.
Zhang Y., Zhang F, Li X, Baller JA, Qi Y, Starker CG, Bogdanove AJ and Voytas DF.2013. Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. Plant physiology 161:20-27.



مقالات کامل

(جانوری و زیست دریا)

دبیرخانه:
استان گلستان، شهرستان گنبد کاووس، دانشگاه گنبد کاووس، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، گروه زیست‌شناسی

Oxidative stress biomarkers and histopathology of Californian red earthworms treated with expired fungicide penconazole

Fariba Karami [1], Mehran Arabi [2*], Mohammad Shadkhast[3]

1- MSc student in Animal physiology, Animal sciences group, Faculty of basic sciences, Shahrekord university
2- Associate Prof. in Animal physiology, Animal sciences group, Faculty of basic sciences, Shahrekord university
3- Associate Prof. in Histology, Deparment of basic sciences, Faculty of Veterinary, Shahrekord University

* *mehranarabi@hotmail.com*

Abstract

As an agricultural fungicide, penconazole is widely used and has adverse effects on various organisms. Earthworms as important bioindicators in the soil are used in detection of many of chemical pollutions in the ecosystems. The aim of the present study is to evaluate toxicity of expired penconazole on oxidative stress (OS) biomarkers and histopathology of Californian red earthworms *Eisenia foetida*. First, the acute LC_{50} for expired penconazole was calculated by means of probit method as ≥280 mg/kg dry soil. Then, earthworms were exposed for 4 and 8 days to sublethal concentrations (1/5, 1/10 and 1/20 of LC_{50}) of pesticide. At the end, earthworms were washed and homogenates were made. The OS biomarkers namely content of lipid peroxidation (LPO/MDA), catalase (CAT) activity and carbonylated protein (CP)(Oxidized) content in homogenates were measured by spectrophotometer. Meanwhile, the histopathological analyses were performed .Our results showed an elevation in LPO and CP contents, and a decrease in CAT activity. Histopathological analyses also revealed that tissue damages were observed in the surface (Epidermis) of earthworm's body .Collectively, expired penconazole could induce OS and related oxidative damages in earthworms.

Keywords: Expired pesticide, Soil pollution, Earthworm, MDA, Oxidative damages

بیومارکرهای استرس اکسیداتیو و هیستوپاتولوژی کرم های خاکی قرمز کالیفرنیایی تیمار شده با قارچ کش پنکونازول تاریخ مصرف گذشته

فریبا کرمی[۱] ؛ مهران عربی[۲*] ؛ محمد شادخواست[۳]

۱- دانشجو کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد

۲- دانشیار فیزیولوژی جانوری، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد

۳- دانشیار بافت شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد

* *mehranarabi@hotmail.com*

چکیده

پنکونازول (Penconazole) علی رغم این که به عنوان یک قارچ کش به میزان زیادی در کشاورزی مورد استفاده دارد اما با این حال دارای اثرات منفی ناخواسته بر موجودات زنده اطراف نیز هست. کرم‌های خاکی به عنوان اندیکاتورهای مهم زیستی جهت تشخیص بسیاری از آلودگی‌های شیمیایی خاک در انواع اکوسیستم‌ها، مورد استفاده دارند. هدف از انجام این پژوهش بررسی سمیت پنکونازول تاریخ مصرف گذشته (Expired) بر بیومارکرهای استرس اکسیداتیو (OS) و هیستوپاتولوژی در کرم های خاکی قرمز کالیفرنیایی (Eisenia fetida) بوده است. ابتدا LC_{50} حاد برای آفت کش به میزان ۲۸۰≤ mg/kg dry soil به کمک روش Probit محاسبه گردید. سپس کرم ها به مدت ۴ و ۸ روز در معرض غلظت‌های زیر حد کشندگی ($\frac{1}{5}$ ، $\frac{1}{10}$ و $\frac{1}{20}$ از LC_{50}) قرار داده شدند. در انتها کرم‌ها شسته شده و از آنان هوموژنیت تهیه گردید. بیومارکرهای OS شامل محتوی پراکسیداسیون لیپیدها (MDA/LPO)، فعالیت آنزیمی کاتالاز (CAT) و نیز محتوی پروتئین های اکسید شده یا کاربولینه (CP) در هوموژنیت ها به روش اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شدند. بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی نیز به انجام رسید. نتایج نشان دهنده ی یک افزایش در محتوی LPO و CP، و نیز یک کاهش در فعالیت CAT بود. آنالیزهای هیستوپاتولوژیکی نیز نشان دهنده ی آسیب های بافتی در سطح بدن (اپیدرم) کرم های خاکی بود. رویهم رفته، پنکونازول تاریخ مصرف گذشته توانسته موجب القای OS و تحمیل آسیب های اکسیداتیو مربوطه در بافت های بدن کرم های خاکی گردد.

واژگان کلیدی: آفت کش تاریخ مصرف گذشته، آلودگی خاک، کرم خاکی، آسیب های اکسیداتیو

۱. مقدمه

افزایش جمعیت و تقاضای روزافزون برای غذا، کشاورزان را بر آن داشته که از آفت کش ها (Pesticides) در جهت پیشگیری و یا نابودی آفات، به منظور افزایش محصول در مزارع و باغات استفاده نمایند. آفت‌کش‌ها پس از استفاده توانایی ورود به بافت‌های بدن موجودات زنده و آلوده سازی محیط اطراف را دارا هستند. به دلیل آن که خاک منبع مواد غذایی برای گیاهان، جانداران خاکزی و

میکروارگانیسم و نیز جانوران گیاه خوار است لذا ورود آلاینده ها به درون آن از جمله مهم ترین اشکال آلودگی ناشی از آفت کش ها محسوب می گردد. خلاصه آن که هرگونه اختلال در شکل گیری زنجیره های غذایی به عنوان خطری بالقوه برای جانداران مرتبط با آنان محسوب می شود (Bustos-Obregon and Goicochea, 2002; Wang et al., 2012; Tudi et al., 2021) .

کرم های خاکی (Earthworms) به دلیل نقش مهمی که در تقویت خاک از طریق فرآیندهای زیستی و فیزیکوشیمیایی دارند و نیز به علت پراکنش گسترده ای که در انواع خاک ها دارند' به عنوان مدلی مناسب برای استفاده در بسیاری از تست های تاکسیکولوژی (سم شناسی) و ارزیابی های محیطی مورد استفاده زیاد قرار می گیرند. این جانوران در بهبود اجزا و حاصلخیزی خاک وارد عمل شده و سبب افزایش سرعت بهبود ساختار خاک نیز می شوند (Bustos-Obregon and Goicochea, 2002).

آفت کش ها انواع مختلفی داشته که پرکاربردترین آنان شامل: ۱- حشره کش ها ۲- علف کش ها و ۳- قارچ کش ها هستند (De Souse and de Andrea, 2011). از جمله آفت‌کش‌های مهم قارچ‌کش‌ها بوده که به منظور حذف قارچ و یا مهار رشد اسپور آنان کاربرد دارند. قارچ‌کش‌ها در کشاورزی و نیز در مبارزه با آلودگی‌های قارچی در بدن حیوانات از ارزش زیادی برخوردارند. آفت‌کش‌ها و به ویژه قارچ‌کش‌ها تاثیرات نامطلوبی بر محیط پیرامونی و سلامت موجودات زنده از جمله انسان دارند. از جمله این موارد می توان به تاثیراتی که بر عملکرد برخی آنزیم‌ها داشته و در طی آن موجب بروز اختلالات فیزیولوژیکی در بدن جانداران می شوند اشاره نمود (Wang et al., 2012; Feliziani and Romanazzi, 2013).

پنکونازول (Penconazole) از انواع قارچ کش های تریازولی با فرمول ساختمانی $C_{13}H_{14}N_3Cl_2$ بوده که متعلق به گروه قارچ‌کش های سیستمیک است. نام شیمیایی این قارچ کش 1-(2,4-dichloro-ß-propylphenethyl)-1H-1,2,4-triazole است. پنکونازول به خصوص برای کنترل عفونت کپک پودری کاربرد زیاد دارد. این قارچ‌کش با ایجاد اشکال در بیوسنتز استرول‌ها در غشای سلول های قارچی موجب محافظت از میوه هایی مثل سیب و انگور و برخی سبزیجات می شود. برای انگور نیز حذف سفیدک سطحی قابل ذکر است (Pose-Juan et al., 2010; Sharkawy and El-Nisr, 2013). روش استفاده از این قارچ کش به صورت محلول پاشی است که پس از جذب از برگ ها در بافت های گیاهی منتشر می گردد (Cordero-Bueso et al., 2014).

میزان LD_{50} خوراکی پنکونازول در Rat برابر Oral $LD_{50} \geq 2125$ mg/kg است. در کرم خاکی *Eisenia fetida* (دوره ۱۴ روزه) برابر $LC_{50} \geq 1000$ mg/kg dry soil و نیز در ماهی قزل آلا در طی یک دوره ۹۶ ساعته برابر LC_{50}: 4.6-6.8 mg/L محاسبه شده است (Merati et al., 2014). با توجه به موارد کاربرد این آفت کش در کشاورزی و بروز سمیت ناشی از آنان در ساختار بدن اورگانیسم‌های مختلف به ویژه انواع خاکزی, پژوهش حاضر به منظور بررسی اثرات قارچ کش پنکونازول تاریخ مصرف گذشته در بدن کرم‌های خاکی طراحی گردیده است. در مطالعه ی حاضر سعی بر آن بوده که نشان دهیم آفت کش های تاریخ مصرف گذشته (Expired pesticides) علی رغم تصور عمومی که اعتقاد بر غیرسمی بودن و ناکارآمدی آنان دارند' کماکان و تا حدی قدرت سمیت خود را حفظ نموده و قادر به ایجاد تغییرات ناخواسته فیزیولوژیکی در بدن کرم های خاکی به عنوان جانوران مفید برای حاصلخیزی خاک' هستند.

پس از کاربرد' ذرات آفت کش ها به محیط زیست و درون بدن موجودات زنده وارد شده و کم کم تجمع می یابد. در بیش تر موارد تاثیر آفت کش ها موجب بروز آسیب های اکسیداتیو (Oxidative damages) در بدن موجودات زنده غیرهدف می گردد. تخریب زیستی و اکولوژیکی از جمله دیگر آثار مضر استفاده از این سموم هستند. پنکونازول از جمله قارچ‌کش‌هایی بوده که برای درمان عفونت‌های موضعی و سیستمیک ناشی از قارچ های پاتوژن برای انواع محصولات زراعی مورد استفاده دارد.. در یک پژوهش اثرات

قارچ‌کش پنکونازول بر ساختار و عملکرد بیضه ها در Rat مورد بررسی قرار گرفت و در آن مشخص شد که پنکونازول موجب کاهش میزان سنتز تستوسترون شده و از سوی دیگر نیز سبب کاهش شدید توده ی سلولی لایدیگ ها و سرتولی ها شده است. در مطالعه ای دیگر نیز نشان داده شد که این آفت کش نقش مهمی در القای استرس اکسیداتیو (OS) و ایجاد آسیب های بافتی در ریه های موش شده و این اثرات نامطلوب با خورانش ویتامین ها تا حدی کاهش یافته و یا در مدت کوتاهی برطرف شده اند (Pose-Juan et al., 2010; Cordero-Bueso et al., 2014; Merati et al., 2014).

تمامی موجودات زنده هوازی (Aerobic) با پارادوکسی به نام اکسیژن مولکولی (O_2) روبرو بوده یعنی از یک سو نیازمند به آن هستند و از سوی دیگر، متابولیت های آن نظیر رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\bullet}$) ، آنیون سوپراکسید ($O_2^{-\bullet}$) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) بر عملکرد و ساختار سلول ها تاثیرمنفی نهاده و بقای موجود زنده را در معرض خطر جدی قرار می دهند و به همین دلیل محققان اکسیژن را نوعی تیغ دو دم در نظر می گیرند. مجموعه مشتقات اکسیژن موسوم به گونه های اکسیژن فعال (ROS) بوده که از جمله عوامل ایجاد آسیب های اکسیداتیو در سلول ها هستند. در تمامی سلول ها سیستم های دفاع آنتی اکسیدانی (آنزیمی و غیرآنزیمی) مسئول جمع آوری و خنثی سازی انواع ROS هستند. هر گاه میزان تولید ROS در سلول ها بیش تر از حد نرمال بوده و میزان کمی از آنتی اکسیدان ها در دسترس باشند، فرآیند OS شکل می گیرد. یکی از پیامدهای اصلی و همیشگی OS در سلول ها و بافت ها، گسترش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی (LPO) است. اساسا LPO پدیده ای فیزیولوژیک بوده و در تمامی سلول‌هایی که غنی از اسیدهای چرب غیراشباع (PUFA) هستند رخ داده و شامل مجموعه ای از واکنش های تخریب و تشکیل مجدد پیوندهای دوگانه در ساختار PUFA است. افزایش غیرطبیعی میزان LPO موجب اختلالات بافتی می شود. روند LPO موجب تخریب ساختار غشاء، کاهش قدرت تحرک سلول ها، مهار فعالیت های آنزیمی و ایجاد شکستگی در DNA سلولی می شود (Halliwell and Gutteridge, 2015).

بررسی ها نشان داده که تیمار با پنکونازول موجب افزایش در میزان ROS، اختلال در بیان ژن ها و فعالیت غدد درون ریز می شود (Perdichizzi et al., 2014). مطالعات دیگر در پستانداران نشان داده که این سم با ایجاد محدودیت کاتالیتیک از طریق محدود سازی فعالیت آنزیم CPY51، باعث مهار فعالیت مسیرهای استروییدوژنیک شده است (Sanderson, 2006). دیگر مطالعات انجام گرفته در خصوص تاثیر سمیت پنکونازول نشان داده که این قارچ کش موجب افزایش مرگ و میر زیاد در جمعیت حشره شکارچی *Deraeocorsi lotescens* می شود (Azimizadeh et al., 2012). در سال ۲۰۰۹ مشخص گردید که پنکونازول فاقد هر گونه اثر بازدارنده بر رشد و تکثیر توده های میکروبی در اکوسیستم های آب شیرین است (Johnson et al., 2009). با توجه به موارد بالا پژوهش حاضر به بررسی تغییرات احتمالی در فعالیت بیومارکرهای OS (Oxidative stress biomarkers) در کرم های خاکی قرمز کالیفرنیایی (*Eisenia foetida*) پس از تیمار با قارچ کش پنکونازول تاریخ مصرف گذشته، پرداخته است.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱- کرم های خاکی و شرایط نگهداری:

مدل جانوری مورد استفاده کرم های خاکی بالغ (با کمربند تناسلی مشخص) از نوع قرمز کالیفرنیایی یا Eisenia foetida با وزن تقریبی ۴۰۰-۳۵۰ میلی گرم بوده که از شرکت مواد آلی کیانپارس در شیراز خریداری گردیدند. کرم های خاکی پس از برقراری

شرایط استاندارد به مدت یک هفته جهت سازگاری محیط جدید، در تشت های بزرگ پلاستیکی محتوی خاک طبیعی (جمع آوری شده از زمین های دانشگاه شهرکرد) نگهداری گردیدند. کرم های خاکی به یک گروه شاهد (بدون تیمار) و سه گروه تجربی (تیمار شده با آفت کش) با سه تکرار مستقل تقسیم شده و در هر گروه حداقل ۲۰ نخ کرم قرار داده شد. رطوبت ۶۰ درصد در طول مدت تیمارها حفظ گردید. کرم ها در دمای حدود ۲±۲۲ °C و دوره روشنایی ۱۲-۱۲ ساعت (نور- تاریکی) و در ظروف پلاستیکی یک بار مصرف درب بسته نگهداری گردیدند.

۲-۲- آفت کش پنکونازول (Penconazole): پنکونازول تازه (Fresh) با ماده موثره ۲۰ درصد و خلوص ۹۹ درصد از شرکت آریا شیمی خریداری و کیسه آفت کش باز گردید. پس از گذشت ۳ سال از نگهداری در انبار محتوی این کیسه به عنوان پنکونازول تاریخ مصرف گذشته (Expired) در مجموعه آزمایشات پژوهش حاضر استفاده گردید. سایر مواد شیمیایی مصرفی مورد نیاز از طریق شرکت های داخلی تهیه گردیدند.

۲-۳- تعیین متوسط غلظت کشندگی (LC_{50}) پنکونازول تاریخ مصرف گذشته: به طور خلاصه برای تعیین LC_{50} حاد برای کرم های خاکی *Eisenia fetida* از روش پروبیت (Probit) در نرم افزار SPSS استفاده گردید. در این تست که به مدت ۷ روز به انجام رسید غلظت های افزایشی از آفت کش (با ۲۰ نخ کرم در هر غلظت) مورد استفاده قرار گرفتند و در انتها غلظتی که ۵۰ درصد از کرم های خاکی در آن مرده بودند (نسبت غلظت آفت کش به میزان مرگ و میر) به عنوان میزان LC_{50} در نظر گرفته شد.

۲-۴- طرح آزمایش: پنکونازول تاریخ مصرف گذشته در سه غلظت زیر حدکشندگی ($\frac{1}{5}$ ، $\frac{1}{10}$ و $\frac{1}{20}$ از LC_{50}) در آزمایشات این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. کرم های خاکی در ظروف محتوی خاک طبیعی و آفت کش در دو دوره زمانی ۴ و ۸ روز نگه داری شده و در انتهای هر یک از این دو زمان کرم ها را خارج نموده و پس از خرد کردن در بافر فسفات پتاسیم واجد EDTA به کمک روش اولتراسونیک از آنان هوموژنیت (Homogenate) تهیه گردید. جهت مهار فعالیت پروتئازی به هوموژنیت ها PMSF افزوده شد و در فریزر ۷۰- درجه نگهداری گردیدند. برای سنجش های آنزیمی هوموژنیت ها به مدت ۱۰ دقیقه و با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه (در دمای ۴ درجه سانتی گراد) سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت آنان جدا گردید.

۲-۵- سنجش تغییرات در بیومارکرهای استرس اکسیداتیو:

۲-۵-۱- بررسی میزان تغییرات پراکسیداسیون لیپیدها (غلظت مالون دی آلدیید)(LPO/MDA): بررسی میزان تولید MDA از انواع TBARS (محصولات پراکسیداسیون لیپیدی واکنش دهنده با اسید باربی تیوریک) در سوپرناتانت هوموژنیت کرم ها به انجام رسید و بدین ترتیب به طور غیرمستقیم میزان نسبی گسترش LPO تعیین گردید. خلاصه آن که ۵۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت را با یک میلی لیتر از TCA ۱۰ درصد مخلوط نموده و با دور ۵۰۰۰ ×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ نمودیم. به مایع بالایی حاصله TBA اضافه گردید و میزان جذب نوری MDA در طول موج ۵۳۲ نانومتر ثبت و خوانده شد (Buege and Aust, 1978).

۲-۵-۲- بررسی فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی کاتالاز (CAT, EC 1.11.1.6): کاتالاز آنزیمی است که آب اکسیژنه را به اکسیژن مولکولی و آب تجزیه می نماید. با اضافه سازی ۳ میلی لیتر از بافر فسفاته آب اکسیژنه به مخلوط واکنش (حاوی سوپرناتانت) میزان تغییرات جذب نوری در طول موج ۲۴۰ nm (برای ۳ دقیقه هر ۲۰ ثانیه یک بار با استفاده از کیووت کوارتز) به وسیله اسپکتروفوتومتر ثبت گردید. یک واحد از این آنزیم، میزانی از آنزیم بوده که قادر باشد یک میکرومول H_2O_2 را در طی یک دقیقه ، در دمای ۲۵ °C و در pH برابر با ۷ در شرایط ثابت تجزیه نماید (Aebi et al., 1974).

۳-۵-۲- بررسی محتوی پروتئین های کاربولینه شده (Carbolynated proteins = CP): در این روش محتوی پروتئین های اکسید شده در هوموژنیت کرم های خاکی مورد ارزیابی قرار می گیرد. مقداری از سوپرناتانت با ۰/۵ میلی لیتر از DNPH (۲و۴- دی نیتروفنیل هیدرازین) ۱۰ میلی مولار (در اسید کلریدریک) به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شده و پس از اضافه سازی TCA ۱۰ درصد مخلوط حاصله به مدت ۲۰ دقیقه با دور g× ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. پلت بدست آمده را شستشو داده و در ترکیب گوانیدین با فسفات پتاسیم (pH برابر ۲/۳) حل نموده و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه نمودیم. میزان جذب نوری در طول موج ۳۷۰ نانومتر خوانده و ثبت شد (Levine et al., 1994).

۲-۶- بررسی های هیستوپاتولوژیکی: کرم های خاکی تیمار شده و نیز شاهد در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شده و با استفاده از دستگاه اتوماتیک مقاطع عرضی با روش H&E رنگ آمیزی شدند. بررسی های هیستوپاتولوژیکی بر روی مقاطع عرضی تهیه شده از منطقه پس از کمربند تناسلی کرم ها به کمک میکروسکوپ نوری معمولی به انجام رسید.

۲-۷- سنجش غلظت پروتیین تام (Total protein): به عنوان یکی از پارامترهای لازم جهت محاسبه نهایی و بیان واحدهای سنجش است. در این قسمت مقدار جذب نوری پروتئین تام با استفاده از سولفات دودسیل سدیم در طول موج ۷۵۰ نانومتر تعیین و محاسبه گردید (Lees and Paxman, 1972).

۲-۸- تجزیه و تحلیل آماری داده ها: تمامی داده ها به صورت Means ± Standard Deviation (SD) نمایش داده شده اند. جهت مقایسه آماری بین گروه ها از روش آماری One way-ANOVA و پس آزمون Tukey's HSD استفاده شد. برای این آنالیزها نرم افزار SPSS و سطح معنی داری $p<۰/۰۵$ مورد استفاده قرار گرفت.

۳. نتایج و بحث

۳-۱- تعیین متوسط غلظت کشندگی (LC_{50}) پنکونازول تاریخ مصرف گذشته: نتیجه بررسی ها با روش پروبیت مشخص نمود که میزان LC_{50} برای کرم های خاکی *Eisenia fetida* پس از یک دوره تیمار ۷ روزه در حد ۲۸۰ mg/kg dry soil≤ بوده است. در مطالعه حاضر سه غلظت زیر حدکشندگی ($\frac{1}{5}$ ، $\frac{1}{10}$ و $\frac{1}{20}$ از LC_{50}) از این آفت کش مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۲- بررسی تغییرات بیومارکرهای استرس اکسیداتیو: داده های مندرج در شکل ۱ نشان می دهند که پنکونازول تاریخ مصرف گذشته موجب افزایش غلظت MDA و گسترش LPO در هوموژنیت بدن کرم های خاکی مورد آزمایش شده است. این افزایش به صورت وابسته به افزایش غلظت (Dose-dependent) آفت کش در هر دو دوره زمانی ۴ و ۸ روزه بوده است. میزان عددی این افزایش در تیمارهای ۸ روزه با افت کش بیش تر از ۴ روزه بود. در این مطالعه بیش ترین میزان MDA تولید شده مربوط به تیمار $\frac{1}{5}$ از LC_{50} در انتهای ۸ روز در حد ۶۶/۷۸ درصد نسبت به گروه شاهد مربوطه ($p<۰/۰۵$) بوده است.

با بررسی نتایج موجود در شکل ۲ مشخص می گردد که تیمارهای مختلف از پنکونازول تاریخ مصرف گذشته در دوره های زمانی متفاوت موجب کاهش فعالیت آنزیمی CAT در بدن کرم های خاکی شده اند. در این قسمت نیز آفت کش مذکور بر طبق الگوی وابسته به غلظت موجب کاهش فعالیت CAT شده است. بیش ترین و معنی دارترین ($p<۰/۰۵$) میزان این کاهش فعالیت مربوط به تیمار با غلظت $\frac{1}{5}$ از LC_{50} در انتهای دوره زمانی ۸ روزه بوده که میزان آن ۳۳/۸۷- بود.

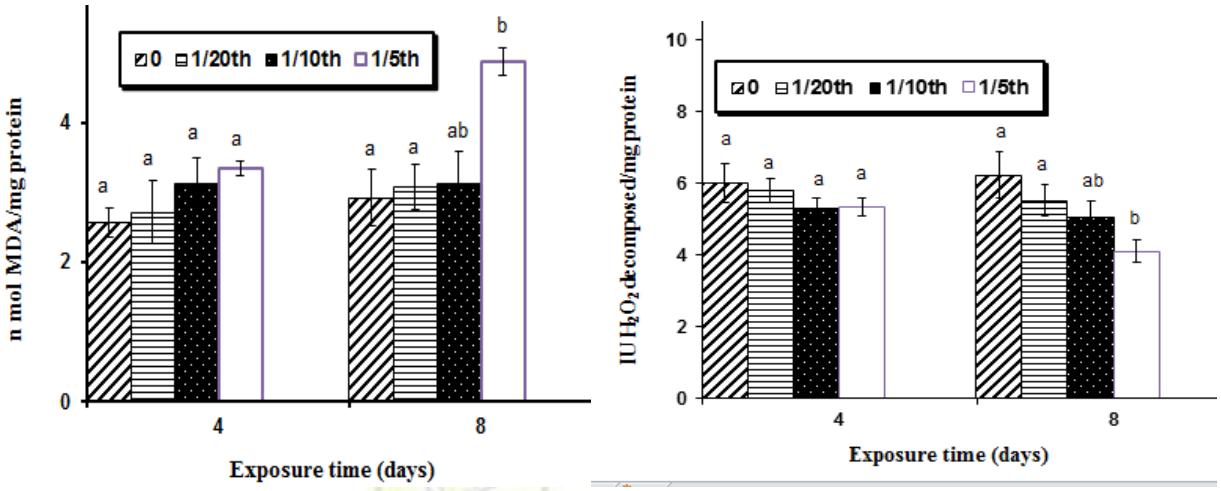
امروزه تاثیرات آفت کش ها بر محیط زیست، کیفیت غذا و هم چنین عوارض ناشی از مقاومت آفات و علف های هرز نسبت به این سموم پرسش های متعددی را در ارتباط با ضرورت استفاده از این مواد در سیستم های زراعی مطرح نموده است. آفت‌کش‌ها پس از استفاده از هوا به خاک و آب‌های مجاور راه یافته و بر اساس قدرت ماندگاری در محیط پس از ورود به بافت‌های بدن موجودات زنده اثرات زیانباری را برجای گذاشته و لذا موجودات زنده غیرهدف نظیر کرم های خاکی آسیب‌های شدیدی را پس از تاثیر آفت‌کش ها

در محیط زیست دریافت می‌نمایند. آفت کش های تاریخ مصرف گذشته (منقضی شده) به موادی گفته می شوند که در پایان یک دوره زمانی مشخص به میزان زیادی اثر مطلوب خود را از دست داده باشند. با این حال این نوع آفت کش ها گاه بدون رعایت ضوابط بهداشتی از رده خارج شده و به محیط زیست وارد می گردند (Torabi Farsani et al., 2021). مطالعات نشان داده که بیش تر آفت کش ها پس از ورود ناخواسته به محیط با افزایش سنتز ROS در بدن موجودات زنده موجب تغییرات در فعالیت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی و نیز القای LPO می شوند (Banerjee et al., 1999). در مطالعات سم شناسی آفت کش ها' کرم های خاکی به عنوان شاخص های زیستی از جایگاه مهمی برخوردار بوده زیرا در صورت بروز هر گونه آسیب به این جانوران باروری خاک نیز با مشکلات جدی روبرو خواهد شد (Gobi et al., 2005).

تاکنون داده های معتبری در ارتباط با بررسی اثرات پنکونازول تاریخ مصرف گذشته بر فعالیت بیومارکرهای OS در دسترس نبوده و لذا منابع لازم نیز جهت انجام مقایسه های علمی در اختیار ما نبوده است. با این حال اخیرا در سال ۲۰۲۱ تیم تحقیقاتی ما نشان داد که آفت کش کلرپایریفوس در هر دو فرم تازه (Fresh) و تاریخ مصرف گذشته قادر به القای OS و LPO و نیز افزایش میزان MDA در بدن کرم های خاکی بوده است (Torabi Farsani et al., 2021). ترکیب آلدییدیMDA به عنوان یکی از محصولات فرعی LPO به طور مستقیم با ساختارهای پروتتینی' فسفولیپیدی و ژنومیک (DNA) پیوندهای کوئووالانسی ایجاد نموده و در نهایت موجب غیرفعال‌سازی و تغییرات ساختاری در آنان خواهد شد (Halliwell and Gutteridge, 2015; Owagboriayea et al., 2020).

در مطالعه حاضر نیز آفت کش مورد استفاده با افزایش میزان MDA (شکل ۱) موجب بروز آسیب های اکسیداتیو در ساختار سلولی بدن کرم های خاکی شده که این خود موید القای OS پس از استفاده از این آفت کش بوده است. پنکونازول با تغییر در عملکرد میکروب های روده کرم خاکی موجب بروز آسیب های گوارشی در این جانوران می شود (Meng et al., 2019). در سال ۲۰۲۰ نیز مشخص گردید که پنکونازول با تجمع در بافت های بدن کرم های خاکی موجب بروز OS و گسترش LPO در آنان شده و به دنبال آن فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی نیز دستخوش تغییر شده است. هم چنین همین گروه نشان دادند که پنکونازول با القای OS موجب کاهش معنی دار در ذخایر گلوتاتیون احیا شده (GSH) در سلول های بدن کرم خاکی شده که این خود بر میزان آسیب های سلولی افزوده است (Li et al., 2020).

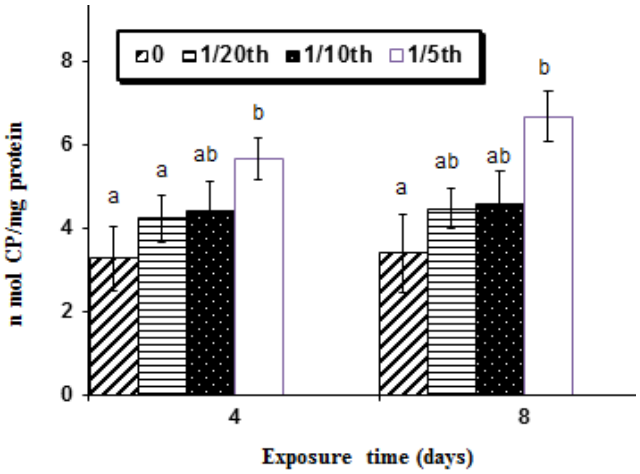
در بافت‌های جانداران سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی (آنزیمی و غیرآنزیمی) به منظور مقابله و حذف متابولیت‌های ناشی از روند LPO و انواع ROS مورد استفاده قرار می گیرند. هر موجود زنده‌ای که بهره کم تری از سیستم‌های آنتی اکسیدانی داشته باشد، حساسیت بیش‌تری نسبت به OS و روند LPO دارد. پس از مداخله ی آنتی اکسیدان ها، ماکرومولکول ها در ساختارهای سلولی محفوظ خواهند ماند (Halliwell & Gutteridge, 2015). در کرم‌های خاکی در سال ۲۰۱۳ نشان داده شد که استفاده از قارچ‌کش‌های تریازولی موجب مهار فعالیت برخی از آنزیم های آنتی اکسیدانی شده و سلول‌های اپیدرمی نیز دچار بدشکلی و جداشدگی از سطوح زیرین خود شده اند (Gao et al., 2013). در پژوهش حاضر نیز فعالیت آنزیمی CAT به مرور زمان و با افزایش غلظت آفت کش کاهش یافته است. غلظت های بالاتر از پنکونازول تاریخ مصرف گذشته مهار بیش تری را اعمال نموده اند (شکل ۲). Li و همکاران نیز نشان دادند که پنکونازول موجب کاهش فعالیت آنزیمی CAT در کرم های خاکی می شود (Li et al., 2020). این نتایج در همسویی با نتایج مطالعه حاضر بوده و نشانگر القای OS توسط پنکونازول تاریخ مصرف گذشته بوده که توانسته مهار CAT را باعث گردد. CAT به عنوان یک آنزیم آنتی اکسیدانی مسئول حذف پراکسید هیدروژن در محیط سلولی بوده و لذا هر گونه مهار فعالیت آن موجب تجمع پراکسید هیدروژن و بروز آسیب های بیش تر اکسیداتیو خواهد شد. در همین ارتباط مشخص شده که قارچ کش های تریازولی با افزایش سنتز پراکسید هیدروژن در سلول قارچ فوزاریوم موجب نابودی آن می شوند (Audenaert et al., 2010).



شکل ۱ (چپ): تغییرات پراکسیداسیون لیپیدها (LPO/MDA) در تیمارهای مختلف از پنکونازول تاریخ مصرف گذشته.
شکل ۲ (راست)- تغییرات فعالیت کاتالاز (CAT) در تیمارهای مختلف از پنکونازول تاریخ مصرف گذشته.
- حروف غیرهمنام از نظر آماری اختلاف معنی دار (p<۰/۰۵) دارند.

با توجه به یافته های موجود در شکل ۳ می توان اظهار نمود که تیمار با پنکونازول تاریخ مصرف گذشته موجب تغییرات افزایشی در محتوی CP یا میزان پروتئین های اکسید شده در هوموژنیت بدن کرم های خاکی مورد آزمایش شده است. در این قسمت نیز این افزایش به صورت وابسته به غلظت بوده به طوری که در غلظت $\frac{1}{5}$ از LC_{50} در دوره های زمانی ۴ و ۸ روزه افزایش محتوی CP به ترتیب در حد ۷۳/۳۹ و ۹۶/۱۹ درصد بوده است (p<۰/۰۵).

در کرم های خاکی محتوی CP به عنوان یک شاخص زیستی برای تعیین میزان اکسیداسیون پروتئین ها (تحت اثر ROS) کاربرد دارد. نتایج پژوهش حاضر نشان دهنده افزایش محتوی CP در تیمار با آفت کش مورد استفاده بوده است. گروه های کاربونیل (آلدیدها و کتون ها) بر روی زنجیره های جانبی پروتئین ها مشاهده شده که دارای ماهیت برگشت ناپذیر و پایدار هستند و لذا به عنوان بیومارکر مورد استفاده قرار می گیرند. محصولات فرعی روند LPO مثل MDA و یا ۲- هگزانال با گروه های آمینی در لیزین و یا گروه های سولفیدریل در سیستئین واکنش داده و در نتیجه پروتئین اصلی کاربولینه و غیرفعال خواهد شد و بدین ترتیب مقدمات ناپایداری سلولی به ویژه غشای آن فراهم می شود (Cecarini et al., 2007; Purdel et al., 2014). برخی از قارچ کش های تریازولی مثل پروپیکونازول (Propiconazole) با القای OS موجب افزایش میزان CP در بافت های بدن جانوران شده که در نتیجه آن برخی از سیستم های پروتئینی نظیر آنزیم ها غیر فعال شده اند (Bruno et al., 2009). از آن جایی که در پژوهش حاضر تیمارهای پنکونازول تاریخ مصرف گذشته موجب افزایش میزان MDA در بدن کرم های خاکی شده اند' لذا می توان اظهار نمود که MDA تولید شده موجب افزایش محتوی CP در این آزمایشات شده است.



شکل ۳: تغییرات محتوی پروتئین های کاربولینه (CP) در تیمارهای مختلف از پنکونازول تاریخ مصرف گذشته.
- حروف غیرهمنام از نظر آماری اختلاف معنی دار ($p<0/05$) دارند.

۳-۳- بررسی های هیستوپاتولوژیکی: در مطالعه حاضر بررسی های هیستوپاتولوژیکی نشان داد که تیمار با پنکونازول تاریخ مصرف گذشته موجب بروز برخی آسیب های بافتی در مقاطع عرضی کرم های خاکی مورد آزمایش شده است. این آسیب ها شامل پارگی (Rupture) و تخریب های پراکنده در ساختار کوتیکول و اپیدرم جدار بدن کرم های خاکی در تمامی غلظت ها در دو دوره زمانی ۴ و ۸ روزه بوده اند (شکل های ۴و ۵).

اطلاعات اندکی‌در ارتباط با تاثیر سمیت دو فرم تازه و تاریخ مصرف گذشته پنکونازول بر بافت‌های بدن جانوران به ویژه کرم‌های خاکی در دسترس است. با این حال از آن جایی که در پژوهش حاضر مشخص گردید که تیمارهای مختلف با پنکونازول تاریخ مصرف گذشته موجب کاهش توان آنتی اکسیدانی و به دنبال آن گسترش OS و آسیب های اکسیداتیو در بافت‌های بدن کرم‌های خاکی گردیده اند، لذا می‌توان عنوان نمود که بدشکلی‌ها و تغییرات ایجاد شده در استقرار سلول‌های سطح بدن کرم‌های خاکی در ارتباط مستقیم با القای OS و آسیب های اکسیداتیو متعاقب آن در بدن کرم ها بوده است. علاوه بر این افزایش محتوی CP در این پژوهش می تواند یکی از عوامل بروز بدشکلی ها و بهم ریختگی ها در ساختارهای سلولی و بافتی مورد مطالعه باشد. در سایر گونه های جانوری نیز تاثیرات پنکونازول آسیب های بافتی را به دنبال داشته است. برای مثال نتایج یک کار پژوهشی در سال ۲۰۱۳ نشان داد که پنکونازول پس از ورود به بدن Rat های نر موجب بروز آسیب‌های بافتی به ویژه در بیضه ها شده به طوری که تعداد بسیار زیادی از سلول‌های سرتولی و لایدیگ همراه با سلول‌های زاینده دچار اپوپتوزیس (مرگ سلولی) شده و تخریب های بافتی زیادی در این اندام مشاهده شده است (Eman et al., 2013). هم چنین پنکونازول همراه با القای التهاب موجب بروز مرگ سلولی و تغییرات غشایی در بافت های مغز و کلیه در موش ها شده است (Chaabane et al., 2016, 2017). بر اساس این نتایج پنکونازول با القای مرگ سلولی اپوپتازیس موجب حذف سلول ها از بافت های مذکور شده و احتمال بروز اثری مشابه برای پنکونازول تاریخ مصرف گذشته در مطالعه ما نیز وجود دارد. بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر و نیز دیگر مطالعات می‌توان عنوان داشت که پنکونازول تاریخ مصرف گذشته تا حدی سطح خارجی بدن (اپیدرم و کوتیکول آن) را مورد آسیب قرار داده که موجبات کاهش تحرک و احتمالا سوء تغذیه کرم‌های خاکی را فراهم خواهند آورد و نتیجه نهایی آن چیزی جز کاهش توده زیستی این بی‌مهرگان خاکزی که برای حاصلخیزی خاک مهم اند' نخواهد بود (شکل های۴ و ۵).



شکل ۴ (چپ):مقطع عرضی کرم خاکی در گروه شاهد منفی. بدون آسیب بافتی (بزرگنمایی ۱۰۰)(H&E).

شکل ۵ (راست): مقطع عرضی کرم خاکی در تمامی گروه های تجربی. دارای آسیب های بافتی (بزرگنمایی ۱۰۰)(H&E).

۴. نتیجه‌گیری

بررسی ها در این پژوهش نشان داد که پنکونازول تاریخ مصرف گذشته با افزایش محتوی LPO و CP، و کاهش در فعالیت CAT موجب القای OS و بروز آسیب های اکسیداتیو مربوطه به صورت آسیب در جدار بدن کرم های خاکی شده است. بر اساس این یافته ها آفت کش های تاریخ مصرف گذشته کماکان از توان تخریبی قابل ملاحظه ای در بدن موجودات زنده خاکزی نظیر کرم های خاکی برخوردار بوده و می بایستی در زمان معدوم سازی آنان دقت زیادی به کار برد تا آلودگی های بعدی متوقف گردند.

سپاسگزاری

از مسئولین محترم دانشگاه شهرکرد بابت حمایت مالی از این پژوهش در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

1. Aebi H., Wyss S.R., Scherz B. and Skvaril F. 1974. Heterogeneity of Erythrocyte Catalase II. European Journal of Biochemistry, 48: 137-145.

2. Audenaert K., Callewaert E., Höfte M., De Saeger S. and Haesaert G. 2010. Hydrogen peroxide induced by the fungicide prothioconazole triggers deoxynivalenol (DON) production by *Fusarium graminearum*. BMC Microbiology, 10 (1): 112.

3. Azimizadeh N., Ahmadi K., Imani S., Takalloozadeh H. and Sarafrazi A. 2012. Toxic effects of some pesticides on Deraeocoris lutescens in the laboratory. Bulletin of Insectology, 65(1): 17-22.

4. Banerjee B.D., Seth V., Bhattacharya A., Pasha S.T. and Chakraborty A.K. 1999. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. Toxicology Letter, 107: 33-47.

5. Borai I.H., Atef A.A., El-Kashoury A.A., Mohamed R.A. and Said M.M. 2019. Ameliorative Effects of Sesame Seed Oil Against Penconazole-Induced Testicular Toxicity and Endocrine Disruption in Male Rats. Biomedical Journal of Scientific & Technical Research, 14(1): 1-11.

6. Bruno M., Moore T., Nesnow S. and Ge Y. 2009. Protein carbonyl formation in response to propiconazole-induced oxidative stress. Journal of Proteome Research, 8(4): 2070-2078.

7. Buege J.A. and Aust S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. Methods in Enzymology, 52: 302-310.
8. Bustos-Obregon E. and Goicochea R.I. 2002. Pesticide soil contamination mainly affects earthworm male reproductive parameters. Asian Journal of Andrology, 4: 195-199.
9. Cecarini V., Gee J., Fioretti E., Amici M., Angeletti M., Eleuteri A.M. and Keller J.N. 2007. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. Biochimica et Biophysica Acta 1773(2): 93-104.
10. Chaâbane M., Ghorbel I., Elwej A., Mnif H., Boudawara T., Chaâbouni S.E., Zeghal N. and Soudani N. 2017. Penconazole alters redox status, cholinergic function, and membrane-bound ATPases in the cerebrum and cerebellum of adult rats. Human & Experimental Toxicology, 36(8): 854-866.
11. Chaâbane M., Mohamed K., Nejla S., Awatef E., Malek G., Kamel J., Tahia B., Ellouze C.S. and Najiba Z. 2017. *Nitraria retusa* fruit prevents penconazole-induced kidney injury in adult rats through modulation of oxidative stress and histopathological changes. Pharmaceutical Biology, 55(1): 1061-1073.
12. Chaâbane M., Elwej A., Ghorbel I., Chelly S., Mnif H., Boudawara T., Chaabouni S.E., Zeghal N. and Soudani N. 2018. Penconazole alters redox status, cholinergic function and lung's histoarchitecture of adult rats: Reversal effect of vitamin E. Biomedicine & Pharmacotherapy, 102: 645-652.
13. Cordero-Bueso G., Arroyo T. and Valero E. 2014. A long term field study of the effect of fungicides penconazole and sulfur on yeasts in the vineyard. International Journal of Food Microbiology, 189: 189-194.
14. De Sousa A.P.A and de Andrea M.M. 2011. Earthworm avoidance of soils treated with cypermethrin. Sensors, 11(12): 11056-11063.
15. El-Sharkawy E.E. and El-Nisr N.A. 2013. Testicular dysfunction induced by penconazole fungicide on male albino rats. Comparative Clinical Pathology, 22 (3): 475-480.
16. Feliziani E. and Romanazzi G. 2013. Preharvest application of synthetic fungicides and alternative treatments to control postharvest decay of fruit. Stewart Postharvest Review, 9(3): 1-6
17. Gao M., Song W., Zhang J. and Guo J. 2013. Effect on enzymes and histopathology in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by triazole fungicides. Environmental Toxicology and Pharmacology, 35(3): 427-33.
18. Gobi M., Janardhanan S. and Vijayalakshmi G.S. 2005. Sublethal toxicity of the herbicide butachlor on the earthworm *Perionyx sansibaricus* and its histological changes. Journal of Soils and Sediments, 5(2): 82-86.
19. Halliwell B. and Gutteridge J.M. 2015. Free Radicals in Biology and Medicine. 5th Edition. Oxford University Press.
20. Johnson D.R., Czechowska K., Chèvre K. and van der Meer J.R. 2009. Toxicity of triclosan, penconazole and metalaxyl on *Caulobacter crescentus* and a freshwater microbial community as assessed by flow cytometry. Enviromental Microbiology, 11(7): 1682-1691.
21. Lees M. and Paxman J. 1972. Modification of Lowry procedure for the analysis of proteolipid protein. Analytical Biochemistry, 47: 184-192.
22. Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.P. and Shacter E. 1994. Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins. Methods in Enzymology, 233: 346-357.
23. Li R., Meng Z., Sun W., Wu R., Jia M., Yan S., Tian S., Zhu W. and Zhou Z. 2020. Bioaccumulation and toxic effects of penconazole in earthworms (*Eisenia fetida*) following soil exposure. Environmental Science and Pollution Research, 27: 38056-38063.
24. Meng Z., Liu L., Jia M., Li R., Yan S., Tian S., Sun W., Zhou Z. and Zhu W. 2019. Impacts of Penconazole and Its Enantiomers Exposure on Gut Microbiota and Metabolic Profiles in Mice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 67(30): 8303-8311.
25. Merati M.J., Hassanpour H., Niknam V. and Mirmasoumi M. 2014. Exogenous application of penconazole regulates plant growth and antioxidative responses in salt-stressed *Mentha pulegium* L. Journal of Plant Interactions, 9 (1): 791-801.
26. Owagboriayea F., Dedekeb G.A., Bamideleb J.A., Aladesida A.A., Omoregie I.P., Feyisola R.T. and Temitope A.M. 2020. Biochemical response and vermiremediation assessment of three earthworm species (*Alma millsoni*, *Eudrilus eugeniae* and *Libyodrilus violaceus*) in soil contaminated with a glyphosate-based herbicide. Ecological Indicators, 108: 105678.
27. Perdichizzi S., Mascolo M. G., Silingardi P., Morandi E., Rotondo F., Guerrini A. and Colacci A., 2014. Cancer-related genes transcriptionally induced by the fungicide penconazole. Toxicology in vitro, 28 (1): 125-130.

28. Pose-Juan E., Rial-Otero R. and Lopez-Periago J.E., 2010. Sorption of penconazole applied as a commercial water-oil emulsion in soils devoted to vineyards. Journal of Hazardous Materials, 182(1): 136-143.
29.Purdel N.C., Margina D. and Ilie M. 2014. Current Methods Used in the Protein Carbonyl Assay. Annual Research & Review in Biology, 4(12), 2015-2026.
30. Sanderson J.T. 2006. The Steroid Hormone Biosynthesis Pathway as a Target for Endocrine-Disrupting Chemicals. Toxicological Sciences, 94(1): 3-21.
31. Sharkawy E. and El-Nisr N.A. 2013. Testicular dysfunction induced by penconazole fungicide on male albino rats. Comparative Clinical.Pathology, 22(3): 475-480.
32. Torabi Farsani A., Arabi M. and Shadkhast M. 2021. Ecotoxicity of chlorpyrifos on earthworm *Eisenia etida* (Savigny, 1826): Modifications in oxidative biomarkers. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 249, 109145.
33. Tudi M., Daniel Ruan H., Wang L., Lyu J., Sadler R., Connell D., Chu C. and Phung D.T. 2021. Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. International Journal of Environmental Research and Public Health, 18: 1112.
34. Uçkun AA. and Öz ÖB. 2020. Acute exposure to the fungicide penconazole affects some biochemical parameters in the crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823). Environmental Science and Pollution Research, 27: 35626-35637.
35. Wang Y., Wu S., Chen L., Wu C., Yu R., Wang Q. and Zhao X. 2012. Toxicity assessment of 45 pesticides to the epigeic earthworm *Eisenia fetida.* Chemosphere, 88: 48-491.

Metal and Microplastic Contamination on Aquatic Organisms

Parvin Sadeghi[1], Masoomeh Zeynoddini[2*]

1- Associate professor of marine biology department, Marine science faculty, Chabahar maritime university
2- MSc Student of Marine biology department, Marine science faculty, Chabahar maritime university

**Corresponding Author Email address: masoomeh.zeynoddini3@gmail.com*

Abstract

Heavy metals are dangerous pollutants that enter the aquatic environment through industrial effluents. Aquatic plants and animals are able to absorb high concentrations of these metals without seemingly harming themselves, but their use by humans can cause health problems and even poisoning. Microplastics are pieces of plastic smaller than 5 mm that are larger than the breakdown of plastic debris, in land and Sea. Microplastics are transferred to aquatic ecosystems as a result of various industrial processes and human activities such as coastal tourism, recreational and commercial fishing, naval fleets and marine industries (such as aquaculture, oil rigs). This review provides an overview of the cross-sectional perspective of microplastics and heavy metals. The results of the analysis showed that contamination, mechanism, sediment, microplasts and contamination are the main keywords in the last 3 years, which indicates that microplast contamination has been widely considered. Environmental factors, including light, temperature and pH significantly affect the interactions between microplasts and heavy metals, and the combined toxic effects and potential hazards to human health are worrisome. Results showed that microorganisms play an important role in the network of interaction between heavy metals and microplasts in the aquatic environment. However, their combined effects on aquatic ecosystems and human health are largely unknown.

Keywords: Pollutant, fish, aquatic ecosystem, bioaccumulation

اثر متقابل آلودگی فلزات سنگین و میکروپلاستیک بر موجودات آبزی

پروین صادقی[۱]؛ معصومه زین‌الدینی*[۲]

۱-دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

۲-دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: *masoomeh.zeynoddini3@gmail.com*

چکیده

فلزات سنگین جزو آلاینده‌های خطرناکی هستند که توسط پساب‌های صنعتی وارد محیط آبی می‌شوند. گیاهان و جانوران آبزی قادرند غلظت‌های بالایی از این فلزات را در خود جای دهند بدون این‌که ظاهراً به آنها آسیبی وارد شود، ولی مصرف آنها توسط انسان می‌تواند، باعث اختلال در سلامتی و حتی مسمومیت گردد. میکروپلاستیک‌ها قطعات پلاستیکی کوچک‌تر از ۵ میلی‌متر هستند که از تجزیه بقایای پلاستیکی بزرگ‌تر، در خشکی و دریا حضور دارند. میکروپلاستیک‌ها درنتیجه فرآیندهای صنعتی و فعالیت‌های مختلف انسانی از قبیل گردشگری ساحلی، ماهیگیری تفریحی و تجاری، ناوگان‌های دریایی و صنایع دریایی (به‌عنوان‌مثال آبزی‌پروری، سکوهای نفتی) به اکوسیستم‌های آبی منتقل می‌شوند. این بررسی مروری بر دیدگاه متقابل میکروپلاستیک‌ها و فلزات سنگین ارائه می‌دهد. نتیجه تجزیه و تحلیل نشان داد که آلودگی، مکانیسم، رسوب، میکروپلاستیک‌ها و آلودگی کلید واژه های اصلی در ۳ سال اخیر هستند که نشان می‌دهد آلودگی میکروپلاستیک‌ها به‌طور گسترده مورد توجه قرار گرفته است. عوامل محیطی، از جمله نور، دما و pH بر تعاملات بین میکروپلاستیک‌ها و فلزات سنگین تأثیر مهمی می‌گذارد، و اثرات سمی ترکیبی و خطرات احتمالی برای سلامت انسان نگران کننده است. نتایج نشان می‌دهد که میکروارگانیسم‌ها نقش مهمی در شبکه تعامل بین فلزات سنگین و میکروپلاستیک‌ها در محیط آب ایفا می‌کنند. با این حال، اثرات ترکیبی آنها بر اکوسیستم آبزی و سلامت انسان تا حد زیادی ناشناخته است.

واژگان کلیدی: آلاینده، ماهی، بوم‌سازگان آبی، تجمع زیستی

۱.مقدمه

توسعه و پیشرفت صنایع، افزایش روزافزون جمعیت شهرها و روستاها و در نهایت توسعه کشاورزی و سپس افزایش استفاده از کودها و سموم شیمیایی از علل اصلی ورود آلاینده‌های مختلف به بوم‌سازگان آبی می‌باشد. مواد آلاینده توسط باد و جریانات آبی و همچنین نزولات جوی در تمامی بوم‌سازگان‌ها منتشر می‌شود و تا زمان تجزیه کامل در بدنه محیط آبی حضور دارد و بر روی سلامت موجودات زنده از جمله انسان تاثیرگذار است (Jezierska et al., 2009).

فلزات سنگین یک اصطلاح عمومی است که برای گروه فلزات و شبه فلزات کاربرد دارد و دارای چگالی بیش‌تر از ۶ گرم در سانتی‌متر مکعب است (Chalkiadaki et al., 2014). فلزات سنگین از آلاینده‌های مهم محیط‌زیست محسوب شده و تقریباً تمام آنها حتی در غلظت پایین یونی برای انسان سمی هستند (Fu et al., 2017). برخی از نمونه‌های مربوط به فلزات سنگین شامل مس، کادمیوم، روی، کروم، آرسنیک، بور، کبالت، تیتانیوم، استرانسیم، قلع، وانادیوم، نیکل، مولیبدن، جیوه، سرب و غیره است. فلزات سنگین مانند مس، روی، نیکل، آهن، مولیبدن از نیازهای اساسی رشد موجودات هستند اما این فلزات سنگین وقتی که غلظت آنها از حد مجاز فراتر رود برای موجودات و گیاهان مضر هستند. معدود فلزات سنگین دیگر مانند سرب، جیوه، کادمیوم و آرسنیک برای رشد گیاهان و حیوانات ضروری نیستند. به دلیل ورود فاضلاب صنعتی، لجن فاضلاب، کودها، استفاده از فاضلاب تصفیه شده در کاربردهای زمین و هوازدگی مواد معدنی خاک، به فلزات سنگین آلوده می‌شود (Krüger et al., 2017). تجمع زیستی فلزات سنگین در بافت‌های مختلف موجودات آبزی منجر به چندین اثر مضر می‌شود. ممکن است دارای اثرات ژنوتوکسیک، جهش‌زا، سرکوب‌کننده سیستم ایمنی و سمیت سلولی باشد. همچنین ممکن است منجر به تغییرات هیستوپاتولوژیک، ناهنجاری در شکل و تولیدمثل و اثرات مخاطره آمیز بهداشت برای مصرف انسان توسط موجودات آبزی آلوده شود (Matos et al., 2017). در سال‌های اخیر، مصرف جهانی ماهی همزمان با افزایش آگاهی از فواید غذایی و درمانی آنها افزایش یافته است. ماهی‌ها علاوه بر اینکه منبع مهمی از پروتئین هستند، به طور معمول دارای محتوای غنی از مواد معدنی ضروری، ویتامین‌ها، پروتئین و اسیدهای چرب اشباع نشده هستند (Medeiros et al. 2012). ماهی‌ها برای ارزیابی سطح آلودگی فلزات سنگین به عنوان مهمترین پایش‌کننده زیستی در سیستم‌های آبی در نظر گرفته می‌شوند (Authman 2008). ماهیها در توصیف ویژگی‌های طبیعی سیستم‌های آبزی و ارزیابی تغییرات زیستگاه‌ها کاربرد دارند. علاوه بر این، ماهی‌ها در بالای هرم زنجیره غذایی آبزیان واقع شده‌اند و می‌توانند فلزات را تجمع داده و به انسان منتقل کنند و باعث بیماری‌های مزمن یا حاد شوند (Malik et al. 2010).

از زمانیکه پلاستیک در قرن بیستم اختراع شد، به‌طور گسترده‌ای در همه جنبه‌های زندگی مورد استفاده قرار گرفت. بدون شک، پلاستیک زندگی را راحت‌تر کرده است، اما به‌عنوان آلودگی سفید نیز به یک مشکل جهانی تبدیل شده است. علاوه بر این، آلودگی میکروپلاستیک‌ها، یعنی اندازه ذرات پلاستیک زیر ۵ میلی‌متر، بسیار نگران‌کننده است. همانطورکه بسیاری از مطالعات گزارش داده‌اند، میکروپلاستیک‌ها توسط صدف، میگو، ماهی و حتی پلانکتون‌ها در محیط آبی بلعیده می‌شوند (Abbasi et al., 2018). میکروپلاستیک‌ها می‌توانند در دیواره داخلی دستگاه گوارش موجود زنده تجمع کنند و به ساختار طبیعی دستگاه گوارش آسیب برسانند و باعث خونریزی داخلی و حتی پارگی سلول‌های روده شوند (Lei et al., 2018). علاوه بر این، میکروپلاستیک‌ها می‌توانند به عنوان جمع‌کننده آلاینده‌های مختلف در محیط آب مورد استفاده قرار گیرند و آلاینده‌های مشترک را به موجودات زنده منتقل کنند. ترکیب میکروپلاستیک‌ها و آلاینده‌های دیگر می‌تواند بر سلامت انسان (مانند آسیب به سیستم عصبی) تأثیر بگذارد (Guo and Wang., 2019). مطالعات مختلفی در مورد میزان فلزات سنگین در بدن موجودات آبزی و اثرات این آلاینده‌ها در سراسر دنیا انجام شده است (Ramírez, 2013; Sfakianakis et al., 2015; Milatou et al., 2020; Sadeghi et al., 2021).

تحقیقات در مورد میکروپلاستیک‌ها به عنوان حامل آلاینده‌های دیگر هنوز یک موضوع مهم و جدید است. در مقایسه با جذب فلزات سنگین، مطالعات بیشتری در مورد جذب آلاینده های آلی بر روی میکروپلاستیک‌ها انجام شده است. در تحقیقات متعددی، بسیاری از آلاینده های آلی مانند بیسفنول A آنالوگ (Wu et al., 2019) و آنتی بیوتیک‌ها (Lei et al., 2018)، برای یافتن اطلاعات در مورد

تعامل بین مواد آلی و میکروپلاستیک انتخاب شده بودند. این تحقیقات نشان دادند که برهم کنش بین میکروپلاستیک ها و مواد آلی تحت تأثیر انواع آلی و میکروپلاستیک ها یا محیط آبی است. Guo و همکاران مطالعه‌ای در مورد جذب فلزات سنگین توسط میکروپلاستیک‌ها انجام دادند. در مطالعه آنها انواع فلزات سنگین و میکروپلاستیک‌ها انتخاب شدند و نتایج تجربی نشان داد که میکروپلاستیک‌ها توانایی جذب فلزات سنگین را دارند. علاوه بر این، فرآیند جذب می‌تواند تحت تأثیر عوامل زیادی مانند نوع و اندازه ذرات میکروپلاستیک ها و غلظت یون‌های فلزی قرار گیرد (Guo et al., 2020). Dong و همکاران مکانیسم جذب As(III) جذب شده توسط ذرات میکروپلاستیک پلی استایرن (PSMP) با روش های توصیف معمولی مانند XPS و FTIR و محاسبه گاوس را مورد مطالعه قرار دادند. مشخص شد که نیروهای الکترواستاتیک و فعل و انفعالات غیر کووالان مکانیسم اصلی جذب As(III) بر روی ذرات میکروپلاستیک پلی استایرن هستند (Dong et al., 2020)

با توجه به موارد گفته شده بررسی اثر متقابل آلودگی فلزات سنگین و میکروپلاستیک بر موجودات آبزی از جمله ماهیان دارای اهمیت بسزایی است.

۲.مواد و روش‌ها

برای بررسی اثرات آلاینده‌هایی چون فلزات سنگین و میکروپلاستیک‌ها از روشهای جمع‌آوری نمونه با توجه به هدف پژوهش استفاده می‌شود. در مطالعه حاضر هدف بررسی مقالات معتبر سالهای اخیر در خصوص این دو آلاینده مهم بود. جهت این امر با استفاده از واژگان کلیدی آلاینده، میکروپلاستیک، فلزات سنگین و اثرات متقابل در پایگاه‌های داده اطلاعاتی معتبر مقالات جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت.

۳. نتایج و بحث

موجودات آبزی مانند ماهی، آلودگی‌ها را مستقیماً از آب آلوده و به‌طور غیرمستقیم از طریق زنجیره غذایی جمع می‌کنند. استفاده از کودهای شیمیایی حاوی فلزات سنگین باعث آلودگی ماهی به این فلزات می‌شود. اثرات آفت کش‌ها یا سموم دفع آفات ارگانوفسفر یا کلر به طور گسترده در ماهی مورد مطالعه و تأیید قرار گرفته است. تأثیر مواد سمی بر یکپارچگی و عملکرد DNA در بسیاری از موجودات تحت شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته است (Sun et al., 2019). نتایج تحقیق Begum و همکاران ۲۰۰۹ نشان داد که بیشترین غلظت فلزات سنگین در کلیه و کبد ده گونه مختلف ماهی است. رسوبات آلوده می‌تواند موجودات موجود در محیط کف را تهدید کند، کرم‌ها، سخت‌پوستان و حشرات را در معرض غلظت‌های خطرناک مواد شیمیایی سمی قرار دهد. برخی از رسوبات سمی از طریق از بین بردن موجودات اعماق دریا، کاهش در دسترس بودن غذا برای جانوران بزرگتر مانند ماهی عمل می‌کند. برخی از آلاینده‌های رسوب در فرآیندی به نام تجمع زیستی توسط موجودات جذب می‌شوند. هنگامی که جانوران بزرگ‌تر از این موجودات آلوده تغذیه می‌کنند، سموم به بدن آنها منتقل می‌شود و در زنجیره غذایی با افزایش غلظت در فرآیندی معروف به بزرگنمایی زیستی به بالای هرم غذایی می‌رسند (Begum et al., 2009). فلزات سنگین در آب به ویژه برای ماهی بالغ خطرناک است و ممکن است به طور قابل توجهی از اندازه جمعیت ماهی‌ها بکاهد و یا حتی باعث انقراض کل جمعیت ماهیان در مخازن آلوده شود. اطلاعات بسیاری از پژوهشگران نشان می‌دهد که فلزات سنگین باعث کاهش بقا و رشد لارو ماهی می‌شوند. آن‌ها همچنین باعث ناهنجاری‌های رفتاری (مانند اختلال در عملکرد حرکتی منجر به افزایش حساسیت به شکارچیان) یا آسیب‌های ساختاری (عمدتاً بدشکلی اسکلتی) می‌شوند. Somiñska و همکاران (۲۰۰۰) لاروهای کپور معمولی را در شرایط آزمایشگاهی، در آب حاوی سرب یا مس مطالعه کردند. نتایج نشان داد، قرار گرفتن در معرض فلزات سنگین منجر به کندی رشد و کاهش بقا شد. قرار گرفتن در معرض مس باعث مهار

استخوان سازی اسکلت گردید، در حالی که سرب باعث اسکولیوز شد (Somiñska et al., 2000). Hou و همکاران (۲۰۱۱) اثرات سرب در ماهیان خاویاری چینی *Acipenser smensas* را به عنوان تغییر شکل و انحنای ستون فقرات با کاهش توانایی در حرکت گزارش دادند. نتیجه قابل توجه توسط Castro-González & Méndez-Armenta (2008) مشاهده شد. آنها کاهش سطح کلسترول لیپید در مغز و اندام غدد جنسی با تاخیر رشد در ماهی *Clarias batrachus* را پس از قرار گرفتن در معرض نیترات سرب به مدت ۱۵۰ روز گزارش دادند. همچنین تعداد سلول‌های ردلت[308] ۳۰ در اپیدرم ماهی کپور معمولی و قزل آلای رنگین کمان در معرض آب آلوده به آرسنیک با اثرات مضر بر روی کبد افزایش یافت و موجب تخلیه سلول‌های کبدی، پیکنوز هسته‌ای، تخریب سلول‌های پارانشیمی و نکروز همراه با سیروز کبدی همچنین باعث اکسیداسیون، استرس در نتیجه تأثیر آن بر کاهش آنتی‌اکسیدان در سلول شد (Ghosh et al., 2006). وجود میکروپلاستیک ها در سیستم های دریایی در سراسر جهان گزارش شده است (Pan et al., 2019). به عنوان مثال، آبهای سطحی شمال غربی اقیانوس آرام به طور گسترده توسط میکروپلاستیک‌ها آلوده شده و غلظت آنها از ۶۴۰ تا ۴۲۰۰۰ واحد در کیلومتر مربع بسته به نوع جریانها متغیر است. میکروپلاستیک ها نیز به وفور در اقیانوس نیمه بسته مدیترانه وجود دارند که مقدار زیادی بقایای پلاستیکی را از توده های خشکی اطراف دریافت می کند (Collignon et al., 2012). میکروپلاستیک‌ها می‌توانند بیشتر آلاینده های آلی و فلزات سمی موجود در محیط را جذب کنند. در نتیجه، آنها حامل مواد سمی مانند سموم دفع آفات، بیفنیل‌های کلریددار و هیدروکربن‌های معطر چند حلقه‌ای هستند (Andrady, et al., 2011). علاوه بر این، میکروپلاستیک‌ها ممکن است حاوی مواد شیمیایی سمی باشند که در حین ساخت به‌منظور محافظت از پلاستیک در برابر خطر آتش‌سوزی، به آن اضافه می‌شوند. به عنوان مثال، دیفنیل اترهای پلی برومین، فتالات، نونیل فنولها، بیسفنول A، پلی بومروبی فنیلها، پلی کلروبی فنیل ها و تثبیت کننده های UV برای جلوگیری از تخریب در معرض نور خورشید (Andrady et al., 2011). هنگامی‌که مواد افزودنی از نظر شیمیایی به مولکول‌های پلیمر متصل نشوند، می‌توانند به‌راحتی از پلاستیک‌ها خارج شده و متعاقباً به آب، رسوب و موجودات زنده منتقل شوند. بلعیدن میکروپلاستیک‌ها توسط میکروارگانیسم‌های دریایی، جانوران و انسان ممکن است منجر به اثرات مخرب فیزیولوژیکی و سمی شود (Peng et al., 2017). ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی میکروپلاستیک پ‌ها مانند اندازه، چگالی و ترکیب شیمیایی ویژگی های کلیدی فراهمی زیستی آنها برای موجودات زنده است. هنگامی که این میکروپلاستیک‌های آلوده توسط موجودات دریایی بلعیده شوند، نه تنها بر عملکردهای مناسب زیست محیطی میکروارگانیسم ها تأثیر منفی می گذارد، بلکه تأثیر شدیدی بر شبکه غذایی آبزیان نیز دارد (Rochman et al., 2016). برخی مطالعات گزارش داده اند که میکروپلاستیک‌ها می‌توانند فراهمی زیستی فلزات سنگین را در رسوبات افزایش دهند. اثرات میکروپلاستیک‌ها بر فراهمی زیستی فلزات سنگین تحت شرایط مختلف تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله نوع پلاستیک، میزان پلاستیک ، غلظت و انواع فلزات سنگین و غیره می باشد. (Zhang et al., 2019). Wen و همکاران (۲۰۱۸) دریافتند وقتی کادمیوم و میکروپلاستیک‌ها بر روی ماهی به‌طور همزمان استفاده می‌شوند، واکنش استرس اکسیداتیو شدید و دفاع ایمنی ذاتی در مقایسه با تیمار دادن یکی از آن دو ایجاد می‌شود. با این حال، Sun و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد که ترکیب میکروپلاستک‌ها و فلزات سنگین می‌تواند باعث آسیب اکسیداتیو هیپوکامپ و افزایش مرگ و میر شود، اما این تأثیر عمدتا توسط فلزات سنگین ایجاد شده است، نه میکروپلاستیک‌ها. Yan و همکاران (۲۰۲۰) همچنین اشاره کردند که تأثیرات نامطلوب میکروپلاستیک ها و فلزات سنگین بر توسعه غدد جنسی *Oryzias melastigma* عمدتاً به دلیل فلزات سنگین بوده است.

[308] rodlet

بنابراین، به منظور ارزیابی عینی خطرات زیست محیطی ناشی از قرار گرفتن در معرض میکروپلاستیک ها و فلزات سنگین، تحقیقات عمیق لازم است تا نقش تاثیر غیر مستقیم ناشی از همکاری قرار گرفتن در معرض میکروپلاستیک‌ها و فلزات سنگین مشخص شود. با توجه به مساحت سطح وسیع و گروه‌های عملکردی، میکروپلاستیک‌ها می‌توانند به‌راحتی به عنوان حامل فلزات سنگین مختلف عمل کرده و در محیط‌های مختلف منتقل شده و حرکت کنند (Zhang et al., 2019). این فرایند جذب عمدتاً تحت تأثیر نوع و ویژگی‌های پلاستیک‌ها ، ویژگی‌های شیمیایی فلزات سنگین و عوامل محیطی مانند pH ، شوری ، و تفاوت غلظت آلاینده‌ها در پس زمینه است. Brennecke. و همکاران (۲۰۱۶) اعلام کردند که تجمع مس در ذرات PVC به دلیل سطح بیشتر و قطبیت PVC حاوی کلر به طور قابل توجهی بیشتر از PS است. Gao و همکاران (۲۰۱۹) به نتیجه ای مشابه رسیدند، آنها دریافتند PVC غلظت بالاتری از فلزات سنگین (Pb^{2+}، Cu^{2+}، Cd^{2}) را نسبت به PA، PE و POM جذب می کند. علاوه بر این، گروه های حاوی O در سطح میکروپلاستک‌های نایلونی جمع‌آوری شده نیز می‌توانند با Ni^{2+}، Cu^{2+} و Zn^{2+} در چند جهت تعامل داشته باشند. علاوه بر این، افزودنی‌های پلاستیکی نیز پتانسیل بسیار بالایی برای تغییر رفتار جذب میکروپلاستیک‌ها دارند.

عوامل محیطی مختلف بر فعل و انفعالات بین میکروپلاستیک‌ها و فلزات سنگین تاثیرگذارند. از جمله دما، pH، زمان تماس، قدرت یونی و اندازه ذرات. همچنین تجزیه نوری می تواند پیوندهای روی سطح میکروپلاستیک‌ها را بشکند و گروه های کربوکسیل جدیدی ایجاد کند (Liu et al., 2019). این گروه های حاوی اکسیژن می‌توانند قطبیت میکروپلاستیک‌ها را افزایش دهند و سطح میکروپلاستیک‌ها را واکنش پذیرتر کنند، که منجر به افزایش ظرفیت جذب یون‌های فلزی می‌شود. از نظر pH، به طور کلی فقط مورد pH کمتر از ۷ در نظر گرفته می شود زیرا یون های فلزی در شرایط قلیایی رسوب می کنند. pH می تواند به طور قابل توجهی بر ظرفیت جذب میکروپلاست ها به فلزات سنگین تأثیر بگذارد. هنگامی که pH کمتر از مقدار مشخصی باشد، میکروپلاستیک ها با فلزات سنگین تعامل ندارند (Tang et al., 2020). به طور کلی، افزایش سطح pH منجر به افزایش ظرفیت جذب فلزات سنگین می شود (Guo et al., 2020). یک مطالعه اخیر نشان داد که میکروپلاستیک‌ها را می توان در دفع انسان تشخیص داد، که تأیید می‌کند میکروپلاستیک‌ها می‌توانند از طریق مسیرهای مختلف وارد بدن انسان شوند (Schwabl et al., 2019). به‌عنوان یک حامل موثر فلزات سنگین، میکروپلاستیک‌ها می‌توانند آلاینده های پیچیده ای با فلزات سنگین تشکیل دهند که ممکن است بر سیستم ایمنی بدن تأثیر گذاشته و با ورود آنها به بدن باعث ایجاد بیماری های مختلف شود. آثار فلزات سنگین بر سلامت انسان به طور گسترده گزارش شده است. به عنوان مثال، جیوه می تواند باعث سمیت عصبی مزمن در انسان شود.

۴. نتیجه‌گیری

شواهد نشان دهنده حضور همه جانبه میکروپلاستیک‌ها و فلزات سنگین در محیط آبی است. میکروپلاستیک‌ها و فلزات سنگین می‌توانند در سطح بالایی در محیط تجمع کرده و در نتیجه سطوح مختلف زنجیره غذایی را آلوده کنند. این بررسی مروری بر دیدگاه متقابل میکروپلاستیک‌ها و فلزات سنگین ارائه می‌دهد. نتیجه تجزیه و تحلیل نشان داد که آلودگی، مکانیسم، رسوب، میکروپلاست‌ها و آلودگی کلید واژه های اصلی در ۳ سال اخیر هستند که نشان می دهد آلودگی میکروپلاستیک‌ها به‌طور گسترده مورد توجه قرار گرفته است. عوامل محیطی بر تعاملات بین میکروپلاستیک‌ها و فلزات سنگین تأثیر مهمی می‌گذارد، و اثرات سمی ترکیبی و خطرات احتمالی برای سلامت انسان نگران کننده است. تعدادی از مطالعات در مورد اثرات ترکیبی میکروپلاستیک‌ها و فلزات سنگین انجام شده است، که نشان می‌دهد تعامل بین دو نوع آلاینده می‌تواند اثرات هم افزایی، تضادی یا تقویت کننده بر موجودات را ایجاد کند. از آنجا که ارزیابی خطرات واقعی ناشی از قرار گرفتن در معرض میکروپلاستیک‌ها و فلزات سنگین برای انسان دشوار است، اثرات

آنها بر روی انسان نامشخص است. اگرچه شواهد زیادی نشان می‌دهد که میکروپلاستیک‌ها می‌توانند فلزات سنگین را جذب کنند، اما مکانیسم‌های کنترل رفتار جذب در محیط‌های مختلف به‌طور کامل شناخته نشده است. علاوه بر این، شواهد موجود عمدتا بر اساس آزمایشات کوتاه مدت در محیط آزمایشگاه بوده است، اثرات طولانی مدت میکروپلاستیک‌ها بر آلاینده‌های فلزی را نمی‌توان به اندازه کافی روشن کرد.

منابع

27. Abbasi S., Soltani N. and Keshavarzi, B. 2018. Microplastics in different tissues of fish and prawn from the Musa Estuary, Persian Gulf. Chemosphere, 205: 80-87.
28. Andrady A.L. 2011. Microplastics in the marine environment. Marine Pollution Bulletin, 62(8):1596–1605.
29. Authman M.M.N. 2008. *Oreochromis niloticus* as a Biomonitor of Heavy Metal Pollution with Emphasis on Potential Risk and Relation to Some Biological Aspects. Global Veterinaria, 2, 104-109.
30. Begum A., HariKrishna S and Khan I. 2009. Analysis of Heavy metals in Water, Sediments and fish samples of Madivala Lakes of Bangalore, Karnataka. International Journal of ChemTech Research, 1(2): 245-249.
31. Brennecke D., Duarte B., Paiva F., Caçdor I. and Canning-Clode J., 2016. Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 178: 189–195.
32. Castro-González M.I. and Méndez-Armenta M. 2008. Heavy metals: Implications associated to fish consumption. Environmental Toxicology and Pharmacology, 26: 263-271.
33. Chalkiadaki O., Dassenakis M. and Lydakis-Simantiris N. 2014. Bioconcentration of Cd and Ni in various tissues of two marine bivalves living in different habitats and exposed to heavily polluted seawater. Chemistry and Ecology, 30(8): 726-742.
34. Collignon A., Hecq J.H., Galgani F., Voisin P., Collard F. and Goffart A. 2012. Neustonic microplastic and zooplankton in the North Western Mediterranean Sea. Marine Pollution Bulletin, 64(4): 861–864.
35. Dong Y., Gao M., Song Z., and Qiu W. (2020). As (III) adsorption onto different-sized polystyrene microplastic particles and its mechanism. Chemosphere, 239:124792.
36. Fu Z., Guo W., Dang Z., Hu Q., Wu F., Feng C., and Giesy J.P. 2017. Refocusing on nonpriority toxic metals in the aquatic environment in China. Environmental Science and Technology, 51 (6): 3117–3118.
37. Gao F., Li J., Sun C., Zhang L., Jiang F., Cao W. and Zheng L. 2019. Study on the capability and characteristics of heavy metals enriched on microplastics in marine environment. Marine Pollution Bulletin, 144: 61–67.
38. Ghosh D, Bhattacharya S and Mazumder S. 2006. Perturbations in the catfish immune responses by arsenic: organ and cell-specific effects. Comparative Biochemistry and Physiology C, 143: 455-463.
39. Guo X. and Wang J. 2019. The chemical behaviors of microplastics in marine environment: A review, Marine Pollution Bulletin, 142: 1-14
40. Guo X., Hu G., Fan X., and Jia H. (2020). Sorption properties of cadmium on microplastics: the common practice experiment and a two-dimensional correlation spectroscopic study. Ecotoxicology and Environmental Safety, 190:110118.
41. Hou J.L., Zhuang P, Zhang L.Z., Fengl, Zhang T, Liu JY, and Feng G.P. 2011. Morphological deformities and recovery, accumulation and elimination of lead in body tissues of Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*, early life stages: a laboratory study. Journal of Applied Ichthyology, 27: 514-519.
42. Jezierska B., Ługowska K., and Witeska M. 2009. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). Fish physiology and biochemistry, 35(4): 625-640.
43. Krüger O., Fiedler F., Adam C., Vogel C. and Senz R. 2017. Determination of chromium (VI) in primary and secondary fertilizer and their respective precursors. Chemosphere, 182: 48-53.
44. Lei L.L., Wu S.Y. and Lu S.B. 2018. Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. Science of the Total Environment, 619: 1-8.
45. Leomá A., Matos Ana C.S., Cunha A., Sousa Jéssica P.R. …. and Horácio F.J.J, 2017. The influence of heavy metals on toxicogenetic damage in a Brazilian tropical river, Chemosphere, 185: 852-859.

46. Liu G., Zhu Z., Yang Y., Sun Y., Yu F., and Ma J. 2019. Sorption behavior and mechanism of hydrophilic organic chemicals to virgin and aged microplastics in freshwater and seawater. Environmental Pollution, 246: 26–33.
47. Malik N., Biswas A.K., Qureshi T.A., Borana K. and Virha R. 2010. Bioaccumulation of Heavy Metals in Fish Tissues of a Freshwater Lake of Bhopal. Environmental Monitoring and Assessment, 160: 267-276.
48. Medeiros R.J., Santos L.M. and Freire A.S., 2012. Determination of inorganic trace elements in edible marine fish from Rio de Janeiro State, Brazil. Food Control, 23:535–41.
49. Milatou N., Dassenakis M. and Megalofonou P. 2020. Mercury concentrations in reared Atlantic bluefin tuna and risk assessment for the consumers: to eat or not to eat? Food Chemistry, 331:127267.
50. Pan Z., Guo H., Chen H., Wang S., Sun X., Zou Q., Zhang Y., Lin H., Cai S. and Huang J. 2019. Microplastics in the northwestern Pacific: abundance, distribution, and characteristics. Science of the Total Environment, 650:1913–1922.
51. Peng J, Wang J, Cai L (2017) Current understanding of microplastics in the environment: occurrence, fate, risks, and what we should do. Integr Environ Assess Manag 13:476–482
52. Ramírez, R. 2013. The gastropod Osilinus atrata as a bioindicator of Cd, Cu, Pb and Zn contamination in the coastal waters of the Canary Islands. Chemistry and Ecology, 29(3), 208-220.
53. Rochman CM, Browne MA, and.. Thompson R.C. 2013 Classify plastic waste as hazardous. Nature, 494:169–171.
54. Sadeghi P., Loghmani M., Yousuf D.J., Taghizadeh Rahmat Abadi Z. 2021. Ecological and human health risk assessment of trace element pollution in sediments and five important commercial fishes of the Oman Sea, Marine Pollution Bulletin, 173:112962.
55. Schwabl P., Köppel S., Königshofer P., Bucsics T., Trauner M., and.. Reiberger T. 2019. Detection of various microplastics in human stool. Annals of Internal Medicine, 171:453.
56. Sfakianakis D.G., Renieri E., Kentouri M., and Tsatsakis, A.M. 2015. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: a review. Environmental research, 137: 246-255.
57. Sun J., Xia S., Ning Y., Pan X., Qu J., and Xu Y. 2019. Effects of microplastics and attached heavy metals on growth, immunity, and heavy metal accumulation in the yellow seahorse, *Hippocampus kuda* Bleeker. Marine Pollution Bulletin, 149:110510.
58. Tang S., Lin L., Wang X., Feng A., and Yu A. 2020. Pb(II) uptake onto nylon microplastics: Interaction mechanism and adsorption performance. Journal of Hazardous Material, 386:121960.
59. Wen B., Jin S., Chen Z., Gao J., LiuY., Liu J. 2018. Single and combined effects of microplastics and cadmium on the cadmium accumulation, antioxidant defence and innate immunity of the discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*). Environmental Pollution, 243: 462–471.
60. Wu N., Zhang Y. and.. Zhang X.H. 2019. Occurrence and distribution of microplastics in the surface water and sediment of two typical estuaries in Bohai Bay, China. Environmental Science: Processes & Impacts, 21: 1143-1152.
61. Yan W., Hamid N., Deng S., Jia P. and Pei D. 2020. Individual and combined toxicogenetic effects of microplastics and heavy metals (Cd, Pb, and Zn) perturb gut microbiota homeostasis and gonadal development in marine medaka (*Oryzias melastigma*). Journal of Hazardous Material, 397:122795.
62. Zhang S., Han B., Sun Y., and Wang F., 2019. Microplastics influence the adsorption and desorption characteristics of Cd in an agricultural soil. Journal of Hazardous Material, 388: 121775.

Different methods to prevent enzymatic browning reactions in shrimp

Salim Sharifian[1*]

1- Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University

*Corresponding Author Email address: sharifian.salim@hotmail.com

Abstract

The appearance of the food is one of the first characteristics used by consumers for evaluation. Shrimp is one of the aquatic animals having a lot of nutritional value. However, this product is highly susceptible to melanosis (browning) after harvest and deteriorates rapidly. Melanosis in shrimp is due to the activity of the enzyme polyphenol oxidase. This enzyme is mainly present in the carapace of shrimp cephalothorax and is the main cause of the formation of black pigments or melanosis in shrimp. These black spots do not change the taste of the shrimp and there are no reports of them being pathogenic, but they reduce the product's customer friendliness due to undesirable surface color changes. In this study, various methods to prevent enzymatic browning or melanosis, especially in seafood, have been reviewed.

Keywords: Seafood, Shrimp, Melanosis, Quality

روش‌های مختلف جلوگیری از واکنش‌های قهوه‌ای شدن آنزیمی در میگو

سلیم شریفیان[۱*]

۱- استادیار گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: *sharifian.salim@hotmail.com*

چکیده

ظاهر ماده غذایی، یکی از اولین ویژگی‌های مورد استفاده توسط مصرف کننده‌ها برای ارزیابی می‌باشد. میگو از جمله آبزیانی است که ارزش تغذیه‌ای زیادی دارد. با این وجود، این محصول پس از برداشت به شدت در معرض ملانوزیس (قهوه‌ای شدن) قرار داشته و به سرعت فاسد می‌شود. ملانوزیس در میگو در اثر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز می‌باشد. این آنزیم عمدتاً در کاراپاس سفالوتوراکس میگو وجود دارد و عامل اصلی تشکیل رنگدانه‌های سیاه یا ملانوزیس در میگو می‌باشد این لکه‌های سیاه تغییری در طعم میگو ایجاد نمی‌کنند و هیچ گزارشی مبتنی بر بیماری‌زا بودن آن‌ها وجود ندارد، اما به دلیل ایجاد تغییرات رنگی نامطلوب سطحی، مشتری پسندی محصول را کاهش می‌دهند. در این مطالعه، روش‌های مختلف جلوگیری از قهوه‌ای شدن آنزیمی یا ملانوزیس، به ویژه در غذاهای دریایی مورد بررسی قرار گرفته است.

واژگان کلیدی: غذاهای دریایی، میگو، ملانوزیس، کیفیت

۱. مقدمه

ظاهر، طعم، بافت و ارزش غذایی چهار ویژگی هستند که مصرف کننده ها هنگام انتخاب غذا آن ها را ارزیابی می‌کنند. ظاهر که به شدت متأثر از رنگ هست، یکی از اولین ویژگی‌های مورد استفاده توسط مصرف کننده‌ها برای ارزیابی می‌باشد. رنگ می‌تواند متأثر از ترکیبات زیادی باشد: رنگدانه‌های موجود طبیعی شامل کلروفیل ها، کارتنوئیدها، آنتوسیانین ها و غیره؛ یا دیگر رنگ های تشکیل شده به واسطه واکنش های آنزیمی و غیرآنزیمی. یکی از مهم‌ترین واکنش‌های رنگی تأثیرگذار در بسیاری از میوه ها، سبزیجات و غذاهای دریایی به ویژه سخت پوستان، قهوه‌ای شدن آنزیمی است که توسط آنزیم پلی فنل اکسیداز (۱، ۲ بنزن دی اُل؛ اکسیژن اکسیدو ردوکتاز، EC 1.10.3.1). این آنزیم هم‌چنین به نام های فنول اکسیداز، فنولاز، مونوفنول و دی فنول اکسیداز و تیروزیناز شناخته می‌شود (Kim و همکاران، ۲۰۰۰).

قهوه‌ای شدن آنزیمی یکی از مهم ترین واکنش‌های مطالعه شده در غذاهای دریایی، میوه‌ها و سبزیجات می‌باشد. پژوهشگران در حوزه‌های مواد غذایی، باغبانی، گیاه و فیزیولوژی پس از برداشت، میکروبیولوژی و حتی فیزیولوژی حشرات و سخت پوستان این واکنش را به دلیل اهمیت آن در کشاورزی بررسی کرده اند.

فنول اکسیداز مسبب نوعی تغییر رنگ به نام ملانوزیز در گونه های سخت پوستان از قبیل لابستر، میگو و خرچنگ می‌باشد. تغییر رنگ تیره پس از مرگ در سخت پوستان با نام ملانویز یا لکه سیاه به صورت ضمنی به فساد اشاره داشته و برای مصرف کنندگان غیر قابل قبول است و بنابراین ارزش بازاری این محصولات را کاهش می دهد. شکل ۱ مثالی از یک مقیاس بصری برای پیشرفت ملانوزیز را نشان می دهد (Liu و همکاران، ۲۰۰۶).



شکل ۱: مقیاس پیشرفت ملانوزیز در میگو (Kim et al., 2006)

۲. خصوصیات آنزیم پلی فنل اکسیداز

پلی فنل اکسیداز دو واکنش اصلی را کاتالیز می‌کند. در واکنش اول این آنزیم با استفاده از سوبستراهای فنول و اکسیژن، اضافه نمودن یک گروه هیدروکسیل (هیدروکسیلاسیون) در موقعیت اورتو را به گروه هیدروکسیل موجود کاتالیز می‌کند (تولید دی فنول). واکنش دوم، اکسیداسیون دی فنول به اورتو-بنزوکینون است و این ترکیب توسط مکانیسم‌های غیر آنزیمی در انتها به ملانین (ترکیبات قهوه ای) اکسید می‌گردد. هنوز مشخص نیست که آیا یک سیستم آنزیمی یکسان مسئول هر دو واکنش هست یا دو سیستم آنزیمی مجزا وجود دارد. برای مثال فعالیت منوفنول اکسیداز همیشه در سیستم های گیاهی وجود ندارد. با این وجود هنگامی که هر دو منوفنول و دی فنول اکسیداز وجود داشته باشد، نسبت مونوفنول به دی فنول اکسیداز معمولاً ۱ به ۱۰ یا بیش تر از ۱ به ۴۰ می باشد (Montero et al., 2006).

۳. روش‌های مختلف کنترل قهوه ای شدن

پلی فنل اکسیداز (PPO) اکسیداسیون فنل ها را به اورتو-کینون اکسید می‌کند. اورتو-کینون ها ترکیباتی به شدت واکنش پذیر هستند. آن ها می‌توانند به صورت خودبخودی به ترکیبات با وزن مولکولی بالا یا رنگدانه‌های قهوه‌ای (ملانین) پلیمریزه شوند یا با آمینو اسیدها و پروتئین‌ها واکنش دهند و ایجاد رنگ قهوه ای را شدت بخشند. روش‌های زیادی برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن آنزیمی انجام شده است. اساس کار جلوگیری از واکنش یک یا تعداد بیشتری از ترکیبات ضروری شامل اکسیژن، آنزیم، مس یا

سوبسترا می باشد. از ترکیبات شیمیایی نیز برای جلوگیری از واکنش PPO استفاده شده است. روش ها و مکانیسم های مختلفی در طی سال ها برای جلوگیری از واکنش PPO در محصولات غذایی ایجاد شده است. در این مقاله تلاش شده است که روش های جلوگیری از واکنش های قهوه ای شدن آنزیمی به ویژه در غذاهای دریایی مورد بررسی قرار گیرد.

۱-۳- فرآوری

۱-۱-۳- حرارت دادن

تیمار حرارتی به دلیل توانایی آن در تخریب میکروارگانیسم ها و غیرفعال سازی آنزیم، پر استفاده ترین روش مورد استغاده در تثبیت غذاها می باشد. دناتوره شدن آنزیم در درجه حرارت های بالا شامل تبدیل ساختار اصلی به یک ساختار در هم پیچیده می باشد که تقریباً فعالیت کاتالیستی خود را از دست داده است. با این وجود ثبات حرارتی یک آنزیم به ساختار آن، مقدار نسبی آب آزاد و متصل، اتصال سوبسترا، pH، و وجود نمک ها بستگی دارد.

با این وجود، تیمار حرارتی روشی عملی برای تیمار غذاهای تازه نمی باشد. در تیمارهای با درجه حرارت بالا، حرارت استفاده شده به ثبات حرارتی آنزیم برای غیر فعال شدن و هم چنین طبیعت محصولات غذایی بستگی دارد. به طور کلی در پاستوریزاسیون از درجه حرارت بین ۶۰ و ۸۵ درجه سانتیگراد استفاده می گردد که برخی از آنزیم ها را غیرفعال نمی سازد. تکنیک های رنگبری اغلب شامل محدوده ی درجه حرارت ۱۰۵-۷۰ درجه سانتیگراد یا بالاتر است. ثبات حرارتی PPO و ایزوآنزیم های آن بسته به منبع آنزیم متفاوت می باشد، اما به طور کلی قرار گرفتن آن در درجه حرارت بین ۹۰-۷۰ درجه سانتیگراد منجر به از بین رفتن فعالیت کاتالیزوری آن می گردد. زمان و درجه حرارت در فرایند رنگبری کنترل می شوند. مدت زمان مورد نیاز برای غیرفعال سازی حرارتی PPO در غذاهای مختلف بسیار متفاوت است. قرار گرفتن PPO میگوی سفید (Penaeus setiferus) به مدت ۳۰ دقیقه در ۶۰ درجه سانتیگراد یا بالاتر به سرعت غیرفعال گردید (Simpson et al., 1987).

معایب رنگبری شامل از بین رفتن مقداری از ویتامین ها، طعم، رنگ بافت، کربوهیدرات و دیگر ترکیبات محلول در آب در هنگام استفاده از آب یا بخار می باشد. میزان مصرف انرژی بالا و مشکلات حذف ضایعات نیز به دلیل نیاز به مقادیر بالای آب و انرژی وجود دارد. اگر قرار بر انجماد محصولات پس از رنگبری باشد، مرحله سردسازی باید قبل از انتقال محصول به فریزر انجام گیرد. اگر سرد سازی با آب سرد انجام گیرد، آب بیش تری نیز مصرف می گردد.

۲-۱-۳- سردسازی

برای جلوگیری از قهوه ای شدن در محصولات غذایی، نگهداری و محافظت در سرما در طی پخش و فروش ضروری است. این بر اساس این ایده است که درجه حرارت یخچال (سرما) در کاهش فعالیت آنزیم مؤثر می باشد. سرعت کاتالیز واکنش توسط آنزیم تا حدی زیادی توسط حرارت کنترل می شود. با هر ۱۰ درجه سانتیگراد افزایش حرارت (در محدوده ی مهم از نظر بیولوژیکی)، سرعت واکنش دو برابر می گردد. این به عنوان ضریب درجه حرارت (Q_{10}) شناخته می شود. به عبارت دیگر، هر ۱۰ درجه سانتیگراد کاهش درجه حرارت، کاهش مشابه‌ای در میزان فعالیت بیولوژیکی را ایجاد می نماید. در درجه حرارت پایین، کاهش انرژی جنبشی مولکول‌های واکنش دهنده منجر به کاهش جابجایی و "برخورد مؤثر" مورد نیاز برای شکل گیری مجموعه آنزیم-سوبسترا و ترکیبات بعدی آن می گردد.

۳-۱-۳- انجماد

اغلب از منجمد کردن در درجه حرارت ۱۸- درجه سانتیگراد یا پایین تر برای محافظت طولانی مدت از کیفیت غذا استفاده می گردد. فرضیه های متعددی برای توضیح مکانیسم غیر فعالسازی آنزیم در درجه حرارت انجماد وجود دارد. بسیاری از املاح از قبیل نمک، شکر، و دیگر کربوهیدارت ها در غلظت های بالا، بازدارنده های مؤثری می باشند. بنابراین، افزایش غلظت املاح ناشی از وضعیت انجماد بازدارندگی سوبسترا و محصول را افزایش خواهد داد. تأثیرات انجماد شاید به تغییرات pH نیز نسبت داده شود (Kim et al., 2006). تغییرات در غلظت و ترکیب بافر می تواند تغییر در pH را ایجاد نماید که اسیدیته واقعی به دلیل افزایش جابجایی یون هیدروژن در یخ در مقایسه با آب افزایش می یابد.

همانند درجه حرارت بالا، غیرفعال شدن ناشی از درجه حرارت پایین نیز معایب مربوط به خود را دارد. انجماد باعث تغییرات در بافت و دیگر خصوصیات تازگی می گردد. شاید بهترین مثال ثابت شده در این مورد، تجزیه آنزیم های خاص، سوبستراها و/یا فعال سازهای ناشی از تخریب سلول باشد. این موارد امکان فعالیت آنزیم در حالت انجماد را ممکن ساخته و حتی پس از یخ گشایی غذا آن را افزایش می دهد که به دلیل آزاد شدن ترکیبات پس از تخریب سلول می باشد.

۴-۱-۳- کاهش آب[۳۰۹] (آب زدایی)

میزان آب به طور کلی تأثیر فوق العاده ای بر فعالیت آنزیمی دارد چرا که به عنوان حلالی عمل می کند که در آن واکنش دهنده ها می توانند حل، جابجا و واکنش دهند؛ هم چنین به عنوان واکنش دهنده نیز عمل می کند.

در واکنش های آنزیمی، فعالیت آبی (a_w) بسیار اهمیت دارد. فعالیت آبی به عنوان نسبت p/p_o تعریف می گردد که در آن p فشار جزئی بخار آب در بالای نمونه و p_o فشار جزئی بخار آب اشباع شده در همان درجه حرارت است. کاهش a_w باعث بازدارندگی در فعالیت آنزیم می شود. در محیط جامد، a_w می تواند به دو شیوه بر واکنش ها تأثیرگذار باشد؛ عدم تحرک مواد واکنش دهنده و تغییر در ساختار فضایی فعال سوبستراها و پروتئین های آنزیمی. محصولات غذایی با رطوبت متوسط، میزان رطوبتی برابر با۴۰-۱۵٪ دارند و a_w یا با خشک کردن جزئی یا با افزودن ترکیبات متصل شونده به آب از قبیل پلی آل، شکر و نمک به منظور افزایش ثبات و جلوگیری از رشد میکروبی کنترل می گردد. آب زدایی، ممکن است دارای تأثیرات متفاوت زیادی بر روی آنزیم باشد که به دلیل تفاوت در واکنش آنزیم نسبت به غلظت املاح مختلف، بازدارنده ها یا فعال سازها می باشد. برخی املاح از قبیل شکر و پروتئین ها اغلب دارای اثر حفاظتی در غیر فعال سازی آنزیم ها هستند.

از نمک ها برای جلوگیری از فعالیت آنزیمی نامطلوب استفاده می شود که همراه با تعدیل دماپویایی (ترمودینامیک) واکنش های کاتالیز شده توسط آنزیم است. به طور کلی، آنیون های چند ظرفیتی از قبیل SO_3^{2-} و PO_4^{2-} تمایل به تثبیت آنزیم دارند، در حالی که کاتیون های چند ظرفیتی از قبیل Ca^{2+} و Mg^{2+} تمایل به ناپایدار کردن آن دارند (Adams, 1991). به طور کلی، غلظت های بالای نمک آب را از محیط واکنش حذف نموده (یعنی کاهش a_w) و آن را از دسترس واکنش های آب-پروتئین خارج ساخته و منجر به کاهش فعالیت می گردد. کلرید سدیم، ساکاروز و دیگر شکرها، گلیسرول، پروپیلن گلیکول و شربت ذرت تعدیل شده برخی از املاخ مورد استفاده در آبزدایی می باشند.

خشک کردن در انجماد شامل حذف رطوبت از غذا در حالت انجماد توسط تصعید تحت شرایط خلأ بالا می باشد. درجه حرارت پایین مورد استفاده در این فرایند مانع از واکنش های شیمیایی و بیوشیمیایی نامطلوب شده و از دست دادن ترکیبات آروماتیک فرار را به

[309] Dehydration

حداقل کاهش می دهد. محصول خشک شده از لحاظ وزنی سبک تر بوده و آن ها را می توان بدون سردسازی در ظروف بدون منفذ نگهداری نمود. این نوع محصولات دارای رنگ، طعم و ارزش تغذیه ای بسیار خوب خواهد بود. روش انجماد سریع میزان قهوه ای شدن آنزیمی را به حداقل رسانده و محصولی خشک شده (در انجماد) با کیفیتی عالی را ایجاد می نماید. علاوه بر خشک کردن با انجماد، روش های متعدد دیگر برای آبزدایی شامل خشک کردن با اسپری، تشعشع، خورشید و مایکروویو می باشد (Kim et al., 2006).

۵-۱-۳- پرتوافشانی[۳۱۰]

در حاضر استفاده از روش پرتوافشانی مواد غذایی به عنوان روشی برای کاهش خسارات پس از برداشت مواد غذایی، اطمینان از کیفیت بهداشتی و تسهیل کننده تجارت بیش تر در محصولات غذایی روز به روز در حال افزایش است. ویژگی منحصربفرد پرتوافشانی مواد غذایی استفاده از تشعشع یونیزه کننده برای بهبود مدت ماندگاری یا سالم ماندن محصول است. برای اطمینان از محافظت طولانی مدت محصول، میکروارگانیسم های مواد غذایی را می توان غیر فعال نمود. تشعشع های یونیزه کننده مورد استفاده در فرآوری مواد غذایی شامل اشعه گاما (از کبالت ۶۰ یا سزیوم ۱۳۷)، اشعه X و الکترون های شتاب داده شده (باریکه های الکترونی[۳۱۱]) می باشد. استفاده از انرژی یونیزه کننده در حفاظت و فرآوری مواد غذایی در ایالات متحده مورد تأیید قرار گرفته است (Kim et al., 2006).

پرتوافشانی میگوی تازه با میزان پایین اشعه گاما، ملانوزیز را کاهش داده و مدت ماندگاری را به طور معنی داری طی نگهداری در یخ افزایش داد. با این وجود، پرتوافشانی با میزان پایین اشعه گاما پس از شروع ملانوزیز در میگو باعث تسریع ملانوزیز گردید. میزان متوسط پرتوافشانی (۵ kGy) مانع از گسترش اریتین[۳۱۲] در کروماتوزوم ها گردید اما در جلوگیری از گسترش ملانین تأثیری نداشت (Yang et al., 1993). این بازدارندگی می تواند به دلیل تغییر ساختار فضایی ناشی از دگرگونی های فیزیکی و شیمیایی ایجاد شده در غشا توسط تشعشع باشد. پرتوافشانی یونیزه کننده در مقادیر بالا تر از ۱ kGy می تواند انواع مختلفی از اختلالات فیزیولوژیکی را در محصولات غذایی ایجاد نماید. هنگام یونیزاسیون غذا با انرژی یونیزاسیون، رادیکال های آزاد تولید می گردد. این رادیکال های آزاد با اجزای مختلف غذا واکنش داده و ممکن است اثرات جانبی نامطلوبی از قبیل تیره شدن بافت، اکسیداسیون چربی و کاهش میزان ویتامین را ایجاد نماید. واکنش های قهوه ای شدن غیر آنزیمی اسید آمینه های آزاد و پروتئین ها یا قندهای احیاء کننده از قبیل گلوکز نیز می تواند دلیلی بر این تغییر رنگ باشد. استفاده همزمان از چند روش پیشگیری، یعنی استفاده از تشعشع همراه با حرارت یا دیگر روش ها دارای تأثیر هم افزایی در پیشگیری از قهوه ای شدن آنزیمی است (Yang et al., 1993).

۶-۱-۳- فشار بالا و دی اکسید کربن فوق بحرانی

دناتوره شدن آنزیمی به علت بازآرایی و/یا تخریب پیوندهای غیرکووالان از قبیل پیوند هیدروژنی، تعامل هیدروفوبیک و پیوند یونی در ساختار سوم پروتئین ایجاد می گردد. فشار می تواند بر واکنش های بیوشیمیایی از طریق کاهش فضای مولکولی موجود و افزایش واکنش های درون زنجیره ای تأثیر بگذارد. در سیستم های آبی، باز کردن مولکول پروتئین باعث قرار گرفتن استخلاف های غیر قطبی در معرض آب می گردد. استخلاف های اسید آمینه در یک پروتئین باز نشده به علت محدودیت های ایجاد شده ناشی از تغییر ناپذیری زاویه و فاصله پیوند ها، ساختاری نفوذناپذیر نمی باشد.

---

[310] irradiation
[311] electron beams
[312] erythin

بنابراین فشار می تواند به صورت بالقوه یک روش عملی برای حفظ کیفیت مواد غذایی از طریق غیر فعال سازی آنزیم ها باشد. فشارهای بالاتر از ۵۰۰ مگاپاسکال (Mpa) معمولاً باعث دناتوره شدن غیر قابل بازگشت می گردد که به دلیل تضعیف تعامل های هیدروفوبیک و شکست پیوندهای یونی برون مولولی در این فشار می باشد. تأثیر اعمال فشار بالا بر روی آنزیم را می توان به تغییرات قابل بازگشت یا غیر قابل بازگشت در ساختار پروتئین نسبت داد. با این وجود در این مورد، از دست دادن توانایی کاتالیکی بسته به نوع آنزیم، ماهیت سوبسترا، درجه حرارت و مدت زمان فرآوری می تواند متفاوت باشد (Kunugi et al., 1992).

در تیمارهای فشار بالا، شاخص های کیفی از قبیل طعم، مزه و ویتامین ها بدون تغییر باقی مانده و حفظ می گردد. با این وجود، اعمال فشار، تغییرات کیفی خاصی در غذاها بسته به نوع غذا را ایجاد می نماید. از ترکیب صحیح فشار و درجه حرارت (گرما/سرما) می توان در افزایش غیر فعال سازی آنزیم و جلوگیری از تغییر طعم و تغییرات در رنگ، ارزش غذایی و ساختار در غذاهای خاص استفاده نمود (Montero et al., 2001).

غیر فعال سازی PPO با فشار در بافر Tris نیازمند استفاده از فشار ۹۰۰ مگاپاسکال در ۴۵ درجه سانتیگراد به مدت بیشتر از ۳۰ دقیقه است (Seyderhelm et al., 1996). غیرفعال شدن آنزیم توسط فشار به محیط غوطه وری، pH و هم چنین درجه حرارت و مدت زمان اعمال فشار بستگی دارد. با این وجود استفاده از فشار در سیستم های حقیقی غذایی ممکن است دارای اثر حفاظتی بر روی دیگر اجزاء بوده و بنابراین نیازمند استفاده از فشارهای بالاتری برای غیر فعال سازی PPO باشد.

سیال فوقی بحرانی، سیالی تحت شرایط فراتر از درجه حرارت و فشار بحرانی خود می باشد. ماده خالص در درجه حرارت و فشار بالاتر از نقطه بحرانی خود، در وضعیتی است که خصوصیاتی شبیه گاز و شبیه مایع را نشان می دهد (Kiran et al., 1997). در سیال فوق بحرانی چگالی بسیار نزدیک به وضعیت مایع، کشش سطحی نزدیک به صفر بوده و ضریب پخش و ویسکوزیته در وضعیت بین مایع و گاز می باشد. از دی اکسید کربن (CO_2) معمولاً به عنوان سیال فوق بحرانی استفاده می شود که به دلیل تقریباً خنثی بودن، غیر سمی بودن، مشتعل نبودن و ارزن بودن آن است. هم چنین، درجه حرارت و فشار بحرانی پایین دی اکسید کربن و سازگاری آن با محیط زیست، در نظر گرفتن آن را به عنوان سیال فوقی بحرانی بسیار مطلوب می سازد. در غذاهای مختلف، سیال فوق بحرانی دی اکسید کربن می تواند تعداد میکروارگانیسم ها را کاهش داده و آنزیم های ناخواسته را غیر فعال سازد. محلول CO_2 حل شده در فشار بالا در آب، همزمان با کاهش موقتی pH باعث تشکیل اسید کربنیک می گردد و این فرایند، آنزیم ها و میکروارگانیسم ها را غیر فعال می کند. قرار گرفتن PPO لابستر خاری فلوریدا (Panulirus argus) در معرض CO_2 (۱ اتمسفر) در ۳۳، ۳۸ و ۴۴ درجه سانتیگراد، باعث کاهش فعالیت آنزیم همزمان با افزایش زمان حرارت دهی شد. غیر فعال سازی PPO با CO_2 در حرارت ۴۳ درجه سانتیگراد نسبت به ۳۳ یا ۳۸ درجه سانتیگراد سریع تر بود. ناپایداری PPO لابستر نسبت به CO_2 و حرارت در محدوده ی ۴۳-۳۳ درجه سانتیگراد در مقایسه با حرارت به تنهایی بیش تر بود. فعالیت PPO متأثر از حرارت و فشار بود به گونه ای که در تیمار استفاده از هر روش با هم، هم افزایی در کاهش فعالیت مشاهده گردید. فعالیت پلی فنل اکسیدازهای به دست آمده از لابستر خاری فلوریدا، میگوی قهوه ای و سیب زمینی پس از تیمار با CO_2 فشار بالا در ۵۸ اتمسفر در ۴۳ درجه سانتیگراد همزمان با افزایش مدت زمان، کاهش یافت. به عنوان مثال، پس از قرار گرفتن پلی فنل اکسیدازهای لابستر، میگو و سیب زمینی در معرض تیمار بالا به مدت ۱ دقیقه، به ترتیب تنها ۲، ۲۲ و ۴۵٪ از فعالیت اولیه آنزیم حفظ گردید. بسته به منبع آنزیم، PPO می تواند در درجه حرارت پایین با CO_2 غیر فعال گردد. برای مثال، به نظر می رسد که PPO لابستر خاری نسبت به تمیار CO_2 بسیار حساس هست، در حالی که PPO سیب زمینی در برابر آن نسبتاً مقاوم است (Chen et al., 1993). طیف های دو رنگ نمایی دورانی[۳۱۳] در محدوده فرابنفش پلی فنل اکسیدازهای لابستر، میگوی قهوه ای و سیب زمینی تیمار نشده و تیمار شده با CO_2 فشار بالا به دست آمده است.

[313] The circular dichroism (CD) spectra

۲-۳- بازدارنده ها

استفاده از بازدارنده های قهوه ای شدن در فرآوری مواد غذایی به دلیل سمیت، سالم بودن آن، تأثیر بر روی مزه، طعم، بافت و هزینه محدود شده است. شش گروه از بازدارنده های مورد استفاده در جلوگیری از قهوه ای شدن آنزیمی وجود دارد:

۳۷. عوامل کاهنده از قبیل اسید آسکوربیک و ایزومر اریتروبیک اسید[۳۱۴] و ترکیبات مرتبط مورد استفاده برای انتقال گسترده یون های هیدروژن

۳۸. عوامل کلات کننده از قبیل سیتریک اسید و EDTA

۳۹. اسیدی کننده ها

۴۰. بازدارنده های آنزیمی

۴۱. تیمارهای آنزیمی

۴۲. عوامل ترکیبی

از میان بازدارنده‌های مختلف، عوامل کاهنده و بازدارنده‌های آنزیمی به عنوان گسترده‌ترین ترکیبات مورد استفاده بررسی خواهد شد.

۱-۲-۳- عوامل کاهنده/ آنتی اکسیدان ها

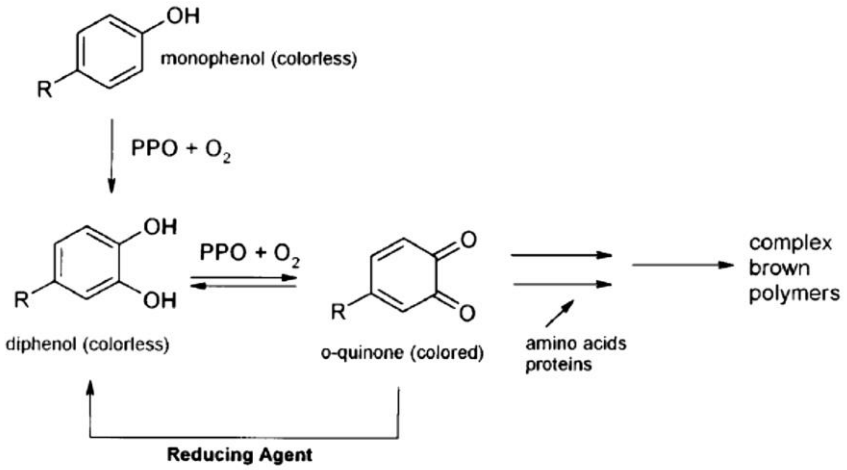
نقش اصلی عوامل کاهنده یا آنتی اکسیدان ها در جلوگیری از قهوه ای شدن، توانایی آن ها در احیاء اورتو-کینون به دی فنول های بی رنگ، یا واکنش غیر قابل بازگشت با اورتو-کینون برای ایجاد ترکیبات بی رنگ پایدار می باشد. استفاده از ترکیبات کاهنده مؤثرترین روش کنترل قهوه ای شدن پلی فنل اکسیدازی است. گسترده ترین شیوه ی مورد استفاده در صنایع غذایی برای کنترل قهوه ای شدن افزودن عوامل سولفیتی می باشد.

ترکیبات سولفیتی. سولفیت ها پرکاربردترین بازدارنده قهوه ای شدن آنزیمی مورد استفاده بوده است. ترکیبات سولفیتی شامل دی اکسید سولفور (SO_2) و شکل های متفاوت سولفیت غیرآلی می باشد که در محیط مورد استفاده SO_2 را آزاد می سازند. در محلول های آبی، SO_2 و نمک های سولفیتی باعث شکل گیری اسید سولفوروس می گردد که به صورت مخلوطی از یون بی سولفیت (HSO_3^-) و سولفیت (SO_3^{2-}) وجود خواهد داشت. اسید دوعاملی بر اساس طرح واکنش نشان داده شده یونیزه می گردد:

$$SO_2 \cdot H_2O \Leftrightarrow (H_2SO_3) \Leftrightarrow HSO_3^- + H^+$$
$$HSO_3^- \Leftrightarrow SO_3^{2-} + H^+$$

بی سولفیت بازدارنده ی رقابتی PPO است که یک گروه سولفیدریل را به جایگاه فعال آنزیم متصل می‌نماید. بازدارندگی بی سولفیت بر روی پلی فنل اکسیداز کاتالیزکننده ی ملانوزیز در لابستر توسط واکنش بی سولفیت با کینون های واسط و ایجاد سولفوکینون و جلوگیری از فعالیت PPO به صورت غیرقابل برگشت با غیر فعال سازی کامل آن صورت می گیرد (Kim et al., 2006). شکل ۲ مکانیسم عمل سولفیت ها در جلوگیری از قهوه ای شدن آنزیمی را نشان می دهد.

[314] erythorbic acid



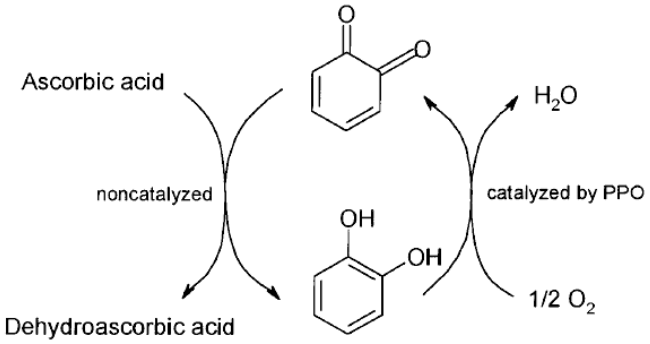
شکل 2: نقش اصلی عوامل کاهنده از قبیل ترکیبات سولفیتی در جلوگیری از قهوه ای شدن آنزیمی به دلیل احیاء ترکیبات میانی رنگی (کینون ها) به دی فنول های بی رنگ با واکنش پذیری کمتر (Kim et al., 2006)

ترکیبات سولفیتی به صورت گسترده در صنعت غذاهای دریایی برای جلوگیری از ملانوزیز استفاده می شود. سولفیت ها به صورت معمول در شناورهای صیادی میگو بلافاصله پس از صید برای جلوگیری از تشکیل لکه سیاه به کار می روند (Martínez-Alvarez et al., 2009). بر اساس قوانین، برای تأخیر در شکل گیری لکه سیاه و کمک به حفظ کیفیت، غوطه وری میگو و دیگر سخت پوستان به مدت ۱ دقیقه در محلول ۱/۲۵٪ بی سولفیت سدیم قبل از فرآوری یا نگهداری مجاز است. در این روش حداکثر باقیمانده مجاز سولفیت در بخش خام یا خوراکی ۱۰۰ ppm می باشد (Muxika et al., 2017). در میزان سولفیت باقیمانده بیش تر از ۱۰ ppm، برچسب زنی ضروری می باشد. معمول ترین و گسترده ترین ترکیب سولفیتی در پیشگیری از ملانوزیز میگو نمک متاسولفیت است. متاسولفیت یک انیدرید از بی سولفیت است که توانایی آزادسازی دو اکی والان دی اکسید سولفور را دارد. با این وجود هنگام آماده سازی محلول برای تیمار، متابی سولفیت سدیم میزان بالاتری از دی اکسید سولفور فرار نسبت به دیگر ترکیبات سولفیتی را آزاد می سازد. بنابراین استفاده از مخلوط های متفاوت متابی سولفیت سدیم و سولفید سدیم نشان داده است که به طور کلی دارای اثر مشابه استفاده تنها متابی سولفیت در کنترل مشکل ملانوزیز است. آزمایشات به تأخیر انداختن ملانوزیز نشان داده است که غلظت ۱٪ مخلوط متابی سولفیت سدیم/ سولفید سدیم با نسبت های ۸۵/۱۵ و ۶۰/۴۰ که معمولاً در روش های تجاری استفاده می گردد، دارای نتایج خوب و قابل قبولی است (Forbes et al., 1996). مخلوط های سولفیتی می توانند خطرات مرتبط با میزان باقیمانده ناشی از تیمارهای غوطه وری را کمتر کنند. میزان باقیمانده (SO_2) ناشی از محلول های سولفیتی ۰/۵٪ و ۱٪ کمتر از ۵۰ ppm در تیمار مخلوط سولفیت ۶۰/۴۰ بود. محلول سولفیت ۲٪ میزان باقیمانده کمتر از ۱۰۰ ppm را ایجاد نمود که پایین تر از حد توصیه شده توسط FDA برای میزان باقیمانده در میگوهای تیمار شده است. استفاده از مخلوط های سولفیتی می تواند کنترل ملانوزیز در صنایع را سالم تر نماید و امکان ادامه استفاده از مزایای تیمارهای سولفیتی را برای آن ها فراهم آورد.

مقدار سولفیت مورد نیاز برای کنترل قهوه ای شدن آنزیمی در درجه ی اول به ماهیت سوبسترای موجود بستگی دارد. هنگامی که مونوفنول ها از قبیل تیروزین وجود داشته باشند، مقدار سولفیت مورد نیاز بسیار کم است. هنگامی که دی فنول ها وجود داشته باشند، غلظت های بسیار بیش تری لازم است. علاوه بر این، از آن جایی که سولفیت ها به صورت غیر قابل بازگشت مانع از قهوه ای شدن نمی گردند، غلظت مورد نیاز به مدت زمانی که باید از مانع از انجام واکنش گردند، بستگی دارد. بنابراین میزان سولفیت مورد استفاده در غذاها بسته به کاربرد آن ها بسیار متفاوت است. با این وجود، برای استفاده از سولفیت ها محدودیت هایی وضع شده

است، که به دلیل اثرات بالقوه مخرب آن ها بر روی سلامتی می باشد. گزارش های متعددی درباره ی واکنش های آلرژیک ناشی از جذب غذاهای تیمار شده با سولفیت در افراد مبتلا به آسم وجود دارد. سولفیت در حال حاضر به عنوان ترکیب شیمیایی سالم (GRAS[315]) برای استفاده در میوه ها و سبزیجاتی که خام استفاده می شوند، در نظر گرفته نمی شوند و دیگر در میزهای غذا از آن استفاده نمی گردد. از این رو تحقیقات زیادی برای یافتن جایگزین های مناسب سولفیت در حال انجام است.

ال- اسکوربیک اسید. ال- اسکوربیک اسید و نمک های مختلف طبیعی و دیگر مشتقات آن آنتی اکسیدان های GRAS شاخص برای استفاده در محصولات غذایی در جلوگیری از قهوه ای شدن و دیگر واکنش های اکسیداسیون می باشد (Nirmal et al., 2015). اسید آسکوربیک (ویتامین C) ترکیبی با حلالیت بسیار بالا در آب و اسیدی و هم چنین تشکیل دهنده نمک های طبیعی همراه با بازها است. اسید آسکوربیک هم چنین به عنوان یک جاروب کننده اکسیژن[316] در کاهش اکسیژن مولکولی عمل می کند. مکانیسم بازدارندگی اسید آسکوربیک معمولاً به احیاء اورتوکینون های تشکیل شده به صورت آنزیمی به دی فنول های مرحله قبلی واکنش و بنابراین جلوگیری از تشکیل رنگدانه ها نسبت داده می شود (Nirmal et al., 2015). با این وجود این ترکیب (اسید آسکوربیک) در طی فرآوری به صورت غیرقابل بازگشت به دی هیدرو اسید آسکوربیک اکسید شده و قهوه ای شدن می تواند پس از اکسید شدن تمام اسید آسکوربیک ها دوباره به وقوع بپیوندد (شکل ۳). از این رو، این موضوع منجر به توسعه مشتقاتی از اسید آسکوربیک از قبیل اریتروبیک اسید، ۲- و ۳-فسفات، استرهای فسفینات و استرهای اسید چرب-۶-آسکوربیل شده که اشکال پایدارتری می باشند. این استرها هنگام هیدرولیز توسط فسفاتازهای اسیدی، اسید آسکوربیک را آزاد می سازند. با این وجود، کارایی نسبی آن ها به عنوان بازدارنده های قهوه ای شدن به محصولات غذایی بستگی دارد. این ترکیبات هنگام استفاده در میگو برای جلوگیری از ملانوزیز، رنگ زرد ناهمگون متمایزی را ایجاد می نماید (Kim et al., 2006). اسید آسکوربیک معمولاً همراه با اسید سیتریک استفاده شده که تمایل به حفظ شرایط بهتر اسیدی pH می گردد و هم چنین به عنوان عامل کلات کننده در برابر آنزیم هایی از قبیل پلی فنل اکسیدازهای دارای مس عمل می کنند (Nirmal et al., 2015).



شکل ۳: مکانیسم جلوگیری از تشکیل رنگ توسط اسید آسکوربیک

آنتی اکسیدان فنولی. آنتی اکسیدان ها با به تأخیر انداختن فساد و تغییر رنگ از طریق تداخل در فرایندهای اکسیداتیو ایجاد کننده رادیکال های آزاد، فلزات کلات کننده و هم چنین جاروب کردن اکسیژن منفرد از مواد غذایی حفاظت می کنند. از آنتی

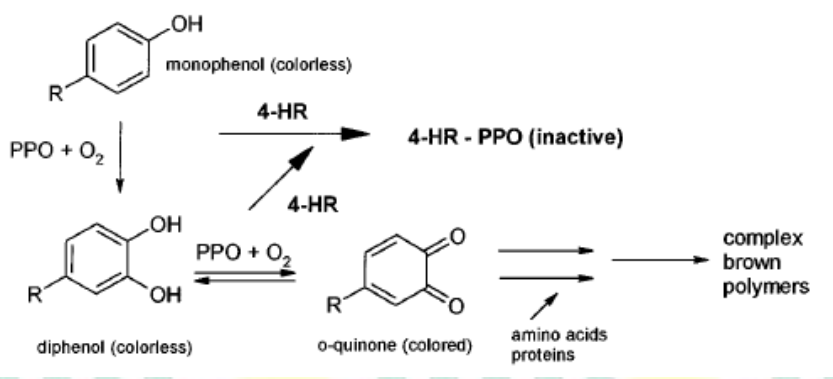
[315] generally regarded as safe
[316] oxygen scavenger

اکسیدان های فنولی مصنوعی یا طبیعی موجود می توان در غذاها استفاده نمود. آنتی اکسیدان های مصنوعی متعددی از قبیل بوتیل هیدورکسی انیزول (BHA)، بوتیل هیدورکسی تولوئن (BHT)، تترا بوتیل هیدروکسی کینون (TBHQ) و پروپیل گالات (PG) برای استفاده در مواد غذایی مجاز می باشد. آنتی اکسیدان های طبیعی موجود عمدتاً ترکیبات فنولی گیاهی از قبیل توکوفرول، ترکیبات فلاوونیدی، مشتقات اسیدی سینامیکی (دارچینی)، کومارین و غیره می باشد (Sharifian et al., 2019).

۲-۲-۳- بازدارنده های آنزیمی

۴-*هگزیل رزورسینول*. رزورسینول های استخلافی[۳۱۷] که از لحاظ ساختاری شبیه به سوبستراهای فنولی می باشند، به عنوان بازدارنده های PPO شناخته می شوند (Ramirez et al., 2003). مشتقات رزورسینول ترکیبات متا-دی فنولی هستند که به دلیل شباهت های ساختاری با سوبستراهای فنولی شاید مانع از واکنش های قهوه ای شدن با بازدارندگی رقابتی PPO گردند.

مزایای متعدد 4-HR نسبت به سولفیت ها در غذا شامل حالت خاص بازدارندگی آن، لازم بودن میزان کمتری از آن برای مؤثر بودن، قابلیت آن در بی رنگ کردن رنگدانه های از پیش تشکیل شده و ثبات شیمیایی آن می باشد. برای ایجاد هم افزایی در اثر ضد قهوه ای شدن، 4-HR همراه با اسید آسکوربیک استفاده می گردد. اسید آسکوربیک کینون های تولید شده توسط پلی فنل اکسیداز را برای به تأخیر انداختن قهوه ای شدن کاهش می دهد، در حالی که 4-HR یک بازدارنده اختصاصی PPO می باشد. 4-HR با PPO واکنش داده و کاتالیز واکنش های آنزیمی را برای آن ناممکن می سازد (شکل ۴) (Varlik et al., 2014).



شکل 4: اثر بازدارندگی ۴-هگزیل رزورسینول بر روی PPO. (Kim et al., 2006)

4-HR به عنوان بازدارنده رقابتی آنزیم عمل می کند. مطالعات متعددی کارایی 4-HR در کنترل قهوه ای شدن آنزیمی در میگو را نشان داده است. 4-HR ترکیبی شیمیایی با ثبات و محلول در آب است. از مدت ها پیش از این ترکیب در درمان انسان و حیوانات استفاده می شده است. بررسی سمیت، جهش زایی، سرطان زایی و حساسیت زایی نشان داده است که 4-HR در میزان مورد استفاده در تیمار میگو هیچ خطری در پی نخواهد داشت. در حال حاضر در ایالات متحده، 4-HR به عنوان ترکیبی GRAS در نظر گرفته می شود (۶۵) و استفاده از آن میگو توسط FDA تأیید شده است (Ramirez et al., 2003). استفاده از 4-HR برای جلوگیری از ملانوزیز در هنگامی که میزان باقیمانده آن در میگو کمتر از ۱ ppm باشد، هیچ تأثیری بر روی مزه، بافت یا رنگ ندارد (Martínez-Alvarez et al., 2005).

[317] The substituted resorcinols

۴- نتیجه گیری

راه های مختلف زیادی برای کنترل قهوه ای شدن آنزیمی وجود دارد. علاوه بر تیمار فیزیکی، گستره عظیمی از ترکیبات شیمیایی مانع فعالیت PPO می گردند، اما تنها شمار محدودی از آن ها به عنوان جایگزین های بالقوه سولفیت ها در نظر گرفته می شوند. روش های جدیدی برای کنترل قهوه ای شدن آنزیمی در دانشگاه ها، دولت ها، آزمایشگاه های تحقیقاتی و صنایع در حال مطالعه می باشد. این روش های جایگزین باید بر اساس کارایی، هزینه، روش کاربرد، ایمنی و وضعیت قوانین مورد بررسی قرار گیرد. هم چنین عوامل ضد قهوه ای نباید بر طعم، مزه، بافت یا رنگ محصولات غذایی تأثیر بگذارد.

منابع

20. Adams, JB. 1991. Review: Enzyme inactivation during heat processing of food-stuffs. Int J Food Sci Technol 26:1–20.
21. Chen, JS., MO Balaban, CI Wei, RA Gleeson, MR Marshall. 1993. Effect of carbon dioxide on the inactivation of Florida spiny lobster polyphenol oxidase. J Sci Food Agric 61:253–259.
22. Forbes, IC. 1996. Sodium metabisulfite and sodium sulfite blends to control shrimp melanosis and reduce sulfur dioxide. MS thesis, University of Florida, Gainesville, FL.
23. Kiran, E., Zhuang. W. 1997. Miscibility and phase separation of polymers in near- and supercritical fluids. In: MAAbraham, AK Sunol, eds. Supercritical Fluids. Washington, DC: American Chemical Society, pp. 2–36.
24. Kunugi. S. 1992. Effect of pressure on activity and specificity of some hydrolytic enzymes. In: C Balny, R Hayashi, K Heremans, P Masson, eds. High Pressure Technology. London: John Libbey Eurotext, pp. 129–137.
25. Martínez-Álvarez, O., López-Caballero, M.E., Montero, P., Gómez-Guillén, M.C. 2005b. A 4-hexylresorcinol-based formulation to prevent melanosis and microbial growth in chilled tiger prawns (Marsupenaeus japonicus) from aquaculture. Journal of Food Science 70(9):M415-M422.
26. Martínez-Alvarez, O., López-Caballero, ME., Gómez-Guillén, MC., Montero, P. 2009. The effect of several cooking treatments on subsequent chilled storage of thawed deepwater pink shrimp (Parapenaeus longirostris) treated with different melanosisinhibiting formulas. LWT - Food Science and Technology 42(8):1335-1344.
27. Muxika, A., Etxabide, A., Uranga, J., Guerrero, P., de la Caba, K. 2017. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. International Journal of Biological Macromolecules, 105(2):1358-1368.
28. Nirmal, N. P., Benjakul, S., Ahmad, M., Arfat, Y. A., Panichayupakaranant, P. 2015. Undesirable Enzymatic Browning in Crustaceans: Causative Effects and Its Inhibition by Phenolic Compounds. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 55(14): 1992- 2003
29. Ramírez, E.C., Whitaker, J.R., Virador, V. 2003. Polyphenol oxidase. In: Handbook of Food Enzymology (edited by J.R. Whitaker, A.G.J. Voragen & D.W.S. Wong). Pp. 509–523. New York, NY: Marcel Dekker, Inc.
30. Seyderhelm, I., Boguslawski, S., Michaels, G., Knorr, D. 1996. Pressure induced inactivation of selected food enzymes. J Food Sci 61:308–310.
31. Sharifian, S., Shabanpour, B., Taheri, A., Kordjazi, M. 2019. Effect of phlorotannins on melanosis and quality changes of Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) during iced storage. Food chemistry 298, 124980
32. Simpson, BK., Marshall, MR., Otwell, WS. 1987. Phenoloxidase from shrimp (Paneus setiferus): Purification and some properties. J Agric Food Chem 35:918–921.
33. Varlik, C., Bostan, K., Bingol, E.B. 2014. Effects of treatment with chitosan and antimelanogenesis agents on discoloration of chilled and frozen stored shrimp. Med. Weter., 70(6):362-368
34. Yang, JS., Perng, FS., Liou, SE., Wu. JJ. 1993. Effects of gamma irradiation on chromatophores and volatile components of grass shrimp muscle. Radiat Phys Chem 42:319–322.

Investigating the nutritional dependence of Indian illisha, *Ilisha melastoma* (Bloch & Schneider, 1801) to the primary production of mangroves

Omid Shayanfar[1]; Mehdi Godrati Shojaei[*1]; Siamak Behzadi[2]

1-Department of marine biology, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, University of Tarbiat Modares

2- Department of marine biology, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, University of Tarbiat Modares

3-Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Institute, Fisheries Science Research Institute,

Agricultural Education and Extension Research Organization, Bandar Abbas

**Corresponding author: mshojaei@modares.ac.ir*

Abstract:

The conservation value of coastal ecosystems has been determined by assessing the diversity and abundance of species in a given habitat. Evidence demonstrating which primary producers constitute the ultimate source of nutrition for consumers provides additional support for the relative importance of different coastal habitats. Due to extensive movement of organic matter in coastal systems, consumers may be segregated from the primary producers upon which they rely. In the current study, the ultimate sources of organic matter supporting the nutrition of Indian ilisha, *Ilisha melastoma* (Bloch & Schneider, 1801) will be determined using stable carbon and nitrogen isotopes ($\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$). Sampling will be conducted seasonally in February and June 2021 in Hara mangrove forest, Persian Gulf. Three potential food sources including leaves of *Avicennia marina*, microphytobenthos and particulate organic matter will be collected for further processing. Fish will be collected using block nets set at slack high water at mangrove-lined creeks. Samples of white muscle (boneless and skinned, 5g) will be removed from the dorsum of fish for processing. All samples will be oven-dried to constant weight at 60°C. After processing, samples will be placed in tin capsules and analysed on an isotope ratio mass spectrometer. The Bayseian mixing model will be used to determine the contribution of organic matter sources to the nutrition of fish.

Keywords: Diet, Organic matter, Mangrove, Microphytobenthos, Particulate organic matter, Food web

بررسی وابستگی غذایی ماهی شمسک کوچک Ilisha melstoma (Bloch & Schneider, 1801) به تولیدات اولیه درخت حرا Avicennia marina

امید شایان فر[۱]؛ مهدی قدرتی شجاعی[۱*]؛ سیامک بهزادی[۲]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی دریا، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی شهرستان نور، دانشگاه تربیت مدرس
۲-استادیار گروه زیست شناسی دریا، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی شهرستان نور، دانشگاه تربیت مدرس

۳- پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس ودریای عمان، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس

*مسئول مکاتبات: mshojaei@modares.ac.ir

چکیده

اهمیت بوم‌سازگان‌های ساحلی و لزوم حفاظت از آنها، با میزان تنوع زیستی و فراوانی گونه‌های ساکن در آنها در ارتباط است. با این وجود، شواهدی که نشان دهد که تولیدکنندگان اولیه بوم‌سازگان‌های ساحلی، منبع اولیه مواد آلی مورد نیاز مصرف‌کنندگان هستند، بر اهمیت این زیستگاه‌های ساحلی می‌افزاید. در مطالعه حاضر، منابع اولیه مواد آلی مورد استفاده ماهی شمسک کوچک Ilisha melstoma (Bloch & Schneider, 1801) با استفاده از ایزوتوپ‌های پایدار کربن ($\delta^{13}C$)، نیتروژن ($\delta^{15}N$) مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌برداری در جنگل مانگرو بندر خمیر در خلیج فارس انجام شد. برگ‌های درخت حرا Avicennia marina ، ریزجلبک‌های کف‌زی و ذرات آلی معلق به عنوان سه منبع غذایی اولیه جمع‌آوری شدند. در ماهی‌ها نمونه‌هایی از بافت ماهیچه سفید (بدون استخوان و پوست ، ۵ گرم) از کنار پشت باله پشتی جدا گردید. تمام نمونه‌ها برای رسیدن به وزن ثابت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. نتایج نشان داد که به ترتیب ذرات معلق، ریزجلبک‌های کف‌زی و گیاه حرا بیشترین نقش را در تامین مواد آلی این گونه بر عهده دارند.

واژگان کلیدی: تغذیه، مواد آلی، مانگرو، ریزجلبک‌های کف‌زی ، ذرات آلی معلق، شبکه غذایی

۱.مقدمه

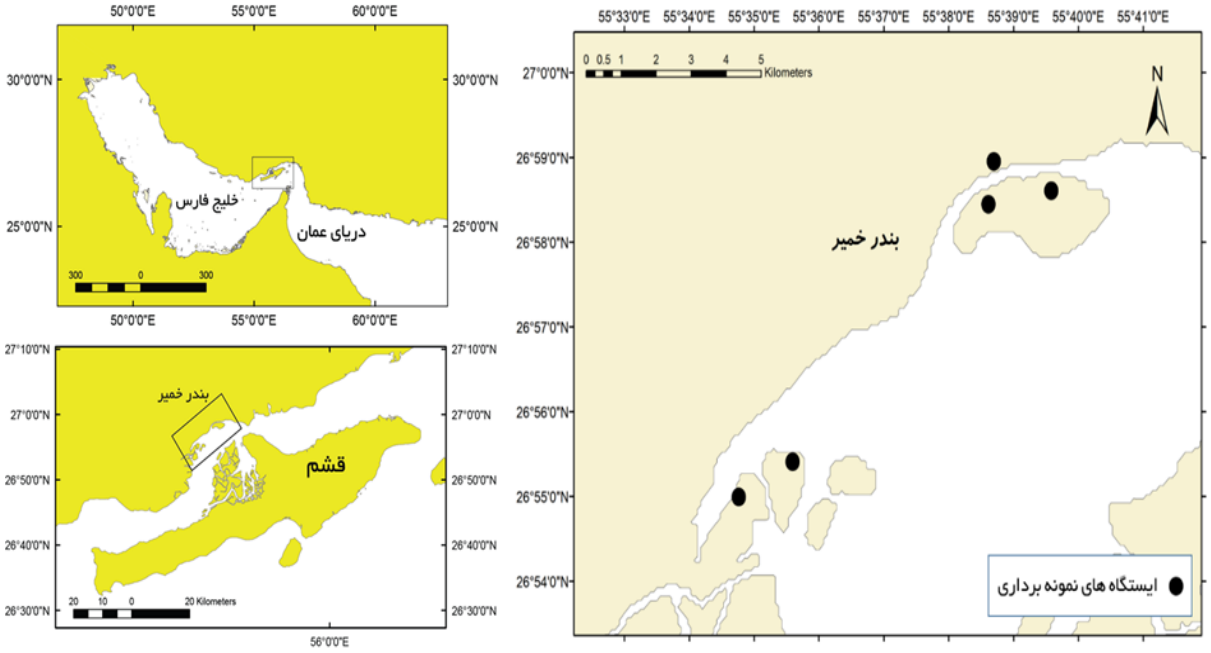
استفاده از ایزوتوپ‌های پایدار در مطالعات بوم‌سازگان‌های دریایی در دهه گذشته سرعت زیادی گرفته است. یکی از این کاربردهای مهم، استفاده از ایزوتوپ‌های پایدار کربن و نیتروژن در بررسی رژیم غذایی آبزیان دریایی می‌باشد که در کنار روش‌هایی مانند بررسی محتوای معده و آنالیز اسیدهای چرب جهت بررسی ارتباطات شبکه غذایی ساحلی و دریایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. دقت بالا، تعداد کم نمونه مورد نیاز و قابلیت سنجش در نمونه‌های بسیار کوچک از مزایای استفاده از ایزوتوپ‌های پایدار در این مطالعات می‌باشد (Peterson and Fry, 1987). مطالعات زیادی در مورد استفاده از ایزوتوپ‌های پایدار در بررسی شبکه‌غذایی بوم‌سازگان‌های دریایی و ساحلی انجام گرفته است که شامل مطالعه رژیم غذایی تک گونه‌ها، بررسی ساختار شبکه غذایی اجتماعات و تعیین میزان مشارکت منابع غذایی در تامین مواد آلی مورد نیاز آبزیان است.

در مطالعه‌ای در مانگروهای جنوب خلیج فارس، مشارکت معنی‌دار تولیدات اولیه درخت حرا *Avicennia marina* در تغذیه میگوی گونه *Palaemon khori* در قطر مورد تاکید قرار گرفته است (Al-Maslamani et al., 2013). در بررسی میزان مشارکت مواد آلی درختان مانگرو در تامین غذای مورد نیاز ماهیان جنگل‌های مانگرو در جنوب غربی تایلند به کمک بررسی محتوای دستگاه گوارشی و تجزیه و تحلیل ایزوتوپ‌های پایدار نتایج نشان داد که ماهی‌ها از تولیدات اولیه درختان مانگرو به عنوان منبع اصلی تغذیه‌ای استفاده می‌کنند (Zagars et al., 2013). در مطالعه‌ای در بوم‌سازگان مانگروی پاناما بررسی رژیم تغذیه‌ای ماهیان به کمک ایزوتوپ‌های پایدار نشان داد که علاوه بر میزان و نوع منابع غذایی در دسترس، ویژگی‌های ساختاری بوم‌سازگان‌های مانگرو نیز در غذای مصرفی ماهی‌ها و سطوح غذایی آنها تاثیر گذار است (Stuthmann and Castellanos-Galindo, 2020). عواملی چون سرعت جریانات جزرومدی، سیستم هیدرولوژیک، پراکنش مکانی و زمانی شکار و شکارچی، پوشش گیاهان آبزی و تفاوت‌هایی که در اندازه گونه‌های ماهی مختلف وجود دارند، همه می‌توانند در رژیم غذایی ماهیان در بوم‌سازگان‌های مانگرو تاثیرگذار باشند (Nagelkarken, 2009). به دلیل جابجایی گسترده مواد آلی در سیستم‌های ساحلی، مصرف کنندگان ممکن است غیر از تولید کنندگان اصلی که به آنها وابسته هستند، از منابع غذایی دیگری هم استفاده کنند. در این تحقیق وابستگی غذایی ماهی شمسک کوچک Ilisha melastoma (Bloch & Schneider, 1801) به تولیدات اولیه درخت حرا Avicennia marina در جنگل حرای بندر خمیر به کمک ایزوتوپ‌های پایدار کربن ($\delta^{13}C$)، نیتروژن ($\delta^{15}N$) مورد بررسی قرار گرفت.

۲.مواد و روش‌ها

۲-۱-منطقه نمونه برداری

نمونه‌برداری در اکوسیستم مانگروی بندر خمیر استان هرمزگان که جزئی از ذخیره‌گاه زیست کره حرا انجام شده است. وسعت جنگل‌های مانگرو در منطقه بندرخمیر (26°58'38.4"N 55°38'53.4"E) حدود ۱۵ کیلومتر مربع است که حدود ۱۷ درصد جنگل‌های مانگروی ایران را شامل می‌شود. گونه درخت حرا Avicennia marina تنها گونه‌ای است که به طور طبیعی در این منطقه رشد کرده است. در بندر خمیر درختان حرا عمدتا در ساحل و کنار نهرهایی با عرض بین ۳ تا ۱۰ متر رشد کرده‌اند. هر چند جنگل مردو به صورت جزیره‌ای با فاصله حدود ۱۰۰ متر از ساحل توسط کانالی به نام خور مردو از ساحل جدا می‌شود. ارتفاع اغلب درختان این منطقه بین ۳ تا ۶ متر است (Spalding et al., 2010). منطقه دارای اقلیمی بیابانی و با متوسط بارش کمتر از ۲۰۰ میلی متر در سال است (Sheppard et al., 2010). با توجه به این بارش کم و این‌که ورودی آب شیرین از ساحل بسیار کم و محدود به رودخانه فصلی شور است، میزان شوری در آب پای درختان این منطقه از ۳۰ تا ۵۰ واحد در هزار در نوسان است (Hajalizadeh et al., 2020).



شکل1: نقشه محل و ایستگاه‌های نمونه برداری در بوم‌سازگان حرا بندر خمیر

۲-۲-نمونه‌برداری از منابع غذایی اولیه

نمونه‌برداری در این تحقیق در فصل تابستان انجام پذیرفت. سه منبع غذایی اولیه شامل برگ درخت حرا، ریزجلبک‌های کف‌زی و ذرات آلی معلق (Particulate Organic Matter) مورد بررسی قرار گرفت. برگ‌های حرا از پنج درخت به طور جداگانه جمع‌آوری شدند. ریزجلبک‌های کف‌زی به هنگام جزر در مکان‌های رشد آنها، با خراش لایه سطحی رسوبات به کمک اسکالپل با دقت جمع‌آوری شدند (Shahraki et al., 2014). نمونه‌برداری از ذرات آلی معلق نیز در زمان حداکثر مد انجام شد. برای این منظور، مواد آلی معلق ابتدا توسط تور پلانکتون با چشمه ۵۰ میکرون گرفته شده و در ادامه محلول باقی مانده به کمک پمپ خلاء تلغیظ گردید.

۲-۳-نمونه برداری از ماهی

ماهی شمسک کوچک با نام علمی *Ilisha melastoma* (Bloch & Scheider, 1801) و با نام محلی پیکو در استان هرمزگان شناخته می‌شود. این ماهی از نظر رده‌بندی در رده پرتوبالگان (Actinopterygii)، راسته شگ‌ماهی‌شکلان (Clupeiformes)، خانواده شکم اره‌ای ماهیان (Pristigasteridae) و جنس ایلیشا (Ilisha) قرار دارد. این ماهی دریازی سطح‌زی بوده و ساکن آب‌های ساحلی گرمسیری است که می‌تواند تا عمق ۵۰ متری آب نیز حضور داشته باشد. ماهی شمسک کوچک می‌تواند وارد خورها شود و توانایی تحمل شوری پایین آب را دارد. این ماهی توسط افراد محلی استفاده می‌شود، ولی از نظر تجاری اهمیت کمی دارد. با این وجود نقش مهمی در پویایی شبکه‌غذایی بوم‌سازگان ساحلی ایفا می‌نماید. حداکثر طول بدن ماهی به ۲۲ سانتی متر می‌رسد. این ماهی پلانکتون‌خوار بوده و احتمالا می‌تواند از سخت‌پوستان کوچک نیز تغذیه نماید (Whitehead, 1985). جهت نمونه‌برداری از ماهی‌ها،

دهانه نهرهای دارای درخت حرا با نصب تورهایی به نام خوربند بسته شد تا در زمان جزر و به هنگام تخلیه آب از نهر، ماهی‌ها جمع‌آوری شود. از هر نهر به تعداد ۵ نمونه ماهی جمع‌آوری شد. تمام نمونه‌های به دست آمده بلافاصله بعد از صید فریز شدند تا از تغییرات ایزوتوپی آنها جلوگیری شود.

۲-۴-آنالیز آماری و مدل سازی

در این تحقیق به منظور بررسی توزیع نرمال داده‌های حاصل از آنالیز نمونه‌ها از آزمون شپیرو ویلک (Shapiro-Wilk) استفاده شده است. در صورت توزیع نرمال داده‌ها از آزمون‌های پارامتری و در غیر اینصورت (پس از تلاش برای نرمال کردن داده‌ها) از آزمون‌های ناپارامتری برای مقایسه داده‌ها استفاده شد. با فرض نرمال بودن توزیع داده‌ها، برای مقایسه نسبت‌های ایزوتوپی بین منابع غذایی اولیه از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده گردید. همچنین برای مقایسه نسبت‌های ایزوتوپی منابع غذایی اولیه و ماهی‌ها بین دو فصل از آزمون Paired sample t-test استفاده شد.

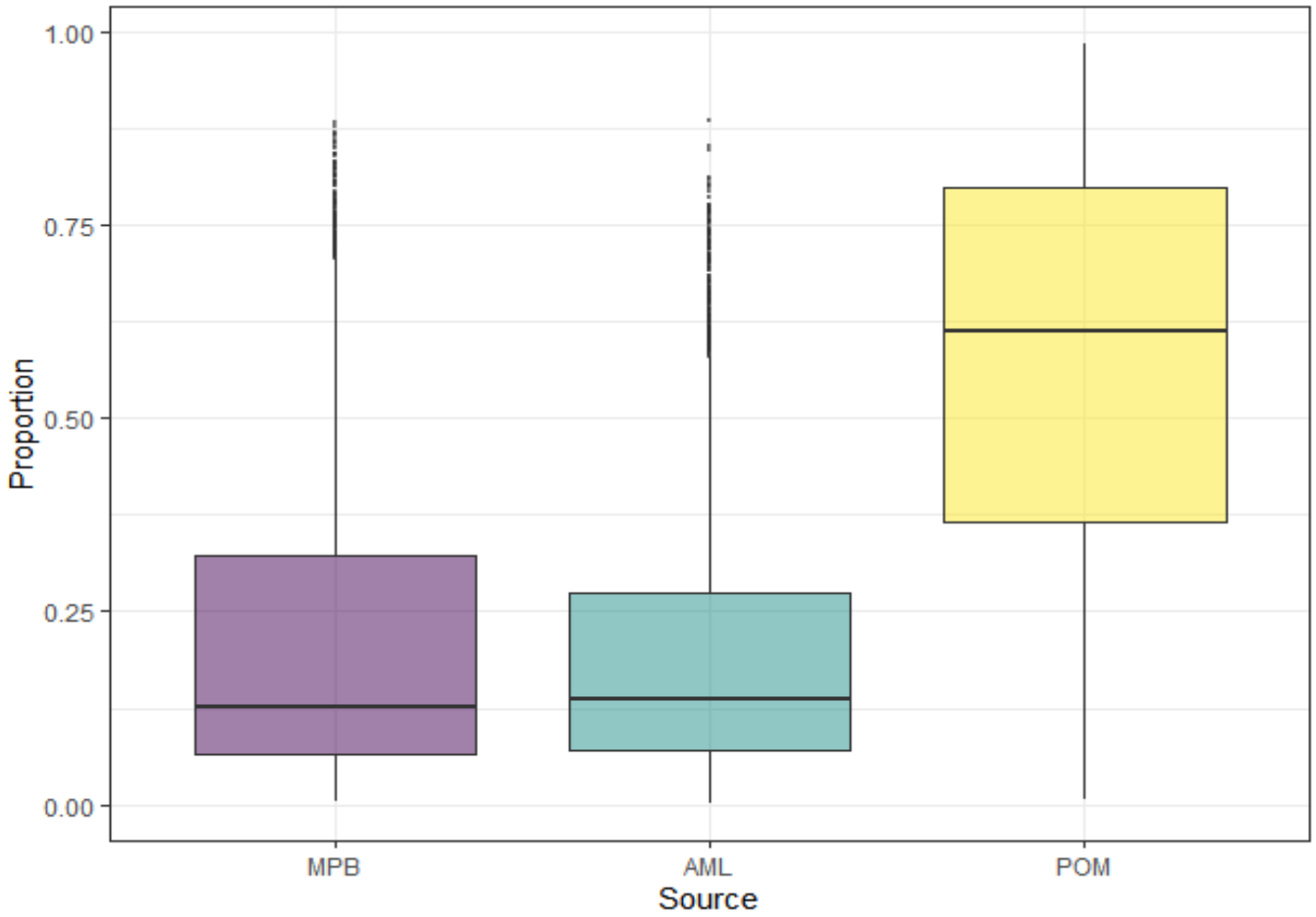
میزان استاندارد ($R_{standard}$) برای ایزوتوپ نیتروژن نسبت ایزوتوپ نیتروژن ۱۵ به نیتروژن ۱۴ در نمونه هوا و میزان استاندارد برای ایزوتوپ کربن نسبت ایزوتوپ کربن ۱۳ به کربن ۱۲ در نمونه‌ی فسیل Pee Dee Belemnite (فسیل نوعی گونه دریایی) است (Coplen et al., 1996). پس از محاسبه نسبت ایزوتوپ‌های کربن و نیتروژن منابع آلی اولیه و ماهی، ابتدا رابطه غذایی بین منابع غذایی اولیه و ماهی گونه *I. melastoma* از طریق مدل Iso-Space بررسی شد. این مدل می‌تواند موقعیت‌های تغذیه‌ای جاندار را نسبت به منابع غذایی آن نشان دهد (Abrantes and sheaves, 2009).

۳.نتایج و بحث

نتایج مدل سیمر نشان داد که ذرات آلی معلق، ریزجلبک‌های کف‌زی و برگ سبز گیاه حرا به ترتیب با ۵۷/۵ درصد، ۲۲/۵ درصد و ۲۰ درصد به ترتیب بیشترین نقش را در تامین غذای مورد نیاز ماهی *I. melastoma* ایفا می کنند (جدول ۱). ضریب همبستگی بین منابع اولیه غذایی نقش مهمی در دقت اندازه گیری های مدل سیمر ایفا می کند. اگر ضریب همبستگی بین منابع بیشتر از ۰/۹ برآورد شود به این معنی است که مدل توانایی تفکیک منابع غذایی را به منظور بررسی نقش هر کدام از آنها به طور جداگانه ندارد.

جدول ۱: میانگین درصد مشارکت و انحراف معیار منابع غذایی مورد مطالعه در این پژوهش در رژیم غذایی ماهی

منابع غذایی اولیه	میانگین درصد مشارکت	انحراف معیار
برگ سبز گیاه حرا	20	17
ریز جلبک های کف‌زی	22/5	22
ذرات آلی معلق	57/5	26



شکل 2: درصد مشارکت منابع اولیه غذایی (AML= برگ سبز حرا ، POM= ذرات آلی معلق، MPB= ریزجلبک‌های کف‌زی) در رژیم غذایی ماهی در بوم‌سازگان مانگرو ذخیره‌گاه زیست‌کره حرا

ذرات آلی معلق می‌توانند دو منشاء اصلی داشته باشند که شامل پلانکتون‌ها و بقایای آنها و ذرات آلی ناشی از سایر تولیدکنندگان اولیه (ریزجلبک‌های کف‌زی و گیاهان مانگرو) است. با توجه به جریان دایمی آب به داخل و خارج بوم‌سازگان مانگرو در زمان جزر و مد، منشاء ذرات آلی معلق می‌تواند خارج از این بوم‌سازگان نیز باشد. از آنجایی که در این پژوهش ترکیب ایزوتوپی ذرات آلی معلق در فاصله معنی‌داری از سایر تولیدکنندگان اولیه قرار گرفته است، می‌توان نتیجه گرفت که در بوم‌سازگان حرای مورد مطالعه منشا ذرات آلی معلق عمدتا از پلانکتون‌ها و یا خارج از بوم‌سازگان مانگرو است.

بر اساس نتایج دو مدل ایزوتوپی مورد مطالعه در این پژوهش نسبت ایزوتوپی ماهی گونه شمسک کوچک به طور عمده مشابه نسبت‌های ایزوتوپی ذرات آلی معلق است. از طرفی بالا بودن نسبت ایزوتوپ نیتروژن در این گونه نشان‌دهنده تغذیه آن از بی‌مهرگان

نیز می‌باشد. این نتیجه در راستای نتایجی است که در این جنس از طریق بررسی محتوای معده و یا با استفاده از ترکیبات ایزوتوپی به دست آمده است. عدم ارتباط تغذیه‌ای این گونه با تولیدات اولیه گیاه حرا می‌تواند ناشی از عدم حضور دایمی این گونه در نهرهای دارای پوشش گیاهی در بوم‌سازگان مانگرو باشد. همچنین ممکن است تغذیه این ماهی از بی‌مهرگانی باشد که از برگ‌ها، پوده‌ها و یا ریزجلبک‌های کف‌زی مانگرو به عنوان منبع اصلی غذایی تغذیه نمی‌کنند. علیرغم عدم تغذیه ماهی‌ها از مواد آلی تولید شده توسط گیاه حرا ، این بوم‌سازگان به دلیل فراهم کردن پناهگاه و محل نوزادگاهی برای بسیاری از ماهی‌ها همواره مهم است، زیرا از طریق کم کردن فشار شکارچی باعث بقای این گونه‌ها می‌شود. علاوه بر این تغذیه این ماهی از منبعی به غیر از کربن آلی گیاه حرا نشان دهنده وابستگی این گونه به بوم‌سازگان‌های مجاور برای تغذیه و استفاده از بوم‌سازگان مانگرو به عنوان پناهگاه می‌باشد که نشان‌دهنده پیوندهای قوی بین بوم‌سازگان‌های دریایی می‌باشد.

۴.نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که در ذخیره‌گاه زیست‌کره حرا نقش پناهگاهی بوم‌سازگان مانگرو برای گونه‌های کوچک سطح‌زی در مقایسه با نقش تغذیه‌ای تولیدات گیاهان آن، دارای ارزش بالایی است.

منابع

15. **Abrantes, K., & Sheaves, M. (2009).** Food web structure in a near-pristine mangrove area of the Australian Wet Tropics. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *82*(4), 597-607.
16. **Al-Maslamani, I., Walton, M. E. M., Kennedy, H. A., Al-Mohannadi, M., & Le Vay, L. (2013).** Are mangroves in arid environments isolated systems? Life-history and evidence of dietary contribution from inwelling in a mangrove-resident shrimp species. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *124*, 56-63.
17. Coplen, T. B., De Bièvre, P., Krouse, H. R., Vocke, R. D., Gröning, M., & Rozanski, K. (1996).
18. Ratios for light-element isotopes standardized for better interlaboratory comparison. *Eos, Transactions American Geophysical Union*, 77(27), 255-255.
19. **Hajializadeh, P., Safaie, M., Naderloo, R., Shojaei, M. G., Gammal, J., Villnäs, A., & Norkko, A. (2020).** Species Composition and Functional Traits of Macrofauna in Different Mangrove Habitats in the Persian Gulf. *Frontiers in Marine Science*, *7*, 1-16.
20. Nagelkerken, I. (2009). Evaluation of nursery function of mangroves and seagrass beds for tropical decapods and reef fishes: patterns and underlying mechanisms. In *Ecological connectivity among tropical coastal ecosystems* (pp. 357-399). Springer, Dordrecht.
21. Peterson, B. J., & Fry, B. (1987). Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual review of ecology and systematics*, 18(1), 293-320.
22. **Shahraki, M., Fry, B., Krumme, U., & Rixen, T. (2014).** Microphytobenthos sustain fish food webs in intertidal arid habitats: a comparison between mangrove-lined and un-vegetated creeks in the Persian Gulf. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *149*, 203-212.
23. **Sheppard, C., Al-Husiani, M., Al-Jamali, F., Al-Yamani, F., Baldwin, R., Bishop, J., Benzoni, F., Dutrieux, E., Dulvy, N.K., Durvasula, S.R.V., Jones, D.A., Loughland, R., Medio, D., Nithyanandan, M., Pilling, G.M., Polikarpov, I., Price, A.R.G., Purkis, S., Riegl, B., Saburova, M., Namin, K.S., Taylor, O., Wilson, S., Zainal, K., (2010).** The Gulf: a young sea in decline. *Marine pollution bulletin*. 60, 13e38.
24. **Spalding, M., Spalding, M., Kainuma, M., Collins, L., (2010).** World Atlas of Mangroves. Earthscan.

25. **Stuthmann, L. E., & Castellanos-Galindo, G. A. (2020).** Trophic position and isotopic niche of mangrove fish assemblages at both sides of the Isthmus of Panama. *Bulletin of Marine Science*, 96 (3): 449-467
26. **Whitehead, P. J. P. (1985).** FAO species catalogue, Vol. 7. Clupeoid fishes of the world. An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, anchovies and wolf herrings. Part 1-Chirocentridae, Clupeidae and Pristigasteridae. *FAO Fish. Synop.*, *125*, 303.
27. **Zagars, M., Ikejima, K., Kasai, A., Arai, N., & Tongnunui, P. (2013).** Trophic characteristics of a mangrove fish community in Southwest Thailand: Important mangrove contribution and intraspecies feeding variability. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *119*, 145-152.

The fauna of Geometrid moths (Lepidoptera) in the Birjand area, Khorasan-e Jonoubi province

Mohammad Mahdi Rabieh[1*] and Javad Noei[2]

1- Assistant professor at Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran.
2- Associate Professor at Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran.

**Corresponding Author Email address: mmrabie@birjand.ac.ir*

Abstract

Birjand area in the Khorasan-e Jonoubi province is a rich agricultural area with divers ecological niches. Various agricultural crops are produced in this area. But, like many other parts of Iran, there is not a complete checklist for insect pest species and their natural enemies in the Birjand area and other parts of the Khorasan-e Jonoubi province, so far. Any management program in the agricultural ecosystems needs a complete knowledge of systematics and biology of insect pests and their natural enemies. Order Lepidoptera (moths and butterflies) with about 160000 described and half million estimated extant species is the second largest order of insects. These insects play significant role as herbivores, as pollinators and as a prey for birds and bats in the ecosystems and accordingly have substantial impact on human life. The family Geometridae with about 23000 recorded species is regarded as the second largest family of Lepidoptera behind the Noctuid moths. These insects are mainly feed on plant leaves and can produce serious damages to the host plants. The geometrid moths can be distinguished from other moth families by their long legs, thin abdomen and slim wings. The geometer moths from the Birjand area, Khorasan-e Jonoubi province, Iran, were investigated, using automated light traps and tent traps, during 2019-2020 in different regions with various ecological conditions. As the result, eight species from eight genera of this family belonging to three subfamilies Ennominae, Larentiinae and Sterrhinae were identified. Among them four species, *Dycia malatyana* Wehrli, 1934, *Zamacra flabellaria* (Heeger, 1838), *Rhodostrophia phaenicearia* Hampson, 1907 and *Orthonama obstipata* (Fabricius, 1794) are newly reported from the province. The reported geometer moth species are feed from various plant species including medicinal plants. Some previous studies reported this family as the main lepidopteran pests of the medicinal plants in Iran. Also, medicinal plants are one of the important productions of the Khorasan-e Jonoubi province. Therefore, more studies determining the host plants of the reported geometer moth species in this area, are necessary.

Keywords: biodiversity, eastern Iran, agricultural pests, medicinal plants

مطالعه شب‌پره‌های خانواده Geometridae (Lepidoptera) در منطقه بیرجند، استان خراسان جنوبی

محمد مهدی ربیعه[1]* و جواد نوعی[2]

۱-استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

۲- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

* نویسنده مسئول مکاتبات: *mmrabie@birjand.ac.ir*

چکیده

منطقه بیرجند در استان خراسان جنوبی یکی از مناطق کشاورزی مستعد با شرایط زیستگاهی متنوع می‌باشد و محصولات زراعی و باغی متنوعی در قسمت‌های مختلف آن کشت می‌شود. در این منطقه مانند بسیاری از مناطق دیگر ایران لیست کاملی از فون حشرات آفت و دشمنان طبیعی آنها جهت استفاده در مطالعات مربوط به زیست‌شناسی و بوم‌شناسی وجود ندارد. از آنجا که اجرای هرگونه برنامه مدیریتی در اکوسیستم‌های کشاورزی این منطقه نیازمند آگاهی کامل از فون، زیست‌شناسی و بوم‌شناسی حشرات آفت و گرده‌افشان می‌باشد، بالپولکداران به عنوان یکی از مهمترین راسته‌های حشرات در منطقه بیرجند مورد مطالعه قرار گرفتند. راسته بالپولکداران با حدود ۱۶۰۰۰۰ گونه توصیف شده و نیم میلیون گونه تخمینی توصیف نشده، دومین راسته بزرگ حشرات بعد از راسته قاب‌بالان می‌باشد. این حشرات نقش مهمی در زیست بوم های مختلف به عنوان گیاهخوار، گرده‌افشان و غذای پرندگان و خفاش ها ایفا می‌کنند و بنابراین بر زندگی انسان بسیار تاثیرگذارند. شب‌پره‌های خانواده Geometridae با حدود ۲۳۰۰۰ گونه توصیف شده پس از خانواده Noctuidae دومین خانواده بزرگ بالپولکداران هستند. این حشرات شب فعال بطور عمده از برگ گیاه میزبان تغذیه کرده و می‌توانند خسارت جدی به گیاه میزبان وارد آورند. این شب‌پره‌ها از دیگر خانواده‌ها با داشتن پاهای بلند و باریک، شکم باریک و بال‌های نازک و حساس تشخیص داده می‌شوند. به منظور مطالعه این خانواده نمونه‌برداری با استفاده از تله‌های نوری خودکار و خیمه‌ای طی سال‌های ۱۳۹۹-۱۳۹۸ در مناطق مختلف منطقه بیرجند با شرایط زیست بومی مختلف انجام شد. در مجموع هشت گونه از شب‌پره‌های خانواده Geometridae متعلق به هشت جنس، از زیرخانواده‌های Ennominae، Larentiinae و Sterrhinae جمع‌آوری و شناسایی شدند. در بین گونه‌های شناسایی شده چهارگونه *Dycia malatyana* Wehrli, 1934، Zamacra flabellaria (Heeger, 1838)، Rhodostrophia phaenicearia Hampson, 1907 و *O*rthonama obstipata (Fabricius, 1794) برای اولین بار از استان گزارش می‌شوند. گونه‌های شناسایی شده از گیاهان متنوعی شامل گونه‌های گیاهان دارویی تغذیه می‌کنند. از آنجا که برخی از مطالعات در مناطق دیگر ایران گونه های خانواده Geometridae را مهمترین آفات بالپولکدار گیاهان دارویی در ایران اعلام نموده‌اند و همچنین گیاهان دارویی یکی از تولیدات مهم استان خراسان جنوبی به حساب می آیند، بررسی گیاهان میزبان گونه های جمع آوری شده در این منطقه اهمیت زیادی دارد.

واژگان کلیدی: آفات کشاورزی، شرق ایران گیاهان دارویی، تنوع گونه‌ای

۱. مقدمه

راسته بالپولکداران یکی از راسته‌های بزرگ حشرات از نظر تعداد گونه توصیف شده می‌باشد. درحدود ۱۶۰۰۰۰ گونه در نقاط مختلف دنیا را شامل می‌شود و از این لحاظ بعد از راسته قاب‌بالان به عنوان دومین گروه متنوع از حشرات شناخته می‌شود. این راسته همچنین متنوع‌ترین گروه از موجودات زنده همزیست با گیاهان گلدار محسوب می‌شود و لارو تعدادی از آنها جزء آفات مهم کشاورزی و جنگل‌ها محسوب می‌شوند. همچنین به بسیاری از گیاهان مفید برای انسان از جمله بسیاری از غلات، حبوبات، چغندرقند، نیشکر، پنبه، تنباکو و بسیاری از درختان میوه خسارت می‌زنند (Sathe and Pandharbale, 2008; Scoble, 1999). بنابراین هرگونه برنامه مدیریت زیست‌بوم‌های کشاورزی و غیرکشاورزی نیازمند شناخت کامل رده‌بندی، زیست‌شناسی و اکولوژی این حشرات و دشمنان طبیعی آنها می‌باشد.

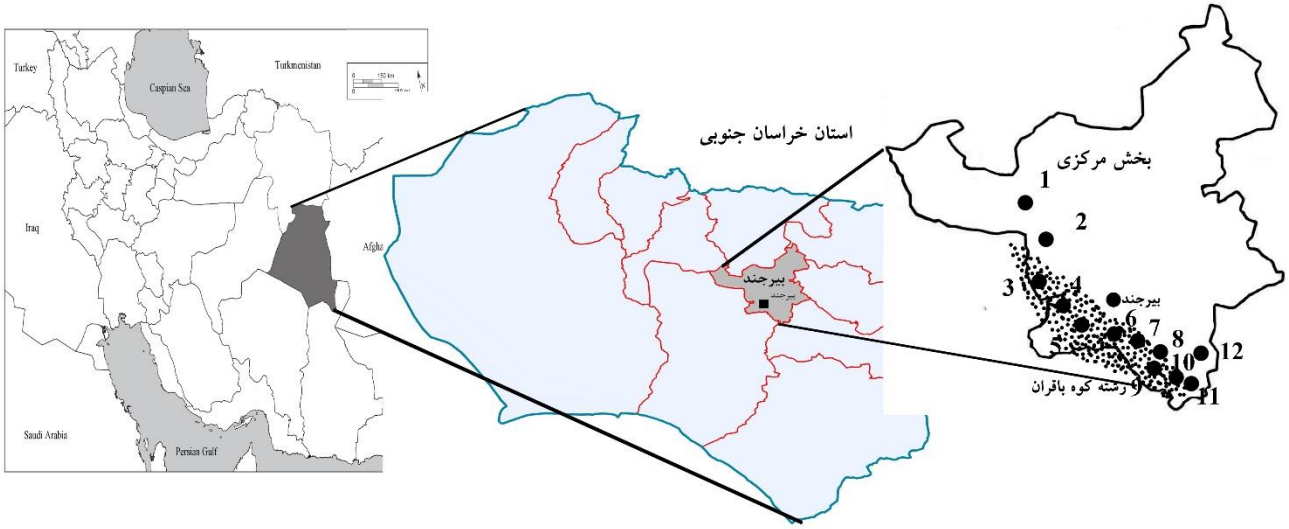
بالپولکداران روزپرواز یا پروانه ها تنها درحدود ۲۰۰۰۰ گونه از بالپولکداران را شامل می شوند و بنابراین اغلب گونه های این راسته را شب پره ها تشکیل می دهند (Kristensen et al., 2007). اغلب گونه‌های بالپولکداران را شب‌پره‌ها تشکیل می‌دهند. در بین خانواده‌های متنوع شب‌پره‌ها، خانواده Geometridae با حدود ۲۳۰۰۰ گونه توصیف شده پس از خانواده Noctuidae دومین خانواده بزرگ بالپولکداران است. این حشرات شب فعال بطور عمده از برگ گیاه میزبان تغذیه کرده و می‌توانند خسارت جدی به گیاه میزبان وارد آورند. این شب‌پره‌ها از دیگر خانواده‌ها با داشتن پاهای بلند و باریک، شکم باریک و بال‌های نازک و حساس تشخیص داده می‌شوند. برای شناسایی برخی از گروه‌های مشابه نیاز به بررسی اندام‌های تولیدمثلی خارجی نر و ماده و همچنین نیم حلقه‌های شکمی و پشتی و اندام شنوایی در حشرات کامل می‌باشد. لاروهای این خانواده از گیاهان مختلفی تغذیه می‌کنند و می‌توانند خسارت قابل توجهی به محصولات کشاورزی وارد کنند. در مطالعه نیکدل (۱۳۹۳) مشخص شد که ۴۱ گونه متعلق به ۱۷ خانواده از گیاهان دارویی استان آذربایجان شرقی توسط ۲۲ گونه آفت بالپولکدار خانواده Geometridae مورد تغذیه قرار گرفته و علاوه بر برگها قسمت‌های دیگرگیاهان میزبان نیز کم و بیش مورد تغذیه آنها قرار می‌گیرد.. Rajaei et al. (2010) گونه *Operophtera brumata* (Linnaeus, 1758) را از این خانواده به عنوان یک آفت بالقوه برای بسیاری از گیاهان زراعی و دارویی برای اولین بار از ایران گزارش نمودند. لارو این گونه پلی‌فاژ بوده و از خانواده‌های گیاهی مختلفی از جمله Rosaceae تغذیه می‌کند. برخی از گونه‌های جنس *Pronus* و *Amygdalus* به عنوان میزبان‌های گونه‌های مختلف جنس *Gnopharmia* Staudinger, 1892 در ایران ذکر شده است (Rajaei et al., 2010). Wanke et al. (2021) با مرور وضعیت تاکسونومیکی گونه *Problepsis wiltshirei* (Prout, 1938) از زیرخانواده Sterrhinae که گونه بومی رشته کوه زاگرس در ایران است گیاهان خانواده Oleaecae را به عنوان میزبان این گونه در این منطقه معرفی نمودند.

منطقه بیرجند در استان خراسان جنوبی یکی از مناطق کشاورزی مستعد با شرایط زیستگاهی متنوع می‌باشد و محصولات زراعی و باغی متنوعی در قسمت‌های مختلف آن کشت می‌شود. در این منطقه مانند بسیاری از مناطق دیگر ایران لیست کاملی از فون حشرات آفت و دشمنان طبیعی آنها جهت استفاده در مطالعات مربوط به زیست‌شناسی و بوم‌شناسی موجود نیست. از آنجا که اجرای هرگونه برنامه مدیریتی در اکوسیستم‌های کشاورزی این منطقه نیازمند آگاهی کامل از فون، زیست‌شناسی و بوم‌شناسی حشرات به عنوان بزرگترین گروه جانوری می‌باشد، گروهی از بالپولکداران به عنوان یکی از مهمترین راسته‌های حشرات در منطقه بیرجند مورد مطالعه و شناسایی قرار گرفتند. این منطقه به مساحت تقریبی ۳۹۴۹ کیلومتر مربع در بخش مرکزی استان خراسان جنوبی قرار گرفته است. این منطقه با زیست‌بوم‌های متعدد کشاورزی دارای آب و هوای نیمه بیابانی بوده و دارای زمستان‌های سرد و تابستان‌های خشک و گرم است. میزان بارش در این منطقه با توجه به آب و هوای آن، کم بوده و میانگین سالیانه بیشترین و

کمترین درجه حرارت این منطقه برابر با ۲۴ و ۸ درجه سانتیگراد است. مجموع بارش سالیانه در منطقه بیرجند به طور میانگین برابر با ۱۷۱ میلی‌متر در سال است و میانگین سالیانه رطوبت نسبی نیز ۳۶٪ است (Joloroo et al., 2016; Amirahmadi et al., 2012). با وجود زیست‌بوم‌های متعدد و متنوع کشاورزی در این منطقه هنوز لیست کاملی از حشرات آفت و دشمنان طبیعی آنها در این منطقه موجود نیست. بنابراین مطالعه حاضر می‌تواند اطلاعات مفیدی از حشرات این منطقه برای استفاده در برنامه‌های آتی مدیریت انواع زیست‌بوم‌های کشاورزی و مرتعی فراهم آورد.

۲. مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری در مجموع در ۱۲ نقطه در منطقه بیرجند در استان خراسان جنوبی شامل امیرآباد، گیوک، رزگ، بند دره، هتل کوهستان، چهارده، اسفهرود، میرعلی، چهکند، بوشاد، نوفرست و خراشاد در طی سال‌های ۱۳۹۹-۱۳۹۸ انجام شد (شکل ۱). نمونه‌های شب‌پره در طی ساعات مختلف شب‌های آرام و بوسیله تله‌های نوری خودکار (با ارتفاع ۱ متر، حاوی لامپ فرابنفش) و خیمه‌ای (ارتفاع ۲ متر، حاوی لامپ گازی ۲۵۰ ولت) جمع‌آوری شدند. نمونه‌برداری‌ها در زیست‌بوم‌هایی با ارتفاع و گیاهان مختلف انجام شد تا اطمینان حاصل شود که حداکثر گونه‌های موجود جمع‌آوری می‌شوند. نمونه‌های جمع‌آوری شده پس از اتاله و خشک شدن برای مطالعه در کلکسیون حشره‌شناسی گروه گیاهپزشکی دانشگاه بیرجند نگهداری شدند. در مجموع ۷۴ نمونه از خانواده Geometridae جمع‌آوری گردید. شناسایی نمونه‌ها با بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی اندام‌های مختلف شامل بال‌های جلو و عقب، شاخک ها، خارهای ساق پا و غیره و با کمک منابع مختلف مانند Hausmann and Mironov (2004) و Manley (2015) انجام شد. در صورت نیاز، برای شناسایی نمونه‌ها از اندام‌های تولیدمثل خارجی آنها براساس روش فیبیگر (Fibiger, 1997) اسلاید میکروسکوپی تهیه شد. تمام شناسایی ها توسط دکتر حسین رجایی از موزه تاریخ طبیعی اشتوتکارت آلمان مورد تایید قرار گرفت.



شکل ۱: موقعیت منطقه بیرجند در استان خراسان جنوبی و ایستگاه های نمونه برداری شامل ۱- امیرآباد، ۲- چهکند، ۳- گیوک، ۴- هتل کوهستان، ۵- بند دره، ۶- چهارده، ۷- میرعلی، ۸- رزگ، ۹- بوشاد، ۱۰- اسفهرود، ۱۱- نوفرست، ۱۲- خراشاد.

۳. نتایج

در مجموع هشت گونه از شب‌پره‌های خانواده Geometridae متعلق به هشت جنس، از زیرخانوده‌های Ennominae، Larentiinae و Sterrhinae جمع‌آوری و شناسایی شدند. از هشت گونه شناسایی شده دو گونه *Idaea* sp. و *Eupithecia* sp. تنها در حد جنس شناسایی شدند. شناسایی دقیق این گونه ها نیازمند مقایسه نمونه ها با نمونه های موجود در موزه ها می باشد که به دلیل درجریان بودن مرور و اصلاح رده بندی این دو جنس این کار در آینده امکان پذیر است. در بین گونه‌های شناسایی شده چهارگونه برای اولین بار از استان گزارش می‌شوند. لیست گونه‌های جمع‌آوری شده به تفکیک زیرخانواده‌ها همراه با اطلاعات نمونه‌های مطالعه شده در ادامه ارائه شده است. گونه‌های جدید برای استان با علامت ستاره مشخص شده‌اند.

لیست گونه‌های شناسایی شده به تفکیک زیرخانواده:

زیرخانواده Ennominae

گونه **Dyscia malatyana* Wehrli, 1934

نمونه‌های مطالعه شده: امیرآباد، ۱♂، ۱۳۹۸/۰۴/۰۲؛ چهکند، ۱♂، ۱۳۹۹/۰۵/۱۸.

زیرگونه *Gnopharmia colchidaria objectaria* Staudinger, 1892

نمونه‌های مطالعه شده: امیرآباد، ۱♂، ۱♀، ۱۳۹۸/۰۴/۰۲؛ نوفرست، ۲♀، ۱۳۹۸/۰۶/۱۱؛ چهکند، ۱♂، ۲♀، ۱۳۹۹/۰۵/۱۸؛ بند دره، ۲♂، ۲♀، ۱۳۹۸/۰۵/۰۵؛ رزگ، ۲♀، ۱۳۹۸/۲/۳۰؛ چهارده، ۱♂، ۱♀، ۱۳۹۹/۰۵/۰۴و ۱۳۹۸/۴/۵؛ گیوک، ۱♀، ۱۳۹۸/۰۵/۱۳؛ هتل کوهستان، ۲♂، ۳♀، ۱۳۹۸/۰۶/۱۷ و ۱۳۹۹/۰۴/۰۷.

گونه **Zamacra flabellaria* (Heeger, 1838)

نمونه‌های مطالعه شده: نوفرست، ۱♀، ۱۳۹۸/۰۶/۱۱.

زیرخانواده Sterrhinae

گونه **Rhodostrophia phaenicearia* Hampson, 1907

نمونه‌های مطالعه شده: میرعلی، ۱♀، ۱۳۹۹/۰۶/۰۳؛ چهکند، ۱♂، ۱♀ ، ۱۳۹۹/۰۵/۱۸.

گونه *Rhodometra sacraria* (Linnaeus, 1767)

نمونه‌های مطالعه شده: امیرآباد، ۱♂، ۱۳۹۹/۰۶/۰۵؛ نوفرست، ۲♀، ۱۳۹۸/۰۶/۱۱؛ خراشاد، ۱♂، ۱♀، ۱۳۹۸/۰۵/۱۴.

گونه *Idaea* sp.

نمونه‌های مطالعه شده: رزگ، ۱♂، ۱♀، ۱۳۹۸/۲/۳۰، ۱۳۹۹/۰۴/۲۸.

زیرخانواده Larentiinae

گونه *Orthonama obstipata* (Fabricius, 1794)*

نمونه‌های مطالعه شده: رزگ، ۱♂، ۱♀، ۱۳۹۸/۲/۳۰و ۱۳۹۹/۰۴/۲۸؛ گیوک، ۱♂، ۱۳۹۸/۰۵/۱۳.

گونه *Eupithecia* sp.

نمونه‌های مطالعه شده: امیرآباد، ۱♂، ۲♀، ۱۳۹۹/۰۴/۱۶؛ رزگ، ۱♂، ۱♀، ۱۳۹۸/۲/۳۰ و ۱۳۹۹/۰۴/۲۸؛ چهکند، ۱♂، ۲♀، ۱۳۹۹/۰۵/۱۸.

۴. نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر با نمونه‌برداری به مدت دو سال از مناطق مختلف با ترکیب گیاهان و ارتفاع مختلف در مجموع هشت گونه از شب‌پره‌های خانواده Geometridae متعلق به هشت جنس جمع‌آوری و شناسایی شد. در بین گونه‌های شناسایی شده چهارگونه برای اولین بار از استان گزارش می‌شوند. ادامه نمونه‌برداری‌ها به منظور شناسایی حشرات شکارگر و پارازیتوئیدهای گونه های شب پره Geometridae جمع آوری شده در این منطقه به ویژه گونه های بال‌غشاییان و دوبالان ، اهمیت زیادی دارد. مطالعات زیست‌شناسی و بوم‌شناسی بر روی هریک از گونه‌های گزارش شده در این مقاله مشخص کننده دقیق میزبان‌های گیاهی و تغییرات جمعیت آنها در منطقه بیرجند خواهد بود. اطلاعات حاصله در برنامه‌های مدیریت زیست‌بوم‌های منطقه از اهمیت بالایی برخوردار است. با توجه به مشاهدات نیکدل (۱۳۹۳) که شب‌پره‌های خانواده Geometridae را فراوان‌ترین آفت بالپولکی گیاهان دارویی در منطقه شمال غرب ایران اعلام نموده است، در منطقه شرق ایران و استان خراسان جنوبی نیز ممکن است گونه‌های جمع‌آوری شده این خانواده پتانسیل وارد نمودن خسارت به گیاهان دارویی منطقه را داشته باشند. از آنجا که گیاهان دارویی یکی از تولیدات مهم استان خراسان جنوبی به حساب می‌آید، بررسی ارتباط گونه‌های شب‌پره جمع‌آوری شده با گونه‌های مختلف گیاهان دارویی در منطقه اهمیت زیادی دارد. لاروهای جنس *Dyscia* از گیاهان بوته‌ای زیادی شامل گونه Salvia pratensis، گونه‌های مختلف جنس‌های Artemisia، Lavandula، Cytisus و Helianthemum تغذیه می‌کنند (Skou and Sihvonen, 2015). در این جنس‌ها گونه‌های دارویی زیادی مانند اسطوخودروس و درمنه وجود دارد. لاروهای Z. flabellaria چندین خوار بوده و خصوصا از خانواده های Asteraceae و Apiaceae تغذیه می کنند (James, 2017). براساس بررسی‌های انجام شده بر روی گونه همه‌جازی *R. sacraria* لاروهای این گونه چندخوار یا اولیگوفاژ بوده و از گونه‌های خانواده Polygonaceae تغذیه می‌کنند (King and Montesinos, 2014). زیرگونه *G. colchidaria objectaria* که از بیشتر مناطق مورد بررسی جمع‌آوری شده است طبق مطالعه Rajaei et al. (2012) احتمالا از گونه‌های *scoparia* (Amygdalus) *Prunus* و *Prunus* (Amygdalus) spinosissima از خانواده Rosaceae تغذیه می‌کنند. این دو گونه گیاه در اکثر ایستگاه های منطقه مورد بررسی نیز موجود است (Abasi, 2005). در مورد گیاهان مورد تغذیه لاروهای گونه *R. phaenicearia* اطلاعاتی موجود نیست ولی سایر گونه‌های این جنس از انواع متنوعی از گیاهان از خانواده‌های Fabaceae، Asteraceae و Caryophyllaceae تغذیه می‌کنند (Zuhal and Mironov, 2008). یکی از دلایل انتشار وسیع گونه *O. obstipata* در چهار قاره آفریقا، آسیا اروپا و آمریکا تنوع زیاد گیاهانی است که مورد تغذیه لاروها قرار میگیرند. لاروهای این گونه در میان گیاهان متنوعی که مورد استفاده قرار می دهند از گونه های جنس های *Rumex*، *Chrysanthemum* و *Polygonum* بیشتر تغذیه می کنند (James, 2017).

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب تشکر خود را از همکاری صمیمانه دکتر حسین رجایی از موزه تاریخ طبیعی اشتوتکارت آلمان در تایید شناسایی نمونه‌های جمع‌آوری شده ابراز می‌دارند. این مطالعه از اعتبار تامین شده در طرح شماره ۹۷۰۲۴۷۴۸ زیرنظر صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) انجام شده است.

منابع

۲۱. نیکدل م. ۱۳۹۳. شب پره های ژئومتریده آفت گیاهان دارویی در استان آذربایجان شرقی. سومین کنگره ملی کشاورزی ارگانیک و مرسوم، دانشگاه محقق اردبیلی. صفحه ۱۲.

22. Abasi M. 2005. Study of ecological regions in Iran. Plant types of Birjand area. Research Institute of Forests and Rangelands 158 pp.

23. Amirahmadi A., Saghafi M. and Rabiei M. 2012. Multivariate analysis and classification for modeling variables affecting the alluvial fan geometry of north Bagheran Mountain range (South of Birjand). Geography and Environmental Planning, 4(44): 19-21.

24. Fibiger M. 1997. Noctuinae III. Noctuidae Europaeae, Vol. 3, Entomological Press/ Denmark, P: 418.

25. Hausmann A. and Mironov V. 2004. The Geometrid Moths of Europe. Apollo Books, Stenstrup, P: 113.

26. James D.G. 2017. The Book of Caterpillars: A Life-size Guide to Six Hundred Species from around the World University of Chicago Press, P: 656.

27. Joloroo H., Rouhi Moghaddam E. and Memarian H. 2016. Determining rangeland suitability model for sheep grazing using GIS (Case Study: Baqeran Watershed). Natural Ecosystems of Iran, 6(4): 69-81. (in Farsi)

28. King, G. E. and Montesinos V. 2014. Rhodometra sacraria (Linnaeus), a cosmopolitan sterrhine confirmed from Chile (Lepidoptera, Geometridae). Revista Brasileira de Entomologia, 58(2): 103-106.

29. Kristensen N.P., Scoble M. J. & Karsholt O. 2007. Lepidoptera phylogeny and systematics: the state of inventorying moth and butterfly diversity. Zootaxa, 1668: 699–747.

30. Manley C. 2015. British Moths: Second Edition: A Photographic Guide to the Moths of Britain and Ireland. Bloomsbury Publishing, P: 354.

31. Rajaei H., Abaii M. and Hausmann A. 2010 First record of the winter moth *Operophtera brumata* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Geometridae) in northern Iran. Iranian Journal of Animal Biosystematics, 6(2): 61-66.

32. Rajaei H., Stüning D. and Trusch R. 2012. Taxonomic revision and zoogeographical patterns of the species of *Gnopharmia* Staudinger, 1892 (Geometridae, Ennominae). Zootaxa, 3360: 1–52.

33. Sathe T.V. and Pandharbale A.R. 2008. Forest Pest Lepidoptera. Mangalam Pub, Delhi, P: 186.

34. Scoble M.J. 1999. Geometrid Moths of the World - A catalogue (Lepidoptera: Geometridae). Collingwood: CSIRO Publishing, P: 482.

35. Scoble M.J. 1992. The Lepidoptera: Form, Function and Diversity. Oxford University Press/ London, P: 404.

36. Skou P. and Sihvonen P. 2015. Ennominae I. – In A. Hausmann (ed.): The Geometrid Moths of Europe 5. Brill, Leiden, P: 657.

37. Wanke D., Krogmann L., Murillo-Ramos L., Sihvonen P. and Rajaei H. 2021. Systematics of Problepsis wiltshirei (Prout, 1938), comb. nov. (Lepidoptera, Geometridae, Sterrhinae) – an endemic species to the Zagros Mountains in the Middle East. Nota Lepi. 44: 175–192.

38. Zuhal and Mironov, 2008. Checklist of the Geometridae of European Turkey, with new records (Lepidoptera). Zootaxa, 1789: 1-56.

Calculation of the thermolytic stability and similarity of 28S in the genus *Tigriopus* Norman, 1869

Fatemeh Nazari[1*], Razieh Razavi Parizi [2]
[1]Department of Biology, Faculty of Science, University of Jiroft, Jiroft, Iran
[2]Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Jiroft, Jiroft, Iran

**Corresponding Author Email address: fatemeh.nazari62@ujiroft.ac.ir*

Abstract

Species of the genus *Tigriopus* have been recognized as a potential model for genetic studies as they are living in splash pools, so their habitat confronts with fluctuations in temperature, amount of oxygen and salinity. The structural gene for 28S and 18S are highly conserved across *Tigriopus* species. To calculate the energy stability of partial fragment of 28S rDNA which include of 60 nucleotides based on molecular mechanic, we applied MM-UFF quantum method for seven species of the genus *Tigriopus*. This stability is due to the arrangement of atoms in the structure of nucleotides as well as the sequence of nucleotides in the structure of rDNA, which leads to different stabilization energies. According to the result, *T. japonicus* shows the highest amount of energy stability with negative sign. *T. raki* got the second rank. *T. iranicus* as well as *T. fulvus* ،*T. brevicornis* ،*T. kingsejongensi* and T .*Calfornicus* are showed approximately similar energy.

Keywords: Geometry, MM-UFF quantum method, Ribosomal gene, Energy stability, Crustacea

محاسبه میزان پایداری ترمودینامیکی ژن 28S و شباهت آن در جنس *Tigriopus* Norman, 1869

فاطمه نظری*[۱]، راضیه سادات رضوی پاریزی[۲]

۱- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جیرفت

۲- استادیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جیرفت

*ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: *fatemeh.nazari62@ujiroft.ac.ir*

چکیده

گونه‌های جنس Tigriopus به عنوان یک مدل ژنتیکی شناخته می‌شوند از آنجایی که در منطقه splash pool یافت می‌شوند و از نظر تغییرات دمایی، غلظت اکسیژن و شوری در زیستگاه خود نوسانات زیادی را متحمل می‌شوند. ساختار ژن‌های ریبوزومی 28S و 18S در بین گونه‌های مختلف جنس Tigriopus حفاظت شده است. برای تعیین پایداری انرژی rDNA 28S براساس مکانیک مولکولی، توالی ۶۰ نوکلئوتیدی هفت گونه از جنس Tigriopus توسط روش کوانتومی MM-UFF محاسبه گردید. براساس نتایج به دست آمده بیشترین میزان پایداری انرژی مربوط به گونه *T. japonicus* با علامت منفی بود. این پایداری ناشی از چیدمان اتم‌ها در ساختار نوکلئوتیدها و همچنین توالی نوکلئوتیدها در ساختار rDNA می باشد که منجر به ایجاد انرژی‌های مختلف پایداری می شود. در رتبه بعد گونه *T. raki* قرار داشت. سایر گونه‌های مورد مطالعه، به عبارت دیگر گونه‌های T. iranicus، T. fulvus، T. brevicornis، T. kingsejongensis و T. calfornicus مقدار پایداری انرژی نسبتاً یکسان بود.

واژگان کلیدی: ژئومتری، روش کوانتومی MM-UFF، ژن ریبوزومی، پایداری انرژی، سخت‌پوست

۱.مقدمه

DNA یک ماکرومولکول زیستی است که حاوی هزاران باز نوکلئیک اسید است و از جنبه مباحث ژنتیکی از اهمیت بالایی برخوردار است و نقش معنی‌داری را در تحقیقات علمی بازی می‌کند (Dinis et al., 2020). نوکلئیک اسیدهای DNA و RNA توسط توانایی تشکیل مولکول تک رشته‌ای مشخص می‌شوند که به ویژه می‌توانند با رشته مکمل دیگر از طریق پیوند بین بازهای نوکلئوتید جفت شوند و یک دو رشته‌ای مارپیچ تشکیل دهند. پایداری ساختار دو رشته‌ای اهمیت حیاتی برای بیشتر جنبه‌های متابولیسمی نوکلئیک اسید دارد (Doktycz, 1997).

مولکول‌های RNA ریبوزومی ساختارهای بزرگی هستند که از اجزاء ریبوزوم، ماشین سنتز پروتئینی در یوکارویوت‌ها و پروکاریوت‌ها، می‌باشند. در یوکاریوت‌ها ژن‌های هسته‌ای rRNA در چندین تکرار وجود دارند. هر واحد قابل ترجمه شامل نواحی کد کننده برای rRNAهای 18S، 5.8S و 28S می‌باشد (Burton et al., 2005). مطالعه ژن‌های RNAهای ریبوزومی احتمالاً کاربرد معناداری برای مطالعات اکولوژی و تکاملی به دو دلیل دارد. اولاً، ترجمه rDNA معمولاً ۸۰٪ کل RNAهای سنتز شده را تشکیل می‌دهد (Paule and White, 2000)، که بخش مهمی از انرژی سلول را به خود اختصاص می‌دهد. از این رو، درصد ترجمه rDNA متناسب با سرعت رشد سلول می‌باشد. ثانیاً، رونویسی از ژن‌های rDNA توسط RNAپلیمراز I انجام می‌شود که با توالی‌های ویژه‌ای در ناحیه آغازی برهمکنش دارد (Elser et al., 2003).

با توجه به سرعت توسعه بیوانفورماتیک، داده‌های زیستی جمع‌آوری شده یک هیولای بزرگی شده است و هنوز به صورت انفجاری در حال رشد می‌باشد. بنابراین، ضروری است که از روش‌هایی برای آنالیز این معدن اطلاعاتی و یافتن اطلاعات مفید و جالب از داده‌ها استفاده کرد. به علت اندازه بسیا بزرگ و پیچیدگی ساختار این اطلاعات، تحلیل توالی‌های DNA و پروتئین یک موضوع چالشی در بیوانفورماتیک است. روش‌ها متعددی برای تحلیل DNA و پروتئین ارائه شده است. در بین این روش‌ها، استفاده از ژئومتری جهت تعیین میزان شباهت و پایداری ترمودینامیکی توالی DNA یکی از روش‌های مورد پسند می‌باشد از این دیدگاه چون نیاز به دانش ماورائی و علامت‌گذاری هدف‌ها ندارد (Junpeng et al., 2014).

گونه‌های جنس Tigriopus سخت‌پوستان کوچکی هستند که تحت شرایط متغیر و شرایط فیزیکی-شیمیایی بسیار سخت در حوضچه‌های جزر و مدی از قطب تا نواحی حاره‌ای دیده می‌شوند. از آنجایی‌که این جانوران در سرتاسر دنیا در شرایط زیستگاهی متفاوت زندگی می‌کنند بنابراین، موجودات مناسبی برای مطالعات ژنتیکی به ویژه بررسی اثرات تغییرات محیطی می‌باشند (Raisuddin, 2007).

هدف از این مطالعه بررسی میزان شباهت و محاسبه پایداری انرژی توالی‌های ژن 28S در هفت گونه‌ها متعلق به جنس Tigriopus از اقلیم‌های متفاوت می‌باشد.

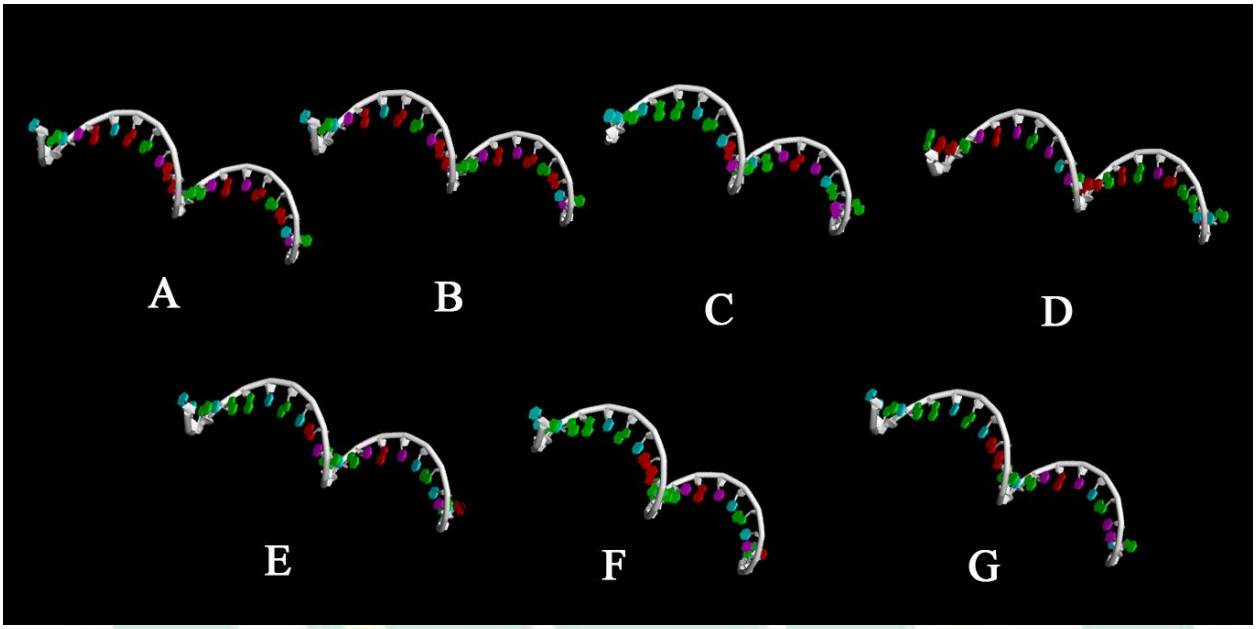
۲.مواد و روش‌ها

توالی‌های ژن ریبوزومی 28S متعلق به هفت گونه Tigriopus برای مطالعات ترمودینامیکی و ژئومتری مورد بررسی قرار گرفتند. برای انجام آنالیزهای مورد نظر، کل ژنوم گونه‌های T. iranicus و T. ra*ki* با استفاده از Chelex استخراج شد. سپس با استفاده از پرایمر مناسب ژن ریبوزومی 28S، توالی مورد نظر در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکثیر گردید و به شرکت ماکروژن جهت توالی یابی ارسال گردید. علاوه‌براین، توالی ژنی 28S گونه‌های T. fulvus، T. kingsejongensis، T. calfornicus، T. brevicornis و T. japonicus نیز از بانک ژنی انتخاب و در آنالیزها مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). با استفاده از نرم‌افزار BioEdit 7.0.5 ویرایش و همتراز کردن هفت توالی به منظور انتخاب ناحیه ژنی مورد نظر جهت آنالیزهای ژئومتری و تعیین میزانی پایداری دمایی صورت گرفت. همتراز کردن توالی‌ها بدین منظور انجام شد تا بتوان توالی مربوط به ناحیه یکسانی را در همه ژن‌های 28S انتخاب نمود.

توالی به طول ۶۰ نوکئوتید از قطعه ژنی 28S جهت بررسی میزان پایداری و شباهت انتخاب و آنالیز شد. محاسبات کوانتومی با استفاده از روش کوانتومی MM-UFF در نرم‌افزار ArgusLab صورت گرفت. در این محاسبات بهینه سازی ژئومتری تمام توالی‌ها نوکلئوتیدی انجام شد. علاوه‌براین، پایداری انرژی توالی‌های انتخاب شده نیز محاسبه گردید.

۳. نتایج و بحث

برای اولین بار در این پژوهش با استفاده از مکانیک مولکولی میزان پایداری انرژی و ژئومتری rDNA مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه توالی به طول ۶۰ نوکلئوتید از ژن ریبوزومی 28S هفت گونه از جنس *Tigriopus* انتخاب و میزان پایداری انرژی آن پیش‌بینی گردید. ساختار توالی نوکلئوتیدهای انتخاب شده در شکل ۱ نشان داده شده است. همچنین، از آنجایی که هدف این مطالعه کسب اطلاعات در مورد پایداری انرژی توالی‌های نوکلئوتیدی انتخاب می‌باشد، از روش کوانتومی MM-UFF جهت مقایسه و بررسی این فاکتور بین گونه‌های مختلف این جنس استفاده شد.



تصویر ۱: ساختار توالی ۶۰ نوکلئوتیدی ژن ریبوزومی 28S گونه‌های جنس *Tigriopus*: A: *T. brevicornis*؛ B: *T. californicus*؛ C: T. *fulvus*؛ D: *T. japonicus*؛ E: *T. kingsejongensis*؛ F: *T. raki*؛ G: *T. iranicus*. (رنگ‌ها به ترتیب نشانگر بازهای : آبی: C؛ قرمز: T؛ سبز: A؛ بنفش: G).

نتایج محاسبات میزان پایداری انرژی توالی‌های نوکلئوتیدی ژن 28S در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج به دست آمده از مقایسه پایداری نسبی توالی‌ها نشان داد که بیشترین پایداری در گونه Tigriopus japonicus و سپس در گونه *T. raki* وجود دارد. میزان این متغیر در گونه‌های T. fulvus، T. iranicus، T. kingsejongensis، T. californicus و T. brevicornis مشابه است. انرژی پایداری یکی از خصوصیات اصلی یک ترکیب شیمیایی می‌باشد که مشخص می کند ساختار آن ترکیب در چه شرایطی (ترمودینامیکی و غیر ترمودینامیکی) پایدار می‌باشد. انرژی پایداری یکی از ویژگی‌های مولکول می‌باشد که به نحوه چیدمان اتم‌ها در ساختار ترکیب، دمای تشکیل یک ترکیب، حالت فیزیکی یک ترکیب و زاویه و طول پیوندها در یک ترکیب و مقدار زاویه چهار وجهی یک ترکیب بستگی دارد. روش‌های مکانیک مولکولی ابزار دقیقی برای شبیه‌سازی و محاسبه مقدار انرژی پایداری در ساختارهای بسیار بزرگ زیستی هستند (Hofer and Visser, 2018).

براساس نتایج پایداری ترمودینامیکی اسیدهای نوکلئیک به توالی نوکلئوتیدی، نوع جفت بازها و طول مارپیچ بستگی دارد (Schroeder and Turner, 2000). همچنین، سهم انتروپی در شکل‌گیری ساختار به عنوان تابعی از موقعیت نوکلئوتیدها نسبت به رفتار موقعیتی انتروپی هر نوکلئوتید اندازه بزرگتر و نوسانات کمتری دارد.

نام علمی تاکسون	محدوده پراکنش گونه	کد بانک ژنی	انرژی (Kcal/mol)
Tigriopus fulvus	Mediterranean Sea	EU370444.1	-7505.72
Tigriopus raki	New Zealand	_	-7633.89
Tigriopus iranicus	Oman Sea	_	-7546.52
Tigriopus kingsejongensis	Antarctica	KX695154.1	-7546.55
Tigriopus californicus	California Gulf	AY599490.1	-7587.29
Tigriopus brevicornis	North Atlantic	AY588146.1	-7587.29
Tigriopus japonicus	Japan	EU057578.1	-7732.48

در مطالعه‌ای با هدف مشابه جهت پیش‌بینی پایداری دمایی اولیگونوکلئوتیدهای مارپیچی دوگانه با رویکرد شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بررسی شد. نتایج نشان داد که با این روش می‌توان آنتالپی تشکیل کمپلکس DNA/DNA را نیز محاسبه نمود (Lomzov et al., 2015). دو ویژگی فیزیکی-شیمیایی پلیمرهای اسید نوکلئیکی برای تعیین عملکرد آن‌ها ضروری است که شامل ساختار دوم و توانایی تشکیل کمپلکس می‌باشد.

از آنجایی که توالی‌های ژن‌های ریبوزومی حفاظت شده هستند بنابراین اختلاف پایداری انرژی در گونه‌های جنس Tigriopus تفاوت زیادی نشان داد. براساس اطلاعات در حال انتشار مربوط به مطالعه فیلوژنی و فیلوجغرافی گونه‌های این جنس مشخص شد که منشأ احتمالی پیدایش این جنس جایی در محدوده پراکندگی گونه Tigriopus japonicus است (Nazari and Gomez, unpublished)، شاید علت احتمالی میزان پایداری انرژی بالاتر این گونه به علت قدمت آن و ایجاد سازگاری با شرایط زیست محیطی باشد.

۴. نتیجه‌گیری

ویژگی‌های مختلفی از یک توالی DNA خام قابل استخراج است مانند فراوانی کلمات، دسته‌بندی بازهای نوکلئوتیدی، موقعیت و غیره. مدل‌های مختلفی برای استفاده ازاین ویژگی‌ها مختلف ساخت جنبه‌های فضایی به کار می‌رود. با استفاده از روش‌های کوانتومی براساس مکانیک مولکولی می‌توان پایداری انرژی توالی‌های نوکلئوتیدی را محاسبه کرد. مکانیک مولکولی یکی از جنبه‌های مدل‌سازی مولکولی است، زیرا شامل استفاده از مکانیک کلاسیک (مکانیک نیوتنی) برای توصیف پایه فیزیکی در پشت مدل‌ها است. مدل‌های مولکولی به‌طور معمول اتم‌ها را به عنوان بار نقطه‌ای با میزان جرم مشخص توصیف می‌کنند. فعل و انفعالات بین اتم‌های همسایه با پیوندهای شیمیایی و نیروهای واندروالسی توصیف شده‌است. پتانسیل لئونارد-جونز معمولاً برای توصیف دومی استفاده می‌شود؛ از طرفی برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک براساس قانون کولون محاسبه می‌شوند. به اتم‌ها مختصات در فضای دکارتی اختصاص می‌یابد همچنین از این طریق می‌توان در شبیه‌سازی‌های پویا سرعت را تعیین کرد. سرعت اتمی مربوط به دمای سیستم، یک مقدار ماکروسکوپی است؛ این متغیر مربوط به انرژی کل سیستم است که یک مقدار ترمودینامیکی که برابر با مجموع انرژی‌های پتانسیل و جنبشی می‌باشد. روش‌هایی که انرژی پتانسیل را به حداقل می‌رسانند، روش‌های به حداقل رساندن انرژی نامیده می‌شوند و روش‌هایی که رفتار سیستم را با انتشار زمان مدل می‌کنند، مکانیک‌های مولکولی نامیده می‌شوند.

منابع

23. Burton RS., Metz EC., Flowers JM. and Willett CS. 2005. Unusual structure of ribosomal DNA in the copepod Tigriopus californicus: intergenic spacer sequences lack internal subrepeats. Gene. 344: 105-113.

24. Dinis TB., Sousa F. and Freire MG. 2020. Insights on the DNA stability in aqueous solutions of ionic liquids. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 8. doi: 10.3389/fbioe.2020.54785

25. Doktycz MJ. 1997. Nucleic acids: Thermal stability and denaturation. Encyclopedia of Life Science. 3123.
26. Elser JJ., Archarya K., Cotner J., Makino W., Watts T., Hobbie T., Fagan W., Schade K., Hood J. and Sterner RW. 2003. Growth rate-stoichiometry couplings in diverse biota. Ecology Letters, 6(10): 936-943.
27. Hofer TS. And Visser SPD. 2018. Editorial: quantum mechanical/molecular mechanical approaches for the investigation of chemical system-recent developments and advanced applications. Frontiers in Chemistry. doi: 10.3389/fchem.2018.00357
28. Junpeng B., Ruiyu Y. and Zhe B. 2014. An improved alignment-free model for DNA sequence similarity metric. BMC bioinformatics. 15(321): 1-15.
29. Lomzov AA., Vorobjev Yn. And Pyshnyi DV. 2015. Evaluation of the Gibbs free energy changes and melting temperatures by molecular dynamics simulation. The Journal of Physical Chemistry. 119: 15221-15234. DOI: 10.1021/acs.jpcb.5b09645
30. Paule MR. and White RJ. 2000. Transcription by RNA polymerases I and III. Nucleic Acids Research. 28, 1283 – 1298.
31. Raisuddin S., Kwok KWH., Leung KMY., Schlenk D. and Lee JS. 2007. The copepod *Tigriopus*: A promising marine model organism for ecotoxicology and environmental genetics. Aquatic Toxicology. 83: 161-173.
32. Schroeder SJ. And Turner DH. 2000. Factors affecting the Thermodynamic stability of small asymmetric internal loops in RNA. Biochemistry. 39(31): 9257-9274.

The effect of copper glycinate supplementation on performance and egg quality in the second cycle of laying hen

Omid Rabbani Zadeh[1]; Heydar Zarghi[2*]; Abolghasem Golian[3]; Reza Majid Zadeh Heravi[4]

24- Master student, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
25- Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
26- Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
27- Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

*Corresponding Author Email address: h.zarghi@um.ac.ir

Abstract

The aim of this experiment was to evaluate the effect of different levels of copper glycinate on performance traits and egg quality of laying hens during the second laying cycle. A total of 300, 105-weeks-old Hy-line-W36 laying hens were used. The experiment lasted 105-117 weeks of age. The experiment was performed in a randomized complete block design with levels of 3, 6, 9, 12 and 15 mg/kg of diet copper (Cu), in the form of copper glycinate supplement, with 5 replications and 12 birds per replication. Experimental treatments included 0, 3, 6, 9, 12 and 15 mg levels of copper glycinate. The production performance of laying hens including egg production (EP), average egg weight, egg mass (EM), feed intake (FI) and feed conversion ratio (FCR) in each 28 days period were evaluated. In addition, the quality feature of produced egg, including shape index, yolk index, albumen index, Haugh unit, specific gravity and shell thickness were determined in 2 samples of eggs produced in the last 2 days of each 28-day period. The results of this experiment showed by increasing the level of copper glycinate supplement in the diet EP ($p < 0.01$) and EM ($p < 0.05$) linearly increased, but the FI and FCR differed with a quadratic trend. The birds fed a diet supplemented with 6 mg/kg copper had the highest FI, and the bids feed the diet supplemented 15 mg/kg Cu showed the lowest FCR. In conclude, the results of this experiment showed that the addition of copper glycinate supplement to laying hens diet in the second cycle can improve production performance.

Keywords: Organic copper chelate, Production yield, Egg quality, Laying hens, Second production cycle

اثر مکمل گلایسینات مس بر عملکرد و کیفیت تخم مرغ در سیکل دوم تولید مرغان تخم‌گذار سویه های‌لاین W-36

امید ربانی زاده[۱]، حیدر زرقی[۲*]، ابوالقاسم گلیان[۳]، رضا مجید زاده هروی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳-استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۴-استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: h.zarghi@um.ac.ir

چکیده

این آزمایش با هدف ارزیابی اثر سطوح مختلف گلایسینات مس بر صفات عملکردی و کیفیت تخم در مرغان‌تخم‌گذار در دوره دوم انجام گرفت. از تعداد ۳۰۰ قطعه مرغ تخم‌گذار سویه های‌لاین- W36 در سن ۱۰۵ هفتگی استفاده شد. آزمایش از سن ۱۰۵ال۱۱۷ هفتگی طول کشید. آزمایش در قالب یک طرح بلوک کامل تصادفی شامل افزودن سطوح ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ میلی‌گرم مکمل گلایسینات مس در کیلو گرم جیره با ۵ تکرار و تعداد ۱۲ قطعه پرنده در هر تکرار انجام شد. تیمار های آزمایشی شامل سطوح ۰،۳،۶،۹،۱۲و۱۵ میلی گرم گلایسینات مس بودند. عملکرد تولیدی مرغان تخم‌گذار تحت آزمایش شامل درصد تخم‌گذاری، میانگین وزن تخم مرغ، گرم تخم مرغ تولیدی روزانه، مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک در هر دوره ۲۸ روز مورد ارزیابی قرار گرفتند. بعلاوه خصوصیات سنجش کیفت تخم مرغ تولیدی شامل شاخص شکل، شاخص زرده، شاخص سفیده، واحدها، وزن مخصوص و ضخامت پوسته در ۲ نمونه تخم مرغ تولیدی در ۲ روز پایانی هر دوره ۲۸ روز تعیین شدند. نتایج این آزمایش نشان داد؛ با افزایش سطح مکمل گلایسینات مس در جیره میزان مصرف خوراک روزانه به صورت معادله درجه دو تغییر نشان داد به طوری که پرندگان تغذیه شده با جیره مکمل شده با ۶ میلی‌گرم در کیلوگرم مس بیش‌ترین میزان مصرف خوراک روزانه را داشتند. افزایش سطح مکمل گلاسینات مس در جیره باعث افزایش خطی درصد تخم‌گذاری ($p<0/01$) و گرم تخم مرغ تولیدی روزانه ($p<0/05$) شد همچنین ضریب تبدیل خوراک ($p<0/01$) به صورت خطی کاهش یافت. سطوح مکمل گلاسینات مس تاثیر معنی داری بر شاخص‌های سنجش کیفت تخم مرغ نشان نداد. به طورکلی نتایج این آزمایش نشان داد که افزودن مکمل گلایسینات مس به جیره مرغان تخم‌گذار در دوره دوم تخم‌گذاری می‌تواند باعث بهبود عملکرد تولید شود.

کلمات کلیدی: کیلات عالی مس، عملکرد تولیدی، کیفیت تخم مرغ، مرغان تخمگذار، دوره دوم تولید

۱. مقدمه

مواد معدنی کمیاب مانند روی، مس و منگنز برای طیف گسترده ای از فرآیندهای فیزیولوژیکی در همه حیوانات ضروری هستند (Underwood and Suttle, 1999). تاثیر مواد کم نیازی مثل روی، مس و منگنز احتملا به واسطه خواص کوفاکتوری آن‌ها در آنزیم

های دخیل در شکل گیری پوسته و اثر متقابل آن‌ها بر کریستال های کلسیت در شکل گیری پوسته است (افشار و همکاران، ۱۳۹۷). مواد معدنی کمیاب در متابولیسم حیوانات به عنوان عوامل کاتالیزوری موجود در تمام واکنش‌های متابولیک نقش دارند و بنابراین برای رشد، نمو و تولید ضروری هستند (Aksu et al., 2012). مس برای طیف گسترده ای از عملکردهای مرتبط با سلامت و عملکرد در همه گونه‌های جانوری ضروری است. به عنوان مثال، لیزیل اکسیداز، آنزیمی که زیر واحدهای کلاژن را به اشکال پروتئین بالغ پیوند می‌دهد تا قدرت آن‌ها را افزایش دهد، وابسته به مس است (Rucker et al., 1998). نیاز به مس در سنتز کلاژن و الاستین، پروتئین‌های اصلی بافت همبند، پس از اینکه این فلز برای سنتز هموگلوبین ضروری شناخته شد، حدود ۳۳ سال بعد کشف شد (Harris et a1 1980). به طور معمول نیاز حیوانات به عناصر معدنی با مکمل‌های معدنی تامین می‌شود در صورتی که برخی پژوهشگران بر این عقیده‌اند که زیست فراهمی فرم معدنی این عناصر کمتر از فرم آلی آن‌هاست که این امر موجب می‌شود تا سطح بیشتری از این عناصر در جیره دام افزوده شود تا کفاف نیاز دام را بدهد. اما مکمل سازی بیش از حد یک عنصر ممکن است اثر سوئی بر سایر عناصر بگذارد و جذب و سوخت و ساز آن‌ها را کاهش دهد و به تبع بازه مصرفی آنهار پایین بیاورد (روشن ضمیر و همکاران, ۱۳۹۸). محققین تغذیه حیوانی به این حقیقت پی برده‌اند که ممکن است کیلات های مواد معدنی از عوامل مهم کنترل کننده جذب این گونه عناصر باشند این کیلات ها به وسیله جلوگیری از تبدیل عنصر به شکل غیر محلول در روده یا جلوگیری از جذب شدید آن توسط کلوئید های غیر محلول که مانع جذب خواهند شد جذب عنصر را به شدت تسریع کنند (Leeson and summer, 2008) . (Yi et al, 2007) و (Ma et al, 2013) ثلبت کردند که ماده معدنی کمیاب با یک لیگاند آلی ارزش بیولوژیکی بهتری نسبت به فرم های سولفات برای جوجه‌های گوشتی دارد، زیرا جذب مواد معدنی به فرم غیر آلی ممکن است به دلیل تمایل آنها به تشکیل کمپلکس با ترکیبات جیره یا تداخل با یکدیگر محدود شود. کمپلکس مواد معدنی با گلایسینات به دلیل پایداری خوب، خوش طعم بودن و خنثی بودن از لحاظ الکتریکی، نسبت به فرم معدنی ارجحیت دارد (Zhang et al., 2017). گلایسین که اسید آمینه ای با کمترین وزن مولکولی است، به پایداری ترکیبات کلیات کمک می‌کند و جذب آن‌ها را در روده افزایش می‌دهد (Kulkarni et al., 2011). بیشتر مطالعات صورت گرفته بر روی اثر مواد معدنی بر عملکرد مرغان تخم گذار بر روی فرم های معدنی این مواد بوده و مطالعات کمی بر روی فرم های آلی مواد معدنی صورت گرفته است. نیاز مرغان تخم‌گذار به عنصر مس به خصوص فرم آلی آن در بسیاری از منابع ذکر نشده به طوری که انجمن ملی تحقیقات آمریکا (NRC, 1994) برای مس عددی بیان نکرده و در کاتالوگ مرغ تخم گذار سویه هایلاین W-36 این نیاز ۸ میلی گرم بیان شده است (Hy-Line, 2020). ولی در برخی منابع استفاده از ۲۵۰ میلی گرم را هم گزارش کرده‌اند. از این رو هدف این مطالعه بررسی اثر فرم گلایسینات مس به عنوان یک منبع آلی از این عنصر بر روی صفات عملکردی مرغ در سنین بالا و هم چنین صفات کیفیت تخم مرغ و از طرفی برآورد سطح مطلوب استفاده از این عنصر در جیره این دسته از مرغ‌ها می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

برای انجام این آزمایش تعداد ۳۰۰ قطعه مرغ تخم‌گذارسویه های‌لاین- W36 که در دوره پس از تولک بری به سر می‌بردند (دوره سنی ۱۰۵-۱۱۷) انتخاب شد. پرنده‌ها به مدت ۲۱ روز با خوراک فاقد مکمل مس برای تخلیه ذخایر بدنی تغذیه شدند. آزمایش در یک دوره ۸۴ روزه با پروتکل ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت خاموشی انجام شد. در طول دوره آزمایش پرندگان دسترسی آزاد به آب و خوراک داشتند و آب از طریق نیپل و دان از طریق دانخوری دستی در اختیار آن‌ها قرار گرفت.

آزمایش در قالب یک طرح بلوک کامل تصادفی شامل افزودن سطوح ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ میلی‌گرم مکمل گلایسینات مس در کیلو گرم جیره با ۵ تکرار و تعداد ۱۲ قطعه پرنده در هر تکرار انجام شد. طول دوره آزمایش شامل سه دوره ۲۸ روزه بود. جیره‌ها بر طبق

جداول استاندارد آنالیز شیمیایی مواد خوراکی و همچنین توصیه‌های کاتالوگ های‌لاین W-36با نرم افزار UFFDAتنظیم شد. شاخص‌های سنجش عملکرد شامل درصد تخم‌گذاری، میانگین وزن تخم مرغ، گرم تخم مرغ تولیدی روزانه، مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک اندازه گیری شد. ضمن اینکه صفات کیفیت تخم مرغ، شاخص شکل، شاخص زرده، شاخص سفیده، واحدهاو و وزن مخصوص در ۲ عدد تخم مرغ که به صورت تصادفی انتخاب شده بودند در ۲ روز آخر هر دوره ۲۸ روزه اندازه گیزی شد.

داده‌های آزمایش به صورت طرح بلوک کامل تصادفی آنالیز شدند. داده‌های به دست آمده را در نرم افزار Excel وارد کرده و بعد ازعملیات تبدیل و مرتب سازی، برای تجزیه و تحلیل آماده شدند. سپس داده‌ها را در نرم افزار SAS ۹/۱ وارد و از طریق proc univariate normal مورد تست نرمالیته قرار دادیم. داده‌ها با proc GLM و با آزمون توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

۳. نتایج و بحث

نتایج مربوط به اثر مکمل گلایسینات مس بر شاخص‌های عملکرد مرغان تخم‌گذار در جدول ۱ ارائه شده است. با افزایش سطح مس به فرم کیلات عالی گلاسینات درصد تخم‌گذاری ($p<۰/۰۱$) و گرم تخم مرغ تولیدی روزانه ($p<۰/۰۵$) به صورت خطی افزایش یافت. پرندگان تغذیه شده با جیره مکمل شده با ۶ میلی‌گرم مس به فرم گلاسینات بالاترین عملکرد تولید تخم را داشت. میانگین وزن تخم مرغ تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت ($p>۰/۰۵$). با افزایش سطح مس جیره مصرف خوراک روزانه به صورت منحنی درجه دوم تغییر کرد، طوری که سطح ۶ میلی گرم مکمل گلایسینات مس بر کیلوگرم جیره بیش‌ترین مصرف خوراک را داشت ($p<۰/۰۱$). اثر افزایش سطح مس جیره بر ضریب تبدیل غذایی به صورت معادله درجه دوم بود به طوری که مرغان تغذیه شده با جیره حاوی ۶ میلی گرم مس بالاترین ضریب تبدیل غذایی را نشان دادند و با افزایش سطح مس ضریب تبدیل غذایی کاهش یافت و پرندگان تغذیه شده با ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم مس به فرم گلایسینات پایین ترین ضریب تبدیل غذایی را داشتند ($p<۰/۰۶۴$). مطابق با نتایج به دست آمده از این تحقیق (Guclu et al., 2008) گزارش کردند افزودن کیلات پروتئینات مس باعث افزایش مصرف خوراک و راندمان تبدیل غذایی مرغان تخم گذار در سن ۳۰ هفتگی می‌شود. همچنین نتایج تحقیق (Ghalid et al., 2019) نشان داد که افزودن مکمل مس-گلایسین موجب بهبود ضریب تبدیل غذایی در جوجه‌های گوشتی می‌شود. نتایج پژوهش (خاقانی و همکاران،۱۳۹۸) نشان داد سطح ۸ میلی‌گرم گلایسینات مس بر کیلوگرم جیره باعث بهبود عملکرد تولیدی مرغان تخم‌گذار می‌شود. بر خلاف نتایج به دست آمده از این مطالعه و گزارشات فوق خاقانی و همکاران (۱۳۹۸) گزارش کردند افزودن مس به صورت مکمل گلاسینات تاثیری بر مصرف خوراک روزانه مرغان تخم‌گذار نداشت.

جدول ۱: بررسی اثر مکمل مس بر صفات عملکردی مرغان تخم گذار مسن

سطح افزودن مس به جیره (mg/kg)	درصد تخم-گذاری	گرم تخم مرغ تولیدی روزانه	میانگین وزن تخم مرغ (گرم)	مصرف خوراک روزانه (گرم)	ضریب تبدیل خوراک
۳	۷۶/۳۷^{b}	۴۹/۹۵^{b}	۶۵/۷۶	۹۲/۷۰^{c}	۱/۸۸^{ab}
۶	۸۰/۹۲^{a}	۵۳/۱۰^{a}	۶۶/۱۶	۱۰۱/۰۳^{a}	۱/۹۱^{a}
۹	۷۸/۱۱^{ab}	۵۱/۲۰^{ab}	۶۵/۲۴	۹۵/۹۱^{bc}	۱/۸۷^{ab}
۱۲	۸۰/۴۶^{a}	۵۲/۵۸^{ab}	۶۵/۴۱	۹۸/۱۴^{ab}	۱/۸۶^{ab}
۱۵	۸۰/۷۶^{a}	۵۲/۷۷^{a}	۶۵/۰۲	۹۴/۷۰^{bc}	۱/۷۹^{b}
SEM	۰/۷۰۴	۰/۲۸۶	۰/۱۰۷	۰/۹۸۶	۰/۰۰۱

p-Value	۰/۰۰۱	۰/۰۱	۰/۲۱۷	۰/۰۰۱	۰/۰۳۷
پاسخ به افزایش سطح جیره					
پاسخ خطی	۰/۰۰۲	۰/۰۲۶	۰/۰۵۲	۰/۶۸	۰/۰۰۹
پاسخ درجه دو	۰/۴۱۸	۰/۴۱	۰/۷۷	۰/۰۰۱	۰/۰۶۴

a...c میانگین‌های هر ستون برای هر اثر که حرف مشترک ندارند دارای اختلاف معنی دار هستند

جدول ۲: بررسی اثر مکمل گلایسینات مس بر صفات کیفیت تخم مرغ مرغان تخم گذار مسن

سطح افزودن مس به جیره (mg/kg)	وزن مخصوص	ضخامت پوسته	شاخص شکل	شاخص زرده	واحد هاو	شاخص سفیده
۳	۱/۰۹	۰/۳۹	۷۷/۰۳	۳۲/۴۵^{a}	۹۳/۲۴	۶/۷۳
۶	۱/۰۹	۰/۳۸	۷۸/۰۸	۳۲/۰۸^{ab}	۹۴/۱۳	۷/۰۶
۹	۱/۰۹	۰/۳۹	۷۷/۳۳	۳۲/۶۰^{a}	۹۲/۰۸	۶/۸۵
۱۲	۱/۰۹	۰/۳۹	۷۷/۴۰	۳۱/۴۵^{b}	۹۲/۴۹	۶/۵۸
۱۵	۱/۰۸	۰/۳۸	۷۷/۵۲	۳۲/۰۶^{ab}	۹۲/۷۱	۶/۸۷
SEM	۰/۰۰۱	۰/۰۰۴	۰/۲۷	۰/۰۵۸	۰/۵۳۱	۰/۰۱۰
p-Value	۰/۵۵	۰/۶۵۱	۰/۱۲	۰/۰۲۲	۰/۱۴۱	۰/۰۷۵
پاسخ به افزایش سطح جیره						
پاسخ خطی	۰/۱۴	۰/۷۳۷	۰/۶۲	۰/۰۵۲	۰/۱۹۷	۰/۷۳۶
پاسخ درجه دو	۰/۴۹	۰/۸۱	۰/۳۶	۰/۸۶۲	۰/۵۹۱	۰/۷۶۱

a...c میانگین‌های هر ستون برای هر اثر که حرف مشترک ندارند دارای اختلاف معنی دار هستند

نتایج مربوط به اثر مکمل گلایسینات مس بر شاخص‌های سنجش کیفیت تخم مرغ در جدول ۲ ارائه شده است. مکمل گلایسینات مس تاثیری بر صفات کیفیت تخم مرغان تخم‌گذار در دوره دوم تولید نداشت ($p<0/05$). این نتایج مطابق با نتایج (خاقانی و همکاران،۱۳۹۸) است، این محققین گزارش کردند مکمل گلایسینات آهن، روی و مس تاثیری بر صفات کیفیت تخم مرغ نشان نداد. (کنعانی و همکاران،۱۳۹۷) نیز گزارش کردند که استفاده از مکمل آلی (بیوپلکس) مس و مکمل نانو مس تاثیری بر شاخص‌های کیفیت تخم مرغ نداشت.

۴. نتیجه گیری

به طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن مکمل گلایسینات مس به جیره مرغان تخم‌گذار در دوره دوم تولید باعث بهبود در عملکرد تولیدی می‌شود به طوری که در بیشتر شاخص‌ها سطح ۶ میلی‌گرم بر کیلو گرم مکمل گلایسینات مس بهترین عملکرد تولید تخم را نشان داد.

منابع

۱ - افشاربکشلو ع.، شیر محمد ف. و مهری م. ۱۳۹۷. تاثیر منابع روی به شکل سولفات، هیدروکسی کلرید و کمپلکس الی روی-متیونین بر عملکرد و خصوصیات کیفی مرغان تخم گذار مسن، نشریه علوم دامی ایران، شماره ۱۲۵، صفحه ۱۵_۲۸.

۲-خاقانی ح ر.، حسینی واشان س ج.، زرقی ح. و الله رسانی ع.۱۳۹۸. اثر گلیسینات روی، مس و آهن بر عملکرد مرغان تخمگذار در اوج تولید. پنجمین کنفرانس ملی مدیریت پرورش دام، طیور و آبزیان.

۳- خاقانی ح ر.، حسینی واشان س ج.، زرقی ح. و الله رسانی ع.۱۳۹۸. اثر کلات گلایسینات روی، مس و آهن برصفات کیفی تخم مرغ و پوسته آن برروی مرغ‌های تخم‌گذار در پیک تولید، پنجمین کنفرانس ملی مدیریت پرورش دام، طیور و آبزیان.

۴- روشن ضمیر ح ا.، رضائی ج. و فضائلی ح. ۱۳۹۸. اثر کمپلکس های آلی منگنز، روی و مس (پیوند شده با گلایسین یا متیونین) به جای شکل‌های سولفاته (برابر یا دو برابر توصیه NRC) بر سلامت، باروری و متابولیت های خون گاو شیری و گوساله، نشریه تحقیقات تولیدات ملی، سال هشتم، شماره ۱، صفحه ۱-۱۵.

۵-باغبان کنعانی پ.، جان محمدی ح.، تقی زاده ا.، محبوب س. و میرقلنج س ع. ۱۳۹۷. تأثیر افزودن مکمل‌های آلی و نانو مس بر عملکرد، کیفیت تخممرغ، کلسترول زرده و فراسنجه های خونی مرغ‌های تخمگذار، نشریه پژوهش‌های علوم دامی (دانش کشاورزی).

6-Aksu DS., Aksu T. and Onel SE. 2012. Does inclusion at low levels of organically complexed minerals versus inorganic forms create a weakness in performance or antioxidant defense system in broiler diets?. B International Journal of Poultry Science, 11:666-672.

7- El-Ghalid O A H., El Ashry G M., Soliman S M. and Abd El Hady. 2019. Effect of dietary sources and levels of copper supplementation on growth performance, blood parameters and slaughter traits of broiler chickens. *Egyptian Poultry Science Journal*, *39*(4), 897-912.

8-Güçlü B K., Kara K., Beyaz L., Uyanik F., Eren M., and Atasever A. 2008. Influence of dietary copper proteinate on performance, selected biochemical parameters, lipid peroxidation, liver, and egg copper content in laying hens. *Biological trace element research*, *125*(2), 160-169.

9-Harris E D., Rayton J K., Balthrop J E., Dislivestro R S. and Garcia M. 1980. Copper and the synthesis of elastin and collagen. Department of Biochemistry and Biophysics and the Texas Agricultural Experiment Station, Texas A &M Univesity, College Station, Texas 77843, USA. (Ciba Foundation Symposium 79), 163-182

10- Hy-Line. (2020). Hy-Line W-36 Commercial Management Guide: Hy-Line In

11- Kulkarni R C., Shrivastava H P., Mandal A B., Deo C., Deshpande K Y., Singh R. and Bhanja S K. 2011. Assessment of growth performance, immune response and mineral retention in colour broilers as influenced by dietary iron. Animal Nutrition and Feed Technology, 11(1):81–90.

12-Leeson S., Summers J D. 2008. Commercial Poultry Nutrition. 3Rd Edition, Nottingham University Press, P:398.

13- Ma W., Jing W., Zhiqing Z., Hong S., Min Y. and Feng J. 2013. Comparison of Absorption Characteristics of Iron Glycine Chelate and Ferrous Sulfate in Caco-2 Cells. International Journal of Agriculture and Biology,15(2). 372-376.

14- Yi GF., Atwell CA., Hume JA., Dibner JJ., Knight CD. and Richards JD. 2007. Determining the methionine activity of Mintrex organic trace minerals in broiler chicks by using radiolabel tracing or growth assay. Poultry Science. 86(5):877-87.

15- Nutrient Requirements of Poultry. 1994. National Academy Press Washington D C, P:176

16- Rucker RB., Kosonen T., Clegg MS., Mitchell AE., Rucker BR., Uria-Hare JY. and Keen CL. 1998. Copper, Lysyl oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking. American Journal of Clinical Nutrition,67(5 Suppl):996S-1002S.

17- Underwood E J., and Suttle N F. 1999. The mineral nutrition of livestock. 3rd Edition. CABI Publishing New York, P:614

18- Zhang L., Wang YX., Xiao X., Wang JS., Wang Q., Li KX., Guo TY. and Zhan XA. 2017. Effects of Zinc Glycinate on Productive and Reproductive Performance, Zinc Concentration and Antioxidant Status in Broiler Breeders. Biological Trace Element Research, 178(2):320-326

Evaluation of the effects of trans-anthole on the expression of resistin genes in induced polycystic ovary syndrome in a rat model

Mahsa Dindar[1], Mahdy Banan Khojasteh[2]

1- Position of the First Author :student
Supervisor:

First Author[1:] Mahsa Dindar

1- Position of the First Author :student

*Corresponding Author Email address :*Dindar.mahsa@yahoo.com

Abstract

Background: Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a common endocrine disorder in women. anthole is a -Serum levels of resistin as an inflammatory cytokine increase in PCOS. Trans phytoestrogen compound that has effects anti-inflammatory and antioxidant. In this study, was .anthole on the mean relative expression of resistin gene-investigated the effect of trans

Materials and Methods: In this study, 15 female rats weighing 180-200 g were used. To induce PCOS, 2 mg of estradiol valerate was injected intramuscularly. Two groups intact and PCOS received saline .One group was injected with 50 mg / kg trans-anthole. Visceral adipose tissue was isolated. The mean relative expression of resistin gene was examined by real-time PCR. The data were analyzed using one-way ANOVA, Tukey post hoc test and SPSS software. In all analyzes, the results were statistically significant with $P \geq 0.05$.

Results: Injection of 50 mg / kg transa-nthole significantly reduced the mean relative expression of resistin gene in PCOS rats compared to the control group.

Conclusion : The activity of inflammatory cytokines in polycystic ovary syndrome increases. Trans-anethole may be involved in improving the complications of PCOS by reducing inflammatory factors.

Keywords: trans-anthole,resistin, PCOS

اثرات ترانس آنتول بر بیان ژن رزیستین در موش های صحرایی مدل PCOS

مهسا دیندار[1] مهدی بانان خجسته[2]

۱- دانشجو کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز

۲- استادیار دانشگاه، گروه زیست شناسی، دانشکده :علوم طبیعی،دانشگاه تبریز

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: *Dindar.mahsa@yahoo.com**

چکیده

سندروم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) اختلال اندوکرینی شایع در زنان است. سطح سرمی رزیستین به عنوان سیتوکین التهابی در PCOS افزایش می‌یابد. ترانس آنتول یک ترکیب فیتو استروژن است که دارای خواص ضد التهابی و آنتی اکسیدانی می باشد. در این مطالعه اثر ترانس آنتول بر میانگین بیان نسبی ژن رزیستین مطالعه شده است.

مواد و روش: در این تحقیق ۱۵ موش صحرایی ماده با وزن تقریبی ۱۸۰-۲۰۰گرم استفاده شد. برای القای PCOS ۲mg استرادیول والرات به صورت داخل عضلانی تزریق شد.دو گروه به عنوان گروه کنترل سالم و گروه PCOS سالین و یک گروه دوز ۵۰ mg/kg ترانس آنتول سالین دریافت کردند. بافت چربی احشایی جداسازی شد. میانگین بیان نسبی ژن رزیستین با تکنیک ریل تایم PCR برسی شد. داده های حاصل با استفاده از آزمون آنوای یک طرفه ،آزمون تعقیبی توکی و با استفاده از نرم افزارSPSS آنالیز شدند .در تمام آنالیزها نتایج با$P \leq 0.05$ از نظر آماری معنی دار گزارش گردید.

نتایج: مقادیر ۵۰ mg/kg ترانس آنتول میانگین بیان نسبی ژن رزیستین را در موش موش های صحرایی PCOS در مقایسه با گروه کنترل از نظر آماری به طور معنی داری کاهش داد.

نتیجه گیری: میزان فعالیت ستوکین‌های التهابی در سندروم تخمدان پلی کیستیک افزایش می یابد. ترانس آنتول ممکن است از طریق کاهش فاکتورهای التهابی در بهبود عوارض PCOS دخالت داشته باشد.

واژگان کلیدی: پلی کیستیک،رزیستین،ترانس آنتول ،کتامین زایلزین

۱.مقدمه

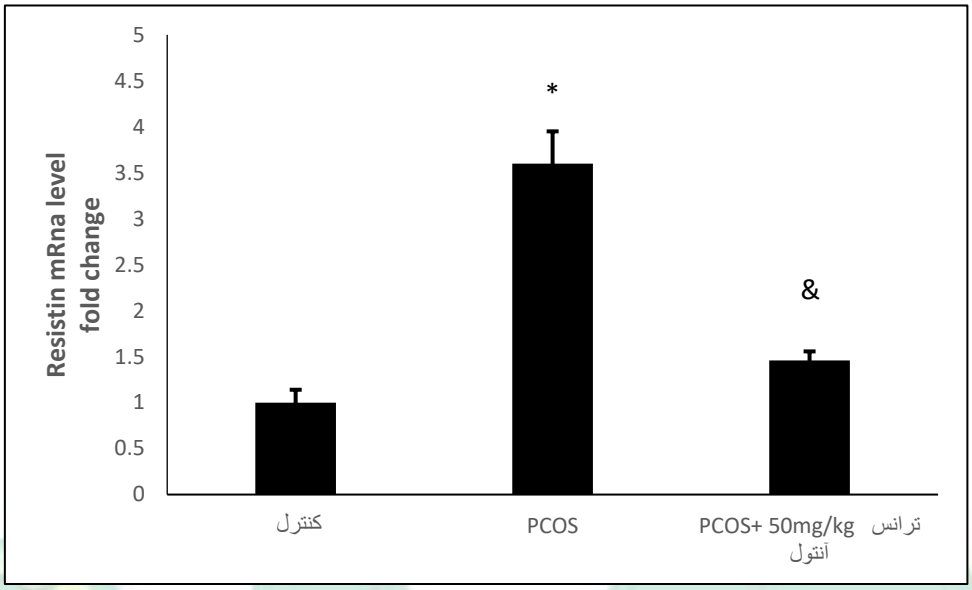
سندروم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) از اختلالات اندوکرینی در زنان است که با شیوع ۵ -۱۰ درصدی در دنیا ظاهر می‌شود. معمولا در زنان در سنین قبل از یائسگی شیوع می‌یابد. این اختلال با علائم عدم تخمک گذاری، افزایش سطوح سرمی آندروژن ها، افزایش آدیپوکین های پیش التهابی و مقاومت به انسولین مشخص می‌شود(Rojas et al.,2014). رزیستین یک سیتوکین پیش التهابی از خانواده پروتئین ترشحی غنی از سیستئین است، این سیتوکین توسط ژن *RETN* کد می‌شود به دلیل ارتباط با مقامت به انسولین بنام Resistin نام گذاری شده است (C.M Steppan et al.2001 and F. AlHAnnan et al.2015). این سیتوکین بیشتر از ماکروفاژها در انسان ترشح می شود در حالی که در جوندگان منبع اصلی آن چربی است.(L.Patel et al.2003). ترانس آنتول یک فیتو استروژن است که ترکیب اصلی بسیاری از گیاهان مثل انیسون و رازیانه را تشکیل می‌دهد. به طور سنتی از این گیاهان برای بیماری‌های مختلف از جمله اختلالات تولید مثلی استفده می‌شود. ترانس آنتول دارای خواص ضد التهابی، آنتی اکسیدانی، ضد سرطانی و ضد میکروبی می‌باشد. این ترکیب پس از مصرف به سرعت جذب می‌شود. مشاهده شده است ترانس آنتول بعد از ۲۴ ساعت از بدن خارج می‌گردد بنابرین از نظر سلامتی برای بدن مشکلی ایجاد نمی‌کند(Akçan, Lale, and Tümer 2018). در این تحقیق اثرات ترانس آنتول بر بیان ژن رزیستین در سندروم تخمدان پلی کیستیک القایی در موش‌های صحرایی ماده بررسی شده است.

۲.مواد وروش

برای انجام آزمایش ۱۵ موش صحرایی ماده به وزن ۱۸۰-۲۲۰ گرم استفاده شده است. برای القای PCOS ، ۲ میلی گرم استرادیول والرات حل شده در ۰/۵ میلی لیتر روغن کنجد به صورت داخل عضله ای تزریق شد. پس از ۶۰ روز واژیناسیون انجام گرفت. وجود سلول‌های شاخی زیر میکروسکوپ نوری نشان دهنده القای PCOS بود. گروه کنترل سالم و گروه کنترل PCOS سالین و یک گروه PCOS ۵۰mg/kg ترانس آنتول به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. بعد از تمام شدن دوره تزریق دارو موش‌های صحرایی با کتامین/زایلزین بی هوش شدند. بافت چربی احشایی خارج شد. در یخچال منفی ۸۰ درجه برای انجام مراحل بعدی نگهداری شد. در مرحله بعد استخراج RNA بر اساس دستور کیت انجام گرفت، به دنبال آن cDNA طبق دستور کیت سنتز شد. غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ تعیین شد سپس واکنش ریل تام انجام گرفت. برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS version 16 استفاده شد. نتایج حاصل به صورت میانگین ± انحراف معیار میانگین(± SEM) ارائه شدند. در تمام آنالیزهای آماری انجام شده، نتایج با $p\leq0.05$ معنی‌دار گزارش شدند.

۳.نتایج و بحث

مقایسه میانگین بیان نسبی ژن *رزیستین* بین گروه کنترل سالم و PCOS نشان داد که افزایش معنی داری در بیان ژن *رزیستن* در گروه PCOS نسبت به گروه سالم وجود دارد. بیان نسبی ژن *رزیستن* در گروه PCOS دریافت کننده ۵۰ mg/kg ترانس آنتول نسبت به گروه کنترل سالم و کنترل PCOS تغییر معنی داری یافت.



شکل۱: میانگین بیان نسبی ژن *رزیستن* در چربی احشایی موش‌های صحرایی دریافت کننده داخل صفاقی ۵۰ mg/kg ترانس آنتول در مقایسه با موش های صحرایی گروه سالم و گروه PCOS. نتایج به صورت میانگین ± SEM ارائه شده اند. *: در مقایسه با گروه سالم &: در مقایسه با گروه PCOS

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تزریق داخل صفاقی ۵۰ mg/kg ترانس آنتول باعث کاهش در میانگین بیان ژن رزیستین در بافت چربی احشایی در موش‌های صحرایی ماده مبتلا به سندروم تخمدان پلی کیستیک نسبت به گروه کنترل شد، این کاهش از نظر آماری معنی دار بود. همچنین مطالعات نشان داده است که میانگین بیان ژن رزیستن در PCOS افزایش پیدا می‌کند که مطابق با نتایج این تحقیق بود(Baldani et al.2019). رزیستین یک آدیپوکین ۱۲.۵ کیلودالتونی از خانواده سیتوکین‌ها است که در بافت چربی، ماکروفاژ و مغز استخوان بیان می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد بین میزان بیان رزیستین و مقاومت به انسولین ارتباط وجود دارد(Bokarewa et al,2005). ترانس آنتول ترکیب فیتواستروژنی است که به مقدار فراوانی در گیاه رازیانه یافت می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد استفاده طولانی مدت از رازیانه باعث بهبود گلوکز خون، پروفایل چربی، HbAc1 و سایر پارامترها در موش های صحرایی دیابتی ناشی از استرپتوزوتوسین می‌شود موش‌هایی که میزان گلوکز بالایی داشتند سطح رزیستین در آنها نیز بالا بود. (Sheikh et al,2015). دیابت به عنوان عامل خطر برای سندروم تخمدان پلی کیستیک محسوب می‌شود (Zhu et al, 2021). بنابرین یکی از مسیرهای احتمالی که ترانس آنتول می‌تواند بر بیان ژن رزیستین اثر بگذارد افزایش در سطح انسولین و کاهش میزان گلوکز می‌باشد. به این صورت که ترانس آنتول احتمالا سطح انسولین در موش‌های مبتلا به سندروم تخمدان پلی کیستیک را افزایش می‌دهد با افزایش در سطح انسولین و بهبود در سطح گلوکز میزان بیان ژن رزیستین نیز کاهش می‌یابد.

منابع

12. Akçan, Ramazan, Aykut Lale, and Ali Rıza Tümer. 2018. "Trans-Anethole : A Key Compound in Bogma Raki." Acta Medica, 49(1):26–31.
13. Baldani, D. P., Skrgatic, L., Kasum, M., Zlopasa, G., Kralik Oguic, S., & Herman, M. (2019). Altered leptin, adiponectin, resistin and ghrelin secretion may represent an intrinsic polycystic ovary syndrome abnormality. Gynecological Endocrinology, 35(5), 401-405.
14. Bokarewa, M., Nagaev, I., Dahlberg, L., Smith, U., & Tarkowski, A. (2005). Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. The Journal of Immunology, 174(9), 5789-5795.
15. Claier M. Steppan, Shannon T. Bailey, Savitha Bhat, Elizabeth J. Brown,Ronadip R. Banerjee, Christopher M. Wright, Hiralben R. Patel, Rexford S. Ahima, Mitchell A. Lazar. 2001.The hormone resistin links obesity to diabetes.Nature .409 (6818) 307–312.
16. Evaluation of the effects of trans-anthole on the expression of proinflammatory adipokines genes in induced polycystic ovary syndrome in a rat model
17. Lisa Patel , Amy C Buckels, Ian J Kinghorn, Paul R Murdock, Joanna D Holbrook, Christopher Plumpton, Colin H Macphee, Stephen A Smith. 2003. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. Biochemical and Biophysical Research Communications.300(2):472-476.
18. Sheikh, B. A., Pari, L., Rathinam, A., & Chandramohan, R. (2015). Trans-anethole, a terpenoid ameliorates hyperglycemia by regulating key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin induced diabetic rats. Biochimie, 112, 57-65.
19. Thomas Ho-yin Lee ,Kenneth King-yip Cheng ,Ruby Lai-chong Hoo,Parco Ming-fai Siu & Suk-yu Yau. 2019. The novel perspectives of adipokines on brain health. International journal of molecular sciences. 20(22): 5638.
20. Xuezhou Yang , Xiaozhen Quan , Yanli Lan , Qipeng Wei , Jinhai Ye , Xiaofang Yin , Zhisong Ji , Hui Xing , Ying Yang .2018. Serum chemerin level in women with PCOS and its relation with the risk of spontaneous aborti. Gynecological Endocrinology.34(10):864-867.
21. Zhihan Wang, Xuefeng Yu1 and Yong Chen.2021. Recruitment of Thermogenic Fat: Trigger of Fat Burning.Frontiers in Endocrinology.12:751
22. Zhu, T., Cui, J., & Goodarzi, M. O. 2021. Polycystic ovary syndrome and risk of type 2 diabetes, coronary heart disease, and stroke. Diabetes, 70(2), 627-637.

The effect of iron glycinate supplementation on the performance and egg quality of laying hens in the second production cycle

Simin Abolfathi[1]; Heydar Zarghi [2*]; Hassan Kermanshahi[3]

۱-Master student, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

۲-Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

۳-Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

*Corresponding Author Email address: h.zarghi@um.ac.ir

Abstract

This experiment was conducted to evaluate the effects of iron glycinate supplementation as an organic source on performance and egg quality of laying hens during the second cycle (post-molt**)**. A total of 300, 105-week-old Hy-Line-W36 laying hen were assigned in a randomized complete block design with five treatment (30, 60, 90, 120, 150 mg Fe/kg of diet) in the form of iron glycinate, five replicates and 12 birds each. Before the start of the experiment, the birds were fed for 21 days without iron supplementation to deplete the body's reserves. Functional traits of laying hens under test include percentage of egg production (EP), egg mass (EM), feed intake (FI) and feed conversion ratio (FCR). As well as egg quality indicators including specific gravity, shape index, shell thickness, yolk index, yolk color index, Haugh unit, and white index were measured using 2 samples of eggs produced in the last 2 days of each 28-day period. With increasing iron level in the diet, EP ($p < 0.012$), EM ($p < 0.026$) and FCR ($p < 0.05$) improved with linear trends. Birds fed diets containing 90 mg/kg Fe had the highest EP and EM. Also, in the birds fed diets containing 60 mg/kg Fe, the FCR showed the lowest numerical value. Dietary iron levels did not show a significant effect on most of the egg quality traits ($p > 0.05$). With increasing the level of Fe in the diet, the yolk color index changed as a quadratic equation, so that birds fed a diet supplemented with 30 mg/kg Fe had a higher yolk color index than other treatments ($p < 0.05$). The results of this experiment showed that supplementing the diet of laying hens during the second cycle with iron glycinate improves the productive performance of birds but has no effect on egg quality traits .

Keywords: Iro chelate, post-molt, Haugh unit, feed conversion ratio, yolk color

اثر مکمل گلایسینات آهن بر عملکرد و کیفیت تخم مرغان تخم‌گذار در سیکل دوم تولید

سیمین ابوالفتحی[۱]، حیدر زرقی[۲*]، حسن کرمانشاهی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳-استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

*ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: h.zarghi@um.ac.ir

چکیده

این آزمایش به منظور ارزیابی اثر مکمل گلایسینات آهن به عنوان منبع آلی بر عملکرد مرغ‌های تخم گذار در سیکل دوم تولید (پس از تولک بری) انجام شد. آزمایش با استفاده از تعداد ۳۰۰ قطعه مرغ تخم گذار سویه های‌لاین W-36 در سن ۱۱۷-۱۰۵ هفتگی در قالب طرح بلوک کامل تصادفی و با افزودن پنج سطح آهن (۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) به فرم گلایسینات آهن، ۵ تکرار و ۱۲ قطعه مرغ در هر تکرار انجام شد. قبل از شروع آزمایش پرنده‌ها به مدت ۲۱ روز با خوراک بدون افزودن مکمل آهن، به منظور تخلیه ذخایر بدن تغذیه شدند. صفات عملکردی مرغ‌های تخم گذار تحت آزمایش شامل درصد تولید تخم، گرم تخم مرغ تولیدی روزانه، مصرف خوراک و ضریب تبدیل غذایی، همچنین شاخص‌های سنجش کیفیت تخم مرغ شامل وزن مخصوص، شاخص شکل، ضخامت پوسته، شاخص زرده، شاخص رنگ زرده، واحد هاو، و شاخص سفیده با استفاده از ۲ نمونه تخم مرغ تولیدی در ۲ روز پایانی هر دوره ۲۸ روز اندازه گیری شد. با افزایش سطح آهن در جیره درصد تخم‌گذاری ($p<۰/۱۲۴$)، گرم تخم مرغ تولیدی ($p<۰/۰۲۶$) و ضریب تبدیل غذایی ($p<۰/۰۵۶$) به صورت خطی بهبود یافت. پرندگان تغذیه شده با جیره حاوی ۹۰ میلی‌گرم در کیلو گرم آهن بالاترین درصد تخمگذاری و گرم تخم مرغ تولیدی روزانه را داشتند. در پرندگان تغذیه شده با جیره حاوی ۶۰ میلی گرم در کیلو گرم آهن ضریب تبدیل غذایی کمترین مقدار عددی را نشان داد. سطوح آهن جیره تاثیر معنی داری بر روی اغلب صفات سنجش کیفیت تخم مرغ تولیدی نشان نداد ($p>۰/۰۵$). با افزایش سطح آهن جیره شاخص رنگ زرده به صورت معادله درجه دو تغییر نشان داد به طوری که پرندگان تغذیه شده با جیره مکمل شده با ۳۰ میلی گرم در کیلوگرم آهن شاخص رنگ زرده بالاتری نسبت به دیگر سطوح آهن جیره داشتند ($p<۰/۰۵$). نتایج این آزمایش نشان داد که مکمل نمودن جیره مرغان تخمگذار در دوره دوم تولید با گلایسینات آهن موجب بهبود عملکرد تولیدی پرنده می شود ولی تاثیری بر صفات کیفیت تخم مرغ ندارد.

کلمات کلیدی: کیلات آهن، پس از تولک بری، واحد هاو، ضریب تبدیل غذایی، رنگ زرده

۱. مقدمه

اعتقاد بر این است که آهن (Fe) یکی از مهم‌ترین عناصر کمیاب برای حیوانات است و در بسیاری از انواع واکنش‌های مهم حیوانی شرکت می‌کند (Abbasi et al., 2015). علاوه بر این آهن جزء موادی در بدن است که در بسیاری از واکنش‌های مربوط به ایمنی، متابولیسم مواد و تبدیل انرژی نقش دارد (Zödl et al., 2003; Nicholls et al., 2000) آهن موجود در بدن نه تنها به حمل و نقل اکسیژن کمک می‌کند، بلکه در تامین انرژی، متابولیسم پروتئین، فرایندهای آنتی اکسیداسیون و ایمن سازی نیز مشارکت دارد (Abbaspour et al., 2014; Von et al., 2013). گلیسین در بین تمام آمینواسید ها سبک‌ترین است که از پایداری کیلات حمایت و از یون آهن در برابر واکنش‌های شیمیایی ضدجذب که مانع از جذب آهن در بدن می‌شود، محافظت می‌کند (Kulkarni et al., 2011). مزیت آن در مقایسه با سایر اسیدهای آمینه، اندازه کوچک مولکول آن است که به بهبود جذب در روده کمک می‌کند (BASF, 2013). گلایسینات ها بسیار پایدار بوده و قابلیت دسترسی بالایی دارند. پیوندهای عناصر کم نیاز با گلیسین فاقد بار الکتریکی است، بنابراین به آنتاگونیست های دیگر حساس نیستند (Swiatkiewicz et al., 2008). میزان احتیاجات آهن در مرغان تخم گذار ۴۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره (Hy-Line, 2020). گزارش شده است ولی این مقدار در کتاب تغذیه مرغان تخم گذار ۳۰ میلی گرم در کیلوگرم است (Leeson and Summers, 2009). در گزارش انجمن تحقیقات تغذیه آمریکا نیز مقدار آن ۳۸ میلی گرم در کیلوگرم جیره گزارش شده است (NRC, 1994). مکمل‌های مواد معدنی ترکیبی از مواد معدنی کم نیاز می‌باشند که به جیره‌های غذایی مرغ‌های تخم گذار برای تامین آن دسته از موادی معدنی که احتمال کمبودشان در جیره‌های غذایی بیشتر است اضافه می‌شوند. شرایط پرورش فشرده یکی از دیگر عللی است که افزودن مکمل‌های معدنی به جیره‌های غذایی روزانه مرغ‌های تخم گذار اجتناب ناپذیر نموده است، از این رو تولید تجاری این مکمل‌ها در تمامی نقاط دنیا رایج است (علیزاده و همکاران، ۱۳۸۶). Kegley و همکاران (2002)، همچنین Creechو همکاران (2004) نیز گزارش کردند گلایسینات آهن (Fe-Gly) به عنوان نوعی مکمل آهن با منبع کیلات آمینو یا پروتئین دار آهن، نسبت به فرم سولفات آن (FeSo4) مزیت دارد. این امر ممکن است با جذب بهتر گلایسینات آهن درارتباط باشد و این بدان معناست که فراهمی زیستی گلایسینات آهن بالاتر از آهن سولفات آهن است است. به نقل از Layrisse و همکاران (2000) گفته شده است که فراهمی زیستی بالاتر احتمالا به دلیل ساختار شیمیایی آن است که تا حدودی از فعل و انفعالات Fe-phytate جلوگیری می‌کند. علاوه بر این سولفات آهن که جهانی‌ترین مکمل آهن در صنعت خوراک نیز گزارش شده است، با ارزش بیولوژیکی پایینی که دارد سبب آزاد شدن مقدار زیادی عنصر آهن به وسیله حیوانات و باعث آلودگی محیط زیست می‌شود (Feng et al., 2007; Ma et al., 2014; Rincker et al., 2005). مکمل گلایسینات آهن می تواند کیفیت داخلی تخم مرغ (وزن تخم مرغ، ارتفاع آلبومین و واحد هاو)، چرخه اسید تری کربوکسیلیک، انتقال آهن و تجمع آهن تخم مرغ را در مقایسه با مکمل سولفات آهن در جیره غذایی بهبود بخشد. به این مفهوم که سولفات آهن می تواند با غلظت کمتر گلایسینات آهن جایگزین شود که ممکن است اثرات بهتری بر کیفیت تخم مرغ و غنی سازی آهن داشته باشد (Xie et al., 2019a). غنی سازی آهن برای طیور مانند مرغ‌های تخم گذار بسیار مهم است، اما مطالعات انجام شده درمورد اثرات مکمل گلایسینات آهن بر مرغ‌های تخم گذار محدود است (Xie et al., 2019b). بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثرات گلایسینات آهن بر عملکرد تخم گذاری، کیفیت تخم مرغ و صفات تولیدی مرغان تخم گذار مسن (دوره دوم تولید) بود.

۲. مواد و روش‌ها

به منظور اجرای این پژوهش از ۳۰۰ قطعه مرغ تخم گذار سویه های‌لاین W-36 در دوره پس از تولک بری (سن ۱۰۵ هفتگی) مورد استفاده قرار گرفت. این طرح پژوهشی از ابتدای اردیبهشت ۱۴۰۰ به مدت ۴ ماه در مرکز تحقیقات دام و طیور دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. قبل از شروع آزمایش پرنده‌ها به مدت ۲۱ روز با خوراک بدون افزودن مکمل آهن، به منظور تخلیه ذخیره بدن، تغذیه شدند. سپس آزمایش اصلی در قالب سه دوره ۲۸ روزه انجام شد. شرایط نوری در طول دوره به صورت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت خاموشی اعمال شد. آب از طریق آبخوری نیپل و خوراک از طریق دانخوری دستی در اختیار مرغ‌ها قرار گرفت. درطول دوره آزمایش، مرغ‌ها به آب و خوراک دسترسی آزاد داشتند. آزمایش در قالب یک طرح بلوک کامل تصادفی با ۵ تیمار آزمایشی، ۵ تکرار و در هر تکرار، ۱۲ قطعه مرغ انجام شد. جیره‌های آزمایشی شامل پنج سطح مکمل گلایسینات آهن (۳۰, ۶۰, ۹۰, ۱۲۰ و ۱۵۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره) بود و طبق جداول استاندارد آنالیز شیمیایی مواد خوراکی و همچنین توصیه‌های کاتالوگ Hy-Line W-36 (2020) با نرم افزار UFFDA تنظیم شد. علاوه بر این جیره پایه (جیره بدون بدون افزودن مکمل گلایسینات آهن) نیز حاوی مقدار ۵۳/۱۹ میلی گرم در کیلوگرم آهن بود.

صفات عملکردی مرغ‌های تخم گذار تحت آزمایش شامل درصد تولید تخم، گرم تخم مرغ تولیدی روزانه، خوراک مصرفی و ضریب تبدیل غذایی، همچنین وزن مخصوص، شاخص شکل، شاخص زرده، واحد هاو، ضخامت پوسته و شاخص سفیده به عنوان شاخص‌های کیفی تخم مرغ اندازه گیری شد. داده‌های آزمایش به صورت طرح بلوک کاملا تصادفی آنالیز شدند. داده‌ها در نرم افزار Excel وارد و برای تجزیه و تحلیل آماده شدند. آنالیز آماری نتایج با استفاده از نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ انجام شد (SAS, 2003). تست نرمالیته داده‌ها با Proc Univariate Normal، آنالیز واریانس و رگرسیون با Proc GLM و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون توکی انجام شد.

۳. نتایج و بحث

نتایج مربوط به تاثیر مکمل سازی جیره مصرفی مرغان تخمگذار در دوره دوم تولید (سن ۱۱۷-۱۰۵ هفتگی) با گلایسینات آهن بر شاخص‌های عملکرد تولید تخم در جدول ۱ و کیفیت تخم مرغ تولیدی در جدول ۲ گزارش شده است. اثر افزایش سطح آهن جیره به فرم مکمل گلایسینات آهن در جیره مرغان تخم‌گذار باعث بهبود درصد تخمگذاری ($p<۰/۱۲۴$)، گرم تخم مرغ تولیدی ($p<۰/۰۲۶$) و ضریب تبدیل غذایی ($p<۰/۰۵۶$) به صورت خطی و معنی‌دار شد. پرندگان تغذیه شده با جیره حاوی ۹۰ میلی‌گرم آهن در کیلوگرم بالاترین درصد تخمگذاری و گرم تخم مرغ را داشتند همچنین پرندگان تغذیه شده با جیره حاوی ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم آهن کمترین مقدار ضریب تبدیل غذایی را نشان دادند. اختلاف بین میانگین شاخص‌های عملکرد تولیدی پرندگان تغذیه شده با جیره های حاوی ۳۰، ۶۰، ۹۰ میلی‌گرم آهن در کیلوگرم جیره نبود ولی افزایش سطح آهن به ۱۲۰ و ۱۵۰ میلی گرم در کیلو گرم جیره باعث کاهش معنی‌دار گرم تخم مرغ تولیدی و افزایش معنی دار ضریب تبدیل غذایی شد. اثر سطوح آهن جیره به فرم مکمل گلایسینات تاثیر معنی‌داری بر روی اغلب شاخص‌های سنجش کیفیت تخم مرغ تولیدی نداشت ($p>۰/۰۵$). با افزایش

سطح گلایسینات آهن در جیره شاخص رنگ زرده به صورت معادله درجه دو تغییر نشان داد به طوری که سطح ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم آهن شاخص رنگ زرده بالاتری نسبت به دیگر سطوح تیماری نشان داد ($p<۰/۰۵$). نتایج به دست آمده از این آزمایش با نتایج گزارش شده توسط Xie و همکاران (۲۰۱۹b) مطابقت دارد این محققین گزارش کردند مکمل سازی جیره مرغان تخمگذار با آهن به فرم گلایسینات باعث بهبود تخمگذاری و میانگین وزن تخم مرغ تولیدی می شود. تاثیر مثبت مکمل سازی جیره با آهن بر عملکرد تولید تخم می تواند به دلیل بهبود فعالیت سوپراکسید دسموتاز برای محافظت از فولیکول در برابر رادیکال های آزاد باشد. همچنین مکمل گلایسینات آهن می تواند کیفیت داخلی تخم مرغ (وزن تخم مرغ، ارتفاع آلبومین و واحد هاو)، چرخه اسید تری کربوکسیلیک، انتقال آهن و تجمع آهن تخم مرغ را بهبود بخشد (Xie et al., 2019 a).

جدول ۱: بررسی اثر مکمل گلایسینات آهن بر صفات عملکردی مرغان تخم گذار مسن

سطح افزودن آهن به جیره (mg/kg)	درصد تخم‌گذاری	گرم تخم مرغ تولیدی روزانه	میانگین وزن تخم مرغ (گرم)	مصرف خوراک روزانه (گرم)	ضریب تبدیل خوراک
۳۰	۷۶/۹۶	۴۹/۵۶۷^{a}	۶۴/۲۴۱	۹۲/۵۷۳	۱/۸۷۴^{ab}
۶۰	۷۵/۵۲	۴۹/۵۶۷^{a}	۶۴/۹۲۱	۹۱/۵۷۹	۱/۸۲۱^{b}
۹۰	۷۸/۰۷	۴۹/۸۹۹^{a}	۶۴/۱۷۶	۹۱/۲۱۵	۱/۸۵۲^{ab}
۱۲۰	۷۵/۵۱	۴۸/۵۲۱^{ab}	۶۳/۸۹۹	۹۲/۶۰۳	۱/۹۱۲^{a}
۱۵۰	۷۴/۵۹	۴۷/۵۷۹^{b}	۶۳/۷۴۹	۹۱/۳۱۴	۱/۹۱۴^{a}
SEM	۰/۹۰۸	۰/۶۴۲	۰/۴۰۰	۱/۰۰۴	۰/۰۲۵
p-Value	۰/۰۷۷	۰/۰۷۱	۰/۲۶۵	۰/۷۰۹	۰/۱۱۲
پاسخ به افزایش سطح جیره					
پاسخ خطی	۰/۱۲۴	۰/۰۲۶	۰/۱۷۹	۰/۷۳۳	۰/۰۵۶
پاسخ درجه دو	۰/۲۵۴	۰/۲۴۸	۰/۵۰۷	۰/۸۱۶	۰/۱۹۸

c...a میانگین‌های هر ستون برای هر اثر که حرف مشترک ندارند دارای اختلاف معنی‌دار هستند ($p<۰/۰۵$)

جدول ۲: بررسی اثر مکمل گلایسینات آهن بر صفات کیفی تخم مرغ مرغان تخم گذار مسن

سطح افزودن آهن به جیره (mg/kg)	وزن مخصوص	شاخص شکل	ضخامت پوسته	شاخص زرده	شاخص رنگ زرده	واحد هاو	شاخص سفیده
۳۰	۱/۰۸	۷۷/۷۲	۰/۳۷	۳۳/۴۸	۶^{a}	۹۲/۹۹	۶/۹۳
۶۰	۱/۰۸	۷۶/۸۷	۰/۳۸	۳۳/۰۵	۵/۴^{b}	۹۳/۲۵	۶/۸۶
۹۰	۱/۰۸	۷۷/۶۷	۰/۳۸	۳۲/۶۵	۵/۶a^{b}	۹۲/۹۹	۶/۶۲
۱۲۰	۱/۰۸	۷۷/۰۶	۰/۳۹	۳۲/۷۲	۵/۸^{ab}	۹۳/۵۲	۶/۹۹
۱۵۰	۱/۰۸	۷۷/۴۱	۰/۳۸	۳۲/۹۲	۵/۷^{ab}	۹۳/۹۰	۶/۹۹
SEM	۰/۰۰۱	۰/۳۴۶	۰/۰۰۴	۰/۴۵۴	۰/۱۰۷	۰/۵۲۳	۰/۱۳۲
p-Value	۰/۸۷۹	۰/۳۱۲	۰/۱۰۸	۰/۷۹۴	۰/۰۰۵	۰/۷۵۵	۰/۲۷۲
پاسخ به افزایش سطح جیره							

پاسخ خطی	۰/۷۹۶	۰/۶۵۰	۰/۴۸۴	۰/۳۴۷	۰/۸۸۳	۰/۲۲۴	۰/۵۹۹
پاسخ درجه دو	۰/۵۴۳	۰/۵۰۲	۰/۱۵۱	۰/۳۴۰	۰/۰۲۴	۰/۵۹۹	۰/۱۳۳

a...c میانگین‌های هر ستون برای هر اثر که حرف مشترک ندارند دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

۴. نتیجه گیری

به طور کل نتایج این آزمایش نشان داد که مکمل نمودن جیره مرغان تخمگذار در دوره دوم تولید با گلایسینات آهن موجب بهبود عملکرد تولیدی پرنده می شود ولی تاثیری بر صفات کیفیت تخم مرغ ندارد به طوری که افزودن ۶۰ میلی‌گرم آهن به فرم گلایسینات به منظور تامین احتیاجات پرنده کفایت می‌کند.

منابع

۷. علیزاده، ق ر. صفامهر، ع. نوبخت، ع. ۱۳۸۶. بررسی تاثیر سه نوع مکمل معدنی بر عملکرد مرغ‌های تخم گذار، مجله دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه.

2- Abbasi M., Zhaghari M., Ganjkhanlo M. and Khalaji S. 2015. Is dietary iron requirement of broiler breeder hens at the late stage of production cycle influenced by phytase supplementation?. Jornal of Applied Animal Research, 43(2):166-176.

3- Abbaspour N., Hurrell R. and Kelishadi R. 2014. Review on iron and its importance for human health. Journal of Research in Medical Sciences, 19(2): 164-174.

4- BASF Glycinates Research. 2013. (The chemical company) Glycinate Animal Nutrition.

5- Creech BL., Spears JW., Flowers WL., Hill GM., Lloyd KE., Armstrong TA. and Engle TE. 2004. Effect of dietary trace mineral concentration and source (inorganic vs. chelated) on performance, mineral status, and fecal mineral excretion in pigs from weaning through finishing. Journal of Animal Science, 82(7):2140-2147.

6- Feng J., Ma WQ., Xu ZR., Wang YZ. And Liu JX. 2007. Effects of iron glycine chelate on growth, haematological and immunological characteristics in weanling pigs. Animal Feed Science and Technology, 134(3):261-272.

7- Hy-Line. 2020. Hy-Line W-36 Commercial Management Guide: Hy- Line In.

8- Kegley EB., Spears JW., Flowers WL. And Schoenherr WD. 2002. Iron methionine as a source of iron for the neonatal pig 1. Nutrition Research, 22(10):1209-1217.

9- Kulkarni RC., Shrivastava HP., Mandal AB., Deo C., Deshpande KY., Singh R. and Bhanja SK. 2011. Assessment of growth performance, immune response and mineral retention in colour broilers as influenced by dietary iron. Animal Feed Science and Technology, 11(1):81-90.

10- Layrisse M., Garcíacasal MN., Solano L., Barón, MA., Arguello F., Llovera D., Ramírez J., Leets I., Tropper E. 2000. Iron bioavailability in humans from breakfasts enriched with iron bis-glycine chelate, phytates and polyphenols. Journal of Nutrition, 130(9):2195-2199.

11- Leeson S., Summers JD. 2009. Commercial poultry nutrition, Nottingham University Press, Rab. ll 5, 1430 AH-Science-416.

12- Ma XY., Liu SB., Lu L., Li SF., Xie JJ., Zhang LY., Zhang JH., Luo XG. 2014. Relative bioavailability of iron proteinate for broilers fed a casein-dextrose diet. Poultry Science, 93(3):556-563.

13- Nicholls DG., Budd SL. 2000. Mitochondria and neuronal survival. Physiological Reviews, 80(1):315-360.

14- Nutrient Requirements of Poultry: Ninth Revised Edition .1994.Subcommittee on Poultry Nutrition, National Research Council.

15- Rincker MJ., Clarke SL., Eisenstein RS., Link JE. And Hill GM. 2005. Effects of iron supplementation on binding activity of iron regulatory proteins and the subsequent effect on growth performance and indices of hematological and mineral status of young pigs. Journal of Animal Science, 83(9):2137–2145.

16- SAS. 2003. User's guide: Statistics (Version 9.1):S.A.S Institute Cary, NC.

17- Swiatkiewicz S., Koreleski J. 2008. The effect of zinc and manganese source in the diet for laying hens on eggshell and bones quality. Veterinarni Medicina, 53(10):555-563.
18- Von Drygalski A., Adamson JW. 2013. Iron metabolism in man. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 37(5):599-606.
19- Xie C., Elwan HAM., Elnesr SS., Dong XY. and Zou XT. 2019a. Effect of iron glycine chelate supplementation on egg quality and egg iron enrichment in laying hens. Poultry Science 98:7101-7109.
20- Xie Ch., Elwan HAM., Elsner ShS., Dong X., Feng J., Xiao-tingZou X-t. 2019b. Effect of iron glycin chelate on laying performance, antioxidants activities, serum biochemical indies iron concentration and transferrin mRNA expression in laying hens. Animal Physiolojy and Animal Nutrition, 103, 2/547-554.
21- Zödl B., Zeiner M., Marktl W., Steffen I. and Ekmekcioglu C. 2003. Pharmacological levels of copper exert toxic effects in caco-2 cells. Biological Trace Element Research, 96(1-3):143-152.

Effect of zinc glycinate supplementation on performance of Hy-Line W36 laying hens in the second production cycle

Ali Alizade Dehnavi[1]; Heydar Zarghi[2*]; Reza Majid Zadeh Heravi[4]

1-Master student, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2-Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
3-Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

Corresponding Author Email address: h.zarghi@um.ac.ir

Abstract

This experiment was conducted to evaluate the effect of different levels of zinc glycinate on the production performance of laying hens in the second period of production cycle. A total of 360, 105-week-old Hy-Line W36 laying hens in the second cycle of egg production were use. The experiment was conducted in a randomized complete block design with six treatment including the addition of zero, 30, 60, 90, 120 and 150 mg/kg zinc (Zn) in the glycinate chelate form to corn-soybean meal based diet with five replications and 12 birds per replicate. The production performance including egg production (EP), average egg weight (EW), egg mass (EM), feed intake (FI), and feed conversion ratio (FCR) were evaluated. With increasing dietary Zn level FI and EW changed by a quadratic trends. Birds fed diets supplemented with 60 mg/kg Zn had the highest EW and the lowest FCR. Increasing the level of Zn supplementation to 150 mg/kg significantly reduced the EP and EM ($P < 0.01$). In conclude, the results of current experiment showed that supplementation 60 mg/kg of Zn in the glycinate chelate form improves egg production performance in the second production period.

Keywords: Amino acid chelate, laying hens, performance, second period of production

اثر مکمل گلایسینات روی بر عملکرد تولید مرغان تخم‌گذار های‌لاین W36 در دوره دوم تولید

علی علیزاده دهنوی[۱]، حیدر زرقی[۲*]، رضا مجیدزاده هروی[۴]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲-دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳-استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

*ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: h.zarghi@um.ac.ir

چکیده

این آزمایش باهدف ارزیابی اثر سطوح مختلف گلایسینات روی بر عملکرد تولید مرغان تخم‌گذار با استفاده از تعداد ۳۶۰ قطعه مرغ تخم‌گذار سویه های‌لاین W-36 در سیکل دوم تخم‌گذاری (سن ۱۱۷-۱۰۵ هفتگی) انجام شد. آزمایش در قالب یک طرح بلوک کامل تصادفی شامل افزودن سطوح صفر، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی به فرم کیلات گلایسینات به جیره بر پایه ذرت-کنجاله سویا با پنج تکرار و ۱۲ قطعه پرنده در هر تکرار انجام شد. عملکرد تولیدی مرغان تخم‌گذار شامل درصد تخم‌گذاری، میانگین وزن تخم‌مرغ، گرم تخم‌مرغ تولیدی روزانه، مصرف خوراک و ضریب تبدیل غذایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. با افزایش سطح روی جیره، میزان مصرف خوراک روزانه و میانگین وزن تخم تولیدی به‌صورت معادله درجه‌دو تغییر یافت. پرندگان تغذیه‌شده با جیره حاوی ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی بالاترین میانگین وزن تخم و پایین‌ترین ضریب تبدیل غذایی را داشتند. افزودن سطح روی جیره به ۱۵۰ میلی گرم در کیلو گرم باعث کاهش معنی‌دار تولید تخم (درصد تخم‌گذار و گرم تخم‌مرغ تولیدی روزانه) شد ($P<0.01$). به‌طورکلی نتایج این آزمایش نشان داد، افزودن ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره روی به فرم کیلات گلاسینات باعث بهبود عملکرد تولید تخم در دوره دوم تخم‌گذاری می‌شود.

کلمات کلیدی: دوره دوم تولید، کیلات اسیدآمینه، عملکرد، مرغان تخم‌گذار

1.مقدمه

طیور برای زنده ماندن، تولیدمثل، تولید اقتصادی گوشت و تخم‌مرغ، علاوه بر کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، چربی‌ها، به مواد مغذی دیگری نیز که به مقدار کم به جیره افزوده می‌شوند، نیاز دارند که شامل ویتامین‌ها و مواد معدنی است (Yan et al. 2001). مواد معدنی کمیاب مانند روی، مس، آهن و منگنز برای طیف گسترده‌ای از فرآیندهای فیزیولوژیکی در همه حیوانات ضروری است (Underwood and Suttle 1999). مواد معدنی کمیاب در متابولیسم حیوانات به‌عنوان عوامل کاتالیزوری در واکنش‌های متابولیک نقش ایفا می‌کند (Aksu et al. 2012). عناصر کم‌مصرف به‌طور عمده در شکل نمک‌های معدنی به‌صورت اکسید، سولفات، کربنات و کمپلکس با اسیدآمینه به جیره غذایی افزوده می‌شوند. با توجه به‌این‌که زیست‌فراهمی فرم معدنی عناصر کمتر از فرم آلی آن‌هاست،

سطح بیشتری از عناصر به جیره افزوده شود تا نیاز طیور تامین شود؛ افزودن سطوح بالای یک عنصر ممکن است اثر سوئی بر جذب و سوخت‌وساز سایر عناصر بگذارد و زیست فراهمی آنهار پایین بیاورد (Batal et al. 2001).

از سال ۱۹۵۰ تاکنون منابع مختلفی از عناصر ریزمغذی معرفی‌شده است. در منابع ابتدایی، عنصر فلزی با پیوند غیر کربنی به نمک اسید و یا سولفات متصل بود. خلوص پایین و وجود مواد ضد مغذی در این ترکیبات ازجمله مشخصه آن‌ها است (Batal et al. 2001). هنگامی‌که مواد معدنی کم‌نیاز به‌صورت غیر عالی مصرف می‌شوند، به دلیل pH پایین در بخش فوقانی دستگاه گوارش یونیزه شد و طی فرایند هضم و جذب با سایر مواد معدنی و همچنین دیگر اجزای خوراک برهمکنش داشته که سبب کاهش جذب آن‌ها در روده کوچک می‌شود (Yan and Waldroup 2006). منابع سولفات عناصر ریزمغذی، به دلیل حلالیت زیاد، به یون‌های فلزی فعال اجازه می‌دهند که سبب افزایش رادیکال‌های آزاد شود و درنتیجه منجر به اکسیداسیون ویتامین‌ها و چربی‌ها می‌شوند. همچنین مواد معدنی به دلیل مکانیسم‌های جذب یکسان، به‌شدت تأثیر اثرات آنتاگونیستی بر هم گذاشته و زیاد بود یک ماده معدنی باعث کاهش جذب سایر مواد معدنی و تشدید کمبود آنها می‌شود. یکی از دلایل قابلیت دسترسی منابع آلی عناصر معدنی را می‌توان ثبات آن‌ها در بخش فوقانی دستگاه گوارش دانست که سبب رسیدن آن‌ها به روده کوچک و جذب بهتر می‌شود (Ashmead, 1993). گلیسین که اسیدآمینه‌ای با کمترین وزن مولکولی است، به پایداری ترکیبات کیلاته کمک می‌کند و جذب آن‌ها را در روده افزایش می‌دهد (Kulkarni et al. 2011).

روی، ازجمله مواد معدنی کم‌نیاز است که می‌تواند در بهبود عملکرد طیور نقش مؤثری داشته باشد. روی در ساختمان بسیاری از آنزیم‌ها شرکت داشته و یا به‌عنوان کوفاکتور بسیاری از آنزیم‌ها ایفاء نقش می‌کند کمبود آن باعث کاهش ایمنی سلولی می‌شود (Virden et al. 2004). روی اثر مثبتی بر تولید تخم‌مرغ در مرغ‌های تخم‌گذار دارد و سبب بهبود اندازه، کیفیت پوسته و تولید تخم‌مرغ می‌شود (Park et al. 2004). البته در جیره‌های عملی بر پایه ذرت و سویا سطح مطلوب روی جیره به‌منظور بروز بهینه شاخص‌های عملکردی۸۵-۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم گزارش‌شده است (Hy-Line 2020). تاکنون تحقیقات زیادی در مورد منابع آلی و غیر آلی عناصر کم‌نیاز انجام‌گرفته است که نتایج به‌دست‌آمده مؤید مزایای به‌کارگیری منابع آلی نسبت به منابع غیر آلی است، بااین‌حال هزینه منابع آلی بالاتر است و برای اثبات برتری آن‌ها نسبت به منابع مرسوم عناصر کم‌نیاز، به آزمایش‌های متعددی نیاز است. لذا آزمایش حاضر به منظور بررسی اثر سطوح مختلف تامین روی جیره به فرم گلاسینات روی بر عملکرد تولید تخم در مرغان تخم‌گذار مسن (دوره دوم تولید) انجام شد.

2.مواد و روش‌ها

تعداد ۳۶۰ قطعه مرغ تخم‌گذار های‌لاین W-36 با سن ۱۰۵ هفتگی، مرحله پیک دوره دوم تولید (پس از تولک‌بری) انتخاب شد. قبل از شروع آزمایش به مدت‌زمان ۲۱ روز پرندگان با جیره فاقد مکمل روی به منظور تخلیه ذخایر بدنی تغذیه شدند. آزمایش به‌صورت یک طرح بلوک کامل تصادفی با ۶ تیمار، ۵ تکرار و ۱۲ قطعه مرغ در هر تکرار اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل افزودن سطوح صفر، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی به فرم کیلات عالی (گلاسینات روی) بود. جیره‌های آزمایشی بر مبنای جداول ترکیب مواد مغذی اقلام خوراکی و تامین احتیاجات مرغان تخمگذار در دوره دوم تولید طبق توصیه‌های دفترچه راهنمای مرغ تخمگذار های لاین W36 با نرم‌افزار UFFDA تنظیم شد. طول دوره آزمایش ۸۴ روزه بود. در طول دوره آزمایش پرندگان دسترسی آزاد به آب و خوراک داشتند.

صفات عملکردی شامل درصد تولید تخم، وزن تخم‌مرغ، گرم تخم‌مرغ تولیدی روزانه، خوراک مصرفی و ضریب تبدیل غذایی اندازه‌گیری شد. داده‌های به‌دست‌آمده وارد نرم‌افزار Excel و برای تجزیه‌وتحلیل آماری آماده شدند. نتایج به دست آمده در قالب

طرح بلوک کامل تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS ویرایش ۹/۱ با رویه univariate normal مورد آزمون نرمال و سپس با رویه GLM آنالیز شدند. میانگین ها با آزمون توکی مقایسه شدند.

3.نتایج و بحث

نتایج مربوط به اثر افزودن سطوح مختلف روی به فرم کیلات گلاسینات بر شاخص‌های عملکرد تولید تخم مرغان تخمگذار های‌لاین W36 در دوره دوم تخمگذاری (۱۱۷-۱۰۵ هفتگی) در جدول ۱ گزارش شده است. با افزایش سطح روی جیره، میزان مصرف خوراک روزانه و میانگین وزن تخم‌مرغ تولیدی به‌صورت معادله درجه‌دو تغییر نشان داد. به‌طوری‌که پرندگان تغذیه‌شده با جیره مکمل شده به ترتیب با ۶۰ و ۹۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی بیشترین وزن تخم‌مرغ و میزان مصرف خوراک روزانه را داشتند و با افزایش سطح روی جیره به سطوح ۱۲۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل سازی با کیلات عالی میزان مصرف خوراک و وزن تخم مرغ به طور معنی داری کاهش یافت. نتایج به دست آمده از این آزمایش با گزارش سایر محققین مطابقت دارد (Huang et al. 2007 and Hassan Khan et al. 2001). این محققین گزارش کردند مصرف خوراک در مرغ‌های دریافت‌کننده سطوح بالاتر روی آلی، به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمارهای دیگر پایین‌تر بود. همچنین افزایش سطح مکمل گلاسینات روی جیره تا سطح ۱۲۰ میلی‌گرم روی در کیلوگرم تاثیر معنی داری روی درصد تخمگذاری و گرم تخم‌مرغ تولیدی روزانه مرغان تخمگذار نداشت، ولی با افزایش سطح مکمل گلاسینات روی تا سطح تامین ۱۵۰ میلی‌گرم روی در کیلوگرم جیره باعث کاهش معنی‌دار درصد تخم‌گذار ($P<0.01$) و گرم تخم‌مرغ تولیدی روزانه ($P<0.01$) شد. نتایج به دست آمده از این آزمایش با گزارش مطابقت (Kaya et al. 2001 and Tabatabaie et al. 2007) دارد. این محققین گزارش کردند افزایش سطح روی، اثر معنی‌داری در تولید تخم‌مرغ در مرغ‌های تخم‌گذار مشاهده نداشت. برخلاف نتایج آزمایش حاضر و گزارشات فوق محققان با استفاده از مکمل نمودن جیره توسط روی اثر مثبتی بر تولید تخم‌مرغ در مرغ‌های تخم‌گذار مشاهده نمودند (Paulicks and M. Kirchgessner, 1994 and Khajaren et al. 2006).

جدول ۱: اثر سطوح گلایسینات روی بر عملکرد تولید مرغان تخم‌گذار در دوره دوم تخم‌گذاری (۱۱۷-۱۰۵ هفتگی)

سطح افزودن روی به جیره (mg/kg)	درصد تخم‌گذاری	گرم تخم‌مرغ تولیدی روزانه	میانگین وزن تخم‌مرغ (گرم)	مصرف خوراک روزانه (گرم)	ضریب تبدیل خوراک
۰	۸۲/۹۳^{a}	۵۳/۶۵^{a}	۶۴/۷۰^{c}	۱۰۳/۹۶^{bc}	۱/۹۴^{bc}
۳۰	۸۰/۸۹^{b}	۵۳/۴۱^{a}	۶۶/۰۳^{ab}	۱۰۵/۸۶^{ab}	۱/۹۸^{abc}
۶۰	۸۰/۱^{b}	۵۳/۳^{a}	۶۶/۵۳^{a}	۱۰۲/۱۴^{c}	۱/۹۲^{c}
۹۰	۷۹/۴۷^{b}	۵۲/۷۲^{a}	۶۶/۳۳^{ab}	۱۰۷/۸۳^{a}	۲/۰۵^{a}
۱۲۰	۸۰/۴۳^{b}	۵۲/۸^{a}	۶۵/۶۶^{b}	۱۰۶/۱۹^{ab}	۲/۰۱^{ab}
۱۵۰	۷۷/۲۳^{c}	۵۰/۶۴^{b}	۶۵/۵۹^{b}	۱۰۱/۴۸^{c}	۲/۰۱^{ab}
SEM	۰/۷۲	۰/۵۱۱	۰/۲۴۷	۰/۹۷۹	۰/۲۳۷
p-Value	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲
پاسخ به افزایش سطح جیره					
پاسخ خطی	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۵۵۸	۰/۰۲۵

پاسخ درجه‌دو	۰/۸۷۲	۰/۰۷۹	۰/۰۰۱	۰/۰۲۲	۰/۶۱۳

[a, ..., c] اختلاف میانگین های هر ستون با حروف غیر مشترک معنی دار است (p<۰/۰۵).

پرندگان تغذیه‌شده با جیره حاوی ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی بالاترین میانگین وزن تخم را داشتند. نتایج به دست آمده با گزارش سایر محققین مطابقت دارد (Durmus et al. 2004, Hazim and Mahmood 2011). نقش روی در وزن تخم‌مرغ را می‌توان از طریق نقش آن در رسوب آلبومین در مگنوم بیان کرد که از طریق افزایش سفیده باعث افزایش وزن تخم‌مرغ می‌گردد (Swiatkiewicz and Koreleski, 2008). بر خلاف نتایج این آزمایش و محققین فوق، Kaya et al. 2001، Kidd et al. 2007 و Tabatabaie et al. 2007 گزارش کردند افزودن مکمل روی تاثیر معنی‌داری بر وزن تخم‌مرغ نداشت. در این آزمایش پرندگان تغذیه‌شده با جیره مکمل شده با ۶۰ میلی‌گرم روی در کیلوگرم پایین‌ترین ضریب تبدیل غذایی را داشتند. نتایج به دست آمده با گزارشDurmus et al. 2004، Hegazy and Adachi, 2000 مطابقت دارد این محققین گزارش کردند با افزودن مکمل روی به جیره ضریب تبدیل خوراک بهبود یافت. اگر چه Kidd et al. 1992 و Bartlett and Smith, 2003 گزارش کردند افزودن مکمل روی به جیره بر راندمان تبدیل خوراک اثر معنی‌داری ندارد.

4.نتیجه‌گیری

به‌طورکلی نتایج این آزمایش نشـان داد، افزودن ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره روی به فرم کیلات گلاسـینات باعث بهبود عملکرد تولید تخم در دوره دوم تخم‌گذاری می‌شود.

منابع

7- Al-Daraji HJ, Amen MH. 2011. Effect of dietary zinc on certain blood traits of broiler breeder chickens. International Journal of Poultry Science. 10(10):807-813.
8- Ashmead H. 1993. Comparative intestinal absorption and subsequent metabolism of metal amino acid chelates and inorganic metal salts. The roles of amino acid chelates in animal nutrition. 319.
9- Bartlett J, Smith M. 2003. Effects of different levels of zinc on the performance and immunocompetence of broilers under heat stress. Poultry Science. 82(10):1580-1588.
10- Batal A, Parr T, Baker D. 2001. Zinc bioavailability in tetrabasic zinc chloride and the dietary zinc requirement of young chicks fed a soy concentrate diet. Poultry Science. 80(1):87-90.
11- Kulkarni R, Shrivastava H, Mandal A, Deo C, Deshpande K, Singh R, Bhanja S. 2011. 2011. Assessment of growth performance, immune response and mineral retention in colour broilers as influenced by dietary iron. Animal Nutrition and Feed Technology. 11(1):81-90.
12- Durmuş Is, Ataşoğlu Cz, Mizrak C, Ertaş S, Kaya M. 2004. Effect of increasing zinc concentration in the diets of brown parent stock layers on various production and hatchability traits. Archives Animal Breeding. 47(5):483-489.
13- Guide SUs. 2012. Statistics, Version 9.1. SAS Inst. Inc Cary, NC, USA.
14- Hassan Khan S, Rehman A, Ansari J. 2001. Effects of dietary mineral on post molt performance of laying hens.Veterinary World. 4:389-395.
15- Hegazy S, Adachi Y. 2000. Comparison of the effects of dietary selenium, zinc, and selenium and zinc supplementation on growth and immune response between chick groups that were inoculated with Salmonella and aflatoxin or Salmonella. Poultry Science. 79(3):331-335.
16- Huang Y, Lu L, Luo X, Liu B. 2007. An optimal dietary zinc level of broiler chicks fed a corn-soybean meal diet. Poultry Science. 86(12):2582-2589.

17- Hy-Line. 2020. Hy-Line W-36 Commercial Management Guide: Hy-Line In.
18- Kaya Ş, UMUCALILAR HD, Haliloğlu S, İpek H. 2001. Effect of dietary vitamin A and zinc on egg yield and some blood parameters of laying hens. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 25(5):763-769.
19- Khajaren J, Khajaren S, Rapp C, Ward T, Johnson J, Falker T. 2006. Effects of zinc and manganese amino acid complexes (Availa-Z/M) on layer production and egg quality. Poultry Science. 55:322-329.
20- Kidd M, Anthony N, Lee S. 1992. Progeny performance when dams and chicks are fed supplemental zinc. Poultry Science. 71(7):1201-1206.
21- Park S, Birkhold S, Kubena L, Nisbet D, Ricke S. 2004. Effects of high zinc diets using zinc propionate on molt induction, organs, and postmolt egg production and quality in laying hens. Poultry Science. 83(1):24-33.
22- Paulicks B, Kirchgessner M. 1994. Influence of supply on feed intake and performance of layers. Archiv für Geflügelkunde. 58:186-191.
23- Saripinar-Aksu D, Aksu T, Önel SE. 2012. Does inclusion at low levels of organically complexed minerals versus inorganic forms create a weakness in performance or antioxidant defense system in broiler diets? International Journal of Poultry Science. 11(10):666.
24- Swiatkiewicz S, Koreleski J. 2008. The effect of zinc and manganese source in the diet for laying hens on eggshell and bones quality. Veterinarni Medicina. 53(10):555.
25- Tabatabaie M, Aliarabi H, Saki A, Ahmadi A, Siyar S. 2007. Effect of different sources and levels of zinc on egg quality and laying hen performance. Pakistan Journal of Biological Sciences 10(19):3476-3478.
26- Underwood EJ. 1999. The mineral nutrition of livestock. Cabi.
27- Virden W, Yeatman J, Barber S, Willeford K, Ward T, Fakler T, Wideman Jr R, Kidd M. 2004. Immune system and cardiac functions of progeny chicks from dams fed diets differing in zinc and manganese level and source. Poultry Science. 83(3):344-351.
28- Yan F, Kersey J, Waldroup P. 2001. Phosphorus requirements of broiler chicks three to six weeks of age as influenced by phytase supplementation. Poultry Science. 80(4):455-459.
29- Yan F, Waldroup P. 2006. Evaluation of Mintrex® manganese as a source of manganese for young broilers. International Journal of Poultry Science. 5(8):708-713.

The effect of probiotics in shrimp farming

Mohammad Hossein Khanjani[1], Fatemeh Azimian[2]

۱-Assistant Professor, Department of Fisheries Sciences and Engineering, Faculty of Natural Resources, University of Jiroft, Jiroft, Kerman, Iran

۲-BS student in Fisheries Sciences and Engineering, Faculty of Natural Resources, University of Jiroft, Jiroft, Kerman, Iran

**Corresponding Author Email address: m.h.khanjani@ujiroft.ac.ir*

Abstract

In the world's food production, aquaculture is one of the most important sectors, and shrimp farming has a large role in this sector. Increased shrimp production has been linked to the spread of diseases and environmental contamination. These problems are prevented and reduced by using probiotics in shrimp farming systems. The genus *Bacillus* and *Pseudomonas* are common bacterial genera used in the shrimp farming industry. Probiotics are more effectively transported through dietary supplements than they are directly applied in the cultivation systems. A combination of probiotics in shrimp aquaculture is highly effective. In addition to increasing the quality of rearing water and reducing pathogens, these compounds also contribute to sustainable shrimp aquaculture. The effects of probiotics on shrimp's physiological and immune responses are also positive. The use of probiotics should be done in moderation, as excessive or prolonged use can cause the immune system to be suppressed. In studies, probiotics were shown to be highly effective at enhancing shrimp growth. A concise overview of probiotics in shrimp aquaculture is presented in this study.

Keywords: Aquaculture, Shrimp, Probiotics

تاثیر پروبیوتیک ها در پرورش میگو

محمدحسین خانجانی[1]، فاطمه عظیمیان[2]

۶- استادیار گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، کرمان، ایران
۷- دانشجوی کارشناسی علوم و مهندسی شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه جیرفت

m.h.khanjani@ujiroft.ac.ir

چکیده

آبزی پروری یکی از بخش های مهم تولید غذا در جهان می باشد و صنعت پرورش میگو نقش مهمی در این زمینه دارد. افزایش تولیدات میگو با گسترش بیماری ها و اثرات زیست محیطی همراه خواهد بود. برای جلوگیری و کاهش این مشکلات از پروبیوتیک ها در سیستم های پرورش میگو استفاده می شود. جنس های باسیلوس و سودوموناس از جنس های باکتری رایج استفاده شده در صنعت پرورش میگو است. مکمل های غذایی در انتقال پروبیوتیک ها نسبت به بکارگیری مستقیم در سیستم پرورش موثرتر هستند. استفاده از پروبیوتیک ها بصورت ترکیبی در آبزی پروری میگو کارایی بالایی دارد، این ترکیبات کیفیت آب پرورش را بهبود، و عوامل بیماری زا را کاهش می دهند و در عین حال به آبزی پروری پایدار میگو کمک می کنند. پروبیوتیک ها همچنین بر پاسخ های فیزیولوژیکی و ایمنی میگو تاثیر مثبت دارند. استفاده از پروبیوتیک ها بایستی در حد اعتدال صورت گیرد و مصرف بیش از حد یا مصرف طولانی پروبیوتیک ها می تواند منجر به سرکوب سیستم ایمنی گردد. با توجه به نتایج بدست آمده از مطالعات، پروبیوتیک ها توانایی بالایی در بهبود عملکرد رشد میگو دارند. در این مطالعه اطلاعاتی فشرده برای تحقیق و توسعه آینده پروبیوتیک ها در آبزی پروری میگو ارائه شده است.

واژگان کلیدی: آبزی پروری، میگو، پروبیوتیک

مقدمه

با افزایش روز افزون جمعیت جهان آبزی پروری نقش حیاتی در تامین فرصت های معیشتی و امنیت غذایی پایدار دارد (Dawood et al. 2016; Wang et al. 2018). بنابراین استفاده از آبزی پروری متراکم برای افزایش تولید، اثرات زیست محیطی به دنبال خواهد داشد (Dossou et al. 2018). افزایش تراکم ذخیره سازی منجر به کاهش کیفیت آب، شیوع و گسترش بیماری ها و افزایش پساب آبزی پروری می گردد (Aliko et al, 2018). بکارگیری فن آوری ها و ترکیباتی که بتواند این مشکل را در آبزی پروری متراکم میگو برطرف بکندریال ضروری است. امروزه فن آوری های جدیدی که با تعویض آب محدود فعالیت می کنند و به سیستم های تعویض

آب محدود (فن آوری توده زیستی) معروف هستند، رایج شده است (Khanjani and Sharifinia, 2020). همچنین ترکیباتی از قبیل پروبیوتیک ها، پربیوتیک ها و فیتوبیوتیک ها در آبزی پروری میگو بکارگیری شده است. استفاده از پروبیوتیک ها جهت حفظ سلامت محیط زیست برای آبزی پرورش یافته و افزایش عملکرد تولید بدون تاثیر منفی بر مصرف کنندگان حائز اهمیت است (Dawood et al. 2017). مطالعات بر استفاده از پروبیوتیک ها برای دستیابی به اهداف آبزی پروری پایدار سازگار با محیط زیست افزایش یافته است (Dawood et al., 2018). پروبیوتیک ها به عنوان مکمل های غذایی میکروبی زنده که سلامت انسان و حیوان را بهبود می دهند، تعریف شده است (Gatesoupe 1999). استفاده از پروبیوتیک ها در تغذیه میگو بطور موثری عملکرد رشد، کارایی خوراک و شرایط فیزیولوژیکی را بهبود می دهد (Elsabagh et al. 2018; Zaineldin et al. 2018). پروبیوتیک ها به میگو در شرایط استرس از جمله دستکاری، رقم بندی، حمل و نقل، واکسیناسیون و درمان بیماری ها کمک می کنند (Bricknell and Dalmo, 2005; Marques et al., 2006). پروبیوتیک ها اجزای مختلف سیستم ایمنی سلولی و هومورال را تحریک می کنند. برای مثال بروبیوتیک باسیلوس S11با فعال کردن دفاع ایمنی سلولی و هومورال در میگوهای ببر سیاه (Penaeus monodon) محافظت در مقابل بیماری را انجام می دهند. پروبیوتیک ها بر پاسخ های ایمنی غیراختصاصی مانند فعالیت سلول های فاگوسیتی، فعالیت سلول های کشنده طبیعی، سطوح لیزوزیم، سطوح مکمل و سطح کل ایمونوگلوبولین تاثیر می گذارند (Witteveldt et al., 2004). در مطالعه حاضر به اهمیت پروبیوتیک ها در آبزی پروری میگو و اثراتی که برعملکرد رشد، فعالیت های ایمنی و گوارشی می گذارد، پرداخته می شود.

۲. مواد و روش ها

آبزی پروری به عنوان یکی از سریع ترین و امیدوار کننده ترین منبع برای تامین پروتئین حیوانی و امنیت غذایی برای جمعیت جهان می باشد (De et al., 2014). افزایش تراکم پرورش جهت افزایش تولید باعث ایجاد شرایط استرس زا برای میگو و محیط زیست شده است (Hossain et al., 2016). شیوع بیماری به عنوان یکی از خطرات صنعت آبزی پروری می باشد. برای کنترل بیماری در صنعت آبزی پروری میگو، انواع داروهای شیمیایی و آنتی بیوتیک ها استفاده شده است (Adel et al., 2016). با این حال، استفاده از آنتی بیوتیک ها می توانند تأثیر منفی بر میگو و محیط زیست داشته باشند. بنابراین، برای گسترش صنعت آبزی پروری، یافتن جایگزین های ایمن و موثر برای آنتی بیوتیک ها ضروری است (Yan et al., 2017). پروبیوتیک ها یکی از مهم ترین جایگزین ها می باشد که منجر به بهبود عملکرد رشد، کارایی بهتر خوراک و بهبود وضعیت سلامت میگو می شود، و اثرات زیست محیطی پرورش را نیز کاهش می دهد که از این طریق به آبزی پروری پایدار کمک می کند (Dawood et al., 2016). پروبیوتیک ها بر میکروبیوتای روده میگو تاثیر می گذارند و باکتری های مفید را افزایش می دهند که منجر به بهبود هضم و جذب غذا می شوند (Burr et al., 2007). پروبیوتیک‌ها می‌توانند به عنوان یک داروی غذایی میکروبی عمل کنند که سلامت میگو را بهبود می دهند. این عمل را از طریق بهبود ایمنی، فیزیولوژیکی، فعالیت های تغذیه ای و همچنین تعادل میکروبی در لوله گوارش انجام می دهند. پروبیوتیک های که در صنعت آبزی پروری استفاده شده اند بیشتر شامل گونه های باسیلوس، لاکتوباسیلوس، میکروکوکوس، اینتروکوکوس، لاکتوکوکوس، استرپتوکوکوس و کارنوباکتریوم هستند.

۳. نتایج وبحث

جیره های غذایی میگو که با پروبیوتیک مکمل شده باشند کارایی هضم و جذب بالایی دارند، بدلیل تولید آنزیم های گوارشی (آمیلاز، پروتئاز و لیپاز) و مواد مغذی (ویتامین ها، اسیدهای چرب، اسیدهای آمینه) که به گوارش کمک می کند. افزودن پروبیوتیک به جیره غذایی در نهایت منجر به بهبود کارایی خوراک، هضم و جذب بهتر و عملکرد بهتر رشد میگو می شود (Ray et al., 2012). مطالعات مختلفی در رابطه با مصرف پروبیوتیک ها در آبزی پروری میگو و اثرات آن بر تغییرات آنزیم های گوارشی صورت گرفته است که در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱: فعالیت آنزیم های گوارشی میگو در حضور مکمل های پروبیوتیک

گونه	پروبیوتیک	آنزیم ها	منبع
Penaeus vannamei	Bacillus sp.	پروتئاز و آمیلاز	Wang (2007)
	Bacillus coagulans SC8168	پروتئاز، آمیلاز و لیپاز	Zhou et al. (2009)
	Lactobacillus plantarum (STBL1), Saccharomyces cerevisiae (STBS1), Bacillus safensis	پروتئاز، آمیلاز و لیپاز	Zhang et al. (2021)
	Bacillus subtilis	پروتئاز و آمیلاز	Zokaeifar et al. (2012)
	Pediococcus pentosaceus	پروتئاز، آمیلاز و لیپاز	Adel et al. (2017)
	Bacillus subtilis E20	پروتئاز	Liu et al. (2009)
	Lactobacillus plantarum	آمیلاز، لیپاز و پپسین	Zheng et al. (2018)
	Bacillus subtilis IS02	پروتئاز، آمیلاز و لیپاز	Mirbakhsh et al. (2021)
Penaeus indicus	Marinilactibacillus piezotolerans, Novosphingobium sp.	تریپسین و کیموتریپسین	Panigrahi et al. (2021)

Macrobrachium rosenbergii	Clostridium butyricum	پروتئاز و آمیلاز	Sumonet al. (2018)

باکتری‌های پروبیوتیک مفید ابزاری حیاتی برای بهبود عملکرد رشد هستند، که به عنوان منبعی از مواد مغذی، ویتامین ها و فعال کننده دستگاه گوارش (آنزیم هایی که تأثیر مثبتی بر مصرف خوراک دارند) عمل می کند (Aragona et al., 2017; Nath et al., 2018). پروبیوتیک ها کارایی خوراک میگو را با تحریک آنزیم های گوارشی و حفظ تعادل میکروب های روده تقویت می کنند، جذب و استفاده از مواد مغذی را بهبود می دهند و در نهایت بقاء و عملکرد رشد میگو را افزایش می دهند (Dawood et al., 2017). مطالعات در مورد جیره های غذایی حاوی پروبیوتیک ها نشان می دهد که پروبیوتیک ها بر بهبود میکرو فلور روده و تولید آنزیم های خارج سلولی تاثیر می گذارند و درنهایت کارایی خوراک و عملکرد رشد میگو را بهبود می دهند (Ringo et al., 2010; Dawood et al., 2017).

پروبیوتیک ها، محرک ایمنی و مقاومت در برابر عوامل بیماری زا

افزودن پروبیوتیک به جیره غذایی میگو منجر به بهبود پاسخ ایمنی می گردد که در واقع بین سلول های باکتریایی و سلول های اپیتلیال روده میزبان خاصیت ایمنی و سد کنندگی قوی تری شکل می گیرد (Liu et al., 2013). پروبیوتیک ها مولکول های سیگنالی تولید می کنند که در برابر بیماری های عفونی می توانند سیستم ایمنی را تحریک کنند. استفاده خوراکی از پروبیوتیک ها در آبزی پروری منجر به بهبود سیستم ایمنی (سلولی و همورال) می شود. فعال ترین اجزای ایمنی عبارتند از لیزوزیم، پراکسیداز و افزایش سطح لنفوسیت ها و گرانولوسیت ها می باشد (Dawood et al., 2018). پروبیوتیک ها مولکول های موثری تولید می کنند که دارای خاصیت باکتری کشی است و بر روی باکتری های بیماری زا روده میزبان موثر بوده و همچنین مانعی در برابر تکثیر عوامل بیماری زا فرصت طلب ایجاد می کنند. مولکول های تولید شده در طول فعالیت باکتری کشی، آنتی بیوتیک ها، باکتریوسین ها، سیدروفورها، آنزیم ها (لیزوزیم ها، پروتئازها)، پراکسید هیدروژن و همچنین تغییر pHروده به دلیل تولید اسیدهای آلی می باشد (Dawood et al., 2018). بنابراین، می توان بیان کرد که توانایی آبزیان برای جلوگیری از بیماری های عفونی به طور عمده به اثر تعدیل کننده ایمنی که به دلیل تجویز پروبیوتیک ها اتفاق می افتد، بستگی دارد. در آبزی پروری میگو، سویه های پروبیوتیک B. cereus، Paenibacillus polymyxa و Pseudomonas spتحمل میگو را در برابر عفونت با عوامل بیماری زا ویبریو بهبود می دهند (Ravi et al., 2007). در تغذیه میگوهای L. vannamei و Penaeus japonicas با جیره های حاوی پروبیوتیک های Pediococcus pentosaceus، L. plantarumو Biifidobacterium thermophiliumبهبود سیستم ایمنی و مقاومت در برابر بیماری ها اتفاق افتاد (Adel et al., ۲۰۱۷). در مطالعه Ngo و همکاران (۲۰۱۶) مشخص شد که سویه های باسیلوس جدا شده از روده میگو نسبت به آنتی بیوتیک ها مقاومت نشان می دهند که اهمیت حساسیت به انواع آنتی بیوتیک ها جهت ارزیابی انواع پروبیوتیک ها در مطالعات میگو را برجسته می کند. باسیلوس ها مجموعه متنوعی از بیش از ۲۰ نوع مختلف از ترکیبات ضد میکروبی (شامل آنتی بیوتیک

های پلی پپتیدی، باکتریوسین ها و لیپوپپتیدها) را با طیف گسترده ای از فعالیت های مختلف از ضد باکتری و ضد قارچ گرفته تا ضد سرطان و ضد ویروس تولید می کنند (Cochrane & Vederas, ۲۰۱۶).

4.نتیجه گیری

پروبیوتیک ها نقش حیاتی در آبزی پروری پایدار بازی می کنند. افزودن پروبیوتیک به جیره غذایی میگو روشی مطمئن برای کارایی بهتر باکتری های پروبیوتیک می باشد بدون اینکه تاثیر نامطلوبی بر محیط زیست بگذارد. اثرات پروبیوتیک ها بر بهبود عملکرد رشد میگو، کارایی بهتر خوراک، بهبود میکروبیوتای روده، تقویت سیستم ایمنی و مقاومت در برابر بیماری ها مورد بررسی و تایید قرار گرفته است. اما مکانیسم های تاثیرگذاری آنها بطور دقیق شناخته نشده است. در مطالعات بایستی ویژگی های گونه/ سویه/ مرحله پروبیوتیک ها مورد توجه قرار گیرد. تحقیقات بیشتری در رابطه با عملکرد و مکانیسم عمل پروبیوتیک ها نیاز هست که انجام گیرد.

منابع

8. Adel M, Yeganeh S, Dadar M, Sakai M, Dawood MAO (2016) Effects of dietary Spirulina platensis on growth performance, humoral and mucosal immune responses and disease resistance in juvenile great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1754). Fish & Shellfish Immunology 56: 436–444.
9. Adel M, Yeganeh S, Dawood MAO, Safari R, Radhakrishnan S (2017) Effects of *Pediococcus pentosaceus* supplementation on growth performance, intestinal microflora and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Nutrition 23: 1401–1409.
10. Aliko V, Qirjo M, Sula E, Morina V, Faggio C (2018) Antioxidant defense system, immune response and erythron profile modulation in Gold fish, *Carassius auratus*, after acute manganese treatment". Fish & Shellfish Immunology 76: 101–109.
11. Aragona M, Lauriano ER, Pergolizzi S, Faggio C (2017) Opuntia ficus-indica (L.) Miller as a source of bioactivity compounds for health and nutrition. Natural Product Research 14: 1–13. https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1365073.
12. Bricknell, I., and R.A. Dalmo. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. Fish & Shellfish Immunology, 19(5): 457–472.
13. Burr G, Gatlin D, Ricke S (2007) Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in fin fish aquaculture. Journal of the World Aquaculture Society 36: 425–436.
14. Cochrane SA, Vederas JC (2016) Lipopeptides from Bacillus and Paenibacillus spp.: A gold mine of antibiotic candidates. Medicinal Research Reviews 36: 4–31.
15. Dawood MAO, Koshio S, Esteban M A (2017) Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. Reviews in Aquaculture. https://doi.org/10.1111/raq. 12209.
16. Dawood MAO, Koshio S, Ishikawa M, El-Sabagh M, Esteban MA, Zaineldin AI (2016) Probiotics as an environment friendly approach to enhance red sea bream, *Pagrus major* growth, immune response and oxidative status. Fish & Shellfish Immunology 57: 170–178.
17. Dawood, M.A.O., Koshio, S., Abdel-Daim, M.M., Van Doan, H., 2018. Probiotic application for sustainable aquaculture. Reviews in Aquaculture, 1–18 doi: 10.1111/raq.12272
18. De BC, Meena DK, Behera BK, Das P, Mohapatra PD, Sharma AP (2014) Probiotics in fish and shellfish culture: immunomodulatory and Eco physiological responses. Fish Physiology and Biochemistry 40(3): 921–971.
19. Dossou S, Koshio S, Ishikawa M, Yokoyama S, Dawood MAO, El Basuini MF et al. (2018) Effect of partial replacement of fish meal by fermented rapeseed meal on growth, immune response and oxidative condition of red sea bream juvenile, *Pagrus major*. Aquaculture 490: 228–235.

20. Elsabagh M, Mohamed R, Moustafa EM, Hamza A, Farrag F, Decamp O et al. (2018) Assessing the impact of Bacillus strains mixture probiotic on water quality, growth performance, blood profile and intestinal morphology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture Nutrition. https://doi. org/10.1111/anu.12797.
21. Gatesoupe FJ (1999) The use of probiotic in aquaculture. Aquaculture180: 147–165.
22. Hossain MS, Koshio S, Ishikawa M, Yokoyama S, Sony NM, Dawood MA et al. (2016) Efficacy of nucleotide related products on growth, blood chemistry, oxidative stress and growth factor gene expression of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. Aquaculture 464: 8–16.
23. Khanjani, M.H., Sharifinia, M. (2020). Biofloc technology as a promising tool to improve aquaculture production. Reviwes in Aquaculture 12 (3): 1836-1850.
24. Liu CH, Chiu CS, Ho PL, Wang SW (2009) Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, Bacillus subtilis E20, from natto. Journal of Applied Microbiology 107: 1031–1041.
25. Liu W, Ren P, He S, Xu L, Yang Y, Gu Z et al. (2013) Comparison of adhesive gut bacteria composition, immunity, and disease resistance in juvenile hybrid tilapia fed two different Lactobacillus strains. Fish & Shellfish Immunology 35: 54–62.
26. Marques, A., T.H. Thanh, P. Sorgeloos, and P. Bossier. 2006. Use of microalgae and bacteria to enhance protection of gnotobiotic *Artemia* against different pathogens. Aquaculture, 258:116–126.
27. Mirbakhsh, M., · Mahjoub, M., · Afsharnasab, M., · Kakoolaki, S., · Sayyadi, M. and · Hosseinzadeh, S., 2021. Efects of *Bacillus subtilis* on the water quality, stress tolerance, digestive enzymes, growth performance, immune gene expression, and disease resistance of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during the early hatchery period. Aquaculture International, 29, 2489–2506.
28. Nath S, Matozzo V, Bhandari D, Faggio C (2018) Growth and liver histology of *Channa punctatus* exposed to a common biofertilizer. Natural Product Research 28: 1–8.
29. Ngo HT, Nguyen TTN, Nguyen QM, Tran AV, Do HTV, Nguyen AH et al. (2016) Screening of pigmented Bacillus aquimaris SH6 from the intestinal tracts of shrimp to develop a novel feed supplement for shrimp. Journal of Applied Microbiology 121: 1357–1372.
30. Panigrahi, A., Esakkiraj, P., Das, R.R., Saranya, C., Vinay, T. N., Otta, S. K., and Shashi Shekhar M., 2021. Bioaugmentation of biofoc system with enzymatic bacterial strains for high health and production performance of *Penaeus indicus*. Scientifc Reports, (2021) 11:13633, https://doi.org/10.1038/s41598-021-93065-3.
31. Ray AK, Ghosh K, Ringo E (2012) Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. Aquaculture Nutrition 18: 465–492.
32. Ringo E, Lovmo L, Kristiansen M, Bakken Y, Salinas I, Myklebust R et al. (2010) Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastro-intestine of fish (a review). Aquaculture Research 41: 451–467.
33. Sumon, M.S., Ahmmed, F., Khush, S.S., Ahmmed, M.K., AbdurRouf, M., Chisty, Md., GolamSarower, Md., 2018. Growth performance, digestive enzyme activity and immune response of *Macrobrachium rosenbergii* fed with probiotic *Clostridium butyricum* incorporated diets. Journal of King Saud University - Science, 30, 21-28.
34. Wang W, Ishikawa M, Koshio S, Yokoyama S, Dawood MAO, Zhang Y (2018) Effects of dietary astaxanthin supplementation on survival, growth and stress resistance in larval and post-larval kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. Aquaculture Research 49: 2225–2232.
35. Wang YB (2007) Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture 269(1): 259–264.
36. Witteveldt, J., J.M. Vlak, and M.C. van Hulten. 2004. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrom virus using a WSSV subunit vaccine. Fish & Shellfish Immunology, 16:571–579.
37. Yan J, Guo C, Dawood MAO, Gao J (2017) Effects of dietary chitosan on growth, lipid metabolism, immune response and antioxidant-related gene expression in *Misgurnus anguillicaudatus*. Beneficial Microbes 8: 439–449.
38. Zaineldin AI, Hegazi S, Koshio S, Ishikawa M, Bakr A, El-Keredy AM et al. (2018) *Bacillus subtilis* as probiotic candidate for red sea bream: growth performance, oxidative status, and immune response traits. Fish & Shellfish Immunology 79: 303–312.

39. Zhang , M., Pan, L., , Fan, D., , He, J., Su, C., Gao, S., and Zhang, M., 2021. Study of fermented feed by mixed strains and their effects on the survival, growth, digestive enzyme activity and intestinal flora of *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 530 (2021) 735703.
40. Zheng, X., Duan, Y., Dong, H., Zhang, J., 2021. Effects of Dietary *Lactobacillus plantarum* on Growth Performance, Digestive Enzymes and Gut Morphology of *Litopenaeus vannamei.* Probiotics and Antimicrobial Proteins, 10, 504–510.
41. Zhou XX, Wang YB, Li WF (2009) Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. Aquaculture 287: 349–353.
42. Zokaeifar H, Balc_azar JL, Saad CR, Kamarudin MS, Sijam K, Arshad A et al. (2012) Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish& Shellfish Immunology 33: 683–689.

Effect of Mn-glycinate supplementation on performance and egg quality of Hy-Line W36 laying hens in the second production cycle

Meysam Ilnet[1]; Heydar Zarghi[2*]; Hassan Nasire moghadam[3], Reza Majid Zadeh Heravi[4]
1-Master science student, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2-Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
3- Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
4-Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
*Corresponding Author Email address: h.zarghi@um.ac.ir

Abstract
This experiment was conducted to evaluate the effect of different levels of Mn-glycinate on the production performance and egg quality of laying hens in the second production cycle. A total of 300, 105-week-old Hy-Line W36 laying hens were use. The experiment was conducted in a randomized complete block design with six treatment including the addition of 30, 60, 90, 120 and 150 mg/kg manganese (Mn) in the glycinate chelate form to corn-soybean meal diet with five replications and 12 birds per replicate. The production performance traits including egg production (EP), egg weight (EW), egg mass (EM), feed intake (FI), and feed conversion ratio (FCR) were evaluated. With increasing dietary Mn level EW changed by a linear trends ($p < 0.02$). Birds fed diets supplemented with 60 mg/kg Mn had the highest EP. In conclude, the results of current experiment showed that dietary Mn supplementation in the organic chelate form improves egg production and egg weight in the second production period.

Keywords: Egg production, egg weight, molting, organic chelate

اثر گلایسینات منگنز بر عملکرد و کیفیت تخم در سیکل دوم تولید مرغان تخم‌گذار های‌لاین W36

میثم ایلنت[۱]؛ حیدر زرقی[۲*]؛ حسن نصیری مقدم[۳]؛ رضا مجید زاده هروی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد تغذیه طیور، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۴- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

*ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: h.zarghi@um.ac.ir

چکیده

این آزمایش به‌منظور بررسی تأثیر سطوح مختلف مکمل منگنز به فرم کیلات آلی (گلایسینات منگنز) در جیره مرغان تخم‌گذار های لاین W36 در دوره‌ی دوم تولید (پس از تولک) در سن ۱۰۵-۱۱۷ هفتگی بر عملکرد و کیفیت تخم انجام شد. آزمایش با استفاده از تعداد ۳۰۰ قطعه مرغ تخم‌گذار در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با ۵ تیمار، ۵ تکرار و ۱۲ قطعه مرغ در هر تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل افزودن سطوح ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم منگنز به فرم کیلات گلایسینات در هر کیلوگرم جیره بر پایه ذرت-کنجاله سویا بودند. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد با افزایش سطح منگنز جیره به فرم مکمل گلایسینات میانگین وزن تخم مرغ‌های تولیدی با یک روند خطی افزایش یافت (P<۰/۰۲). پرندگان تغذیه شده با جیره مکمل شده با ۶۰ میلی‌گرم منگنز بالاترین درصد تخم‌گذاری را داشتند. اثر سطوح منگنز بر روی سایر شاخص‌های عملکرد تولیدی و شاخص‌های سنجش کیفیت تخم به جزء شاخص شکل تخم مرغ معنی‌دار نشد. به‌طورکلی نتایج این آزمایش نشان داد، افزودن مکمل آلی منگنز به جیره مرغان تخم‌گذار در دوره دوم تولید تاثیر مثبت بر درصد تخم‌گذاری و وزن تخم‌مرغ‌های تولیدی دارد.

واژگان کلیدی: تولک، تخم‌گذاری، کیلات آلی، وزن تخم

۱.مقدمه

منگنز ازجمله مواد معدنی ضروری در تغذیه حیوانات به‌ویژه طیور است. مقدار جذب منگنز در مجاری روده‌ای پائین است. تغذیه مرغ‌های تخم‌گذار با جیره‌ی حاوی منگنز کم‌تر سبب تولید تخم‌های با پوسته نازک‌تر، سطوح شفاف و ساختمان غیر نرمال مخصوصاً در لایه نوک پستانی می‌شود. منگنز فعال‌کننده آنزیم گلایکوزیل ترانسفراز مؤثر در تشکیل موکوپلی ساکاریدها (از اجزای پروتئوگلیکان‌ها) است. پروتئوگلیکان‌هایی مانند درماتان و کراتان در ماتریکس پوسته تخم‌مرغ وجود دارند و که در کنترل بافت و ساختمان پوسته نقش داشته و از این طریق برخواص مکانیکی پوسته تأثیر می‌گذارند (Mabe et al., 2003).

در مطالعات صورت گرفته توسط محققین مشخص شده که میزان ۲۵ میلی‌گرم منگنز در کیلوگرم جیره برای به حداکثر رسیدن تولید تخم، وزن تخم و بهبود ضریب تبدیل خوراکی کافی است، اما برای بهبود کیفیت پوسته تخم میزان منگنز جیره باید افزایش یابد(Inal et al., 2001). در مطالعه‌ای اضافه کردن منگنز به میزان ۴۰-۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره مرغ‌های لگهورن در سیکل دوم تولید سبب بهبود ضخامت پوسته و کاهش درصد تخم‌مرغ‌های حذفی به دلیل عدم قابلیت بسته‌بندی و ارسال به بازار گردید.

بیشترین میزان ضخامت پوسته زمانی مشاهده شد که جیره حاوی میزان ۲۰۰ میلی‌گرم منگنز در کیلوگرم جیره بود (Fassani et al., 2000).

منگنز آلی زیست‌فراهمی و جذب روده‌ای بالاتری نسبت به منگنز معدنی داشته و درنتیجه اثرات مفید آن در فراسنجه‌های رشد، تولید و سلامت در طیور قابل‌مشاهده است. استفاده از منگنز در جیره طیور نسبت به سایر گونه‌های جانوری امری ضروری به نظر می‌رسد دلیل آن این است که جذب این عنصر در پرندگان در مقایسه با پستانداران ناکارآمدتر است (Turk et al., 1982). اثر افزودن منگنز به جیره، در مرغان مسن آشکارتر از مرغان جوان است و پایین بودن مقدار منگنز در جیره پایه، فرضیه واکنش نشان دادن به مکمل منگنز را تقویت می‌کند. میزان احتیاج طیور به منگنز طبق توصیه انجمن ملی تحقیقات ۲۵ میلی‌گرم در هر کیلوگرم جیره (NRC, 1994) و در کاتالوگ مرغان تخم‌گذار سویه های‌لاین W36 ۹۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم جیره گزارش‌شده است(Hy-Line., 2020).

یکی از راهکارهای مهم برای کاهش غلظت مواد معدنی در جیره، بدون تأثیر بر عملکرد حیوان، به‌کارگیری منابع املاح معدنی به فرم آلی است (zhang et al., 2017). املاح کم‌نیازی که به فرم آلی هستند، قابلیت دسترسی بالاتری دارند و متشکل از یون‌های فلزی باند شده با مواد آلی مانند اسیدهای آمینه، پپتیدها و یا کمپلکس‌های پلی‌ساکاریدی هستند که این یون‌ها را با پایداری، حلالیت و دسترسی بالاتری فراهم می‌سازد (Vieria, 2004). بهبود قابلیت دسترسی با استفاده از منابع آلی ممکن است یک گزینه مناسب جهت تصحیح سطوح تغذیه‌ای باشد. به‌طوری‌که نشان داده‌شده است منگنز آلی بهتر از منگنز غیر آلی در ایلئوم مرغ‌های تخم‌گذار جذب می‌شود (Ji et al., 2006). همچنین گزارش‌شده است استفاده از کیلات‌های آلی عناصر معدنی باعث کاهش آلودگی زیست‌محیطی ناشی از ورود این عناصر به طبیعت از طریق استفاده از کود طیور در مزارع کشاورزی می‌شود (وکیلی و ایروانی، ۱۳۹۰). Venglovska et al., (2014) گزارش کردند که استفاده از مکمل آلی منگنز (پروتئینات منگنز و منگنز گلایسین) و غیر آلی (سولفات منگنز) اثری بر وزن بدن و وزن تخم‌مرغ نسبت به جیره بدون مکمل منگنز نداشت درحالی‌که Yildiz et al., (2011) گزارش کردند که استفاده از مکمل آلی منگنز، وزن تخم‌مرغ و میزان افزایش وزن بدن مرغان تخم‌گذار را طی سنین ۴۳ تا ۶۸ هفتگی افزایش و درصد تخم‌مرغ‌های آسیب‌دیده را در مقایسه با منبع غیر آلی این عنصر کاهش داد. گزارش‌شده است، شاخص شکل تخم‌مرغ با افزودن منبع غیر آلی سولفات منگنز و منبع آلی منگنز-گلیسین در مقایسه با پروتئینات منگنز پس از ۱ هفته به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (Venglovska et al., 2014).

۲.مواد و روش‌ها

این آزمایش با استفاده از تعداد ۳۰۰ قطعه مرغ تخم‌گذار سویه های‌لاین W36 در دوره‌ی دوم تولید (پس از تولک) در دامنه سنی ۱۰۵-۱۱۷ هفته، ۸۵/۷ درصد تولید و شرایط ظاهری سالم و یکنواخت در سالن مرغداری دانشگاه فردوسی در بهار و تابستان سال ۱۴۰۰ انجام شد. مرغ‌ها به مدت ۲۱ روز با خوراک بدون افزودن مکمل منگنز به‌منظور تخلیه ذخیره بدن تغذیه شدند. در طول دوره آزمایش برنامه روشنایی و خاموشی، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود. در طول دوره آزمایش مرغ‌ها به آب‌ودان دسترسی آزاد داشتند. مطالعه به‌صورت یک آزمایش بلوک کامل تصادفی، پنج تیمار شامل افزودن پنج سطح منگنز (۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خوراک) به فرم گلایسینات با پنج تکرار و ۱۲ قطعه پرنده در هر تکرار بود. جیره پایه بر اساس جداول آنالیز شیمیایی مواد خوراکی و احتیاجات توصیه‌شده در کاتالوگ Hy-line W36 (۲۰۲۰) با نرم‌افزار UFFDA تنظیم شد (Hy-Line, 2020). به‌منظور بررسی صفات عملکرد تعداد تخم‌مرغ‌های تولیدی هر تکرار، هرروز و در ساعت ۸ شمارش و ثبت می‌شدند. در پایان هر هفته تخم‌مرغ‌های تولیدی وزن و از تقسیم وزن بر تعداد میانگین وزن تخم‌مرغ‌های تولیدی محاسبه شد. با ضرب درصد تخم‌گذاری

در میانگین وزن تخم‌مرغ‌های تولید، گرم تخم‌مرغ تولیدی روزانه هر قطعه مرغ محاسبه شد. خوراک مصرفی از مابه‌التفاوت خوراک داده‌شده در طول دوره و خوراک ماندهدر پایان دوره با تصحیح برای تلفات محاسبه شد. به‌منظور بررسی صفات کیفی (وزن تخم‌مرغ، وزن مخصوص تخم‌مرغ، ضخامت پوسته و واحد هاو) دو عدد تخم‌مرغ تولیدی هر تکرار، در دو روز آخر هر دوره‌ی ۴ هفته انتخاب و مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. داده‌های حاصل‌شده با استفاده از نرم‌افزار SAS ۹/۱ و از طریق proc univariate normal مورد آزمون نرمالیته قرار گرفت (SAS, 2003). داده‌ها از طریق proc GLM و با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند.

۳.نتایج و بحث

نتایج به‌دست‌آمده از تأثیر مکمل سازی جیره با سطوح مختلف کیلات منگنز بر شاخص‌های عملکردی در جدول ۱ گزارش‌شده است. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد با افزایش سطح منگنز جیره به فرم مکمل گلایسینات میانگین وزن تخم مرغ‌های تولیدی با یک روند خطی افزایش یافت (P<۰/۰۵). این نتیجه در راستای نتایج به‌دست‌آمده توسط Yildiz *et al.*, (2011) بود که گزارش کردند استفاده از مکمل آلی منگنز، وزن تخم‌مرغ و میزان افزایش وزن بدن مرغان تخم‌گذار را طی سنین ۴۳ تا ۶۸ هفتگی افزایش و درصد تخم‌مرغ‌های آسیب‌دیده را در مقایسه با منبع غیر آلی این عنصر کاهش داد اما Venglovska *et al.*, (2014) گزارش کردند که استفاده از مکمل آلی منگنز (پروتئینات منگنز و منگنز گلایسین) و فرم غیر آلی (سولفات منگنز) اثری بر وزن بدن و وزن تخم‌مرغ نسبت به جیره بدون مکمل منگنز نداشت. پرندگان تغذیه شده با جیره مکمل شده با ۶۰ میلی‌گرم منگنز بالاترین درصد تخم‌گذاری را داشتند. این نتیجه هم‌سو با نتیجه برزگر و همکاران است که گزارش کردند پرندگان تغذیه‌شده با جیره حاوی ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل منگنز به فرم آلی دارای بالاترین عملکرد تولید بود. بیشترین وزن تخم‌مرغ هم در سطح ۱۵۰ میلی‌گرم از کیلات ذکرشده در هر کیلوگرم از جیره حاصل شد.

جدول ۱: اثر مکمل منگنز گلایسینات بر عملکرد تولید تخم مرغان تخم‌گذار در دوره دوم تولید (۱۱۷-۱۰۵ هفتگی)

سطح منگنز	تخم‌گذاری	وزن تخم‌مرغ	تولید توده تخم‌مرغ	مصرف خوراک	ضریب تبدیل غذایی
کیلوگرم/ میلی‌گرم	درصد	گرم	روز/پرنده/گرم		
۳۰	۸۱/۷۰^{ab}	۶۴/۳۸	۵۲/۶۲	۹۷/۶۸	۱/۸۶
۶۰	۸۲/۴۴^{a}	۶۴/۱۱	۵۲/۸۵	۹۷/۴۵	۱/۸۵
۹۰	۷۹/۷۷^{bc}	۶۵/۰۹	۵۱/۹۱	۹۶/۶۶	۱/۸۶
۱۲۰	۷۸/۹۶^{c}	۶۵/۱۰	۵۱/۴۲	۹۸/۳۵	۱/۹۲
۱۵۰	۸۰/۶۵^{abc}	۶۵/۴۴	۵۲/۷۹	۹۸/۳۹	۱/۸۷
SEM	۰/۶۷	۰/۳۹	۰/۵۷	۱/۱۲	۰/۰۳
P-Value	۰/۰۱	۰/۱۱	۰/۳۲	۰/۸۱	۰/۳۸
پاسخ به سطح منگنز جیره					
خطی	۰/۰۵	۰/۰۲	۰/۶۱	۰/۵۷	۰/۳۱
درجه‌دو	۰/۲۶	۰/۸۸	۰/۲۹	۰/۵۴	۰/۷۱

$^{a, .., c}$ اختلاف میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک معنی‌دار است (p<۰/۰۵)

نتایج به‌دست‌آمده از تأثیر سطوح متفاوت منگنز گلایسینات بر روی شاخص‌های کیفی تخم‌مرغ در جدول ۲ نشان داده‌شده است. با بررسی این نتایج مشخص شد که تیمارهای آزمایشی تأثیر معنی‌داری بر صفات کیفی تخم مرغ شامل؛ وزن مخصوص، ضخامت پوسته، شاخص رنگ زرده، شاخص زرده، شاخص سفیده و همچنین واحد هاو نداشتند. ولی شاخص شکل تخم‌مرغ معنی‌دار شد (P <۰/۰۱). نتایج به دست آمده از این آزمایش با نتایج زمانی و همکاران (۱۳۸۸) مطابقت دارد به طوری که این محققین گزارش کردند سطوح مختلف منگنز تأثیر معنی‌داری بر واحد هاو نداشت.

جدول ۲: اثر مکمل منگنز گلایسینات بر شاخص‌های کیفی تخم‌مرغ تولیدی مرغان تخم‌گذار در دوره دوم تولید (۱۱۷-۱۰۵ هفتگی)

سطح منگنز	وزن مخصوص	ضخامت پوسته	شاخص شکل	شاخص رنگ زرده	شاخص زرده	واحد هاو	شاخص سفیده
۳۰	۱/۰۸	۰/۳۹	۷۶/۹۸^{b}	۵/۵۰	۳۲/۸۰	۹۱/۵۵	۶/۴۰
۶۰	۱/۰۸	۰/۴۰	۷۷/۸۶^{ab}	۵/۵۴	۳۲/۸۶	۹۲/۱۷	۶/۵۷
۹۰	۱/۰۸	۰/۴۰	۷۸/۴۲^{a}	۵/۵۹	۳۳/۴۶	۹۲/۵۱	۶/۸۲
۱۲۰	۱/۰۹	۰/۳۹	۷۷/۱۶^{b}	۵/۵۹	۳۲/۲۶	۹۱/۳۹	۶/۵۳
۱۵۰	۱/۰۹	۰/۳۹	۷۷/۰۰^{b}	۵/۶۰	۳۲/۳۲	۹۲/۶۰	۶/۷۱
SEM	۰/۰۰۱	۰/۰۰۵	۰/۳۳	۰/۰۸	۰/۴۱	۰/۶۹	۰/۱۵
P-Value	۰/۷۳	۰/۷۱	۰/۰۰۹	۰/۹۱	۰/۲۴	۰/۶۴	۰/۳۳
پاسخ به سطح منگنز جیره							
خطی	۰/۳۷	۰/۶۲	۰/۵۲	۰/۳۳	۰/۲۴	۰/۵۶	۰/۲۶
درجه دو	۰/۴۴	۰/۲۱	۰/۰۰۳	۰/۷۱	۰/۲۵	۰/۹۱	۰/۳۸

$^{a, .., c}$ اختلاف میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

۴.نتیجه‌گیری

به‌طورکلی نتایج این آزمایش نشان داد، افزودن مکمل آلی منگنز به جیره مرغان تخم‌گذار در دوره دوم تولید تاثیر مثبت بر درصد تخم‌گذاری و وزن تخم‌مرغ‌های تولیدی دارد.

منابع

۶. برزگر ن.، زرقی ح.، نصیری مقدم ح.، حسن‌آبادی ا. اثر سطوح و منابع مختلف منگنز در جیره غذایی بر عملکرد تولیدی مرغان تخم‌گذار. هفتمین کنگره علوم دامی ایران.

۷. زمانی ا.، رحمانی ح.، پور رضا ج. ۱۳۸۸. اثر سطوح مختلف منگنز و روی بر خاکستر پوسته، واحدها، تلفات و تخم‌مرغ‌های با سطوح روشن در مرغ‌های تخم‌گذار. مجله پژوهش‌های علوم دامی ایران، جلد ۱، شماره ۲، سال ۱۳۸۸.

۸. وکیلی ر. و ایروانی ج. ۱۳۹۰. کیلات‌های مواد معدنی ریز مغذی و اهمیت آن در تولید و سلامت دام و طیور. واحد تحقیقات و فناوری شرکت ماکیان فسفات. صفحات ۱-۱۳.

9. DuncanD. B. 1955. Multiple ranges and multiple f-test. Biometrics, 11: 1-42.

10. Fassani J., Bertechini E., de Oliveria A. G., Goncalves B. L., T. and Fialh E. T. 2000. Manganese in nutrition of the leghorn hens in the second cycle of production (in Portuguese). Revista Ciencia e Agrotecnologia, 24, 468-478.
11. Hy-Line. 2020. Hy-Line W-36 Commercial Management Guide. Hy-Line Int. West Des Moines, IA.
12. Inal F., Coskun B., Gulsen, N. and Kurtoglu V. 2001. The effects of withdrawal of vitamin and trace mineral supplements from layer diets on egg yield and trace mineral composition. British Poultry Science, 42, 77-80.
13. Ji F., Kuo X. G., Lu L., Liu B. and Yu S. Y. 2006. Effect of manganese source on manganese absorption by the intestine of broilers. Poultry Science, 85, 1947-1952.
14. Mabe I., Rapp C., Bain M. M. and Nys Y. 2003. Supplementation of a corn-soybean meal diet with manganese, copper and zinc from organic or inorganic sources improves eggshell quality in aged laying hens. Poultry Science, 82, 1903-1913.
15. NRC. 1994. Nutrient Requirements of Poultry. 9th ed. National Academy Press, Washington, USA. 155 pp.
16. SAS. 2003. User's guide: Statistics. Vol. 2. 9.1 ed. S.A.S Institute Cary, NC.
17. Turk R.G., Grunji D.S. and Molitares P., 1982. Coccidial infections and manganese absorption. Poultry Science, 61:2430-2434
18. Venglovska K., Grešakova Ľ., Placha I., Ryzner M., Čobanova K. 2014. Effects of feed supplementation with manganese from its different sources on performance and egg parameters of laying hens. Czech Journal of Animal Science 59(4):147-155.
19. Vieira S. L. 2004. Minerais quelatados na nutriço animal. In: Proceedings of Simpósio Sobre Manejo Enutrição De Aves e Suínos, Campinas, p. 51-70.
20. Zhang Y. N., Wang J., Zhang H. J., Wu S. J. and Qi G. H. 2017. Effect of dietary supplementation of organic or inorganic manganese on eggshell quality, ultrastructure, and components in laying hens. Poultry Science, 96, 2184-2193.

The effect of global warming on the population of sea turtles

Hamidreza Torabi 1 *; Ruhollah Zare 2

1- Master student of Chabahar University of Maritime and Marine Sciences
2- Faculty member of Chabahar University of Maritime and Marine Sciences

*Corresponding Author Email address: torabi.hamidreza7@gmail.com

Abstract
Sea turtles are generally known to be highly vulnerable to climate change due to characteristics such as the role of temperature in determining embryo sex, longevity, long maturity, and highly migratory nature. Existing species of sea turtles probably emerged in the mid-late Jurassic period; Therefore, they have survived past changes in climate, including glacial periods and global warming, and therefore have the capacity to adapt to climate change. Current rates of increasing atmospheric greenhouse gas concentrations and changes in atmospheric temperature are occurring very rapidly. The adaptability of sea turtles to these rapid changes has been significantly reduced. Rising sea levels and rising storms will have a negative impact on turtle nesting shores. Global warming is likely to directly affect all stages of turtle life, such as nesting and nest growth rates. Heating to 2 ° C can potentially lead to a large change in the ratio of sex to females. This will lead to a very unstable sex ratio in the sea turtle population, further reduction in reproduction and population size. Coastal development due to rising sea levels may threaten nesting shores and breeding success. Illicit exploitation and fishing in other fisheries has seriously reduced the population of sea turtles.

Keywords: Climate change, global warming, turtles

تاثیر گرمایش جهانی بر جمعیت لاکپشت‌های دریایی

حمیدرضا ترابی[۱*]؛ روح الله زارع[۲]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار
۲- عضو هیئت علمی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: 7@gmail.comtorabi.hamidreza

چکیده

لاک‌پشت‌های دریایی به دلیل ویژگی‌هایی چون نقش دما در تعیین جنسیت رویان، زندگی طولانی مدت، سن بلوغ طولانی و ماهیت بسیار مهاجر آن‌ها، به‌طورکلی در برابر تغییرات آب و هوایی بسیار آسیب‌پذیر شناخته شده‌اند. گونه‌های موجود لاک‌پشت‌های دریایی احتمالاً در اواسط اواخر دوره ژوراسیک پدید آمده‌اند؛ بنابراین از تغییرات گذشته در آب‌وهوا، از جمله دوره یخبندان و حوادث گرمای زمین، جان سالم به در برده‌اند و بنابراین از ظرفیت سازگاری با تغییرات آب و هوایی برخوردارند. نرخ‌های فعلی افزایش غلظت گازهای گلخانه‌ای جوی و تغییرات دمایی اتمسفر، بسیار سریع در حال وقوع است. ظرفیت سازگاری لاک‌پشت‌های دریایی با این تغییرات سریع کاهش قابل توجهی پیدا کرده است. افزایش سطح دریا و افزایش شدت طوفان بر سواحل لانه‌سازی لاک‌پشت‌ها تأثیر منفی خواهد گذاشت. گرم شدن جهانی احتمالاً مستقیماً در تمام مراحل زندگی لاک‌پشت‌ها مانند تعیین جنسیت رویان در لانه و میزان رشد تأثیر می‌گذارد. گرم شدن ۲ درجه سانتی‌گراد به‌طور بالقوه می‌تواند منجر به تغییر زیادی در نسبت جنسیت نسبت به ماده‌ها شود. این امر، منجر به یک نسبت جنسیتی بسیار ناپایدار در جمعیت لاک‌پشت‌های دریایی، کاهش بیشتر تولید مثلی و اندازه جمعیت خواهد شد. توسعه خطوط ساحلی تحت تاثیر بالا آمدن سطح دریا ممکن است سواحل لانه‌سازی و موفقیت تولیدمثل را تهدید کند. بهره‌برداری و صید غیر مجاز در سایر شیلات باعث کاهش جدی جمعیت لاک‌پشت‌های دریایی شده است.

واژگان کلیدی: تغییرات اقلیمی، گرمایش جهانی، لاکپشت

۱. مقدمه

تغییرات آب و هوایی به تهدیدی فزاینده برای گونه‌های سراسر کره زمین تبدیل شده است. با دمای متوسط‌تر و الگوی آب و هوایی کمتر قابل پیش‌بینی، فعالیت انسان‌ها به‌صورت غیرقابل انکار بر آب‌وهوای جهانی تأثیر گذاشته‌اند. اثرات تغییر آب‌وهوا در اقیانوس‌ها، جایی که دمای سطح دریا و افزایش سطح دریا می‌تواند اکوسیستم دریایی را در بسیاری از سطوح تغییر دهد. این تغییرات می‌تواند تنوع زیستی را کاهش داده و تعادل اکوسیستم‌های دریایی را تغییر دهند (Fuentes et al. 2010). تغییرات آب و هوایی مرتبط است،

به معنی طوفان‌های مکرر که سواحل لانه‌سازی را تغییر می‌دهند، باعث فرسایش ساحل و طغیان می‌شوند. این تأثیرات گسترده پیامدهای شدیدی برای زندگی دریایی دارد؛ اما برخی از گونه‌ها بیش از سایر گونه‌ها تأثیر می‌پذیرند. یکی از این گونه‌های مهم لاک‌پشت‌های دریایی است که به دلیل طیف گسترده‌ای از زیستگاه‌ها به شدت تحت تأثیر تغییرات آب و هوایی قرار می‌گیرند (Butt et al. 2016). بزرگ‌ترین عامل گرمایش، انتشار گازهایی است که اثر گلخانه‌ای ایجاد می‌کنند و بیش از ۹۰٪ آن دی‌اکسید کربن (CO_2) و متان است. سوزاندن سوخت‌های فسیلی (زغال‌سنگ، نفت و گاز طبیعی) برای مصرف انرژی منبع اصلی این انتشارات است. کشاورزی، جنگل‌زدایی و صنایع از عوامل تسریع در گازهای گلخانه‌ای است. افزایش دما با بازخورد آب‌وهوا، مانند از دست دادن برف و پوشش یخ منعکس‌کننده نور خورشید، افزایش بخارآب (خود یک گاز گلخانه‌ای) و تغییر در غرقاب کربن زمین و اقیانوس‌ها، تسریع یا تعدیل می‌شود (Dinan, 2017).

اثرات گرم شدن کره زمین تأثیرات زیادی بر حیوانات وحشی دارد. سرعت گرم شدن کره زمین بسیار بیشتر از توانایی حیوانات در انطباق طبیعی با چنین تغییرات چشمگیر محیطی است. افزایش سطح دریا از ذوب یخ‌های قطبی در حال حاضر به از دست دادن زیستگاه لانه‌سازی موجودات دریایی در سواحل کمک می‌کند (Santidrián Tomillo & Spotila, 2020).

اثرات تغییرات اقلیمی

افزایش دما در خشکی تقریباً دو برابر متوسط افزایش جهانی است که منجر به گسترش بیابان و بیشتر شدن امواج گرما و آتش‌سوزی می‌شود. افزایش دما همچنین در قطب شمال سبب ذوب شدن یخچال‌ها، عقب‌نشینی آن‌ها و افزایش سطح دریا می‌شود (Thomas et al. 2018). گرما میزان تبخیر را افزایش می‌دهد و باعث طوفان‌ها و اوضاع شدید هوایی می‌شود. تأثیرات بر اکوسیستم‌ها شامل جابجایی یا انقراض بسیاری از گونه‌ها با تغییر محیط آن‌ها است که بیشتر در آبسنگ‌های مرجانی و قطب شمال رخ داده است. تغییرات آب و هوایی مردم را با ناامنی غذایی، کمبود آب، جاری شدن سیل، بیماری‌های عفونی، گرمای شدید، خسارات اقتصادی تهدید می‌کند (Hoque et al. 2019). این تأثیرات باعث شده است که سازمان بهداشت جهانی تغییرات آب و هوایی را بزرگ‌ترین تهدید برای سلامت جهانی در قرن ۲۱ بخواند. حتی اگر تلاش‌ها برای به حداقل رساندن گرم شدن هوا در آینده موفقیت‌آمیز باشد، برخی از اثرات برای قرن‌ها ادامه خواهد داشت. از جمله افزایش سطح دریا، افزایش دمای اقیانوس‌ها و اسیدی شدن اقیانوس‌ها هستند (Savo et al. 2017).

هیئت بین دولتی تغییر اقلیم (IPCC) مجموعه‌ای از گزارش‌ها را منتشر کرده است که پیش‌بینی می‌کند با ادامه گرم شدن دما تا ۱/۵ درجه سانتی‌گراد و بیشتر، افزایش قابل‌توجهی در این تأثیرات وجود دارد. گرم شدن اضافی همچنین خطر ایجاد آستانه‌های بحرانی را به نام نقاط سرریز افزایش می‌دهد. پاسخ به تغییرات آب و هوایی شامل تعدیل (کاهش) و انطباق (سازگاری) است. محدود کردن تغییرات آب و هوایی شامل کاهش انتشار گازهای گلخانه‌ای و حذف آن‌ها از جو است. این روش‌ها شامل توسعه و استقرار منابع انرژی کم کربن مانند باد و خورشید، از بین رفتن زغال‌سنگ، افزایش بهره‌وری انرژی، احیای جنگل‌ها است. سازگاری شامل سازگاری با آب‌وهوای واقعی یا مورد انتظار، از جمله از طریق بهبود حفاظت از سواحل، مدیریت بهتر فاجعه‌ها و توسعه محصولات مقاوم‌تر است. سازگاری به‌تنهایی نمی‌تواند خطر تأثیرات شدید، گسترده و برگشت‌ناپذیر» را دفع کند (Ding et al. 2017; Evans

& Waggitt, 2020; Savo et al. 2017). بر اساس توافقنامه پاریس ۲۰۱۵، کشورها به‌طور مشترک توافق کردند که از طریق تلاش دمای جهان را ۲ درجه سانتی‌گراد کاهش دهند. بااین‌حال، با تعهدات انجام شده در این توافق نامه، گرم شدن کره زمین در پایان قرن هنوز به حدود ۲/۸ درجه سانتی‌گراد خواهد رسید. محدود کردن گرم شدن به ۱/۵ درجه سانتی‌گراد نیاز به نصف شدن میزان انتشار تا سال ۲۰۳۰ و دستیابی به انتشار تقریباً صفر تا سال ۲۰۵۰ دارد (Mulyasari et al. 2018).

اثرات زیست محیطی تغییر اقلیم گسترده است و بر اقیانوس‌ها، یخ‌ها و هوا تأثیر می‌گذارد. تغییرات ممکن است به‌تدریج یا به‌سرعت اتفاق بیفتد. شواهد این اثرات از مطالعه تغییرات آب و هوایی درگذشته، از مدل‌سازی و از مشاهدات مدرن حاصل می‌شود. از دهه ۱۹۵۰، خشکسالی و امواج گرما هم‌زمان با افزایش فرکانس ظاهر می‌شوند. حوادث بسیار مرطوب یا خشک در دوره موسمی در هند و آسیای شرقی افزایش یافته است. حداکثر بارندگی و سرعت باد از طوفان‌های شدید احتمالاً در حال افزایش است (Poloczanska et al. 2013). تغییرات آب و هوایی منجر به کاهش و نازک شدن یخ‌های قطب شمال شده و آن را در برابر ناهنجاری‌های جوی آسیب‌پذیر کرده است (Poloczanska et al. 2013). غلظت‌های بالاتر CO2 در جو باعث تغییر در شیمی اقیانوس‌ها شده است. افزایش CO2 محلول باعث اسیدی شدن اقیانوس‌ها می‌شود. علاوه بر این، با کاهش محلول اکسیژن در آب گرم، سطح اکسیژن در حال کاهش است زیرا اکسیژن در آب گرم‌تر محلول نیست و مناطق مرده هیپوکسی در نتیجه شکوفه جلبک که توسط دمای بالاتر، سطح CO2 بالاتر، از بین بردن اکسیژن در اقیانوس و یوتروفیکاسیون تحریک می‌شود، گسترش می‌یابد (Sydeman et al. 2015).

تغییرات آب و هوایی همیشه در زمین اتفاق افتاده است؛ اما سرعت سریع و بزرگی آن‌که اکنون رخ داده است که بسیار نگران کننده می‌باشد. تغییر اقلیم در نتیجه عدم تعادل بین تابش ورودی و خروجی در جو رخ می‌دهد. پیش‌بینی می‌شود که تا سال ۲۱۰۰ میانگین دمای جهانی تا ۵/۴ درجه سانتی‌گراد افزایش یابد. شواهد قریب به اتفاق وجود دارد که نشان می‌دهد فعالیت‌های انسانی طی قرن گذشته به تغییرات آب و هوایی کمک کرده است (Heshmati, 2020). تغییرات آب و هوایی عمدتاً توسط انسان به‌ویژه از طریق افزایش انتشار گازهای گلخانه‌ای ایجاد می‌شود. تغییر اقلیم به‌عنوان تهدیدی جدی برای اکوسیستم، تنوع زیستی و سلامت شناخته شده است و با تغییراتی در محیط فیزیکی سیاره زمین همراه است و بر زندگی در سراسر کره زمین تأثیر می‌گذارد (Heshmati, 2020). فعالیت‌های انسانی که گازهای گلخانه‌ای را در اتمسفر آزاد می‌کنند، مانند سوزاندن سوخت‌های فسیلی مانند زغال‌سنگ، عامل اصلی گرم شدن کره زمین است (Yoro & Daramola, 2020). جنگل‌زدایی همچنین منبع اصلی گازهای گلخانه‌ای است (Cederberg et al. 2019). دانشمندان پیش‌بینی می‌کنند که این عامل می‌تواند منجر به از بین رفتن ۳۰-۲۰٪ از گونه‌های گیاهی و جانوری زمین تا سال ۲۰۵۰ شود (Heshmati, 2020). مهم‌ترین کشورهایی که به ترتیب عامل افزایش گازهای گلخانه‌ای هستند عبارت‌اند از: چین، ایالات‌متحده آمریکا، روسیه، هند و ژاپن. بااین‌حال، سرانه انتشار ایالات‌متحده ۵ برابر چین و ۲۰ برابر بیشتر از هند است. درختان در طول فتوسنتز دی‌اکسید کربن دریافت می‌کنند که با گرم شدن کره زمین این فرآیند خنثی می‌شود. هرچه تعداد درختان در کره زمین بیشتر باشد، دی‌اکسید کربن بیشتری توسط آن‌ها جذب می‌شود. اقیانوس‌ها همچنین به‌عنوان «محل غرق کربن» عمل می‌کنند. تقریباً یک‌سوم کل انتشار گازهای گلخانه‌ای مربوط به انسان توسط اقیانوس‌ها جذب می‌شود (Heshmati, 2020). سازگاری با پیامدهای تغییر اقلیم و جلوگیری از تشدید تغییرات آب و هوایی چالش‌های اساسی جامعه است.

سیاست‌گذاران باید استراتژی‌های شخصی را به‌ویژه در جمعیت آسیب‌پذیر اجرا کنند (Wulff et al. 2015). سطح گازهای گلخانه‌ای در حال حاضر بیش از هر زمان در ۸۰۰،۰۰۰ سال گذشته است. با افزایش دما، آب بیشتری از اقیانوس‌ها و سایر منابع آب در جو تبخیر می‌شود و باعث افزایش بیشتر دما می‌شود (Hsiang & Kopp, 2018). دی‌اکسید کربن اتمسفر از دو منبع اصلی، طبیعی و انسانی تأمین می‌شود. منابع طبیعی دی‌اکسید کربن شامل اکثر حیواناتی است که دی‌اکسید کربن را به‌عنوان ماده زائد بازدم می‌کنند. منابع انسانی دی‌اکسید کربن اساساً توسط فعالیت‌های انسانی از اوایل قرن ۲۰ (انقلاب صنعتی) منشا گرفته اند، عمدتا سوزاندن سوخت‌های فسیلی (به‌عنوان‌مثال، سوزاندن زغال‌سنگ، نفت و گاز طبیعی)، انتشارات کشاورزی و جنگل‌زدایی بیشترین عوامل انسانی هستند. در سال ۲۰۱۷، ایالات‌متحده آمریکا تقریباً ۵/۱ میلیارد تن دی‌اکسید کربن مرتبط با انرژی برای انتشار جهانی حدود ۳۲/۵ میلیارد متریک تن منتشر کرد. جنگل‌زدایی آمازون در برزیل، عمدتا برای اهداف کشاورزی، به‌طور قابل‌توجهی در تغییرات آب‌وهوا نقش دارد (Ahima, 2020; McMichael & Lindgren, 2011). تغییرات آب و هوایی باعث ایجاد انبوهی از عوارض جانبی برای محیط فیزیکی سیاره زمین و موجودات زنده روی کره زمین می‌شود. تمام تغییرات در سیاره فیزیکی محیط زمین بر زندگی گیاهان، حیوانات و انسان تأثیر می‌گذارد. آبسنگ‌های مرجانی، جنگل‌ها و جوامع دریایی و انسانی سواحل به‌ویژه در برابر تغییرات آب و هوایی آسیب‌پذیر بیشتری دارند. برخی از تأثیرات تغییر اقلیم ممکن است از طریق افزایش حساسیت به آلودگی شیمیایی باشد (Jensen et al. 2018; Liang et al. 2017). اقلیم بیانگر متوسط درازمدت پارامترهای هواشناسی نظیر دما، رطوبت و بارندگی در یک منطقه می‌باشد و کلیه موجودات زنده در محیط زیست خود تحت تاثیر عوامل اقلیمی قرار می‌گیرند و از عوامل اقلیمی متأثر می‌شوند. شرایط اقلیمی در طول زمان و مکان متغیرند و موجودات زنده نسبت به این تغییرات واکنش‌های متفاوتی از خود نشان می‌دهند و گاهی اوقات با این تغییرات همسو می‌شوند. رشد، بقا، تولید مثل و تمامی اعمال حیاتی جانوران تابعی از شرایط اقلیمی منطقه است و شرایط اقلیمی تعیین کننده نوع گونه‌های جانوری منطقه می‌باشد. یکی از جنبه‌های مهم اقلیم، تغییرات اقلیمی می‌باشد و در صورت تغییر شرایط اقلیمی منطقه ممکن است سه حالت برای افراد یک جمعیت اتفاق بیفتد که عبارتند از: مهاجرت به سایر مکان‌ها، سازگاری تکاملی و انقراض. البته تغییرات اقلیمی تاثیر زیادی بر نحوه زندگی، میزان مهیایی مواد غذایی، شاخص‌های زیستگاهی، بقا و تولید مثل در گونه‌های جانوری دارد و جانوران را با چالش‌ها و استرس‌های زیادی روبرو می‌سازد (عباسی بیرگانی، ۱۳۹۵).

گرم شدن اخیر بسیاری از گونه‌های خشکی و آب شیرین را به سمت قطب و به سمت ارتفاعات بالاتر سوق داده است. سطح بالاتر CO_2 در جو و یک فصل رشد طولانی منجر به سبز شدن کره زمین شده است، درحالی‌که موج‌های گرما و خشک‌سالی باعث کاهش بهره‌وری اکوسیستم در برخی مناطق شده است (Froehlich et al. 2018). توازن آینده این تأثیرات مخالف مشخص نیست. تغییرات آب‌وهوا به گسترش مناطق آب و هوایی خشک تر مانند گسترش بیابان‌ها در مناطق نیمه گرمسیری کمک کرده است. اندازه و سرعت گرم شدن کره زمین تغییرات ناگهانی را در اکوسیستم‌ها محتمل می‌کند. به‌طور کلی، انتظار می‌رود که تغییرات آب و هوایی منجر به انقراض بسیاری از گونه‌ها شود (Hollowed et al. 2014).

تاثیر تغییرات اقلیم بر محیط آبی و آبزیان

اقیانوس‌ها با سرعت کمتری نسبت به خشکی گرم شده‌اند؛ اما گیاهان و حیوانات در اقیانوس سریع‌تر از گونه‌های روی خشکی به سمت قطب مهاجرت کرده اند. امواج گرما در اقیانوس به دلیل تغییر آب‌وهوا بیشتر اتفاق می‌افتد و اثرات مضر آن روی طیف وسیعی از ارگانیسم‌ها مانند مرجان ها، جلبک دریایی و پرندگان دریایی و بسیاری از آبزیان دیگر پستانداران دریایی و لاک‌پشت‌ها دیده می‌شود. اسیدی شدن اقیانوس بر ارگانیسم‌هایی که پوسته و اسکلت تولید می‌کنند، مانند صدف‌ها و آبسنگ‌های مرجانی تاثیر مخربی دارد. آبسنگ‌های مرجانی شاهد سفید شدگی و نابودی گسترده‌ای پس از امواج گرما بوده اند. شکوفایی جلبک‌های مضر که با تغییرات آب و هوایی و یوتروفیکاسیون افزایش می‌یابد باعث کمبود اکسیژن، ایجاد اختلال در شبکه‌های غذایی و مرگ‌ومیر گسترده در دریای بزرگ می‌شود. اکوسیستم‌های ساحلی تحت تنش خاصی قرار دارند، تقریباً نیمی از تالاب‌ها به عنوان یک نتیجه از تغییرات آب‌وهوا و سایر اثرات انسانی ناپدید شده‌اند (ICPP, 2019). تغییرات آب و هوایی باعث افزایش سطح دریاها می‌شود. سطح دریا به دنبال افزایش حجم آب موجود در اقیانوس با گرم شدن و گسترش آب یا افزایش جرم آب در اقیانوس عمدتاً به دلیل ذوب شدن یخچال‌های طبیعی افزایش می‌یابد. از سال ۱۹۰۰، میانگین سطح جهانی دریا تقریباً ۰.۲ متر افزایش یافته است (Hsiang et al. 2018). تا سال ۲۱۰۰، بر اساس سناریوهای مختلف انتشار، پیش‌بینی می‌شود سطح دریا بین ۰/۴ تا ۱/۵ متر افزایش یابد. افزایش سطح دریا منجر به ناپدید شدن برخی از جزایر و طغیان با حمله به شهرها توسط آب، منجر به بی‌خانمانی و جابجایی جمعیت خواهد شد (Vineis et al. 2016). آب‌شور اقیانوس، گیاهان و حیوانات بومی را به چالش می‌کشد تا با شرایط متغیر سازگار شوند. برای انسان، باعث شور شدن منابع آب شیرین و از بین رفتن مزارع تولیدی می‌شود. کشورهای کم درآمد (به عنوان مثال، بنگلادش) به‌ویژه تحت تأثیر قرار می‌گیرند (Vineis et al. 2016). اقیانوس بیشترین محیط زندگی را در سیاره زمین فراهم می‌کند. فراوانی دی‌اکسید کربن در جو باعث اسیدی شدن آب‌های سطحی اقیانوس‌ها می‌شود؛ زیرا مقداری دی‌اکسید کربن در آب اقیانوس‌ها حل می‌شود و اسیدکربنیک تشکیل می‌شود. اسیدی شدن اقیانوس می‌تواند اکوسیستم‌های دریایی را با آسیب به آبسنگ‌های مرجانی، ماهی‌ها و سایر گونه‌های آبزی تغییر دهد (Hoegh-Guldberg et al. 2017).

اکوسیستم‌های آبی اجزای حیاتی محیط جهانی هستند. آن‌ها علاوه بر اینکه به تنوع زیستی و بهره‌وری اکولوژیکی کمک می‌کنند، خدمات متنوعی را برای جمعیت انسانی شامل آب برای شرب و آبیاری، فرصت‌های تفریحی و زیستگاه برای شیلات اقتصادی مهم ارائه می‌دهند. بااین‌حال، سیستم‌های آبزی به‌طور مستقیم و غیرمستقیم، توسط فعالیت‌های انسانی تهدید شده‌اند. علاوه بر چالش‌های ناشی از تغییر کاربری اراضی، آلودگی محیط‌زیست و انحراف آب، انتظار می‌رود سیستم‌های آبزی به‌زودی تجربه فشارهای اضافی ناشی از تغییرات آب و هوایی جهانی را داشته باشند (Morrongiello et al. 2012). افزایش دمای آب در نتیجه تغییرات آب و هوایی روندهای اساسی زیست محیطی و توزیع جغرافیایی گونه‌های آبزی را تغییر می‌دهد. اگر گونه‌ها سعی کنند با مهاجرت به زیستگاه مناسب سازگار شوند، ممکن است چنین اثراتی بهبود یابد. بااین‌حال، تغییر دالان‌های مهاجر احتمالی توسط انسان ممکن است توانایی جابجایی گونه‌ها را محدود کند که احتمال انقراض گونه‌ها و از بین رفتن تنوع زیستی را افزایش دهد (Benjankar et al. 2018). تغییر در الگوی فصلی بارش و رواناب ویژگی‌های هیدرولوژیکی سیستم‌های آبزی را تغییر می‌دهد و بر ترکیب گونه‌ها و

بهره‌وری اکوسیستم تأثیر می‌گذارد. جمعیت موجودات آبزی به تغییر در فراوانی، مدت‌زمان و زمان وقوع حوادث شدید بارشی، مانند سیل یا خشک‌سالی حساس هستند. تغییر در زمان فصلی ذوب برف جریان‌ها را تغییر می‌دهد و به‌طور بالقوه در تولیدمثل بسیاری از گونه‌های آبزی تداخل ایجاد می‌کند (Kernan, 2015). تغییرات آب و هوایی احتمالاً به تنش‌های حساس به آب شیرین و تالاب‌های ساحلی که قبلاً تحت تأثیر تأثیرات مختلف انسانی دیگر قرار گرفته اند، نظیر رژیم‌های جریان تغییر یافته و افت کیفیت آب، بیشتر فشار می‌آورد. تالاب‌ها زیستگاه حیاتی بسیاری از گونه‌ها هستند که برای سایر شرایط محیطی سازگاری کمی دارند و به‌عنوان اجزای مهم شیلات ساحلی و دریایی عمل می‌کنند (Dwire et al. 2018). اکوسیستم‌های آبی توانایی محدودی در سازگاری با تغییرات آب و هوایی دارند. کاهش احتمال تأثیرات چشمگیر بر این سیستم‌ها به شدت وابسته به فعالیت‌های انسانی است که سایر منابع تنش اکوسیستم را کاهش داده و ظرفیت سازگاری را افزایش می‌دهد. این موارد شامل نگهداری از جنگل‌های ساحلی، کاهش بارگذاری مواد مغذی، بازیابی اکوسیستم‌های آسیب‌دیده، به حداقل رساندن برداشت آب‌های زیرزمینی و قرار دادن مخازن جدید به‌منظور کاهش اثرات سوء استراتژیک است (Helbig et al. 2017). تغییرات آب و هوایی به بزرگی پیش‌بینی شده برای ایالات متحده طی ۱۰۰ سال آینده باعث تغییرات قابل توجهی در رژیم‌های دما و الگوهای بارش در سراسر ایالات‌متحده خواهد شد. چنین تغییراتی در آب‌وهوا خطرات جدی برای اکوسیستم‌های آب شیرین داخلی (دریاچه‌ها، جویبارها، رودخانه‌ها، تالاب‌ها) و تالاب‌های ساحلی به وجود می‌آورد و ممکن است بر خدمات بی‌شماری که به جمعیت انسانی ارائه می‌دهند تأثیر منفی بگذارد (Salimi et al. 2021).

فعالیت‌های ساحلی و اقیانوس‌ها، مانند حمل‌ونقل دریایی کالا، حفاری انرژی در دریا، استخراج منابع، پرورش ماهی، محل تولیدمثل و زندگی آبزیان و گونه‌های حساس تفریح و گردشگری را تشکیل می‌دهند. مناطق ساحلی همچنین زیستگاه گونه‌های حساس و زیستگاه‌هایی است که فواید بسیاری برای جامعه و اکوسیستم‌های طبیعی فراهم می‌کند (He & Silliman, 2019). تغییرات آب و هوایی می‌تواند از طرق مختلف مناطق ساحلی را تحت تأثیر قرار دهد. سواحل به افزایش سطح دریا، تغییر در فراوانی و شدت طوفان، افزایش بارندگی و دمای گرم‌تر اقیانوس حساس هستند. علاوه بر این، افزایش غلظت‌های دی‌اکسید کربن در اتمسفر باعث جذب بیشتر گاز و اسیدی شدن اقیانوس‌ها می‌شود. این افزایش اسیدیته می‌تواند تأثیرات مخربی بر اکوسیستم‌های ساحلی و دریایی بگذارد (Ahmed et al. 2017). گرم شدن آب‌های ساحلی باعث می‌شود تا زیستگاه‌های مناسب گونه‌های حساس به دما به سمت قطب تغییر مسیر دهند (Savo et al. 2017). تغییرات دما در اکوسیستم‌های ساحلی و دریایی بر متابولیسم ارگانیسم‌ها تأثیر می‌گذارد و فرآیندهای اکولوژیکی مانند بهره‌وری و فعل‌وانفعالات گونه‌ها را تغییر می‌دهد. گونه‌ها با دامنه‌های خاص دمای محیط سازگار هستند. با تغییر دما، توزیع‌های جغرافیایی گونه‌ها گسترش می‌یابد و ترکیبات جدیدی از گونه‌ها ایجاد می‌شود که به طرق غیرقابل‌پیش‌بینی برهم‌کنش می‌کنند. گونه‌هایی که قادر به مهاجرت یا رقابت با سایر گونه‌ها برای منابع نیستند، ممکن است با انقراض محلی یا جهانی روبرو شوند (Carr et al. 2017). تغییرات آب و هوایی احتمالاً باعث تغییر الگوهای گردش باد و آب در محیط اقیانوس می‌شود. چنین تغییراتی ممکن است بر حرکت عمودی آب‌های اقیانوس تأثیر بگذارد، میزان دسترسی به مواد مغذی و اکسیژن ضروری را برای موجودات دریایی افزایش یا کاهش دهدند. تغییر در الگوهای گردش اقیانوس همچنین می‌تواند باعث تغییرات قابل‌توجهی در دمای منطقه اقیانوس و زمین و توزیع جغرافیایی گونه‌های دریایی شود (Taillardat et al. 2018).

تغییر آب‌وهوا می‌تواند باعث تخریب یا از بین رفتن زیستگاه چندین گونه حساس و مهم مانند خرس‌های قطبی، کوالاها، پرندگان و لاک‌پشت‌های دریایی شود. خرس‌های قطبی به یخ دریا وابسته هستند. افزایش دما باعث ذوب شدن یخ‌های دریای قطب شمال شده و به زیستگاه خرس‌های قطبی آسیب می‌رساند. کوآلا به درخت اکالیپتوس وابسته است. افزایش دما و خشکسالی باعث آتش‌سوزی شده و زیستگاه کوالاها را از بین می‌برد. دریاچه ارومیه (ایران) یک زیستگاه پرندگان است و در گذشته مقصد محبوب گردشگری بوده است. این دریاچه به دلیل تغییرات آب و هوایی در حال خشک شدن است. جوجه ریزی لاک‌پشت‌ها به دما بستگی دارد که افزایش دما باعث کاهش نرخ تولیدمثلی و انقراض در آن‌ها می‌شود (Narayan & Williams, 2016).

تاثیر گرمایش جهانی بر لاکپشت‌های دریایی

لاک‌پشت‌های دریایی در تمام مراحل زندگی، از تخم تا جوجه‌کشی گرفته تا نوجوانی و بزرگ‌سال، در معرض آلودگی اقیانوس‌ها هستند. آلاینده‌ها شامل مواردی مانند فلزات سمی، فرآورده‌های نفتی و رواناب‌های کشاورزی و صنعتی آلاینده‌ها مانند کودها، مواد شیمیایی، مواد مغذی و ضایعات تصفیه نشده هستند؛ بنابراین لاکپشت‌ها در تمامی مراحل زندگی نسبت به‌تمامی تغییرات محیط حساس هستند (Jacobs & Miller, 2019). استرالیا ازلحاظ زیست‌محیطی دارای جمعیت قابل‌توجهی از لاک‌پشت‌های دریایی است که برای صنعت گردشگری نیز ارزشمند است. برخی از آن‌ها زندگی خود را در استرالیا ادامه می‌دهند، درحالی‌که دیگران فقط در اینجا لانه می‌کنند. برخی از جمعیت لاک‌پشت‌های دریایی سواحل تودرتو در استرالیا در سطح جهانی قابل‌توجه هستند. این جمعیت از بزرگ‌ترین جمعیت جهان هستند (Bentley, 2018). افزایش دمای سطح دریا باعث ایجاد محیط پرتنش‌تری برای لاک‌پشت‌های دریایی می‌شود، اما ثابت‌شده که افزایش دمای شن و ماسه حتی مضرتر است. پیش‌بینی می‌شود تغییرات آب و هوایی از چند طریق و در تمام مراحل زندگی بر لاک‌پشت‌ها تأثیر بگذارد. بیشترین تأثیرات قابل‌تشخیص در بخشی از زندگی لاک‌پشت‌هایشان در تولیدمثل زمین اتفاق می‌افتد: تخم‌گذاری، جوجه‌کشی تخم و مراحل موفقیت جوجه ریزی. اثرات قابل‌توجه افزایش دما، افزایش سطح دریا و فعالیت سیکلونیک بر روی مکان‌های لانه‌سازی لاک‌پشت‌های دریایی و میزان تولید مثلی آن‌ها وجود دارد (Almpanidou et al. 2018).

گرم شدن کره زمین به طرز غیرقابل‌اجتنابی در حال پیشرفت است، افزایش دما باعث تغییرات آب و هوایی با تأثیرات منفی بر روی هرگونه از جمله انسان می‌شود. انتظار می‌رود تا سال ۲۰۳۰، درجه حرارت ۲ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با مقادیر پیش از صنعتی افزایش یابد. ازجمله گونه‌های زنده که تحت تأثیر قرار گرفته‌اند، خزندگان هستند که مشهورترین و مورد مطالعه‌ترین نمونه آن مربوط به لاک‌پشت‌های دریایی است. اینها با دمای محیط پیوند دارند که در هر مرحله از چرخه زندگی، ازجمله جوجه ریزی، آن‌ها تأثیر می‌گذارد. از زمان کشف ذخایر نفتی در قرن بیستم، جمعیت لاک‌پشت‌ها در خلیج‌فارس تحت فشارهای فزاینده‌ای قرار داشته اند. از آن زمان این منطقه رشد قابل توجهی در جمعیت انسانی و توسعه بی‌نظیر صنعتی و تجاری را تجربه کرده و زیستگاه‌های اصلی تغذیه‌ای لاک‌پشت‌ها تحت تاثیر این فعالیت‌ها تخریب شده‌اند. داده‌ها در مورد این مرحله غالب چرخه‌های زنده لاک‌پشت برای تعیین اینکه چگونه جمعیت لاک‌پشت تحت تأثیر تنش‌های مختلف طبیعی (به‌عنوان‌مثال تغییر آب‌وهوا) و انسانی (به‌عنوان‌مثال فشار شیلات) قرار دارند، حیاتی هستند. متأسفانه، هیچ اطلاعاتی در مورد نسبت جنسیت در طبیعت یا پویایی جمعیت لاک‌پشت‌ها با توجه به رشد، بقا و نسبت جنسیت منتشر نشده است. مطالعات روی لاک‌پشت‌ها در مناطق علف دریایی می‌تواند عوامل مهمی را در

سلامتی جمعیت‌های تولیدمثل نشان دهد و می‌توان از آن‌ها به عنوان سیستم‌های هشدار سریع در مورد وضعیت جمعیت استفاده کرد (Pilcher, 2018). علاوه بر تنش‌های ناشی از زیستگاه‌های تخریب شده ساحلی و محدودیت‌های مواد مغذی، لاک‌پشت‌های خلیج‌فارس در برابر نوسانات سریع دما از درجه حرارت کشنده بالا (تا ۳۵ درجه سانتیگراد) در ماه‌های تابستان و دمای پایین (۱۵ درجه سانتیگراد) در ماه‌های زمستان در حد شمالی دامنه خود هستند. داده‌های محدود دمای انکوباسیون نیز حاکی از آن است که تخم‌های موجود در منطقه در دمای بالاتر از ۳۴ درجه سانتی‌گراد و در منتهی الیه بالاتر از تحمل حرارتی رشد می‌کنند (Pilcher, 2018). افزایش دمای شن و ماسه همچنین با تغییر در نسبت‌های جنسیت طبیعی، جوجه‌های دریایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد، درحالی‌که درجه حرارت گرم‌تر جوجه‌های ماده بیشتری تولید می‌کند. مطالعه‌ای که اخیراً در استرالیا انجام‌شده نشان می‌دهد ۹۹٪ لاک‌پشت‌های سبز دریایی در اطراف جزیره Raine ماده هستند (Dunstan et al. 2020).

همه این تهدیدات لاک‌پشت‌های دریایی می‌تواند تأثیرات مخربی بر جمعیت آن‌ها داشته باشد. تحقیقات مختلف افزایش انقراض جمعیت لاک‌پشت‌های دریایی را بیان کرده‌اند و بیشتر گونه‌های لاک‌پشت دریایی از قبل در لیست گونه‌های در معرض خطر انقراض قرار دارند. با توجه به اینکه لاک‌پشت‌های دریایی با تهدیدات زیادی روبرو هستند، یافتن تکنیک‌های مدیریتی برای مقابله با این مسائل دشوارتر می‌شود (Fuentes et al. 2010). برخی از استراتژی‌های ساده‌تر با زیستگاه لاک‌پشت دریایی در خشکی سروکار دارند، زیرا مدیریت سواحل از اقیانوس باز آسان‌تر است. ازآنجاکه لاک‌پشت‌های دریایی برای لانه‌سازی به سواحل خاصی اعتماد می‌کنند، محافظت از این مناطق برای حفظ زیستگاه لانه‌سازی آن‌ها امکان‌پذیر است (Fuentes et al. 2010). پروژه‌های حفاظت از سواحل تخم‌ریزی لاک‌پشت‌ها در بسیاری از مناطق ساحلی، جایی که سایت‌های لانه‌سازی برای استفاده عمومی مسدود شده است، اجراشده است. بعلاوه، بسیاری از مناطق ساحلی مقرراتی برای کنترل روشنایی شبانه در نزدیکی سواحل تودرتو nesting areas دارند بنابراین نوزادن لاک‌پشت دریایی شانس بیشتری برای رسیدن به اقیانوس دارند. با محافظت از این مناطق مهم تودرتو، لاک‌پشت‌های دریایی قادر خواهند بود با خیال راحت تخم‌گذاری کنند و تعداد جوجه‌های بیشتری تا بزرگ‌سالی زنده بمانند. این امر منجر به افزایش جمعیت لاک‌پشت‌های دریایی می‌شود، بنابراین از کاهش سریع‌تر تعداد آن‌ها جلوگیری می‌کند (Cavallo et al. 2015).

پروژه‌های تحقیقاتی در حال انجام برای تعیین چگونگی تأثیر تغییرات آب و هوایی به‌طور مستقیم بر لاک‌پشت‌های دریایی و بهترین گزینه‌های سیاست برای مبارزه با این اثرات وجود دارد. این مطالعات بسیار مهم هستند؛ زیرا اطلاعات کمی در مورد چگونگی محافظت ازاین گونه‌ها در برابر اثرات تغییر اقلیم وجود دارد. میانگین دمای سطح کره زمین در قرن گذشته تقریباً ۰/۶ درجه سانتی‌گراد گرم شده است و مدل‌سازی برای تغییرات آب و هوایی در ۱۰۰ سال آینده گرم شدن سریع‌تر را پیش‌بینی می‌کند (Pilcher, 2018). طی چهل سال گذشته، سطح دریا به‌طور متوسط هرسال ۲ میلی‌متر افزایش‌یافته است (Butt et al. 2010). با ذوب شدن یخ و گرم شدن اقیانوس‌ها تحت تاثیر تغییرات آب و هوایی، سطح دریا افزایش می‌یابد. پیش‌بینی‌های افزایش سطح دریا برای پایان قرن ۲۱ از ۰/۱۸ تا ۰/۵۹ متر است. حتی یک افزایش ناچیز در سطح دریا می‌تواند منجر به از دست رفتن زیاد زیستگاه لانه‌سازی موجودات در سواحل شود (Perez et al. 2016). طبیعت بسیار مهاجر لاک‌پشت‌ها و توانایی آن‌ها در جابجایی فواصل قابل‌توجه در مدت‌زمان کوتاه باید مقاومت آن‌ها را در برابر تغییرات آب و هوایی افزایش دهد. بااین‌حال، هرگونه تاب‌آوری لاک‌پشت‌های دریایی در برابر تغییرات آب و هوایی احتمالاً توسط فعالیت‌های انسانی به‌شدت تحت تأثیر قرار خواهد گرفت (Poloczanska et al. 2009).

تاثیر گرمایش جهانی بر جنسیت و تولید مثل لاکپشت

لاک‌پشت‌های دریایی یک مشکل اساسی در برابر تغییرات آب و هوایی دارند؛ زیرا جنسیت آن‌ها توسط دما تعیین می‌شود. جنسیت جوجه‌کشی لاک‌پشت دریایی تحت تأثیر دمای ماسه‌ای است که تخم‌ها در آن رشد می‌کنند. در واقع، جنسیت جنین‌ها تا حدی توسط دمای محیط تعیین می‌شود. تغییر آب‌وهوا می‌تواند باعث افزایش دما شود. دمای بالاتر باعث گرم شدن شن ماسه می‌شود و منجر به افزایش تعداد جوجه ریزی به ماده می‌شود. اگر لاک‌پشت‌های دریایی نتوانند خود را با تغییرات دمای محوری سازگار کنند (بالاتر از آن ماده‌ها تولید می‌شوند و زیر آن نرها تولید می‌شوند)، این می‌تواند برای لاک‌پشت در سال‌های آینده عواقب قابل‌توجهی داشته باشد (Pilcher, 2018). تخمین زده شده است که افزایش ۲ درجه سانتی‌گراد منجر به ۹۹/۸۶٪ میزان جوجه ریزی زنانه خواهد شد. این امر، منجر به یک نسبت جنسیتی بسیار ناپایدار در جمعیت لاک‌پشت‌های دریایی، کاهش بیشتر تولیدمثلی و اندازه جمعیت خواهد شد (Butt et al. 2016). افزایش سطح دریا از تهدیدهای اصلی دیگر تغییرات آب و هوایی برای لاک‌پشت‌های دریایی است. یکی از عمده‌ترین تأثیرات تغییر اقلیم، افزایش دمای هوا است که با افزایش دمای سطح دریا ارتباط دارد. این تنش گرمایی بیش‌ازحد عواقب منفی را برای خزندگان که حیوانات خونسردی هستند و برای تنظیم دمای داخلی خود به دمای محیط خارجی متکی هستند، دارد (Perez et al. 2016). جنسیت جوجه ریزی جوجه‌های لاک‌پشت دریایی، موفقیت جوجه ریزی و کیفیت جوجه ریزی توسط دمای انکوباسیون تعیین می‌شود. جوجه‌کشی موفقیت‌آمیز تخم‌های لاک‌پشت دریایی در محدوده محدودی انجام می‌شود: ۲۵ تا ۳۳ درجه سانتی گراد. جوجه‌کشی بالاتر از آستانه حرارتی منجر به نوزادانی می‌شود که ناهنجاری‌های جسمی بیشتری داشته و موفقیت جوجه ریزی در آن‌ها کمتر باشد (Almpanidou et al. 2019). دمای شن و ماسه بالاتر حتی افزایش اندک همچنین منجر به جوجه‌کشی کوتاه‌تر می‌شود که باعث کاهش اندازه و جرم بدن جوان می‌شود. این احتمال وجود دارد که اندازه کوچک‌تر بدن، شانس زنده ماندن جوجه‌ها را کاهش می‌دهد، زیرا برخی از مطالعات نشان می‌دهد که فرزندان کوچک‌تر هنگام عبور از صخره، بیشتر خورده می‌شوند (Tanner et al. 2019).

افزایش دمای ساحل تودرتو نیز بر لاک‌پشت‌های دریایی تأثیر خواهد داشت. ازآنجاکه لاک‌پشت‌های دریایی خزنده هستند، برای تعیین جنسیت جوجه ریزی در لانه، به دمای ماسه‌ای که تخم‌ها در آن جوجه می‌زنند، اعتماد می‌کنند. به‌طور معمول، تخم‌های موجود در قسمت پایین، خنک و آشیانه نر تبدیل به نر می‌شوند، درحالی‌که تخم‌ها در قسمت بالایی، گرم‌تر و لانه ماده می‌شوند (Patrício et al. 2017). با افزایش درجه حرارت لانه، دانشمندان پیش‌بینی می‌کنند تعداد جوجه‌های جوجه‌کشی ماده بیشتر باشد که تهدید قابل‌توجهی برای تنوع ژنتیکی لاک‌پشت‌ها خواهد بود و این عامل به‌نوبه خود باعث کاهش نرخ باروری در آینده و انقراض لاک‌پشت خواهد شد (Rivas et al. 2019).

بنابراین استراتژی‌های حفاظت از تنوع زیستی باید به آینده نگاه کنند و برای نتایج بالقوه در طیف وسیعی از تغییرات احتمالی در آب‌وهوای جهانی، منطقه‌ای و محلی برنامه‌ریزی کنند، اما پیش‌بینی واکنش گونه‌ها نسبت به تغییرات آب و هوایی با توجه به بازه‌های زمانی و شیب دما مشکل‌ساز است.

تاثیر گرمایش جهانی بر زیستگاه و تغذیه لاک‌پشت‌های دریایی

ازآنجاکه لاک‌پشت‌های دریایی در طول چرخه زندگی خود از زیستگاه‌های دریایی و خشکی استفاده می‌کنند، تغییرات آب و هوایی تأثیرات مخربی بر روی این گونه‌های در معرض خطر دارد (Almpanidou et al. 2019). افزایش سطح دریا سواحل لانه‌سازی لاک‌پشت‌های دریایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. حافظه لاک‌پشت‌های دریایی با یک نقشه مغناطیسی از ساحل شنی که در آن بیرون می‌روند، نقش بسته است که این توانایی منحصربه‌فرد را به آن‌ها می‌دهد که ده‌ها سال بعد برای تکرار آئین لانه‌سازی قدیمی خود به همان مکان برگردند. با ذوب شدن یخ‌های قطبی و بالا آمدن سطح دریا، این سواحل شروع به ناپدید شدن می‌کنند (Palomino et al. 2020). تغییرات آب و هوایی جریان‌های اقیانوسی (بزرگراه‌هایی که لاک‌پشت‌های دریایی از آن‌ها برای مهاجرت استفاده می‌کنند) را تغییر می‌دهد. با تغییر در گردش جریانات اقیانوسی، لاک‌پشت‌های دریایی ممکن است مجبور شوند حرکات خود را تغییر دهند و احتمالاً دامنه و زمان لانه‌سازی آن‌ها تغییر می‌کند (Perez et al. 2016).

اثرات مستقیم افزایش سطح دریا شامل از دست دادن سواحل، تالاب‌های سازگار با محیط‌زیست و ریف‌های بزرگ است. اثرات گرم شدن کره زمین تأثیرات زیادی بر لاک‌پشت‌های دریایی و سایر حیوانات وحشی دارد. سرعت گرم شدن کره زمین بسیار بیشتر از توانایی حیوانات در انطباق طبیعی با چنین تغییرات چشمگیر محیطی است. افزایش سطح دریا از ذوب شدن یخ‌های قطبی در حال حاضر به از دست دادن زیستگاه لانه‌سازی ساحل و لاک‌پشت دریایی کمک می‌کند (Santidrián & Spotila, 2020). شدت آب‌وهوا، همچنین به تغییرات آب و هوایی مرتبط است، به معنی طوفان‌های مکرر و شدیدتر است که سواحل لانه‌سازی را تغییر می‌دهد، باعث فرسایش ساحل و طغیان می‌شود که لانه‌های لاک‌پشت دریایی را نابود می‌کند. شن و ماسه گرم‌تر از افزایش دما منجر به کاهش میزان جوجه ریزی یا خرابی کامل لانه می‌شود (Almpanidou et al. 2018). لاک‌پشت‌های دریایی برای سفر و یافتن طعمه از جریان‌های اقیانوس استفاده می‌کنند. گرم شدن دمای اقیانوس‌ها با تغییر جریان و تأثیر بر توزیع و فراوانی گونه‌های طعمه، گونه‌های مهاجر را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این می‌تواند منجر به یافتن گونه‌های جنوبی در مناطق شمالی‌تر و خارج از محدوده طبیعی خود شود. دمای آب گرم‌تر نیز از طریق سفید شدن مرجان‌ها که برای بقای گونه‌هایی مانند لاک‌پشت منقاردار حیاتی است، بر آبسنگ‌های مرجانی تأثیر می‌گذارد (Miller, 2017). ازآنجاکه لاک‌پشت‌های دریایی در سواحل تخم‌ریزی می‌کنند، اما زندگی خود را در اقیانوس می‌گذرانند، تحت تأثیر تغییر اقلیم در هر دو جبهه قرار می‌گیرند. علاوه بر این، تغییرات آب و هوایی ممکن است بر بقای لاک‌پشت‌های نوجوان دریایی تأثیر بگذارد و تعداد جمعیت بزرگ‌سالان را کاهش دهد. ازآنجاکه لاک‌پشت‌های دریایی می‌توانند به طور گسترده تحت تأثیر تأثیرات تغییرات آب و هوایی قرار بگیرند، لازم است اقدامات حفاظتی برای آن‌ها انجام شود (Butt et al. 2016).

تغییرات آب و هوایی می‌تواند لاک‌پشت‌های دریایی را به طرق مختلف تحت تأثیر قرار دهد. گرم شدن بیش‌ازحد دریاها تهدیدی برای زیستگاه‌های حیاتی لاک‌پشت‌های دریایی و منابع غذایی، مانند آبسنگ‌های مرجانی است (Pilcher et al., 2020). دمای سردتر اقیانوس‌ها با بهره‌وری بالاتر همراه است، بنابراین غذای بیشتری برای بسیاری از ارگانیسم‌ها ازجمله لاک‌پشت‌های دریایی فراهم

می‌کند (Schofield et al., 2017). اقیانوس‌های گرم‌تر و مواد غذایی کمتر موجود منجر به کاهش فعالیت لانه‌سازی و تولد لاک‌پشت‌های دریایی کمتر می‌شود. این تأثیرات در برخی از جمعیت‌ها تحت نظارت به‌عنوان مثال در اقیانوس آرام غربی و اقیانوس اطلس غربی قرارگرفته است (Hays et al. 2018). دمای هوای گرم اقیانوس بر منابع غذایی لاک‌پشت‌های دریایی و تقریباً همه گونه‌های دریایی تأثیر منفی بگذارد. صخره‌های مرجانی که منبع غذایی مهمی برای لاک‌پشت‌های دریایی هستند، بسیار در معرض خطر قرار دارند. تقریبا نیمی از اکوسیستم‌های صخره‌های مرجانی در سطح جهان در وضعیت نامناسب قرار دارند. درنتیجه افزایش دما، صخره‌های مرجانی از یک اثر «سفید شدگی» رنج می‌برند که باعث از بین رفتن قسمت‌های آبسنگ می‌شود (Miller, 2017). دمای هوای گرم اقیانوس بر منابع غذایی لاک‌پشت‌های دریایی و تقریباً همه گونه‌های دریایی تأثیر منفی می‌گذارد (Serra, 2020). آبسنگ‌های مرجانی که منبع غذایی مهمی برای لاک‌پشت‌های دریایی هستند، بسیار در معرض خطرات تغییرات اقلیمی قرار دارند (Fernandes et al. 2017). تقریبا نیمی از اکوسیستم‌های مرجانی در جهان در وضعیت نامناسب قرار دارند. در نتیجه افزایش دما، آبسنگ‌های مرجانی از یک پدیده «سفید شدگی» رنج می‌برند که باعث از بین رفتن قسمت‌های گسترده‌ای از آبسنگ‌ها می‌شود (Spalding & Brown, 2015). از سال ۲۰۰۵، منطقه کارائیب ۵۰ درصد از مرجانهای خود را به دلیل افزایش دمای دریا ازدست‌داده است. تخمین زده می‌شود که فقط از سال ۱۹۹۷ تا ۱۹۹۸، سفید شدن دسته جمعی باعث مرگ و میر جدی ۱۶ درصد از آبسنگ‌های مرجانی در جهان شده است. درحالی‌که علائم قوی بهبودی در برخی از مناطق مشاهده شده است، بهبودی کامل بسیاری از آن‌ها دهه‌ها طول می‌کشد (Mumby et al. 2011). از سال ۲۰۰۵، منطقه کارائیب ۵۰ درصد از مرجان‌های خود را از دست داده است، بیشتر به دلیل افزایش دمای دریا. تخمین زده می شود که فقط از سال ۱۹۹۷ تا ۱۹۹۸، سفید شدن دسته جمعی باعث مرگ و میر جدی ۱۶ درصد از صخره های مرجانی در جهان شده است. درحالی‌که علائم قوی بهبودی در برخی از مناطق مشاهده‌شده است، بهبودی بسیاری از آن‌ها دهه‌ها طول می‌کشد (Miller, 2017).

مطالعات مربوط به تاثیر تغییرات اقلیم بر لاک‌پشت‌های دریایی

نتایج یک پژوهش نشان داد که پیش‌بینی می‌شود مکان‌های جغرافیایی زیستگاه مناسب لانه سازی دو نوع لاک پشت دریایی در استرالیا تا پایان قرن حاضر تغییر کند (Butt et al. 2016). برخی از زیستگاه‌های فعلی ممکن است به دلیل دمای بیش‌ازحد برای تولیدمثل نامناسب شوند و بسیاری از زیستگاه‌ها نیز تحت تاثیر افزایش سطح دریا توسط طغیان و سیل تخریب شوند (Butt et al. 2016). به‌طور کلی، سواحل لانه‌سازی لاک‌پشت منقاری در جزیره Queensland ازنظر خطر سیلاب مقاوم‌ترین در برابر تغییرات آب و هوایی هستند (Humber et al. 2014). تغییرات آب و هوایی تأثیرات متفاوتی در مناطق مختلف خواهد داشت. پیش‌بینی می‌شود که موفقیت جوجه ریزی برای لاک‌پشت‌های loggerhead در بخش گرم‌تر دامنه زیست خود کاهش یابد. درحالی‌که در مناطق لانه‌سازی خنک‌تر، موفقیت بالایی در جوجه ریزی داشته اند؛ بنابراین جمعیت‌هایی که در مکان‌های معتدل در حال حاضر کوچک هستند می‌توانند بزرگ‌تر شوند درحالی‌که جمعیت‌های فعلی در حاشیه با دامنه دمای بالا احتمالاً کاهش می‌یابند (Pike, 2013b). بر اساس نتایج Fuentes و همکاران (۲۰۱۰)، تاثیر افزایش دمای شن و ماسه باعث می‌شود دو برابر بیشتر از افزایش سطح دریا بر تولیدمثلی لاک‌پشت‌های دریایی است. اگرچه این اطلاعات بینش ارزشمندی در مورد تأثیر نسبی هر فرآیند آب و هوایی ارائه می‌دهد،

اما باید با دقت تفسیر شوند. Fuentes و همکاران (۲۰۱۰) دمای شن و ماسه را برای سال ۲۰۷۰ مدل‌سازی کردند و مشخص کردند که مکان‌های تودرتو در ریف‌های بزرگ، دمایی نزدیک به آستانه حرارتی بالایی را تجربه خواهند کرد. طبق دسته‌بندی‌های متخصصان، عواقب این افزایش دما برای لاک‌پشت‌های دریایی بزرگ» تا فاجعه‌بار خواهد بود. Fuentes و همکاران (۲۰۱۰) دریافتند که پیش‌بینی ۰/۷۹ متر افزایش سطح دریا احتمالاً باعث از بین رفتن ۳۸٪ زمین‌های مربوط به لانه‌سازی جمعیت لاک پشته‌ای سبز تا سال ۲۱۰۰ خواهد شد. علاوه بر این، پژوهشگران گزارش دادند که یک ساحل خنک از طریق سایه زنی می‌تواند دمای تخم‌ها را تا چهار برابر کاهش دهد. محققان اثرات این اقدامات ساده حفاظتی را محاسبه کردند دریافتند که این عملیات منجر به تغییر مثبت از نسبت جنسی اولیه زن مایل به یک سمت متعادل در شرایط فعلی می‌شود (Hill et al. 2014; Wood et al. 2014; Esteban et al. 2018). سایه زدن در مقایسه با جابجایی لانه لاک‌پشت‌ها به یک ساحل خنک می‌تواند فواید بسیار بیشتری داشته باشد (Esteban et al. 2018). تخم‌ها و نوزاد لاک‌پشت‌های دریایی در یک محدوده دمایی به نام دامنه انتقالی دما (TRT) زندگی می‌کنند که می‌تواند در بین جمعیت‌های مختلف متفاوت باشد. ۱۰۰٪ نسبت جنسیت مرد و ۱۰۰٪ زن در این محدوده تغییر می‌کنند. به‌طور کلی، تغییر ۳ درجه سانتی‌گراد در TRT می‌تواند منجر به تولید لاک‌پشت‌های دریایی یا تمام نوزادان ماده یا تمام نوزادان نر شود (Sinaei et al. 2018). در این محدوده، دمایی به نام مقدار محوری وجود دارد که در آن نسبت جنسیت ۱: ۱ ایجاد می‌شود. نوع ساحل، فصل، شرایط آب و هوایی، بارندگی یا طوفان، تغییر در وضعیت فیزیکی لانه، مداخله انسان و گونه‌ها چندین عامل مؤثر این مقدار محوری بر هستند (DeGregorio & Williard, 2011). چندین مطالعه در مورد گونه‌های مختلف لاک‌پشت‌های دریایی برای تعیین مقدار محوری انجام‌شده است، بیشتر آن‌ها آن را به‌عنوان دمای بین ۳۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد گزارش کرده اند (Segura & Cajade, 2010; Kaska et al. 1998; Booth & Astill, 2001). در مطالعه Sinaei و همکاران (۲۰۱۸)، دمای محوری لاک‌پشت سبز (Chelonia mydas) در سواحل چابهار را دمای ۲۹.۲ درجه سانتی‌گراد را در نظر گرفتند. آن‌ها بیان کردند که دمای پایین این مقدار نوزادان نر و دمای بالاتر جوجه ریزی غالباً ماده تولید می‌کند. همچنین بیان کردند که به نظر می‌رسد اطراف سوراخ محل تخم‌گذاری به عنوان یک بافر عمل می‌کند و از نوسانات زیاد دما بر نوزاد جلوگیری می‌کند. Hays و همکاران (۲۰۱۱) و Kaska و همکاران (۱۹۹۸) نیز نوسانات دمای پایین را در حفره‌های تخم‌گذاری لاک‌پشت‌های دریای سبز (*C. mydas*) ثبت کردند. Booth و Astill (۲۰۰۱) و Matsuzawa و همکاران (۲۰۰۲) اظهار داشتند که دمای حفره های تخم در حدود ۱ درجه سانتی‌گراد تا ۱/۷ درجه سانتی‌گراد بالاتر از محیط اطراف آن است. این افزایش دما به دلیل فعالیت متابولیکی تخمک و جنین است. تغییرات آب و هوایی سبب افزایش سطح دریا و طغیان و سیل می‌شود که این فرآیند منجر به نوسانات شدید دما و همچنین کاهش زیاد آن می‌شود که باعث تخریب تخم‌ها و کاهش میزان جوجه ریزی می‌شود. عدم پیشرفت در هنگام طغیان را می‌توان عملاً با نوسانات سه متغیر مهم فیزیکی مؤثر بر بقای جنین لاک‌پشت‌های دریایی توضیح داد: محتوای آب، دما و گازهای تنفسی (Caut et al. 2010). دما مهم‌ترین عامل در رشد جنین لاک‌پشت است. کاهش آن به مقدار کمتر از حد نرمال یا مقدار بهینه می‌تواند رشد جنین را متوقف کرده و باعث مرگ شود (Sinaei et al. 2018). لاک‌پشت‌های چرمی در معرض خطر انقراض در شرق اقیانوس آرام نمونه‌های عالی برای ارزیابی تاثیر گرمای زمین‌بر موجودات حساس هستند و حساسیت آن‌ها به تنوع آب و هوایی به‌طور اساسی موردمطالعه قرارگرفته است (Sieg, 2010; Tomillo et al. 2012; Saba et al. 2008). پژوهش انجام‌شده توسط Saba و همکاران (۲۰۱۲) بیان کردند که تغییر در شرایط اقیانوس آرام

تأثیر کمی بر جمعیت لاک‌پشت‌های چرمی داشته است؛ اما گرم شدن ۲/۵ درجه سانتی‌گراد در سواحل عامل اصلی کاهش از طریق کاهش موفقیت‌آمیز در جوجه ریزی و میزان ظهور جوجه ریزی بود. بااین‌حال نسبت جنس تغییر اساسی نکرد. همچنین بیان کردند که تنظیم فنولوژی لانه‌سازی یا تغییر مکان‌های لانه‌سازی ممکن است به‌طور کامل از افت جوجه ریزی جلوگیری نکند؛ اما می‌تواند نرخ افت را جبران کند. نتایج Wright و همکاران (۲۰۱۲) نشان می‌دهد که فواصل باروری نرها ممکن است کوتاه‌تر از ۲ تا ۴ سال معمول برای ماده‌ها باشد. همچنین، بیان کردند که الگوهای جفت‌گیری نرها می‌تواند تحت تاثیر تغییر آب‌وهوا تهدید شود و از بی، بسیاری از آن‌ها به‌طورجدی تهدید می‌شوند. Laloë و همکاران (۲۰۱۴) تخمین زدند که سواحل رنگ روشن در حال حاضر ۷۰/۱۰ درصد ماده تولید می‌کنند؛ درحالی‌که سواحل تیره‌رنگ ۹۳/۴۶ درصد ماده تولید می‌کنند.

علاوه بر تغییرات اقلیمی آلاینده‌های شیمیایی دیگری مثل نفت خام و فلزات سنگین نیز بر رفتار لاک‌پشت‌های دریایی تأثیراتی مخربی دارند. از طریق تأثیر بالقوه بر فرایندهای فیزیولوژیکی و حساس شدن لاک‌پشت‌ها رخ می‌دهند. این عوامل تهدیدی جدی برای وجود و بقای لاک‌پشت‌ها در ایران هستند (Zare & Sinai, 2019). در سال ۱۳۸۸ زارع و رحیمی طی یک تحقیق بیان کردند که هشت گونه از لاک‌پشت‌های دریایی و اقیانوس‌های جهان زیست می‌کنند که دو گونه منقار عقابی و سبز در سواحل خلیج‌فارس اقدام به تخم‌گذاری می‌کنند. لاک‌پشت منقار عقابی که گونه غالب سواحل شمالی خلیج‌فارس به شمار می‌رود، به عنوان گونه‌ای در معرض خطر انقراض معرف شده است. درنهایت مشخص شد که تغییر شکل و تخریب زیستگاه‌ها ، توسعه تجاری سواحل و مسکونی کردن آن‌ها ، گرفتار شدن در تورهای ماهیگیری، شکار شدن توسط انسان‌ها و شکار شدن تخم‌ها و نوزادان از مهم‌ترین عوامل تخریب‌کننده زیستگاه‌های تخم‌گذاری لاک‌پشت‌های دریایی در سواحل شمالی خلیج‌فارس می‌باشند. این عوامل می‌توانند میزان موفقیت تفریخ تخم‌ها را تا حدود زیادی کاهش دهند و لذا طراحی و انجام برنامه‌های حفاظتی- مدیریتی می‌تواند در کاهش این مخاطرات مؤثر باشند.

در ایران خلیج‌فارس جزء گرم‌ترین مناطق دریایی است. در پروژه‌ای به سرپرستی جناب آقای دکتر نیکولاس پیلچر، بنیان‌گذار و مدیرعامل بنیاد تحقیقات دریایی کشور مالزی مطالعه‌ای بر روی حدود ۳۰۰ لاک‌پشت در جزیره قشم صورت گرفت. نتایج مطالعه آن‌ها بیان کرد که نسبت جنسی طبیعی ۱:۱ نزدیک می‌باشد. لذا به نظر می‌رسد لاک‌پشت‌های سبز توانسته‌اند خود را با دماهای بالای منطقه خلیج‌فارس سازگار نمایند (موسسه حفاظت از محیط زیست قشم، ۱۳۹۵) (Fa.qeci.org).

۸. نتیجه‌گیری

شن و ماسه گرم تحت تاثیر افزایش دما منجر به کاهش میزان جوجه ریزی یا نبودی کامل لانه لاک‌پشت‌ها می‌شود. افزایش دمای شن و ماسه نیز با تغییر در نسبت‌های جنسیت طبیعی، جوجه‌های لاک‌پشت‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد و در دمای گرم‌تر تعداد جوجه‌های ماده بیشتری تولید می‌شود. لاک‌پشت‌های دریایی برای مهاجرت و یافتن طعمه از جریان‌های اقیانوس استفاده می‌کنند. گرم شدن دمای اقیانوس‌ها با تغییر جریان و تأثیر بر توزیع و فراوانی گونه‌های طعمه، گونه‌های مهاجر را تحت تأثیر قرار می‌دهد. دمای آب گرم‌تر نیز از طریق سفید شدن مرجان‌ها که برای بقای گونه‌هایی مانند شمشاد شاهین حیاتی است، بر صخره‌های مرجانی تأثیر می‌گذارد. علاوه بر مدیریت زیستگاه در خشکی، محافظت از لاک‌پشت‌های دریایی در اقیانوس نیز مهم است. یکی از راه‌های

انجام این کار، اجرای مناطق حفاظت‌شده دریایی در زیستگاه‌های مهم لاک‌پشت‌ها، مانند مناطقی است که جوان‌های آنها بالغ می‌شوند. بااین‌حال، مسئله اصلی تأثیرگذار بر لاک‌پشت‌های دریایی تغییر اقلیم است و باید در مقیاس وسیع‌تری با این مسئله برخورد شود. برای کاهش تأثیر کلی تغییرات آب و هوایی نه‌تنها روی لاک‌پشت‌های دریایی، بلکه سایر گونه ها، کاهش انتشار گازهای گلخانه‌ای و ایجاد شیوه زندگی پایدارتر ضروری است. قبلاً گامهایی در جهت دستیابی به این هدف برداشته شده است، ازجمله توافق‌نامه آب و هوای پاریس، همراه با استانداردهای بی شماری برای انتشار هوای پاک، اما کافی نیست. مقررات سختگیرانِ زیست محیطی و آموزش حفاظت از محیط زیست به دستیابی به زندگی پایدارتر و همچنین محافظت از لاک پشت های دریایی همراه با بسیاری از گونه های دیگر کمک می کند. افزایش تلاش های پژوهشی در مورد شکاف دانش حیاتی فرآیندهای تأثیرگذار بر تعداد جمعیت، مانند شناسایی کانون های جستجوی اقیانوس ها یا فرایندهایی که زمینه ساز آغاز مهاجرت های لانه سازی و انتخاب مناطق تولید مثل هستند، مدیریت سازگار را در یک شرایط تغییر یافته آگاه می کند. پیش بینی تأثیرات گرمایش آب و هوا در جوجه های جوجه کشی، نسبت های تولید مثل زن و مرد و تعداد تودرتو یک رویکرد جامع برای ارزیابی نگرانی های حفاظت از لاک پشت های دریایی در یک جهان در حال گرم شدن فراهم می کند.

منابع

٦. زارع، روح الله و رحیمی، روح الله،۱۳۸۸،بررسی عوامل تهدید کننده حیات لاک پشتهای دریایی در برخی از جزایر شمالی خلیج فارس،همایش بین المللی خلیج فارس،بوشهر،، https://civilica.com/doc/124159

7. Ahima, R. S. (2020). Global warming threatens human thermoregulation and survival. The Journal of clinical investigation, 130(2), 559-561.

8. Ahmed, N., Cheung, W. W., Thompson, S., & Glaser, M. (2017). Solutions to blue carbon emissions: Shrimp cultivation, mangrove deforestation and climate change in coastal Bangladesh. Marine Policy, 82, 68-75.

9. Almpanidou, V. Katragkou, E. & Mazaris, A. D. (2018). The efficiency of phenological shifts as an adaptive response against climate change: a case study of loggerhead sea turtles (Caretta caretta) in the Mediterranean. Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change, 23(7), 1143-1158.

10. Almpanidou, V., Katragkou, E., & Mazaris, A. D. (2018). The efficiency of phenological shifts as an adaptive response against climate change: a case study of loggerhead sea turtles (Caretta caretta) in the Mediterranean. Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change, 23(7), 1143-1158.

11. Almpanidou, V., Markantonatou, V., & Mazaris, A. D. (2019). Thermal heterogeneity along the migration corridors of sea turtles: Implications for climate change ecology. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 520, 151223.

12. Benjankar, R., Tonina, D., McKean, J. A., Sohrabi, M. M., Chen, Q., & Vidergar, D. (2018). Dam operations may improve aquatic habitat and offset negative effects of climate change. Journal of environmental management, 213, 126-134.

13. Bentley, B. P. (2018). Predicting the impacts of increasing nest temperatures associated with climate change on Western Australian sea turtles (Doctoral dissertation, PhD Thesis, The University of Western Australia).

14. Booth, D. T., & Astill, K. (2001). Incubation temperature, energy expenditure and hatchling size in the green turtle (Chelonia mydas), a species with temperature-sensitive sex determination. Australian Journal of Zoology, 49(4), 389-396.

15. Butt, N., Whiting, S., & Dethmers, K. (2016). Identifying future sea turtle conservation areas under climate change. Biological Conservation, 204, 189-196.

16. Carr, M. H., Robinson, S. P., Wahle, C., Davis, G., Kroll, S., Murray, S., ... & Williams, M. (2017). The central importance of ecological spatial connectivity to effective coastal marine protected areas and to meeting the challenges of climate change in the marine environment. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems, 27, 6-29.
17. Caut, S., Guirlet, E., & Girondot, M. (2010). Effect of tidal overwash on the embryonic development of leatherback turtles in French Guiana. Marine Environmental Research, 69(4), 254-261.
18. Cavallo, C., Dempster, T., Kearney, M. R., Kelly, E., Booth, D., Hadden, K. M., & Jessop, T. S. (2015). Predicting climate warming effects on green turtle hatchling viability and dispersal performance. Functional Ecology, 29(6), 768-778.
19. Cederberg, C., Persson, U. M., Schmidt, S., Hedenus, F., & Wood, R. (2019). Beyond the borders–burdens of Swedish food consumption due to agrochemicals, greenhouse gases and land-use change. Journal of Cleaner Production, 214, 644-652.
20. DeGregorio, B. A., & Williard, A. S. (2011). Incubation temperatures and metabolic heating of relocated and in situ loggerhead sea turtle (Caretta caretta) nests at a northern rookery. Chelonian Conservation and Biology, 10(1), 54-61.
21. Dinan, T. (2017). Projected increases in hurricane damage in the United States: the role of climate change and coastal development. Ecological Economics, 138, 186-198.
22. Ding, Q., Chen, X., Hilborn, R., & Chen, Y. (2017). Vulnerability to impacts of climate change on marine fisheries and food security. Marine Policy, 83, 55-61.
23. Dunstan, A., Robertson, K., Fitzpatrick, R., Pickford, J., & Meager, J. (2020). Use of unmanned aerial vehicles (UAVs) for mark-resight nesting population estimation of adult female green sea turtles at Raine Island. PloS one, 15(6), e0228524.
24. Dwire, K. A., Mellmann-Brown, S., & Gurrieri, J. T. (2018). Potential effects of climate change on riparian areas, wetlands, and groundwater-dependent ecosystems in the Blue Mountains, Oregon, USA. Climate Services, 10, 44-52.
25. Esteban, N., Laloë, J. O., Kiggen, F. S., Ubels, S. M., Becking, L. E., Meesters, E. H., ... & Christianen, M. J. (2018). Optimism for mitigation of climate warming impacts for sea turtles through nest shading and relocation. Scientific reports, 8(1), 1-8.
26. Evans, P., & Waggitt, J. (2020). Impacts of climate change on Marine Mammals, relevant to the coastal and marine environment around the UK.
27. Fa.qeci.org/conservation-activities/green-turtle-climate-change
28. Fernandes, A., Bondioli, A. C. V., Solé, M., & Schiavetti, A. (2017). Seasonal variation in the behavior of sea turtles at a Brazilian foraging area. Chelonian Conservation and Biology, 16(1), 93-102.
29. Froehlich, H. E., Gentry, R. R., & Halpern, B. S. (2018). Global change in marine aquaculture production potential under climate change. Nature ecology & evolution, 2(11), 1745-1750.
30. Fuentes, M. M. P. B., & Cinner, J. E. (2010). Using expert opinion to prioritize impacts of climate change on sea turtles' nesting grounds. Journal of Environmental Management, 91(12), 2511-2518.
31. Fuentes, M. M. P. B., Maynard, J. A., Guinea, M., Bell, I. P., Werdell, P. J., & Hamann, M. (2009). Proxy indicators of sand temperature help project impacts of global warming on sea turtles in northern Australia. Endangered Species Research, 9(1), 33-40.
32. Fuentes, M. M., Pike, D. A., Dimatteo, A., & Wallace, B. P. (2013). Resilience of marine turtle regional management units to climate change. Global Change Biology, 19(5), 1399-1406.
33. Hays, G. C., & Hawkes, L. A. (2018). Satellite tracking sea turtles: opportunities and challenges to address key questions. Frontiers in Marine Science, 5, 432.
34. He, Q., & Silliman, B. R. (2019). Climate change, human impacts, and coastal ecosystems in the Anthropocene. Current Biology, 29(19), R1021-R1035.

35. Helbig, M., Chasmer, L. E., Desai, A. R., Kljun, N., Quinton, W. L., & Sonnentag, O. (2017). Direct and indirect climate change effects on carbon dioxide fluxes in a thawing boreal forest–wetland landscape. Global Change Biology, 23(8), 3231-3248.
36. Heshmati, H. M. (2020). Impact of Climate Change on Life. In Environmental Change and Sustainability. IntechOpen.
37. Hill, J. E., Paladino, F. V., Spotila, J. R., & Tomillo, P. S. (2015). Shading and watering as a tool to mitigate the impacts of climate change in sea turtle nests. PloS one, 10(6), e0129528.
38. Hoegh-Guldberg, O., Poloczanska, E. S., Skirving, W., & Dove, S. (2017). Coral reef ecosystems under climate change and ocean acidification. Frontiers in Marine Science, 4, 158.
39. Hollowed, A. B., Barange, M., Beamish, R. J., Brander, K., Cochrane, K., Drinkwater, K., ... & Yamanaka, Y. (2013). Projected impacts of climate change on marine fish and fisheries. ICES Journal of Marine Science, 70(5), 1023-1037.
40. Hoque, M. Z., Cui, S., Xu, L., Islam, I., Tang, J., & Ding, S. (2019). Assessing agricultural livelihood vulnerability to climate change in coastal Bangladesh. International journal of environmental research and public health, 16(22), 4552.
41. Hsiang, S., & Kopp, R. E. (2018). An economist's guide to climate change science. Journal of Economic Perspectives, 32(4), 3-32.
42. IPCC SROCC Ch5 2019, p. 510.
43. Jacobs, R., & Miller, J. (2019). The Ocean Pollution Crisis.
44. Jensen, M. P., Allen, C. D., Eguchi, T., Bell, I. P., LaCasella, E. L., Hilton, W. A., ... & Dutton, P. H. (2018). Environmental warming and feminization of one of the largest sea turtle populations in the world. Current Biology, 28(1), 154-159.
45. Kaska, Y., Downie, R., Tippett, R., & Furness, R. W. (1998). Natural temperature regimes for loggerhead and green turtle nests in the eastern Mediterranean. Canadian Journal of Zoology, 76(4), 723-729.
46. Kernan, M. (2015). Climate change and the impact of invasive species on aquatic ecosystems. Aquatic Ecosystem Health & Management, 18(3), 321-333.
47. Laloë, J. O., Cozens, J., Renom, B., Taxonera, A., & Hays, G. C. (2014). Effects of rising temperature on the viability of an important sea turtle rookery. Nature Climate Change, 4(6), 513-518.
48. Liang, L., & Gong, P. (2017). Climate change and human infectious diseases: A synthesis of research findings from global and spatio-temporal perspectives. Environment international, 103, 99-108.
49. Matsuzawa, Y., Sato, K., Sakamoto, W., & Bjorndal, K. (2002). Seasonal fluctuations in sand temperature: effects on the incubation period and mortality of loggerhead sea turtle (Caretta caretta) pre-emergent hatchlings in Minabe, Japan. Marine Biology, 140(3), 639-646.
50. McMichael, A. J., & Lindgren, E. (2011). Climate change: present and future risks to health, and necessary responses. Journal of internal medicine, 270(5), 401-413.
51. Miller, J. D. (2017). Reproduction in sea turtles. In The biology of sea turtles (pp. 51-81). CRC Press.
52. Morrongiello, J. R., Thresher, R. E., & Smith, D. C. (2012). Aquatic biochronologies and climate change. Nature Climate Change, 2(12), 849-857.
53. Mulyasari, G., Waluyati, L. R., & Suryantini, A. (2018, November). Perceptions and local adaptation strategies to climate change of marine capture fishermen in Bengkulu Province, Indonesia. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 200, No. 1, p. 012037). IOP Publishing.
54. Mumby, P. J., Elliott, I. A., Eakin, C. M., Skirving, W., Paris, C. B., Edwards, H. J., ... & Stevens, J. R. (2011). Reserve design for uncertain responses of coral reefs to climate change. Ecology letters, 14(2), 132-140.
55. Narayan, E. J., & Williams, M. (2016). Understanding the dynamics of physiological impacts of environmental stressors on Australian marsupials, focus on the koala (Phascolarctos cinereus). BMC Zoology, 1(1), 1-13.

56. Palomino-González, A., López-Martínez, S., & Rivas, M. L. (2020). Influence of climate and tides on the nesting behaviour of sea turtles. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 527, 151378.
57. Patrício, A. R. Marques, A. Barbosa, C. Broderick, A. C., Godley, B. J., Hawkes, L. A., ... & Catry, P. (2017). Balanced primary sex ratios and resilience to climate change in a major sea turtle population. Marine Ecology Progress Series, 577, 189-203.
58. Perez, E. A., Marco, A., Martins, S., & Hawkes, L. A. (2016). Is this what a climate change-resilient population of marine turtles looks like?. Biological Conservation, 193, 124-132.
59. Pilcher, N. J., Rodriguez-Zarate, C. J., Antonopoulou, M. A., Mateos-Molina, D., Das, H. S., & Bugla, I. A. (2020). Combining laparoscopy and satellite tracking: Successful round-trip tracking of female green turtles from feeding areas to nesting grounds and back. Global Ecology and Conservation, 23, e01169.
60. Pilcher, N., (2018). What will global warming mean for sea turtles?, saveourseas.com, Marine Research Foundation. https://saveourseas.com/project/what-will-global-warming-mean-for-sea-turtles./
61. Poloczanska, E. S., Brown, C. J., Sydeman, W. J., Kiessling, W., Schoeman, D. S., Moore, P. J., ... & Richardson, A. J. (2013). Global imprint of climate change on marine life. Nature Climate Change, 3(10), 919-925.
62. Poloczanska, E. S., Limpus, C. J., & Hays, G. C. (2009). Vulnerability of marine turtles to climate change. Advances in marine biology, 56, 151-211.
63. Rivas, M. L., Esteban, N., & Marco, A. (2019). Potential male leatherback hatchlings exhibit higher fitness which might balance sea turtle sex ratios in the face of climate change. Climatic Change, 156(1), 1-14.
64. Saba, V. S., Spotila, J. R., Chavez, F. P., & Musick, J. A. (2008). Bottom-up and climatic forcing on the worldwide population of leatherback turtles. Ecology, 89(5), 1414-1427.
65. Saba, V. S., Stock, C. A., Spotila, J. R., Paladino, F. V., & Tomillo, P. S. (2012). Projected response of an endangered marine turtle population to climate change. Nature Climate Change, 2(11), 814-820.
66. Salimi, S., Almuktar, S. A., & Scholz, M. (2021). Impact of climate change on wetland ecosystems: A critical review of experimental wetlands. Journal of Environmental Management, 286, 112160.
67. Santidrián Tomillo, P., & Spotila, J. R. (2020). Temperature-Dependent Sex Determination in Sea Turtles in the Context of Climate Change: Uncovering the Adaptive Significance. BioEssays, 42(11), 2000146.
68. Santidrián Tomillo, P., & Spotila, J. R. (2020). Temperature-Dependent Sex Determination in Sea Turtles in the Context of Climate Change: Uncovering the Adaptive Significance. BioEssays, 42(11), 2000146.
69. Savo, V., Morton, C., & Lepofsky, D. (2017). Impacts of climate change for coastal fishers and implications for fisheries. Fish and Fisheries, 18(5), 877-889.
70. Savo, V., Morton, C., & Lepofsky, D. (2017). Impacts of climate change for coastal fishers and implications for fisheries. Fish and Fisheries, 18(5), 877-889.
71. Schofield, G., Katselidis, K. A., Lilley, M. K., Reina, R. D., & Hays, G. C. (2017). Detecting elusive aspects of wildlife ecology using drones: new insights on the mating dynamics and operational sex ratios of sea turtles. Functional Ecology, 31(12), 2310-2319.
72. Segura, L. N., & Cajade, R. (2010). The effects of sand temperature on pre-emergent green sea turtle hatchlings.
73. Serra, I. (2020). Assessing the Effects of Incubation Temperature on the Cognitive Ability of Hatchling Loggerhead (Caretta caretta) Sea Turtles (Doctoral dissertation, Florida Atlantic University).
74. Sieg, A. E. (Dissertation, Drexel Univ., 2010), Physiological Constraints on the Ecology of Activity-Limited Ectotherms..Return to ref 1 in article.
75. Sinaei, M., Bolouki, M., & Mirshekar, D. (2018). Temperature-Based Prediction of Sex Ratio in Hatchlings Green Sea Turtle (Chelonia mydas). ECOPERSIA, 6(4), 235-240.
76. Spalding, M. D., & Brown, B. E. (2015). Warm-water coral reefs and climate change. Science, 350(6262), 769-771.
77. Sydeman, W. J., Poloczanska, E., Reed, T. E., & Thompson, S. A. (2015). Climate change and marine vertebrates. Science, 350(6262), 772-777.

78. Taillardat, P., Friess, D. A., & Lupascu, M. (2018). Mangrove blue carbon strategies for climate change mitigation are most effective at the national scale. Biology letters, 14(10), 20180251.
79. Tanner, C. E., Marco, A., Martins, S., Abella-Perez, E., & Hawkes, L. A. (2019). Highly feminised sex-ratio estimations for the world's third-largest nesting aggregation of loggerhead sea turtles. Marine Ecology Progress Series, 621, 209-219.
80. Thomas, Y., Cassou, C., Gernez, P., & Pouvreau, S. (2018). Oysters as sentinels of climate variability and climate change in coastal ecosystems. Environmental Research Letters, 13(10), 104009.
81. Tomillo, P. S., Saba, V. S., Blanco, G. S., Stock, C. A., Paladino, F. V., & Spotila, J. R. (2012). Climate driven egg and hatchling mortality threatens survival of Eastern Pacific leatherback turtles. PLoS One, 7(5), e37602.
82. Vineis, P., Chan, Q., & Khan, A. (2011). Climate change impacts on water salinity and health. Journal of Epidemiology and Global Health, 1(1), 5-10.
83. Wood, A., Booth, D. T., & Limpus, C. J. (2014). Sun exposure, nest temperature and loggerhead turtle hatchlings: Implications for beach shading management strategies at sea turtle rookeries. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 451, 105-114.
84. Wright, L. I., Stokes, K. L., Fuller, W. J., Godley, B. J., McGowan, A., Snape, R., ... & Broderick, A. C. (2012). Turtle mating patterns buffer against disruptive effects of climate change. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 279(1736), 2122-2127.
85. Wulff, K., Donato, D., & Lurie, N. (2015). What is health resilience and how can we build it?. Annual review of public health, 36, 361-374.
86. Yoro, K. O., & Daramola, M. O. (2020). CO2 emission sources, greenhouse gases, and the global warming effect. In Advances in Carbon Capture (pp. 3-28). Woodhead Publishing.
87. Zare, R. & Sinaei, M., (2019). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and some biomarkers in the green sea turtles (Chelonia mydas). Marine pollution bulletin, 146, 336-342.

Omega-3 fatty acids and its anti-inflammatory influences

Fatemeh Eshari[1*]; Mehdi Taati Keley[1]; Mehran Habibi-Rezaei [1]; Sajad Tajeddini[2]

1- School of Biology, College of Science, University of Tehran
2- School of Chemical Engineering, College of Engineering, University of Tehran

Corresponding Author Email address: fatemeh.eshari@guest.ut.ac.ir

Abstract

Omega-3 fatty acids, especially eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) are essential fatty acids that have been shown high potential for preventing of many diseases and playing role in human health. Today, the epidemiological evidence for the effects of this group of fatty acids on inflammatory related disease including Inflammatory bowel disease (IBD), arthritis, Type 1 Diabetes Melitus, Pulmonary Inflammation, also many oxidative stress diseases, various types of cancer, fatty liver, mental illness, etc., has been well studied and various studies have been conducted with different perspectives in this regard. These effects are mediated by various biological processes, including changes in the composition of cell membrane fat, gene expression, cellular metabolism, signal transmission, metabolite production, and so on. Accordingly, using this pharmaceutical supplement (omega-3) is immensely crucial for all groups of society. Moreover, omega-3 is one of the few recommended supplements by the FDA.

Keywords: Fatty acids, Eicosapentaenoic acid (EPA), Omega 3, Docosahexaenoic acid (DHA), inflammatory disease

اسید های چرب امگا ۳ و تاثیرات آن بر بیماری های التهابی

فاطمه اشعاری[۱*]؛ مهدی طاعتی کلی [۱]؛ مهران حبیبی رضائی[۱] ؛ سجاد تاجدینی[۲]

۱- دانشکده زیست، دانشکدگان علوم، دانشگاه تهران

۲- دانشکده مهندسی شیمی، دانشکدگان فنی، دانشگاه تهران

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات : fatemeh.eshari@guest.ut.ac.ir

چکیده

اسیدهای چرب امگا ۳ به ویژه ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) و دکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) از اسیدهای چرب ضروری هستند که قابلیت بالای آن ها برای پیشگیری از بسیاری بیماری ها و نیز ایفای نقش در سلامتی انسان به اثبات رسیده است. امروزه شواهد همه گیر شناسی (اپیدمیولوژیک) تاثیرات این گروه از اسیدهای چرب را روی بیماری های التهابی از جمله بیماری التهابی روده ،آرتروز، پیوند عضو، دیابت نوع ۱، بیماری التهابی ریه ، بسیاری از بیماری های استرس اکسیداتیو، انواع سرطان، کبدچرب، بیماری های روانی و غیره به خوبی شناسانده و مطالعات گوناگونی با دیدگاه های مختلف در این راستا صورت پذیرفته است. این تاثیرات با فرآیندهای زیستی متفاوتی از جمله تغییرات در ترکیب چربی غشای سلولی، تاثیر روی بیان ژن، متابولیسم سلولی، انتقال پیام سلولی، تولید متابولیت ها و ... انجام می گیرد. بدین سبب استفاده از این مکمل (امگا ۳) برای گروه های مختلف جامعه ضرورت دارد. همچنین امگا ۳ یکی از چند مکمل دارویی می باشد که مصرف آن توسط سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) توصیه شده است.

واژگان کلیدی: اسیدهای چرب، ایکوزاپنتانوئیک اسید، امگا ۳، دکوزاهگزانوئیک اسید، بیماری های التهابی

۱.مقدمه

اسیدهای چرب امگا ۳ جزو اسیدهای چرب بس غیراشباع [۳۱۸] (PUFA) هستند که دارای زنجیره کربنی خطی (۱۸ تا ۲۲ کربن) منتهی به گروه کربوکسیلیک بوده و دارای ۳ تا ۶ پیوند دوگانه می باشند. اسید های چرب امگا ۶ که از روغن های گیاهی غنی از لینولئیک اسید[۳۱۹] (LA, C18:2n-6) تهیه می‌شود، عمده رژیم غذایی انسان را به خود اختصاص داده است. ولی، در بدن انسان آنزیم‌های ضروری برای تبدیل اسیدهای چرب امگا ۶ به اسیدهای چرب امگا ۳ به اندازه کافی وجود ندارد و انواع امگا ۳ باید از منابع غذایی مناسب، عمدتاً منابع دریایی به ویژه ماهیان تامین شود (Saini et al., 2021) . امگا ۳ به عنوان اسیدهای چرب ضروری[۳۲۰] که در بدن سنتز نمی شوند در نظر گرفته می شود(Saini & Keum, 2018). PUFAها در ساختارهای تری گلیسریدی که تحت

[318] Poly Unsaturated Fatty Acid
[319] Linoleic acid
[320] Essential fatty acids

عنوان تری آسیل گلیسرول[۳۲۱] (TAG) نامیده می شوند قرار میگیرند. امروزه به خوبی مشخص شده است که روغن ماهی منبع اصلی PUFA ها، بهویژه ایکوزاپنتانوئیک اسید[۳۲۲] ($EPA: 5^{\Delta5,8,11,14,17}$) و دوکوزا هگزانوئیک اسید [۳۲۳] ($DHA: 6^{\Delta4,7,10,13,16,19,21}$) می باشد.

توجه به اسیدهای چرب امگا ۳ (آلفا لینولنیک اسید C18:3 ، ایکوزاپنتانوئیک اسید C20:5 و دکوزا هگزانوئیک اسید C22:6) از چندین سال قبل آغاز شده و در حال حاضر مستندات و مقالات علمی فراوانی نقش مثبت و موثر آنها را بر سلامت انسان تایید می نمایند . این اسیدهای چرب می توانند در بروز بسیاری از بیماری‌ها که به صورت معمول وجود دارند، نقش پیشگیرانه ایفا نمایند. از میان اسیدهای چرب امگا ۳ EPA و DHA به دلیل اثر بخشی متمایز، اهمیت بسیار بالاتری داشته و دارای ارزش دارویی و پیشگیرانه بالایی برای بیماری های گوناگون است .

تحقیقات بسیار زیادی اثرات مثبت اسیدهای چرب امگا ۳ را بر بیماری های قلبی و عروقی، بیماری های روانی، بیماری های التهابی و ... گزارش کرده اند (Handelsman & Shapiro, 2017) . در این مقاله، جنبه های مختلف ضرورت مصرف امگا ۳ و عوارض ناشی از کمبود آن، با تمرکز بر بیماری ها التهابی ارائه می شود (Rubio-Rodríguez et al., 2012). همچنین، نتایج پژوهش های کلینیکی و اپیدمیولوژیکی پیشنهاد می کنند که EPA و DHA که تنها در ماهی و غذاهای دریایی وجود دارند، تاثیرات بسیار زیادی در جلوگیری از بیماری های قلبی عروقی انسان دارند(.Hu et al., 2019; Maki & Dicklin, 2018)

۲. اسیدهای چرب امگا ۳ و بیماری های التهابی :

۲-۱. اسیدهای چرب امگا ۳ و التهاب روده :

بیماری التهاب روده (IBD)[324] یک اصطلاح عمومی است که برای بیماری های مزمن دستگاه گوارش به کار می رود و بیشتر شامل ورم مخاط روده بزرگ و بیماری کرون[۳۲۵] می شود. میزان وقوع این دو بیماری درکشورهای غربی بیشتر از کشورهای آسیایی و در حال افزایش است که مطالعات اپیدمیولوژیک دلیل آن را به مصرف بالای PUFA n-6 در رژیم غذایی غربی نسبت می دهند(Barbalho et al., 2016). در این سال ها از مدل تری نیتروبنزوسولفونیک اسید[۳۲۶] برای مطالعه اثرات مصرف اسیدهای چرب امگا ۳ بر تغییرات فراساختاری و بافت شناسی التهاب روده بزرگ (القا شده در شرایط آزمایشگاهی) در موش های صحرایی و تولید نشانگرهای التهابی بیولوژیک استفاده شده است (Nieto et al., 2002). نتایج بافت شناسی این مطالعات نشان می دهد که موش های آزمایشگاهی که از یک رژیم غذایی از اسیدهای چرب امگا ۳ استفاده کردند، در مقایسه با گروه امگا ۶ و امگا ۳+ امگا ۶ ، به طور معنی داری آسیب های ماکروسکوپی و میکروسکوپی کمتری در روده بزرگ داشتند. در حالی که اسیدهای چرب امگا ۶ در شرایط آزمایشگاهی موجب تحریک التهاب روده بزرگ شدند (Nieto et al., 2002). مطالعات اپیدمیولوژیک گوناگون رابطه ی معکوس بین مصرف اسیدهای چرب امگا ۳ و خطر ابتلا به بیماری التهاب روده را نشان داده اند. به علاوه برخی از مطالعات نشان داده اند که مصرف اسیدهای چرب

[321] Triacylglycerol
[322] Eicosapentaenoic acid
[323] Docosahexaenoic acid
[324] Inflammatory bowel disease (IBD)
[325] Crohn’s disease
[326] Trinitrobenzenesulfonic acid model

امگا ۳ یک روش درمانی موثر برای مدیریت این بیماری ها می باشد (Marton et al., 2019). یک مطالعه ۲۴ ساله نشان داد که در مردم ساکن گرینلند میزان وقوع IBD در مقایسه با جمعیت های ساکن غرب، به طور معنی داری پایین تر بود. دلیل این امر را به رژیم غذایی غنی از اسیدهای چرب امگا ۳ حاصل از غذاهای دریایی نسبت می دهند(Bang et al., 1980).

البته تمام مطالعات نیز اثرات درمانی اسیدهای چرب در افراد مبتلا به IBD را تایید نمی کنند. به عنوان مثال گروهی از محققین مطالعه ای را بر روی ۲۰۴ بیمار مبتلا به کرون انجام دادند تا اثرات PUFA n-3 را بر نگهداری و بهبود بیماران، دریک دوره ۱۲ ماهه بررسی کنند. در پایان این آزمایش تفاوت معنی دار بین گروه های مصرف کننده امگا ۳ و گروه شاهد وجود نداشت به خصوص این که ۳۰ درصد از بیماران در هر دو گروه در شرایط بهبودی قرار گرفتند. با این حال در پایان این مطالعه مشخص بود که گروه مصرف کننده امگا ۳ در مقایسه با گروه شاهد، برای مدیریت بیماری نیازمند مصرف داروی کمتر بودند (Lorenz-Meyer et al., 1996) .

۲-۲. اسیدهای چرب امگا ۳ و آرتروز :

به شایع ترین نوع بیماری های التهابی که باعث می شود غضروف های مفصلی در بدن دچار آسیب دیدگی شوند آرتروز[۳۲۷] گفته می شود. آرتروز نوعی بیماری خود ایمنی مزمن با مفاصل متورم و دردناک است که با فرسایش استخوان و اختلال عملکردی همراه است و بیشتر در مفصل های بزرگ بدن که وزن بسیاری را تحمل می کنند به وجود می آید. در این بیماری غضروف هایی که شکسته شده اند باعث به وجود آمدن درد، تورم و مشکلات حرکتی می گردند (Li et al., 2019). ضایعات مفاصل با نفوذ لنفوسیت های T، ماکروفاژها و لنفوسیت های B به داخل سینوویوم[۳۲۸] (لایه داخلی کپسول مفصلی) و همچنین التهاب سینوویال ناشی از متابولیت هایPUFA ها، سایتوکین ها و متالوپروتئینازهای ماتریکس مشخص می شوند(Akbar et al., 2017).

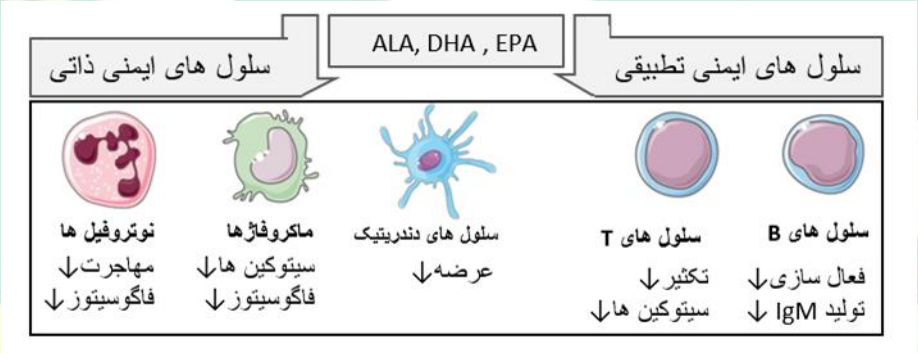
اثرات مصرف اسیدهای چرب امگا ۳ روی بیماران مبتلا به آرتروز به خصوص آرتریت روماتوئید[۳۲۹] مورد مطالعه قرار گرفته است. برخی محققین اثرات تغییر در میزان چربی موجود در رژیم غذایی بیماران مبتلا به آرتروز روماتوئید را مورد مطالعه قرار داده و مشاهده نمودند که گروه مصرف کننده امگا ۳، خشکی مفصلی کمتر در هنگام صبح و قدرت مفاصل بیشتری را در کل نشان دادند که این امر حاکی از بهبود قابل توجه بیماران بود (۱۴). اسیدهای چرب امگا ۳ از طریق مکانیسم های گوناگونی سبب کاهش التهابات می گردند که بیشترین ارتباط آن ها با این موضوع از طریق جایگزین نمودنPUFA های موجود در غشای سلول می باشد. تغییر در ترکیباتPUFA های غشا می تواند موجب تاثیر بر گیرنده های غشایی، جلوگیری از تولید سایتوکین های پیش التهابی و نیز اصلاح سنتز واسطه های لیپیدی گردد. سطوح هریک ازPUFA ها در غشا می تواند از طریق دریافت و یا عدم دریافت آن ها از رژیم غذایی تغییر یابد (Kostoglou-Athanassiou et al., 2020). از سوی دیگر، ایکوزانوئیدها که شاملLTs ، PGs و TXs می باشند، در درجه اول از AA و EPA مشتق می شوند که میانجی و تنظیم کننده مهم التهاب هستند. بر خلاف آراشیدونیک اسید که منجر به التهاب می گردد، ایکوزانوئیدهای مشتق از EPA دارای نقش ضدالتهابی هستند (Li et al., 2019). بنابراین، جایگزینیPUFA های مختلف در غشای سلولی می تواند منجر به تغییر الگوهای تولید مشتقات ایکوزانوئیدی گشته و در نهایت بر میزان پاسخ التهابی تاثیرگذار باشد(Deutch et al., 2000).

[327] arthritis
[328] Synovium
[329] Rheumatoid arthritis (RA)

۲-۳. اسیدهای چرب امگا ۳ و دیابت نوع ۱ :

دیابت نوع ۱ [330](T1DM) بیماری خود ایمنی پلی ژنیک و با تاثیر بر اندام خاص است، که در آن زیر رده خاصی از لنفوسیت های Tکه در حملات خود ایمنی منجر به تخریب سلول های β پانکراس می شوند، دخیل هستند(Mali et al., 2016).

سلول های ایمنی بر اساس خصوصیات و مکانیسم دفاعی مربوطه، در کل شامل دو دسته اصلی سلول های سیستم ایمنی ذاتی[۳۳۱] و تطبیقی[۳۳۲] هستند. سلول های سیستم ایمنی ذاتی شامل نوتروفیل ها، ماکروفاژ ها، ائوزینوفیل ها، بازوفیل ها، ماست سل ها، سلول ها ی کشنده طبیعی[۳۳۳] و سلول های دندیرتیک[۳۳۴] هستند، که خط مقدم دفاعی را تشکیل می دهند. نحوه عملکرد آنها عموما، سریع و با ویژگی محدود است. سلول های سیستم ایمنی تطبیقی شامل سلول های B و T ، با ویژگی بالا ولی عملکرد تاخیری هستند. با این حال سلول های سیستم ایمنی تطبیقی بعد از اولین مواجهه با عوامل بیماری زا، حافظه ایمنی را بر علیه عامل مزبور شکل می دهند. در کل ALA ، DHA و EPA ، دارای اثرات بازدارنده روی هر دو سیستم ایمنی ذاتی و تطبیقی است. (شکل ۱)



شکل ۱: تاثیر روغن های امگا ۳ بر روی فعالیت و عملکرد سیستم ایمنی ذاتی و تطبیقی

مطالعات کلینیکی اخیر که روی طیف وسیعی از بیماران انجام شده بود نشان می دهد که مصرف EPA و DHA در کودکان و بچه ها، به وضوح دارای اثرات پیشگیرانه در برابر توسعه دیابت نوع ۱ است (Cadario et al., 2018). پژوهشگران به طور موفقیت آمیزی میزان قند خون را در کودکان ۸ ساله دارای دیابت نوع ۱ که به مدت یک سال و نیم مکمل های حاوی EPA/DHA و ویتامین D را مصرف نموده بودند کاهش داده و به صورت معنی داری میزان دوز انسولین تزریقی در آن ها را کم کردند (Grahl-Nielsen & Mjaavatten, 1991). مجموعه مطالعات ژنتیکی و کلینیکی اخیر سبب روشن شدن مکانیسم ها و پتانسیل های درمانیPUFA های امگا ۳ در کاهش و یا حتی سرکوب فرآیندهای خودایمنی و همچنین تاثیر آن ها بر حفاظت و افزایش عملکرد سلول های ایسلت [۳۳۵] شده است. افزایش اسیدهای چرب امگا ۳ سلولی از طریق بیان ترانسژنیک ژنfat-1 ، غالباً به طور کامل حمله سایتوکین های

[330] Type 1 Diabetes Melitus
[331] Innate immune system
[332] Adaptive immune system
[333] Natural killer cells
[334] Dendritic cells
[335] Islet cells

التهابی به سلول های β پانکراس را مسدود کرده و به طور قابل توجهی ترشح انسولین را افزایش می دهد (Li et al., 2019). این اثرات در درجه اول از طریق کاهش ترشح PGE2[۳۳۶] از سلول های ایسلت و سلول های β میانجی گری می شود، که این امر پیشنهاد دهنده آن است که احتمالاً کنترل التهاب از طریق کاهش اسیدهای چرب امگا ۶ و متابولیت های آن ها، موضوع اصلی در تنظیم عملکرد سلول های β است (Chewcharat et al., 2020). نتایج مطالعه بر روی موش های دارای دیابت نوع ۱ که با خوراک های غنی از EPA و DHA تغذیه شده بودند، کاهش بروز بیماری خود ایمنی و دیابت را نشان داد. این روش به عنوان شیوه ای پیشگیرانه یا درمانی، به طور قابل توجهی سبب سرکوب جمعیت سلول های Th1[337] و Th17[۳۳۸] ، کاهش ترشح IFN-γ[339] و IL-17[340]و افزایش نسبت Th2[341]و سلول های T تنظیم کننده شد (Bi et al., 2017).

به طور کلی، محصولات اسیدهای چرب غیراشباع نقش مهمی را در سامان بخشی سیستم ایمنی ایفا می کنند. به عنوان مثال، ایکوزانوئیدهای مشتق از اسید آراشیدونیک که از طریق فعالیت آنزیم هایی مانند لیپوکسیژناز، سیکلواکسیژناز و سیتوکروم P450 سنتز می شوند، غالباً اثرات التهابی دارند (Patterson et al., 2012). در مقابل، ایکوزانوئیدهای مشتق از EPA و DHA بسیار کمتر از فرم اسیدهای چرب امگا ۶ التهابی هستند.(Schmitz & Ecker, 2008)

روی هم رفته، مطالعات بالینی و حیوانی امید دارند که با مداخله اسیدهای چرب امگا ۳، پیشرفت هایی در پیشگیری و حتی درمان T1DMحاصل شود. البته، مطالعات تکمیلی جهت تایید تاثیر مصرف امگا ۳ بر پیشرفت دیابت نوع ۱ مورد نیاز است. در مجموع، کاهش PUFA های امگا ۶ و افزایش میزان مصرفPUFA های امگا ۳ برای پیشگیری و درمان دیابت نوع ۱ حیاتی است و حضور مکمل های EPA/DHA به تحقیقات بالینی آینده کمک شایانی خواهد نمود .

۲-۴. اسیدهای چرب امگا ۳ و پیوند عضو :

مطالعات انسانی متعددی روی اثرات اسیدهای چرب امگا ۳ بر سرکوب سیستم ایمنی در بیماران پیوند عضو شده صورت گرفته است. به عنوان مثال در یک مطالعه اثر مصرف روغن ماهی بر روی پذیرش پیوند کلیه و فعالیت کلیه بررسی شد. پس از یک سال از این مطالعه بهبود در عملکرد کلیه در گروهی از بیماران که روغن ماهی مصرف می کردند مشاهده شد در گروهی که روغن ماهی مصرف می کردند در مقایسه با گروه شاهد میزان پس زدن پیوند و متوسط فشار خون شریانی کمتر بود (Gomes Neto et al., 2017). نتایج مطالعات انسانی و حیوانی روی اثرات بالقوه مصرف اسیدهای چرب امگا ۳ در سرکوب سیستم ایمنی پس از جراحی در بیماران پیوند عضو شده تا حدی متناقض است.. در حالی که برخی از مطالعات از اثرات سودمند درمانی مصرف آنها گزارش داده اند ولی در برخی موارد نیز چنین نبوده است. این نتایج متناقض می تواند به دلیل تفاوت ها در طرح آزمایشی، مثلاً مقادیر و منابع تامین اسید چرب، طول دوره مطالعه و نوع اندام پیوند شده در مطالعه باشد. آزمایشات کلینیکی بیشتری باید انجام شود تا به طور روشن اثرات سودمند اسیدهای چرب امگا ۳ در سرکوب سیستم ایمنی در بیماران پیوند عضو شده مشخص شود .

[336] Prostaglandin E2
[337] T helper 1
[338] T helper 17
[339] Interferon gamma
[340] Interleukin 17
[341] T helper 2

۲-۵. اسیدهای چرب امگا ۳ و بیماری التهابی ریه :

فراوانی ابتلا به بیماری های ریه در جوامع غربی در حال افزایش است. برخی از کارشناسان معتقدند که این روند می تواند به دلیل نسبت بالای اسید چرب امگا ۶ به امگا ۳ در رژیم های غذایی متداول در غرب باشد، که می تواند موجب افزایش تولید سایتوکین های پیش التهابی و در نتیجه التهاب برانش در افرادی شود که در معرض ابتلا به بیماری های ریه می باشند. برخی متابولیت های EPA و DHA که از طریق آنزیم های سیتوکروم P450 در ریه ها سنتز می شوند، گشادکننده های عروقی و برانشی قوی بوده و خاصیت ضد التهابی نشان می دهند. سایر متابولیت های اسیدهای چرب امگا ۳ مانند ایکوزانوئیدها نیز برای از بین بردن واسطه های التهابی و بهبود التهاب عمل می نمایند(Lemoine et al., 2019). افزایش محتوای امگا ۳ در رژیم غذایی سبب جایگزینی جزئی آن ها با اسیدهای چرب امگا ۶ در غشای سلولی و رقابت برای آنزیم های متابولیز کننده می شود. همانگونه که در قبل نیز اشاره گردید، علاوه بر متابولیت های لیپیدی، مکانیسم های ضدالتهابی اسیدهای چرب امگا ۳ شامل میانجی گری مستقیم در بیان ژن التهابی (از طریق تنظیم رونویسی هسته ای) نیز می باشد که در پاتوژنز التهاب ریه دخالت دارد(Yao & Rahman, 2011). مطالعات کنترل شده و موردی نشان می دهند کودکانی که در اوایل زندگی خود ماهی مصرف نمی کنند، نسبت به کودکانی که در اوایل زندگی خود ماهی مصرف می کنند، احتمال ابتلا به بیماری آسم سه برابر بیشتر است. اسیدهای چرب ماهی، EPA و DHA از ورود آراشیدونیک اسید به فسفولیپیدهای غشاء جلوگیری می کنند و مشخص شده است که میزان تولید ایکوزانوئیدهای پیش التهابی حاصل از آراشیدونیک اسید را کاهش می دهند. بنابراین، روغن ماهی می تواند بر روی علائم بیماری التهابی ریه تاثیرگذار باشد و مطالعات گوناگون نشان می دهند افزایش مصرف اسیدهای چرب امگا ۳ به صورت مکمل و یا غذاهای غنی از آن ها سبب بهبود عملکرد تنفسی و کاهش نشانه های بیماری های ریوی به ویژه در افراد سیگاری میگردد(Scoditti et al., 2019).

۳. نتیجه‌گیری

اسیدهای چرب امگا ۳ از اسیدهای چرب ضروری برای بدن انسان هستند که به واسطه عدم سنتز در بدن، باید از طریق مواد خوراکی تامین شوند. مهمترین اسیدهای چرب امگا ۳ EPA و DHA هستند که در محصولات دریایی و مقدار بسیار کم در برخی میکروارگانیسم ها وجود دارند. تاثیرات امگا ۳ بر ابعاد مختلف سلامتی مورد مطالعه قرار گرفته و به عنوان عامل پیشگیرانه و درمانی سودمند و مثبت شناخته می شود. اسیدهای چرب امگا ۳ با اثرات ضد التهابی ثابت شده است. همچنین، جایگزینی اسیدهای چرب امگا ۳ در غشای سلولی می تواند منجر به تغییر الگوهای تولید مشتقات ایکوزانوئیدی گشته و در نهایت بر میزان پاسخ التهابی تاثیرگذار باشد. تغییر در ترکیبات PUFA های غشا می تواند موجب تاثیر بر گیرنده های غشایی، جلوگیری از تولید سایتوکین های پیش التهابی و نیز اصلاح سنتز واسطه های لیپیدی گردد. بنابراین، امگا ۳ دارای اثرات ضدالتهابی، و قدرت پیشگیرانه مناسبی برای بسیاری از بیماری های التهابی مانند التهاب روده و ریه، آرتروز، دیابت نوع ۱ و غیره است. همانگونه که در ابتدا نیز اشاره گردید، امگا ۳ یکی از معدود مکمل هایی است که توسط FDA مصرف آن به صورت روزانه توصیه گشته است. لذا، مصرف این نوع مکمل به میزان یک عدد کپسول با حداقل ۳۰ درصد (EPA+DHA) ماده موثره در روز در صورت عدم مصرف، ۲ وعده ماهی در هفته مناسب می باشد.

منابع

15. Akbar, U., Yang, M., Kurian, D., & Mohan, C. (2017). Omega-3 fatty acids in rheumatic diseases a critical review. *Journal of Clinical Rheumatology*, *23*(6), 330–339. https://doi.org/10.1097/RHU.0000000000000563
16. Bang, H. O., Dyerberg, J., & Sinclair, H. M. (1980). The composition of the Eskimo food in north western Greenland. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *33*(12), 2657–2661. https://doi.org/10.1093/AJCN/33.12.2657
17. Barbalho, S. M., Goulart, R. D. A., Quesada, K., Bechara, M. D., & de Carvalho, A. D. C. A. (2016). Inflammatory bowel disease: can omega-3 fatty acids really help? *Annals of Gastroenterology : Quarterly Publication of the Hellenic Society of Gastroenterology*, *29*(1), 37. /pmc/articles/PMC4700845/
18. Bi, X., Li, F., Liu, S., Jin, Y., Zhang, X., Yang, T., Dai, Y., Li, X., & Zhao, A. Z. (2017). ω-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate type 1 diabetes and autoimmunity. *The Journal of Clinical Investigation*, *127*(5), 1757. https://doi.org/10.1172/JCI87388
19. Cadario, F., Savastio, S., Ricotti, R., Rizzo, A. M., Carrera, D., Maiuri, L., & Ricordi, C. (2018). Administration of Vitamin D and high dose of omega 3 to sustain remission of type 1 diabetes. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *22*(2), 512–515. https://doi.org/10.2/JQUERY.MIN.JS
20. Chewcharat, A., Chewcharat, P., Rutirapong, A., & Papatheodorou, S. (2020). The effects of omega-3 fatty acids on diabetic nephropathy: A meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS ONE*, *15*(2). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0228315
21. Deutch, B., Jorgensen, E. B., & Hansen, J. C. (2000). N-3 PUFA from fish- or seal oil reduce atherogenic risk indicators in Danish women. *Nutrition Research*, *20*(8), 1065–1077. https://doi.org/10.1016/S0271-5317(00)00205-0
22. Gomes Neto, A. W., Sotomayor Campos, C. G., Pranger, I. G., van den Berg, E., Gans, R. O. B., Soedamah-Muthu, S. S., Navis, G. J., & Bakker, S. J. L. (2017). Intake of Marine-Derived Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Mortality in Renal Transplant Recipients. *Nutrients*, *9*(4). https://doi.org/10.3390/NU9040363
23. Grahl-Nielsen, O., & Mjaavatten, O. (1991). Dietary influence on fatty acid composition of blubber fat of seals as determined by biopsy: A multivariate approach. *Marine Biology 1991 110:1*, *110*(1), 59–64. https://doi.org/10.1007/BF01313092
24. Handelsman, Y., & Shapiro, M. D. (2017). Triglycerides, Atherosclerosis, and Cardiovascular Outcome Studies: Focus on Omega-3 Fatty Acids. *Endocrine Practice*, *23*(1), 100–112. https://doi.org/10.4158/EP161445.RA
25. Hu, Y., Hu, F. B., & Manson, J. A. E. (2019). Marine Omega-3 Supplementation and Cardiovascular Disease: An Updated Meta-Analysis of 13 Randomized Controlled Trials Involving 127 477 Participants. *Journal of the American Heart Association*, *8*(19). https://doi.org/10.1161/JAHA.119.013543
26. Kostoglou-Athanassiou, I., Athanassiou, L., & Athanassiou, P. (2020). The Effect of Omega-3 Fatty Acids on Rheumatoid Arthritis. *Mediterranean Journal of Rheumatology*, *31*(2), 190. https://doi.org/10.31138/MJR.31.2.190
27. Lemoine, S. C. M., Brigham, E. P., Woo, H., Hanson, C. K., McCormack, M. C., Koch, A., Putcha, N., & Hansel, N. N. (2019). Omega-3 fatty acid intake and prevalent respiratory symptoms among U.S. adults with COPD. *BMC Pulmonary Medicine*, *19*(1). https://doi.org/10.1186/S12890-019-0852-4
28. Li, X., Bi, X., Wang, S., Zhang, Z., Li, F., & Zhao, A. Z. (2019). Therapeutic Potential of ω-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Human Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, *10*(SEP), 2241. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.02241
29. Lorenz-Meyer, H., Bauer, P., Nicolay, C., Schulz, B., Purrmann, J., Fleig, W. E., Scheurlen, C., Koop, I., Pudel, V., & Carr, L. (1996). Omega-3 fatty acids and low carbohydrate diet for maintenance of remission in Crohn's disease. A randomized controlled multicenter trial. Study Group Members (German Crohn's Disease Study Group). *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *31*(8), 778–785. https://doi.org/10.3109/00365529609010352
30. Maki, K. C., & Dicklin, M. R. (2018). Omega-3 Fatty Acid Supplementation and Cardiovascular Disease Risk: Glass Half Full or Time to Nail the Coffin Shut? *Nutrients 2018, Vol. 10, Page 864*, *10*(7), 864. https://doi.org/10.3390/NU10070864
31. Mali, A. v., Bhise, S. S., & Katyare, S. S. (2016). Omega-3 Fatty Acids and Diabetic Complications. *Omega-3 Fatty Acids: Keys to Nutritional Health*, 221–227. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40458-5_16
32. Marton, L. T., Goulart, R. de A., Carvalho, A. C. A. de, & Barbalho, S. M. (2019). Omega Fatty Acids and Inflammatory Bowel Diseases: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(19). https://doi.org/10.3390/IJMS20194851

33. Nieto, N., Torres, M. I., Ríos, A., & Gil, A. (2002). Biochemical and Molecular Action of Nutrients Dietary Polyunsaturated Fatty Acids Improve Histological and Biochemical Alterations in Rats with Experimental Ulcerative Colitis 1. *J. Nutr*, *132*, 11–19. https://academic.oup.com/jn/article/132/1/11/4768393
34. Patterson, E., Wall, R., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P., & Stanton, C. (2012). Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated Fatty acids. *Journal of Nutrition and Metabolism*, *2012*. https://doi.org/10.1155/2012/539426
35. Rubio-Rodríguez, N., de Diego, S. M., Beltrán, S., Jaime, I., Sanz, M. T., & Rovira, J. (2012). Supercritical fluid extraction of fish oil from fish by-products: A comparison with other extraction methods Supercritical fluid extraction of fish oil from fish by-products: a 1 comparison with other extraction methods. *Journal of Food Engineering*, *109*(2), 238–248. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.10.011
36. Saini, R. K., & Keum, Y. S. (2018). Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review. *Life Sciences*, *203*, 255–267. https://doi.org/10.1016/J.LFS.2018.04.049
37. Saini, R. K., Prasad, P., Sreedhar, R. V., Naidu, K. A., Shang, X., & Keum, Y. S. (2021). Omega−3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs): Emerging plant and microbial sources, oxidative stability, bioavailability, and health benefits—A review. *Antioxidants*, *10*(10). https://doi.org/10.3390/ANTIOX10101627
38. Schmitz, G., & Ecker, J. (2008). The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Progress in Lipid Research*, *47*(2), 147–155. https://doi.org/10.1016/J.PLIPRES.2007.12.004
39. Scoditti, E., Massaro, M., Garbarino, S., & Toraldo, D. M. (2019). Role of Diet in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Prevention and Treatment. *Nutrients 2019, Vol. 11, Page 1357*, *11*(6), 1357. https://doi.org/10.3390/NU11061357
40. Veselinovic, M., Vasiljevic, D., Vucic, V., Arsic, A., Petrovic, S., Tomic-Lucic, A., Savic, M., Zivanovic, S., Stojic, V., & Jakovljevic, V. (2017). Clinical benefits of n-3 PUFA and ɤ-linolenic acid in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrients*, *9*(4). https://doi.org/10.3390/nu9040325
41. Yao, H., & Rahman, I. (2011). Current concepts on oxidative/carbonyl stress, inflammation and epigenetics in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *254*(2), 72–85. https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2009.10.022

Heavy metals contamination in water and sediments of the Iran rivers: a review

Reza Kazemi Darsanaki*[1], Hojatollah Jafaryan[2]

1- M.Sc. Student in Marine Biology, Department of Biology, Faculty of Basic Science and Engineering, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran
2- Associate Professor, Department of Fishery, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran

*Darsanaki@hotmail.com

Abstract
Nowadays, heavy metals contamination in aquatic ecosystems is one of the most significant global environmental issues. Since these metals have characteristics such as chemical stability, low degradability and bioaccumulation ability. Therefore they can affect the food chain at different levels, causing an abundant ecological risks for bioorganisms. In recent years, toxic and chemical effluents from agricultural and industrial activities have entered into surface waters without considering environmental considerations, which has caused water pollution, contamination of river sediments and many environmental hazards. Rivers and running waters have been required and considered by the human societies from a long time ago, and in order to exploit water resources, cities and industrial and agricultural centers have been established more or less near rivers. several studies have been conducted to determine the heavy metals contamination of rivers in the country, most of which indicate the existence of excess contamination in water and sediments. Therefore, the aim of this study was to review heavy metals contamination in water and sediments of the Iran rivers.

Keywords: Heavy metals, River, Sediment

مروری بر آلودگی فلزات سنگین در آب و رسوبات رودخانه‌های ایران

رضا کاظمی درسنکی*[۱]؛ حجت‌الله جعفریان[۲]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد زیست دریا، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی‌مهندسی، دانشگاه گنبدکاووس

۲-دانشیار، گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس

** Darsanaki@hotmail.com*

چکیده

امروزه یکی از مهم‌ترین مشکلات جهانی محیط‌زیست به‌خصوص در اکوسیستم‌های آبی، آلودگی ناشی از فلزات سنگین است. چراکه این عناصر به دلیل خصوصیاتی همچون ثبات شیمیایی، تجزیه‌پذیری ضعیف و داشتن قدرت تجمع زیستی در سطوح مختلف زنجیره غذایی موجب ایجاد صدمات و خطرات اکولوژیکی فراوانی برای موجودات زنده می‌گردند. در سال‌های اخیر پساب سمی و شیمیایی فعالیت‌های کشاورزی و صنعتی بدون رعایت ملاحظات زیست‌محیطی وارد آب‌های سطحی شده است که این عمل باعث ایجاد آلودگی آب، آلودگی رسوبات رودخانه و ایجاد مشکلات عدیده‌ای برای محیط‌زیست شده است. رودخانه‌ها و آب‌های جاری، از دیرباز موردنیاز و توجه جوامع بشری بوده‌اند و برای بهره‌بردن از منابع آب، شهرها، مراکز صنعتی و کشاورزی کمابیش در نزدیکی رودخانه‌ها برپا شده‌اند. در خصوص آلودگی فلزات سنگین در آب و رسوبات رودخانه‌های ایران مطالعاتی انجام شده است که بیشتر آن‌ها حاکی از وجود آلودگی در آب و رسوبات است. هدف این مطالعه؛ مروری بر آلودگی فلزات سنگین در آب و رسوبات رودخانه‌های ایران است.

واژگان کلیدی: فلزات سنگین، رودخانه، رسوبات

۱. مقدمه

اکوسیستم‌های آبی یکی از مهم‌ترین و غنی‌ترین اکوسیستم‌های جهان هستند که نقش مهمی در زندگی بشر و سایر موجودات زنده دارند (Haghshenas et al., 2017). بیش از۷۵ درصد وزن یک انسان و بیش از۷۰ درصد سطح کره زمین را آب پوشانده است. باوجود این حجم عظیم آب؛ تنها ۲ درصد از آب‌های کره زمین شیرین و قابل شرب می‌باشند و باقی آن‌ها به علل مختلف ازجمله شوری غیرقابل استفاده می‌باشند. از همین مقدار آب شیرین بیش از۹۰ درصد به‌صورت منجمد در دو قطب زمین قرار دارند. ۸۰ درصد جمعیت جهان تنها به ۲۰ درصد از ذخایر آب سالم و بهداشتی دسترسی دارند و این اهمیت آب و سلامت آن را به‌وضوح نشان می‌دهد (رحیمی ح، ۱۳۸۲). یکی از عمده‌ترین آلاینده‌های محیط‌زیست فلزات سنگین هستند. انتشار فلزات سنگین ناشی از افزایش صنعتی شدن و توسعه اقتصادی است. در بسیاری از مناطق وجود دارد و اثرات زیست محیطی نامطلوبی دارد. این فلزات در سه مخزن رسوب، آب و موجودات زنده انباشته می شوند که در میان رسوبات ظرفیت ذخیره سازی بالاتری دارند (Hossain et al., 2021). پایداری فلزات سنگین در محیط‌زیست، مشکلات زیادی را به وجود می‌آورد. پایداری آن‌ها سبب

تجمع زیستی در طول زنجیره غذایی می‌شود. فلزات سنگین به‌طور طبیعی از اجزای تشکیل‌دهنده پوسته زمین هستند؛ ولی فعالیت‌های انسانی به‌صورت قابل توجه‌ای، چرخه ژئوشیمیایی و توازن بیوشیمیایی آن‌ها را تغییر می‌دهد؛ در نتیجه ممکن است منجر به ورود غلظت بسیار بالایی از فلزات سنگین به محیط شود و موجودات زنده را تحت تأثیر قرار دهد. ازجمله مهم‌ترین منابع انسانی اصلی در تولید فلزات سنگین، خروجی‌ها و فاضلاب صنایع، معدنکاری، کودهای شیمیایی، آفت‌کش‌ها و سوزاندن سوخت‌های فسیلی و زباله‌ها است که سبب افزایش فلزات سنگین در خاک و درنهایت آب می‌شود (اعظمی و همکاران ۱۳۹۶). فلزات سنگین در محیط‌های آبی از شکل محلول و مواد جامد معلق در رسوبات جذب و انباشته می‌شوند. انباشت نهایی فلزات سنگین در محیط‌های آبی رسوبات و بدن موجودات زنده است. انباشت زیستی این فلزات از طریق شبکه غذایی نگرانی‌های ناشی از خطرهای بیولوژیکی و محیط‌زیستی بالقوه را فراهم می‌کنند (آبادی و همکاران ۱۳۹۸). بررسی فلزات سنگین در آب می‌تواند برای ارزیابی تأثیرات انسانی، صنعتی و خطرات ناشی از تخلیه زباله در اکوسیستم‌های رودخانه مورداستفاده قرار گیرد؛ بنابراین اندازه‌گیری غلظت فلزات سنگین در آب و رسوبات اکوسیستم رودخانه‌ها بسیار مهم است (خلیلی و همکاران ۱۴۰۰). مطالعاتی در خصوص میزان آلودگی فلزات سنگین رودخانه‌های سطح کشور انجام‌گرفته است که بیشتر آن‌ها حاکی از وجود آلودگی در آب و رسوبات رودخانه‌ها است. هدف این مطالعه؛ مروری بر آلودگی فلزات سنگین در آب و رسوبات رودخانه‌های ایران در دهه اخیر است.

۲. مواد و روش‌ها

طی این مطالعه مروری با کلیدواژه‌های «فلزات سنگین» و «رودخانه‌های ایران» به جستجو مطالعات مرتبط در خصوص آلودگی فلزات سنگین در آب و رسوبات رودخانه‌های ایران در دو دهه اخیر از پایگاه‌های معتبر داخلی نظیر Magiran, SID و Civilica پرداخته شد.

۱-۲- آلودگی آب رودخانه‌ها

استفاده‌های گوناگون از آب رودخانه‌ها به علت توسعه جوامع بشری و گسترش صنایع همواره از عوامل کاهش کیفیت آب‌های جاری است. آلودگی رودخانه‌ها را در حقیقت می‌توان شاخص آلودگی محیط‌زیست بر اثر فعالیت‌های انسانی به‌حساب آورد، زیرا رودخانه‌ها تنها منابع آبی هستند که مسیری طولانی را از میان شهرها، روستاها و مناطق صنعتی و کشاورزی طی می‌کنند (یعقوب زاده و صفری، ۱۳۹۴). ادامه حیات و زیست انسانی از جهات مختلف با سلامت و حفظ تعادل در اکوسیستم‌های آبی در ارتباط متقابل است؛ انسان برای ادامه حیات به آب و اکوسیستم‌های آبی وابسته است و از سوی دیگر برای تأمین آب موردنیاز خود تغییرات کمی و کیفی را بر منابع و اکوسیستم‌های آبی تحمیل می‌کند. هرگونه تغییرات نامطلوب در خواص فیزیکی و شیمیایی آب آلودگی تلقی می‌شود و منبع آلودگی به هر نوع فعالیتی اطلاق می‌شود که موجب چنین تغییراتی در خواص آب شوند. به‌طورکلی منابع آلوده‌کننده آب رودخانه‌ها شامل موارد زیر است:

منابع آلوده‌کننده آب رودخانه‌ها عبارت‌اند از:

۱- فاضلاب مناطق شهری و روستایی: فاضلاب‌های شهری و روستایی می‌توانند دارای آلودگی‌های میکروبی، مواد آلی، ترکیبات ازته و فسفره باشند که از طریق مناطق مسکونی وارد فاضلاب‌ها شده و محیط‌زیست را مورد تهدید قرار می‌دهند.

۲- منابع آلوده‌کننده صنعتی: فاضلاب‌های کارخانه صنعتی مملو از مواد سمی مانند فلزات سنگین است که در ترکیب با مواد جامد معلق در آب تشکیل لجن مسموم را بر بستر رودخانه‌ها می‌دهند.

۳-فعالیت‌های عمرانی: برخی فعالیت‌های عمرانی و شهرسازی از قبیل برداشت شن از بستر رودخانه‌ها، ریختن نخاله‌های ساختمانی و احداث جاده‌ها و پل‌ها نیز می‌توانند؛ سبب آلودگی رودخانه‌ها شوند.
۴-ضایعات کشاورزی و آب‌های زهکش مزارع: فاضلاب‌های دامداری‌ها، استخرهای پرورش آبزیان و سالن‌های پرورش ماکیان سرشار از مواد آلی، کودهای شیمیایی، بقایای سموم کشاورزی و میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا هستند.
۵- پدیده‌های طبیعی: پدیده‌هایی چون فعالیت‌های آتش‌فشانی، افزایش رشد جلبک‌ها، طوفان‌ها و زمین‌لرزه‌ها نیز در ایجاد آلودگی آب‌ها دخیل هستند (پورکاظم، ۱۳۸۹).

۲-۲- فلزات سنگین

فلزسنگین در واژه‌نامه‌های تخصصی به فلزاتی با جرم مخصوص بیش‌تر از ۵ گرم بر سانتی‌متر مکعب اطلاق می‌شود (اعظمی و همکاران، ۱۳۹۶). از نظر بیولوژی این واژه به عناصری که دارای خاصیت سمی هستند، اطلاق می‌شود. بر این اساس فلزاتی که در فهرست مواد سمی قرار می‌گیرند؛ عبارت‌اند از آلومینیوم، آرسنیک، برلیوم، بیسموت، کادمیوم، کروم، کبالت، مس، آهن، سرب، منگنز، جیوه، نیکل، سلنیوم، تالیم، قلع، تیتانیوم و روی، برخی از این فلزات نظیر کرم و آهن جزو عناصر ضروری در جیره غذایی روزانه انسان هستند اما دزهای بالای این عناصر سمی است. برخی از این عناصر از طریق دستگاه تنفس وارد بدن می‌شوند مانند سرب و برخی دیگر از طریق غذا جذب می‌شوند (میزان جذب این عناصر در بدن بستگی به نوع فلز دارد) برخی نمک‌های فلزی مانند نمک‌های سرب، قلع و کادمیوم به مقدار اندکی جذب بدن می‌شوند. در صورتی نمک فلزاتی مانند آرسنیک و تالیوم؛ تقریباً به‌طور کامل جذب می‌شوند. مهم‌ترین اندام جذب‌کننده عناصر سنگین کلیه‌ها هستند، در حقیقت کلیه‌ها وظیفه جذب مواد سمی از خون را بر عهده دارند. تقریباً تمام فلزات سنگین در بدن عوارض سو جای می‌گذارند که از آن جمله می‌توان به اختلال در سیستم عصبی، کلیوی، ایجاد جهش‌های ژنتیکی و غده‌ها اشاره کرد (اعظمی و همکاران ۱۳۹۶). مطالعه کیفیت آب رودخانه‌ها از نظر آلودگی به فلزات سنگین به علت غلظت بسیار کم و در نتیجه دقت پایین اندازه‌گیری آن‌ها مشکل است، درحالی‌که غلظت این عناصر در رسوبات به‌مراتب بالاتر است. این موضوع باعث شده تا رسوبات بستر به‌عنوان ابزاری برای تخمین وضعیت آلودگی رودخانه‌ها به کار گرفته شوند، بخشی از غلظت عناصر در رسوبات رودخانه‌ها به‌طور عمده در اثر هوازدگی سنگ‌های بستر، واریزه‌های غیر شستشوی و آلوده سنگ‌های حوزه آبخیز رودخانه‌های غیر آلوده روی‌هم انباشته شده و اجزای اصلی رسوبات را تشکیل می‌دهند (وهاب‌زاده و همکاران ۱۳۹۳). منابع برخی از فلزات سنگین در محیط‌های آبی در جدول شماره ۱ آمده است (Yousif et al., 2021). تجمع فلزات سنگین در رسوبات به طور مستقیم بر موجودات اعماق زمین و همچنین بسیاری از موجودات دیگر از طریق شبکه غذایی تأثیر می‌گذارد و رفاه اکوسیستم آبی را به خطر می‌اندازد. بنابراین، ارزیابی و درک توزیع و تجمع فلزات سنگین در رسوب از اهمیت بالایی برخوردار است (Huang et al., 2020).

جدول ۱: منابع برخی از فلزات سنگین در محیط‌های آبی

فلز سنگین	منبع
روی	صنایع آبکاری، ذوب و پالایش، معادن، مواد آلی جامد
آهن	خودروها،پل‌ها، ساختمان‌ها، وسایل خانگی و همچنین سایر منابع آهن مانند داروها، مواد شیمیایی، کودهای آهن و آفت‌کش‌ها
مس	صنایع آبکاری، ذوب و پالایش، معادن، مواد آلی جامد
سرب	استخراج و ذوب سنگ معدن فلزی، بنزین سرب‌دار، فاضلاب شهری، ضایعات صنعتی غنی‌شده با سرب، انواع رنگ‌ها
کادمیوم	ذوب و پالایش فلزات، سوزاندن سوخت‌های فسیلی، کودهای فسفاته، فاضلاب
جیوه	فوران‌های آتشفشان، آتش‌سوزی جنگل، انتشار گازهای گلخانه‌ای، زغال‌سنگ و سوزاندن چوب

آرسنیک	نیمه‌هادی‌ها، معدن و ذوب، نیروگاه‌های زغال‌سنگ، علف‌کش‌ها، آتشفشان‌ها، پالایش نفت، افزودنی‌های خوراک دام
کروم	صنایع آبکاری، لجن، ضایعات جامد
منگنز	فاضلاب شهری، استخراج معادن و فرآوری مواد معدنی، احتراق سوخت‌های فسیلی
نیکل	فوران‌های آتشفشانی، دفن زباله، آتش‌سوزی جنگل، هوازدگی خاک ، پساب‌های صنعتی، لوازم آشپزخانه، ابزار جراحی، آلیاژهای فولادی، باتری‌های خودرو

۳. نتایج و بحث

با توجه به غلظت فلزات سنگین در رسوبات، عمده تحقیقات صورت گرفته برای ارزیابی این فلزات در فاز رسوبی انجام می‌شود. فلزات پس از ورود به محیط آبی، از طریق فرآیندهای فیزیکی، شیمیایی و یا بیولوژیکی در رسوبات انباشته می‌شوند (راست‌منش و همکاران ۱۳۹۴). بررسی‌های انجام‌شده در دهه اخیر وضعیت آلودگی فلزات سنگین رودخانه‌های کشور را مخاطره‌آمیز نشان می‌دهند (جدول شماره ۲).

جدول ۲: میزان آلودگی فلزات سنگین رودخانه‌های کشور

سال مطالعه	محل نمونه‌برداری	فلزات سنگین موجود	بیشترین آلودگی	روش بررسی	نتیجه نهایی	منبع
۱۳۹۰	۱۰ ایستگاه رسوب در گرگانرود	آلومینیوم، نیکل، مس، آهن، کبالت، منگنز	آلومینیم	پلاسمای جفت شده القایی	غنی‌شدگی فلزات سنگین بیانگر آن است که این فلزات به‌طور عمده از منابع طبیعی فرسایش (حوضه آبریز) تأمین می‌شوند و اثر فعالیت‌های انسانی در تمرکز فلزات سنگین ناچیز است.	(باقری و همکاران ۱۳۹۰)
۱۳۹۱	۱۵ نمونه آب و ۱۵ نمونه رسوب خلیج گرگان و مصب رودخانه گرگانرود	روی، سرب، کروم و کادمیوم	سرب در آب روی در رسوب	طیف‌سنجی جذب اتمی	میزان کروم، کادمیوم و سرب در آب بیشتر از استاندارد سازمان بهداشت جهانی و غلظت فلزات در رسوب پایین‌تر از استاندارد جهانی بود.	(رجایی و همکاران ۱۳۹۷)
۱۳۹۳	۳۳ نمونه از رسوبات سطحی رودخانه حوزه آبخیز سردآبرود کلاردشت	کرم، منگنز، جیوه، کبالت، مس، نیکل، سرب، قلع	منگنز	طیف‌سنجی جرمی پلاسمای جفت‌شده القایی ICP-MS	منگنز وکروم دارای بیشترین میزان فراوانی بودند	(وهاب‌زاده و همکاران ۱۳۹۳).
۱۳۹۴	۱۶ نمونه از آب و رسوبات سطحی رودخانه قشلاق سنندج	آرسنیک، سرب، کادمیوم و روی	سرب	طیف‌سنجی جذب اتمی	سرب، روی، کادمیوم و آرسنیک به ترتیب بیشترین میزان آلودگی را به خود اختصاص دادند.	(فقیری و همکاران ۱۳۹۸)
۱۳۹۴	۲۴ نمونه از رسوبات رودخانه کارون	کروم، مس، روی، سرب، آرسنیک، نیکل، منگنز و آهن	نیکل	طیف‌سنجی جرمی پلاسمای	آلودگی متوسط رسوبات رودخانه	(راست‌منش و همکاران ۱۳۹۴)

			جفت‌شده القایی ICP-MS			
۱۳۹۴	رسوبات ۷ ایستگاه رودخانه زاینده‌رود	کادمیوم، مس، منگنز، نیکل، سرب و روی	کادمیوم	طیف‌سنجی انتشار اتمی ICP-AES	میزان تمام عناصر به‌جز کادمیوم از استانداردهای جهانی پایین‌تر است	(میرزایی و سلگی ۱۳۹۴)
۱۳۹۵	۱۵ نمونه از رسوبات رودخانه سیاهرود قائمشهر	سرب، روی، مس، کروم، نیکل، آرسنیک و کادمیوم	روی	استخراج ترتیبی	فلزات کادمیم و سرب و در بخش آلودگی متوسط تا شدید و دیگر فلزات در رده غیرآلوده با آلودگی خیلی کم.	(قشلاقی و رستمی ۱۳۹۶)
۱۳۹۶	۳ ایستگاه آب رودخانه خرم آباد	مس، روی، آهن، منگنز و کادمیوم	کادمیوم	طیف‌سنجی جذب اتمی	غلظت کادمیوم در دو ایستگاه بالاتر از استاندار جهانی بود و سایر عناصر پایین‌تر از استاندارد بودند.	(ملکی و همکاران ۱۳۹۶)
۱۳۹۶	۹۰ نمونه آب و رسوب رودخانه کرخه	جیوه، آرسنیک، نیکل و کادمیوم	جیوه	دستگاه جذب اتمی و سیستم کوره گرافیتی و هیدرید	آلودگی در رسوبات بیشتر از آب بود. میزان جیوه بالاتر از حد مجاز استاندارد ملی ایران و سازمان بهداشت جهانی بود، اما میزان کادمیوم، نیکل و آرسنیک آب رودخانه در مقایسه با آستانه مجاز استاندارد ملی ایران و استانداردهای جهانی نظیر آژانس حفاظت محیط‌زیست آمریکا و سازمان بهداشت جهانی پایین‌تر بود.	(رومیانی و پاینده، ۱۳۹۶)
۱۳۹۶	۱۲ نمونه آب سطحی از رودخانه اهرچای اهر	مس، آهن و روی	آهن	طیف‌سنجی جذب اتمی	مقادیر فلزات سنگین مس و روی و آهن در آب رودخانه اهرچای نسبت به استانداردهای ملی و بین‌المللی آب آشامیدنی، کاربری کشاورزی و شیلات و حیات آبزیان در حد مطلوب و قابل قبول قرار دارد	(جعفرزاده و همکاران ۱۳۹۶)
۱۳۹۷	نمونه رسوب ۱۲ ایستگاه در رودخانه بالخلو اردبیل	سرب، روی، کروم و مس	روی	طیف‌سنجی جذب اتمی	بار آلودگی و خطر اکولوژیکی فلزات سنگین منطقه در طیف خطر پایین قرار دارد.	(شاددل و همکاران ۱۳۹۷)
۱۳۹۸	نمونه رسوبات ۱۶ ایستگاه در چهار رودخانه مهم غرب مازندران منتهی به دریای خزر	آهن، منگنز، روی، مس، نیکل، سرب، کادمیوم و کبالت	روی	جذب اتمی شعله	عنصرهای روی، کادمیوم و سرب بیشتر از غلظت میانگین رسوبات جهانی است.	(آبادی و همکاران ۱۳۹۸)
۱۳۹۸	نمونه آب و رسوب از ۳ ایستگاه در تالاب ناصری خرمشهر	روی، آهن، منگنز، مس، نیکل و وانادیوم	مس	طیف‌سنجی پلاسمای جفت شده	مقادیر روی، آهن، مس و وانادیوم در آب تالاب پایین‌تر از حد مجاز استانداردهای	(ولایت زاده و کوشافر ۱۳۹۸)

			القایی و ترکیب آن با طیف‌سنجی جرمی		ملی و جهانی بود، اما میزان منگنز و نیکل بالاتر به دست آمد.	
۱۳۹۸	رسوبات سطحی رودخانه سیاه رود استان مازندران	آهن، روی، آرسنیک، سلنیوم، نیکل، کبالت، آلومینیوم، منگنز و کروم	آهن	اسپکترومتری نشری پلاسمای جفت شده القایی ICP OES	بیشترین غلظت مربوط به عنصر آهن و سپس منگنز و کمترین غلظت مربوط به کبالت بود. غلظت عناصر روی، آهن، نیکل، کبالت، آلومینیوم و منگنز نگران‌کننده نیست، اما مقادیر عناصر کروم، سلنیوم و آرسنیک نگران‌کننده بوده و به‌طور بالقوه می‌تواند تهدیدکننده سلامت موجودات باشند.	(ملوندی و حسن‌زاده ۱۳۹۸)
۱۳۹۹	رسوب از ۲۱ ایستگاه در رودخانه و سد مهاباد	آرسنیک، منگنز، روی، مس، نیکل، سرب، کادمیوم	منگنز در رسوب رودخانه و سد مخزن	طیف‌سنجی جرمی پلاسمای جفت‌شده القایی ICP-MS	منگنز وکروم دارای بیشترین میزان فراوانی بودند	(لاهیجی و همکاران ۱۳۹۹)

۳. نتیجه‌گیری

بررسی مطالعات انجام شده درخصوص آلودگی‌های فلزات رودخانه‌های کشور نشان می‌دهد که آلودگی در این رودخانه‌ها قابل‌توجه و در برخی بالاتر از استانداردهای تعیین‌شده است؛ بیشتر فلزات سنگین پس از ورود به رودخانه ها به سرعت در رسوبات رسوب می کنند. تجمع فلزات سنگین در رسوبات به طور مستقیم بر موجودات اعماق زمین و همچنین بسیاری از موجودات دیگر از طریق شبکه غذایی تأثیر می گذارد. تجمع بیش‌ازحد فلزات سنگین می‌تواند تأثیرات نامطلوبی بر روی کارکرد ارگانیسم‌های مختلف بدن نظیر کبد، کلیه، سیستم خون‌ساز، سیستم اعصاب، دستگاه گوارش و پوست داشته و باعث ایجاد سرطان در بافت‌های مختلف بدن گردد. ورود فاضلاب‌های شهری، صنعتی و کشاورزی از مهم‌ترین علل آلودگی این رودخانه‌ها مطرح هستند که مدیریت در جهت عدم ورود این فاضلاب‌ها به رودخانه‌ها و بررسی و پایش سالانه می‌تواند به کاهش و کنترل میزان آلودگی کمک نماید.

منابع

۳. رحیمی ح.۱۳۸۲. مشکل ناشناختهٔ جهانی. بحران آب. پیک نور.۲۲، ص ۲۳-۳۳.

۴. اعظمی ج. مرادپور م. کیانی مهر ن. ۱۳۹۶. مروری بر شاخص‌های زیستیِ محیط‌های آلوده به فلزات سنگین. انسان و محیط‌زیست. دوره ۱۵، شماره ۴۰ ص. ۱۳-۲۴

۵. آبادی م. زمانی ع. پری زنگنه ع. خسروی ی. بدیعی ح. ۱۳۹۸. بررسی غلظت فلزات سنگین در رسوبات چهار رودخانه مهم منتهی به دریای خزر. اکوبیولوژی تالاب.۱۱(۴۰)؛ ص. ۶۷-۸۲ .

۶. پور کاظم ا. ۱۳۸۹. بررسی منابع و عوامل آلودگی رودخانه‌های گیلان. ماهنامه دامدار. ۲۲۷، ص ۲۱.

۷. یعقوب زاده ز، صفری ر.۱۳۹۴. بررسی میزان آلودگی میکروبی آب‌های سطحی رودخانه هراز. ۲۸، ص ۱۳۶-۱۴۴.

۸. راست منش ف. زراسوندی ع. مسلم ف. ۱۳۹۴. ارزیابی آلودگی فلزات سنگین در رسوبات سطحی رودخانه کارون در محدوده شهر اهواز. زمین‌شناسی کاربردی پیشرفته، ۵(۱۷)، ص. ۱۱-۲۲.

۹. رومیانی ل. پاینده خ. ۱۳۹۶. بررسی تجمع فلزات سنگین در آب، رسوبات سطحی و چهار گونه گیاهان آبزی رودخانه کرخه. اکوبیولوژی تالاب (تالاب), ۹(۳۳), ص.۶۹-۸۴.

۱۰. قشلاقی ا؛ و رستمی ش. ۱۳۹۵. آلودگی و گونه‌سازی فلزات سنگین در رسوبات بستر رودخانه سیاهرود (منطقه قائم‌شهر - استان مازندران). پژوهش‌های چینه نگاری و رسوب‌شناسی. مجله پژوهشی علوم پایه دانشگاه اصفهان. ۳۲(۲ (پیاپی ۶۳)). ص ۷۳-۸۹ .

۱۱. فقیری ف. حاجی احمدی د. امان اللهی ج، قربانی ف. ۱۳۹۸. ارزیابی پتانسیل خطر اکولوژیک و منشأ یابی فلزات سنگین سرب، آرسنیک، کادمیوم و روی در آب و رسوبات سطحی رودخانه قشلاق سنندج. علوم و تکنولوژی محیط‌زیست، ۲۱(۳ (پیاپی ۸۲))، ص. ۱۹-۳۵.

۱۲. باقری ح. شارمد ت. خیرآبادی و. درویش بسطامی ک باقری ز. ۱۳۹۰. سنجش و ارزیابی آلودگی فلزات سنگین در رسوبات رودخانه گرگان رود. اقیانوس‌شناسی، ۲(۵), ص. ۳۵-۳۹.

۱۳. ملکی ع. ناصحی پ، شریفی پور، م. ۱۳۹۶. بررسی تغییرات مکانی و فصلی برخی فلزات سنگین در آب رودخانه خرم آباد، کنفرانس ملی پژوهش‌های نوین در مهندسی کشاورزی، محیط‌زیست و منابع طبیعی، کرج.

۱۴. رجایی ق. حسن‌پورم. مهدی نژاد م. (۱۳۹۱). بررسی غلظت فلزات سنگین روی، سرب، کروم و کادمیوم در آب و رسوب خلیج گرگان و مصب رودخانه گرگانرود. تحقیقات نظام سلامت، ۸(۵), ۷۴۸-۷۵۶.

15. Haghshenas A, Hatami-manesh M, Mirzaei M, Mir Sanjari M, Hossein Khezri P. 2017. Measurement and Evaluation of Ecological Risk of Heavy Metals in Surface Sediments of Pars Special Economic Energy Zone. ISMJ, 20(5), 448-469.

16. Vahabzadeh g, barsan y, masoudi. F. 2014. Investigation of effect of geological formation units on heavy metal distribution in sediments of sardabrood watershed. Journal of Watershed Management Research 5. 9.107-108.

17. Khalili R, Zali A, Motaghi H. 2021. Evaluation of Heavy Metals in Water and Sediments of Haraz River, Using Pollution Load Index (PLI) and Geoaccumulation Index (Igeo). Iranian Journal of Soil and Water Research, 52(4), 933-942.

18. Velayatzadeh M, Koshafar A.2019. Pollution Assessment some of Heavy Metals in Water and Surface Sediments of Nasseri Wetland (Khorramshahr). sjsph. 17 (2):157-168

19. Mirzaei M. Solgi E, 2016. Evaluation of heavy metals concentration (cadmium, copper, manganese, nickel, lead and zinc) in sediments of Zayandehrood River. Journal of Research in Environmental Health, 1(4),.251-265.

20. Lahijani O. Rastegari MM. Shakeri A. Yeganeh F.M, 2020. Study of heavy metals in bottom sediments of Mahabad river and dam, and investigating the risk of consumption of edible fish in the area. Iran. J. Health & Environ. 13,.1 .50-61.

21. Jafarzade Sh, Nasehi F, Ghorbani E, Moradi-Asl E .2017 .The Concentrations of Heavy Metals in Surface Water of Aharchai River. Journal of Occupational and Environmental Health, 3(2), pp.126-135.
22. Malvandi H. nd Hassanzadeh N. 2019. Potential ecological risk assessment of heavy metal contamination in surface sediment of the Siahrood River, Mazandaran province. Journal of Research in Environmental Health, 5(3) . 217-229.
23. Shaddel M. Mortazavi S. Tayebi L. Rahelinamin B. 2019. Monitoring of Heavy Metals Contamination (Pb, Zn, Cr and Cu) in Sediments of Balkhlou River of Ardebil by Implication of Sediment pollution Indices. Journal of Environmental Health Enginering, 6(2).213-226.
24. Yousif, R., Choudhary, M. I., Ahmed, S., & Ahmed, Q. 2021. Bioaccumulation of heavy metals in fish and other aquatic organisms from Karachi Coast, Pakistan. Nusantara Bioscience, 13(1).
25. Hossain, M., Ahmed, M., Liyana, E., Jolly, Y. N., Kabir, M. J., Akter, S., & Rahman, M. S. 2021. A case study on metal contamination in water and sediment near a coal thermal power plant on the eastern coast of Bangladesh. Environments, 8(10), 108.
26. Huang, Z., Liu, C., Zhao, X., Dong, J., & Zheng, B. 2020. Risk assessment of heavy metals in the surface sediment at the drinking water source of the Xiangjiang River in South China. Environmental Sciences Europe, 32(1), 1-9.

Review of microbial pollution of rivers in Iran and the factors affecting on rivers quality

Reza Kazemi Darsanaki[1], Mohammad Farhangi[*2]

1- M.Sc. Student in Marine Biology, Department of Biology, Faculty of Basic Science and Engineering, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran
2- Assistant Professor, Department of Fishery, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran

* *s.farhangi@yahoo.com*

Abstract

Rivers and lotic waters have had an essential role in human being civilization, as many rural and urban areas and also agricultural and industrial centers were established and developed near to rivers to ensure accessibility to the water resources. A pollutant is a waste material that pollutes air, water, or soil. Three factors determine the severity of a pollutant: its chemical nature, the concentration the area affected and the persistence. However, there are three categories of water Ppollutions, including physical, chemical and microbial pollutions, Microbial pollution which are the most important one, can be caused by disposal of unrefined homemade, industrial and agricultural wastewater to the rivers. Several studies conducted for determining the microbial pollution of rivers in the country indicated that microbial pollution existed in these water resources excessively. As the exploitation of water resources depend on its quality and the quality of natural water in rivers, lakes and below the ground surface depends on a number of interrelated factors such as variety of soluble inorganic and soluble organic compounds. So, the aim of this study was to review microbial pollution of rivers in Iran and the factors affecting on rivers quality.

Keywords: *Microbial Pollution, River, Coliform*

مروری بر آلودگی‌های میکروبی رودخانه‌های ایران و عوامل مؤثر بر آن

رضا کاظمی درسنکی[۱]؛ محمد فرهنگی*[۲]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد زیست دریا، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی‌مهندسی، دانشگاه گنبدکاووس

۲-استادیار، گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس

s.farhangi@yahoo.com

چکیده

رودخانه‌ها و آب‌های جاری، از دیرباز موردنیاز و توجه جوامع بشری بوده‌اند و برای بهره بردن از منابع آب، شهرها و مراکز صنعتی و کشاورزی کمابیش در نزدیکی رودخانه‌ها برپا شده‌اند. آلودگی در واقع همان ضایعاتی هستند که سبب آلوده شدن آب، هوا و خاک می شوند. شدت آلودگی به سه عامل بستگی دارد: طبیعت شیمیایی آلاینده، غلظت و مکان اثرپذیری و مقاومت آن در محیط. در هر صورت آلودگی‌ها به سه دسته آلودگی‌های فیزیکی، شیمیایی و میکروبی تقسیم می‌شوند، مهم‌ترین نوع آلودگی‌ها، آلودگی میکروبی است که ناشی از دفع فاضلاب‌های تصفیه نشده خانگی، صنعتی و کشاورزی به رودخانه‌ها است. مطالعاتی در خصوص تعیین میزان آلودگی میکروبی رودخانه‌های سطح کشور انجام‌گرفته است که بیشتر آن‌ها حاکی از وجود آلودگی بیش از حد استاندارد در این منابع آبی است. یکی از مسائل مهم در بهره‌برداری از منابع آب، کیفیت آن است و کیفیت آب رودخانه ها، دریاچه ها و آبهای زیرزمینی نیز خود وابسته به چندین فاکتور از جمله ترکیبات معدنی و ,آلی محلول در آب است. بنابراین هدف این مطالعه؛ مروری بر آلودگی‌های میکروبی رودخانه‌های کشور و عوامل مؤثر بر آن است.

واژگان کلیدی: آلودگی‌های میکروبی، رودخانه، کلی فرم

۱. مقدمه

آب فراوان‌ترین ماده مرکب روی سطح کره زمین است. برخورداری از آب سالم برای نیازهای انسانی از عوامل اساسی و به‌منزله عامل تمدن شناخته می‌شود، به‌طوری که همواره مورد احترام جوامع بوده و رودخانه‌های مختلف در سراسر جهان، نزد جمعیت‌های ساکن در آن نواحی اهمیت زیادی داشته و مورد تقدس بوده است. هیچ کشوری بدون اطمینان از داشتن آب نمی‌تواند ثبات اقتصادی، اجتماعی و سیاسی خود را حفظ کند. امروزه کمبود و آلودگی آب، زندگی میلیون‌ها نفر از ساکنان زمین، به‌خصوص کشورهای فقیر را به‌شدت با خطر مواجه ساخته است. ۸۰ درصد جمعیت جهان تنها به ۲۰ درصد از ذخایر آب سالم و بهداشتی دسترسی دارند. بیماری‌های ناشی از آب آلوده نیز عامل بسیاری از مرگ‌ومیرها در کشورهای فقیر جهان است (رحیمی ح، ۱۳۸۲). آلودگی محیط‌زیست، یکی از اصلی‌ترین عوامل نابودی و تهدید جمعیت موجودات زنده است. آلودگی منابع آبی نه‌تنها حیات آبزیان را به نابودی می‌کشاند، بلکه حیات انسان را نیز به مخاطره انداخته و تهدید می‌کند. بیش از ۱۶ درصد جمعیت کشور در استان‌های ساحلی استقرار یافته‌اند. ازاین‌رو توجه به کیفیت ذخایر آبی که تحت تأثیر فعالیت‌های مختلف انسانی هستند، پیش از پیش آشکار

می‌گردد (Joubani et al., 2014). افزایش سریع جمعیت شهرها و توسعه مراکز مسکونی، صنعتی و دامداری‌ها در اطراف رودخانه‌ها و تخلیه فاضلاب و فضولات انسانی و شیمیایی به آن‌ها؛ آلودگی را در سالیان اخیر افزایش داده‌اند. از سوی دیگر نبود سیستم‌های مدرن دفع فاضلاب و بالا بودن سطح ایستابی، باعث تخلیه بیشتر فاضلاب به رودخانه‌ها شده است. آبهای سطحی بیش از آب‌های دیگر در معرض آلودگی قرار دارند به دنبال بارندگی، به‌خصوص بارش‌های شدید، ذرات مختلف گیاهی، حیوانی و حتی صنعتی و سمی با آب حمل شده و آب‌ها را آلوده می‌سازند(ویسی و همکاران ۱۴۰۰). عوامل میکروبی از آلاینده‌های بسیار مهمی هستند که از طریق فاضلاب‌های شهری و روستایی تصفیه نشده به‌صورت مستقیم و یا غیرمستقیم وارد رودخانه‌ها شده و می‌توانند موجب به خطر افتادن سلامت انسان‌ها شوند. از مهم‌ترین باکتری‌های شاخص در آب‌های ساحلی می‌توان به اشریشیا کلی، سیتروباکتر، کلبسیلا، انتروباکتر، سودوموناس‌ها و ... اشاره نمود. این میکروارگانیسم‌های فرصت‌طلب و بیماری‌زا در آب‌های سطحی آلوده زمینه ابتلا به انواع بیماری‌های پوستی، گوارشی و تنفسی را فراهم می‌کنند (Shahryari et al., 2008 and Griffin et al., 2001). مطالعاتی در خصوص تعیین میزان آلودگی میکروبی رودخانه‌های سطح کشور انجام‌گرفته است که بیشتر آن‌ها حاکی از وجود آلودگی در این منابع آبی است. هدف این مطالعه بررسی میزان آلودگی‌های میکروبی رودخانه‌های کشور و عوامل مؤثر بر آن در دو دهه اخیر است.

۲. مواد و روش‌ها

طی این مطالعه مروری مقالات مرتبط با آلودگی میکروبی رودخلنه‌های کشور در دو دهه اخیر از پایگاه‌های معتبر داخلی نظیر Magiran, SID و Civilica جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت.

۱-۲- آلودگی آب رودخانه‌ها

با تماس آب با سطح زمین امکان آلودگی آن به ذرات کوچک زنده و غیرزنده که در مسیر آن قرار می‌گیرند، وجود دارد. این مواد ممکن است؛ مقدارشان خیلی ناچیز و یا به‌اندازه‌ای باشد که موجب ایجاد خواص جدید در آب شوند. میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا از راه ادرار و یا مدفوع انسانی وارد خاک شده و با آب تماس پیدا می‌کنند. گاهی نیز ممکن است آب با ترشحات حاصله از سایر حیوانات، آلودگی میکروبی پیدا کند و موجب بیماری شود؛ به‌عبارت‌دیگر هر آبی که ادرار یا مدفوع انسان و یا حیوانات دیگر در آن واردشده باشد، آب آلوده نامیده می‌شود.

استفاده‌های گوناگون از آب رودخانه‌ها به علت توسعه جوامع بشری و گسترش صنایع همواره از عوامل کاهش کیفیت آب‌های جاری است. آلودگی رودخانه‌ها را می‌توان شاخص آلودگی محیط‌زیست بر اثر فعالیت‌های انسانی به‌حساب آورد، زیرا رودخانه‌ها تنها منابع آبی هستند که مسیری طولانی را از میان شهرها، روستاها و مناطق صنعتی و کشاورزی طی می‌کنند (یعقوب زاده و صفری، ۱۳۹۴).

منابع آلوده‌کننده آب رودخانه‌ها عبارت‌اند از:

۱- فاضلاب مناطق شهری و روستایی: خواص فاضلاب‌های مسکونی تقریباً یکنواخت بوده ولی غلظت آلاینده‌های آن‌ها با میزان سرانه آب مصرفی متغیر است و به آلودگی‌های میکروبی، مواد آلی و ترکیبات ازته و فسفره پارامترهای آلوده‌کننده بستگی دارد که از طریق مناطق مسکونی وارد فاضلاب‌ها شده و محیط‌زیست را مورد تهدید قرار می‌دهند.

۲- منابع آلوده‌کننده صنعتی: فاضلاب‌های کارخانه صنعتی مملو از مواد سمی مانند فلزات سنگین است که در ترکیب با مواد جامد معلق در آب تشکیل لجن مسموم را بر بستر رودخانه‌ها می‌دهند.

۳-فعالیت‌های عمرانی: برخی فعالیت‌های عمرانی و شهرسازی از قبیل برداشت شن از بستر رودخانه‌ها، ریختن نخاله‌های ساختمانی و احداث جاده‌ها و پل‌ها نیز می‌توانند؛ سبب آلودگی رودخانه‌ها شوند.

۴-ضایعات کشاورزی و آب‌های زهکش مزارع: فاضلاب‌های دامداری‌ها، استخرهای پرورش آبزیان و سالن‌های پرورش ماکیان سرشار از مواد آلی، کودهای شیمیایی، بقایای سموم کشاورزی و میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا هستند.
۵- پدیده‌های طبیعی: پدیده‌هایی چون فعالیت‌های آتش‌فشانی، افزایش رشد جلبک‌ها، طوفان‌ها و زمین‌لرزه‌ها نیز در ایجاد آلودگی آب‌ها دخیل هستند (پور کاظم، ۱۳۸۹).

۲-۲- شاخص‌های میکروبی کیفیت آب

آب آلوده به مدفوع، سبب بیماری‌های روده‌ای زیادی است، امکان آزمایش آب برای هر پاتوژن احتمالی که ممکن است در آن حضورداشته باشد، غیرممکن است. به همین خاطر باید شاخصی را جهت تشخیص آلودگی مدفوعی آب، تعیین کرد. شاخص آلودگی مدفوعی، باید به تعداد زیادی در مدفوع انسان و حیوانات خونگرم وجود داشته باشند و باید به‌آسانی توسط روش‌های ساده قابل‌تشخیص باشند و همچنین نباید در آب‌های طبیعی رشد کنند. علاوه بر این میزان پایداری آن‌ها و حذف آن‌ها به‌وسیله روش‌های تصفیه آب، مشابه سایر عوامل بیماری‌زای منتقله توسط آب باشد.
به‌طورکلی به پنج شاخص آلودگی مدفوعی می‌توان اشاره نمود:
۱- کلی فرم مدفوعی مقاوم در برابر حرارت و توتال‌کلی‌فرم‌ها (کلی‌فرم کل)
۲-انتروکوک‌های مدفوعی
۳-کلستریدیوم‌های احیاءکننده سولفیت
۴-باکتریوفاژها
۵-شاخص‌های متفرقه
لازم به ذکراست که گروه اول، مهم‌ترین شاخص آلودگی مدفوعی آب می‌باشند. سایرگروه‌ها همیشه به‌طور معمول آزمایش نمی‌شوند و به‌عنوان شاخص‌های ثانوی مطرح هستند (عیسی‌زاده و همکاران ۱۳۹۳ و محمدعلی زاده و همکاران، ۱۳۹۴).

۲-۳- استانداردهای و حد مجاز باکتریولوژیکی آب

آب‌ها را برحسب نوع استفاده و کاربری از نظر تعداد کلی‌فرم کل و مدفوعی به‌صورت زیر طبقه‌بندی می‌کنند (جداول شماره ۱،۲ و ۳)

جدول۱: استاندارد تعداد کل کلی فرم و کلی فرم مدفوعی ازنظر محل شنا گاه‌های طبیعی و پرورش ماهی (آهنگر زاده و همکاران، ۱۳۹۸).

عوامل میکروبی	استاندارد شنا	استاندارد پرورش ماهی
کلی فرم کل (در ۱۰۰ سی‌سی نمونه)	۴۶۰	-
کلی فرم مدفوعی (در ۱۰۰ سی‌سی نمونه)	۱۰۰	کمتر از ۱۰۰۰

جدول ۲: حد مجاز شاخص‌های باکتریولوژی مورد بررسی برای اغلب کاربری‌ها (آهنگرزاده و همکاران، ۱۳۹۸).

کاربری	کلی فرم کل (در ۱۰۰ سی‌سی نمونه)	کلی فرم مدفوعی (در ۱۰۰ سی‌سی نمونه)
آب آشامیدنی، شرب احشام محصور شده و آب مورد استفاده در صنایع غذایی (بدون نیاز به تصفیه)	۰	۰

آب آشامیدنی، شرب احشام محصور شده و آب مورد استفاده در صنایع غذایی (فقط نیازمند ضدعفونی کردن)	<۱۰	<۱۰
آب آشامیدنی، شرب احشام محصور شده و آب مورد استفاده در صنایع غذایی (نیازمند تصفیه مقدماتی)	≤۱۰۰	<۱۰۰
آبیاری محصولاتی که خام مصرف می‌شوند و استفاده‌های تفریحی (شنا، ورزش‌های آبی)	≤۲۰۰	≤۷۷
استفاده چارپایانی که عموماً در مزارع استفاده می‌شوند	۰	<۲۰۰
آبیاری عمومی	≤۱۰۰۰	≤۱۰۰۰

جدول ۳: استاندارد خروجی مجاز فاضلاب‌ها و پساب‌ها از نظر کلی‌فرم و کلی‌فرم مدفوعی- استاندارد محیط‌زیست (آهنگرزاده و همکاران، ۱۳۹۸).

عوامل میکروبی	تخلیه به آب‌های سطحی	تخلیه به چاه جاذب	مصارف کشاورزی و آبیاری
کلی فرم کل (در ۱۰۰ سی‌سی نمونه)	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰
کلی فرم مدفوعی (در ۱۰۰ سی‌سی نمونه)	۴۰۰	۴۰۰	۴۰۰

۲-۳- میزان آلودگی میکروبی رودخانه‌های کشور

بررسی‌های انجام‌شده در دو دهه اخیر وضعیت آلودگی میکروبی رودخانه‌های کشور را مخاطره‌آمیز نشان می‌دهند (جدول شماره ۴). در مطالعه شهسواری و اسماعیلی طی سال‌های ۱۳۸۲ الی ۱۳۸۳؛ ۱۷ ایستگاه در امتداد رودخانه هراز (امامزاده هاشم تا پلیس‌راه بایجان) جهت بررسی کلی‌فرم کل و مدفوعی مورد بررسی قرار گرفتند که میزان آلودگی در فصل بهار در پایین‌دست بیشتر از بالادست بود و علل آلودگی بیشتر نسبت به استانداردها؛ ورود انواع فاضلاب خانگی، صنعتی، کشاورزی و ازدحام جمعیت بود. مردانی و همکاران، در بازه فروردین تا آذر ۱۳۸۳، میزان آلودگی کلی‌فرمی رودخانه کر در استان فارس را در ۳ ایستگاه مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد؛ بیشترین آلودگی کلی‌فرمی در مرداد و در لایه‌های سطحی مشاهده شد که در دو ایستگاه بالاتر از حد استاندارد بود.

در بررسی یعقوب‌زاده و صفری طی سال‌های ۱۳۸۸ الی ۱۳۸۹؛ ۸۴ نمونه از آب‌های سطحی رودخانه هراز (۷ ایستگاه) جهت سنجش کلی‌فرم کل و مدفوعی مورد بررسی قرار گرفتند. ایستگاه سرخرود که پایین‌دست‌ترین ایستگاه مورد بررسی بود؛ بیشترین آلودگی کلی‌فرمی را داشت و بیشترین فصل آلودگی پاییز (ماه آذر) ثبت گردید. در بررسی حقیقی و همکاران در سال ۱۳۸۶، کیفیت میکروبی رودخانه سبز کوه در استان چهارمحال و بختیاری مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد. کلی‌فرم‌ها کل دارای بیشترین آلودگی بود و هیچ کدام از نمونه‌های آب به باکتری سالمونلا آلودگی نداشتند. افزایش بار میکروبی آب رودخانه بویژه در فصل تابستان بدلیل شرایط نامساعد رودخانه (ازجنبه تبخیر بالا و دبی کم) تشدید یافته گزارش شد. در مطالعه دیگر از یعقوب زاده و صفری در

مهر ۱۳۸۸ تا شهریور ۱۳۸۹ باکتری‌های کلی‌فرمی و تخم نماتود رواناب‌های رودخانه هراز در ۴ ایستگاه مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد به دلیل تخلیه زباله در اطراف رودخانه و استفاده از مسیر رودخانه‌ها برای انتقال فاضلاب شهری و صنعتی و زه آب‌های مزارع کشاورزی و باغداری، رواناب‌های رودخانه هراز در معرض آلودگی‌های میکروبی و انگلی قرار دارند که در فصل بهار در بیشترین مقدار خود قرار دارد. در بررسی فئید و همکاران در فصل‌های تابستان و پاییز سال ۱۳۹۰ در تالاب انزلی جهت شناسایی شاخص‌های میکروبی نشان داد؛ از ۸ ایستگاه مورد بررسی، ایستگاه ۶ (رودخانه پیر بازار) در فصل تابستان بیشترین آلودگی کلی‌فرمی کل و مدفوعی را داشت؛ که این امر به دلیل قرارگیری این ایستگاه در مجاورت مناطق مسکونی، ورود فاضلاب شهری، استقرار کارگاه و تعمیرگاه‌ها است. در مطالعه جلیل زاده و همکاران آلودگی میکروبی رودخانه دز در سال ۱۳۹۲ در ۸ ایستگاه در فصل بهار مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد؛ ورود فاضلاب‌های خانگی شهری و کشاورزی ازدحام جمعیت از مهم‌ترین عوامل آلودگی کلی‌فرمی بیش از استانداردهای تعیین‌شده در این مطالعه است. بررسی قربانی و علیدوست در سال ۱۳۹۶ نشان داد، از ۶ ایستگاه مورد مطالعه در دو فصل بهار و تابستان از رودخانه ناورود، باکتری اشریشیا کلی در فصل بهار به بیشترین مقدار خود رسید که دلیل این افزایش بارش باران، افزایش رطوبت که همراه با جاری شدن روان آب‌های آلوده به فاضلاب و پس‌آب کشاورزی و آلاینده‌ها است؛ نسبت به تابستان ذکر گردید. طی مطالعه تنهایی و رستمی در سال ۱۳۹۶ (فروردین تا شهریور)، رودخانه مهاباد از لحاظ پارامترهای میکروبیولوژیکی در ۴ ایستگاه مورد پایش قرار گرفت و نتایج نشان داد که از ایستگاه ۱ به ۴ میزان آلودگی کاهش پیدا نمود که دلیل این امر جریان حرکت آب و توان خودپالایی آن ذکر شد. بیشترین آلودگی در فصل بهار (اردیبهشت) مشاهده شد که کمتر از کمتر از استانداردهای مربوطه بود. خطیب و همکاران در سال ۱۳۹۶ آلودگی کلی‌فرمی رودخانه کرگانرود در غرب استان گیلان را مورد سنجش قرار دادند و بیشترین میزان آلودگی در منطقه مصب و بستر به علت کاهش دبی آب و عبور از مراکز شهری و کشاورزی و وارد شدن ضایعات آن‌ها به داخل رودخانه و ته‌نشین شدن و در فصل تابستان به علت کم شدن حجم آب رودخانه و افزایش درصد باکتری‌ها در حجم کمتر آب مشاهده شد. مطالعه آهنگرزاده و همکاران در سال ۱۳۹۸ در بررسی آلودگی میکروبی ۶ ایستگاه از آب‌های سطحی رودخانه گرگر نشان داد، بیشترین میزان آلودگی در فصل پاییز و در ایستگاه شماره ۲ مشاهده شده که این ایستگاه در نزدیکی ورودی تخلیه فاضلاب شوشتر واقع شده است. در بررسی صابری نیا و همکاران در سال ۱۳۹۵-۱۳۹۶، آلودگی رودخانه گوهررود در استان گیلان از نظر هتروتروف و کلی‌فرم‌های مقاوم به آنتی بیوتیک مورد بررسی قرار گرفت که نشان داد رودخانه گوهررود آلوده به باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و به‌ویژه باکتری‌های مقاوم به سفالکسین بوده و اگر از آب رودخانه در آبزی‌پروری و آبیاری کشت‌زارهای پایین‌دست در کشاورزی استفاده شود، ممکن است باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و ژن‌های مقاومت در آنها در اکوسیستم‌های دیگر پخش شده و وارد زنجیره غذایی انسان شوند.

جدول ۴: میزان آلودگی میکروبی رودخانه‌های کشور

سال مطالعه	رودخانه	نوع آلودگی غیرمجاز	بیشترین فصل آلوده	نتیجه نهایی	منبع
۱۳۸۲-۱۳۸۳	هراز	کلی‌فرم کل و مدفوعی	بهار	بیشتر از استانداردهای تعیین‌شده	شهسواری و اسماعیلی، ۱۳۹۰
۱۳۸۳	کر	کلی‌فرم کل و مدفوعی	تابستان	بیشتر از استانداردهای تعیین‌شده در	مردانی و همکاران، ۱۳۹۶

				برخی از ایستگاه‌ها	
۱۳۸۸-۱۳۸۹	هراز	کلی‌فرم مدفوعی و نماتود	بهار	بیشتر از استانداردهای تعیین‌شده	یعقوب زاده و صفری، ۱۳۹۵
۱۳۸۸-۱۳۸۹	هراز	کلی‌فرم کل و مدفوعی	پاییز	بیشتر از استانداردهای تعیین‌شده	یعقوب زاده و صفری، ۱۳۹۴
۱۳۸۶	سبز کوه	کل کلی‌فرم‌ها و کلیفرم مدفوعی و سالمونلا	تابستان	کل کلی‌فرم‌ها بیشترین آلودگی را داشتند و هیچ کدام از نمونه‌های آب به باکتری سالمونلا آلوده نبودند	حقیقی و همکاران، ۱۳۹۸
۱۳۹۰	تالاب انزلی	کلی‌فرم کل و مدفوعی و انتروکوک	تابستان	بیشتر از استانداردهای تعیین‌شده	فئیده و همکاران، ۱۳۹۴
۱۳۹۲	دز	اشریشیا کلی و کلی‌فرم کل	بهار	بیشتر از استانداردهای تعیین‌شده	جلیل زاده و همکاران، ۱۳۹۲
۱۳۹۵-۱۳۹۶	گوهررود	هتروتروف و کلی‌فرم	زمستان	تعداد هتروتروف بیشتر از کلی‌فرم بود و مقاومت آنتی‌بیوتیکی داشتند	صابری نیا و همکاران، ۱۳۹۹
۱۳۹۶	ناورود	اشریشیا کلی و کلی‌فرم کل	بهار	کمتر از استانداردهای تعیین‌شده	قربانی و علیدوست، ۱۳۹۶
۱۳۹۶	مهاباد	اشریشیا کلی و کلی‌فرم کل، نماتود	بهار	کمتر از استانداردهای تعیین‌شده	تنهایی و رستمی، ۱۳۹۷
۱۳۹۶	گرگانرود	کلی‌فرم کل و مدفوعی	تابستان	کمتر از استانداردهای تعیین‌شده	خطیب و همکاران، ۱۳۹۶

۱۳۹۸	گرگر	کلی‌فرم کل و مدفوعی	پاییز	بیشتر از استانداردهای تعیین‌شده	آهنگرزاده و همکاران، ۱۳۹۸

۳. نتیجه‌گیری

بررسی مطالعات انجام شده درخصوص آلودگی‌های میکروبی رودخانه‌های کشور نشان می‌دهد که آلودگی کلی‌فرمی در این رودخانه‌ها نگران‌کننده و بالاتر از استانداردهای تعیین‌شده است؛ که خطر جدی برای سلامتی محسوب می‌گردد. ورود فاضلاب‌های شهری، روستایی، صنعتی و کشاورزی از مهم‌ترین علل آلودگی این رودخانه‌ها مطرح هستند که مدیریت در جهت عدم ورود این فاضلاب‌ها به رودخانه‌ها و بررسی و پایش سالانه می‌تواند به کاهش میزان آلودگی و افزایش سلامت عمومی کمک نماید.

منابع

۶. پور کاظم ا. ۱۳۸۹. بررسی منابع و عوامل آلودگی رودخانه‌های گیلان. ماهنامه دامدار. ۲۲۷، ص ۲۱.

۷. تنهایی و، رستمی کشکی ن. ۱۳۹۷. پایش کیفی آب رودخانه مهاباد از لحاظ پارامترهای میکروبیولوژیکی بر اساس پروتکل ۱۰۱۱ سازمان ملی استاندارد ایران. تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی.۸،۳۱، ص ۵۷-۶۴.

۸. جلیل زاده ر، یزدی زاده ر، مرشدی ج. ۱۳۹۲. مطالعه آلودگی میکروبی رودخانه دز مطالعه موردی: محدوده شهرستان دزفول، دومین همایش ملی حفاظت و برنامه‌ریزی محیط‌زیست، همدان.

رحیمی ح.۱۳۸۲. مشکل ناشناختهٔ جهانی. بحران آب. پیک نور.۲۲، ص ۲۳-۳۳. 9.

۱۰. شهسواری پور، اسماعیلی ساری. ۱۳۹۰. بررسی آلودگی میکروبی رودخانه هراز و تعیین کاربری‌های مجاز آب رودخانه با توجه به استانداردهای جهانی. فصلنامه علوم و تکنولوژی *محیط‌زیست*. ۱۳، ۴، ص ۹۴-۸۱.

۱۱. عیسی‌زاده خ، کاظمی درسنکی ر، عزیزالهی علی‌آبادی م. ۱۳۹۳. کتاب میکروبیولوژی محیطی، انتشارات دانشگاه آزاد واحد لاهیجان. ص ۲۱۶

۱۲. یعقوب زاده ز، صفری ر.۱۳۹۴. بررسی میزان آلودگی میکروبی آب‌های سطحی رودخانه هراز. ۲۸، ص ۱۳۶-۱۴۴.

۱۳. صابری نیا، ف. فرهنگی، م. یغماییان مهابادی، ن. قربان‌زاده ن. ۱۳۹۹. بررسی آلودگی رودخانه گوهررود به باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک. آب و فاضلاب. ۱۳۱، ص ۱۴۵-۱۶۱.

۱۴. حقیقی، س. قانع، ا. مددی، ف. ۱۳۹۸. بررسی میکروبی پساب های پرورش ماهیان سرد آبی رودخانه سبز کوه در استان چهارمحال و بختیاری

۱۵. مطالعات علوم زیستی و زیست فناوری.۱۴، ص ۳۱-۴۱.

۱۶. محمد ویسی، م. روزبهانی، م. ظهرابی، ن. ۱۴۰۰. بررسی کیفیت آب رودخانه شاوور با استفاده از شاخصهای کیفی آب. علوم و تکنولوژی محیط زیست. ۲۳، ص ۸۴-۹۳.

17. Ahangarzadeh M. Houshmand H., Dehghan madiseh S., Seyed Morezaei S.R. 2020. Evaluation of bacterial contamination of surface waters of the Gargar River based on global standards. Isfj. 29 (2):169-178.

18. Griffin, DW., Lip EK., McLaughlin MR., Rose JB. 2001. Marine recreation and public health microbiology quest for the ideal indicator. Bioscience. 51(10), 817-825.

19. Khatibhaghighi S., et al. 2017. Study of Coliform Contamination of Karganrood River in the West of Guilan Province." Advanced Aquaculture Sciences Journal 1.2: 87-98.
20. Naimi- joubani M., Eslami M., Saeedi A., Keramati A., Javahershenas M. 2014. Study of the Microbial Contamination in Coastal Water of the Caspian Sea in the Guilan Province, Northern Iran. Jour guilan uni med sci. 22 (S1):67-72
21. Sayyad Ghorbani Shirin, Farzin, and Alidoost Nedamani S. 2017. Evaluation of microbial contamination of Nawrood River to *E. coli* and Coliform bacteria based on global standards. Journal of Environmental Geology.11;40; 1-10.
22. Shahryari A., Javad Kabir M., Golfirozy K. 2008. Evaluation of microbial pollution of Caspian Sea at the Gorgan Gulf. J Gorgan Uni Med Sci. 10 (2), 69-7.
23. Yaghoubzadeh Z., and Safari R. 2016. Evaluation of coliform bacteria and Nematode eggs in Haraz River runoff. isfj. 25 (1) :29-38
24. Yaghoubzadeh Z.,Reza Safari R. 2015. Evaluation of bacterial contamination of surface waters of Haraz River. Cellular and Molecular Researche Iranian Journal of Biology28.1: 136-144.

Prebiotics and fermented carbon sources in aquaculture systems

Mohammad Hossein Khanjani

Department of Fisheries Sciences and Engineering, Faculty of Natural Resources, University of Jiroft, Jiroft, Kerman, Iran

**Corresponding Author Email address: m.h.khanjani@ujiroft.ac.ir*

Abstract

Global population growth has increased demand for food, resulting in intensive aquaculture and, consequently, an increase in disease risks. Aquatic animals and consumers have been exposed to health risks due to bacterial resistance in aquatic animals and the improper use of antibiotics for the prevention and treatment of disease. A series of regulations have been implemented to reduce antibiotic use in aquatic life by prohibiting or reducing their use. Suitable supplements in diet and water have been used as alternatives, among which prebiotics and fermented carbon sources have been most useful for controlling or treating bacterial, viral, and parasitic diseases in aquaculture. Prebiotics have been discussed in this study as well as their benefits. Enhanced growth performance, the strengthening of immune responses, improved water quality, and changes in intestinal microflora, as well as better digestion and absorption of feed are some of the benefits provided by prebiotics and fermented carbon sources in aquaculture systems.

Keywords: prebiotics, carbon source, aquaculture

پری بیوتیک ها و منابع کربن تخمیر شده در سیستم های آبزی پروری

محمدحسین خانجانی

گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، کرمان، ایران

m.h.khanjani@ujiroft.ac.ir

چکیده

با افزایش جمعیت جهان، تقاضا برای غذا افزایش یافته که منجر به پرورش متراکم آبزیان و به دنبال آن خطر بیماری ها نیز تشدید شده است. تولید کنندگان به دلیل شیوع بیماری ها و استفاده نامناسب از انواع آنتی بیوتیک ها برای پیشگیری و درمان بیماری ها با زیان‌های عمده‌ای مواجه شده‌اند که منجر به مقاومت باکتریایی در آبزیان و تحمیل خطرات سلامتی بر مصرف‌کنندگان شده است. مقررات مشخصی برای ممنوعیت یا کاهش استفاده از انواع آنتی بیوتیک ها برای کاهش اثرات مضر آنها بر زندگی آبزیان وضع شده است. مکمل‌های مناسب در جیره غذایی و آب به‌عنوان جایگزین مورد استفاده قرار گرفته‌اند که در میان آنها پری‌بیوتیک‌ها و منابع کربن تخمیر شده برای کنترل یا درمان بیماری‌های باکتریایی، ویروسی و انگلی در پرورش آبزیان مفیدترین بوده‌اند. در مطالعه حاضر به پیشرفت های صورت گرفته در استفاده از پری بیوتیک ها و مزایای استفاده از آنها پرداخته می شود. طبق مطالعات صورت گرفته، بهبود عملکرد رشد، تقویت پاسخ های ایمنی، مقاومت در برابر انواع بیماری ها، بهبود کیفیت آب، تغییر در میکرو فلور روده، هضم و جذب بهتر خوراک از عملکرد پری بیوتیک ها و منابع کربن تخمیر شده در سیستم های آبزی پروری است.

واژگان کلیدی: پری بیوتیک، منبع کربن، آبزی پروری

۱.مقدمه

با توجه به افزایش تقاضا برای غذا، آبزی پروری به عنوان یک منبع مناسب در آبهای داخلی و دریایی می باشد. با افزایش تراکم در سیستم های آبزی پروری برای افزایش تولید در نظر گرفتن اهداف آبزی پروری پایدار بطور ویژه سازگار بودن سیستم پرورش با محیط زیست حائز اهمیت است. بکارگیری افزودنی های مناسب در سیستم پرورش که بتواند منجر به بهبود کیفیت آب گردد، ضروری است. پروبیوتیک ها، پری بیوتیک ها و سین بیوتیک ها از ترکیبات مناسب برای استفاده در سیستم های پرورش هستند (Ali and El-Feky, 2019). اینولین، فروکتولیگوساکاریدها (FOS)، فروکتولیگوساکاریدهای زنجیره کوتاه (scFOS)، الیگوساکاریدهای مانان (MOS)، گالاکتولیگوساکاریدها (GOS)، زایلولیگوساکاریدها (XOS)، آرابینوکسیلولیگوساکاریدها (AXOS) و ایزومالتوالیگوساکاریدها (IMO) که معمولاً از گیاهان و فیبرها مشتق می شوند، پری بیوتیک های رایج در آبزی پروری هستند

(Butt et al., 2021). برخی از کربوهیدرات ها نیز بر اساس درجه پلیمریزاسیون آنها به مونوساکاریدها، الیگوساکاریدها و پلی ساکاریدها به عنوان پری بیوتیک طبقه بندی می شوند. در مطالعه مروری حاضر به اهمیت پری بیوتیک ها و غلات های تخمیر شده در آبزی پروری پرداخته می شود.

۲. مواد وروش ها

۲-۱-پری بیوتیک

پری بیوتیک ها و ترکیبات کربوهیدراته توانایی متابولیزه شدن توسط باکتری های مفید لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم را دارند، که در نهایت تولید اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه و لاکتات می کند. اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه از طریق لوله گوارش جذب می شوند و به عنوان منبع انرژی عمل می کنند در حالی که لاکتات به عنوان یک محرک برای گلوکونئوژنز عمل می کند (Burr et al., 2005). تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه به کاهش pH روده بزرگ کمک، که از تکثیر پاتوژن ها جلوگیری می کند و رشد بیفیدوباکتریوم و دیگر گونه های باکتریایی از نوع اسید لاکتیک را افزایش می دهد. جیره های غذایی مکمل با پری بیوتیک ها همچنین می تواند فعالیت آنزیم گوارشی را افزایش دهد (.(Kühlwein et al., 2014افزایش سطح آنزیم های گوارشی مرتبط با افزایش وزن و ضریب تبدیل غذایی موثر گزارش شد ه است. پری بیوتیک ها می توانند با فعال کردن سیستم ایمنی غیراختصاصی و ارتقای سلامت باکتری های مفید، ایمنی را افزایش دهند (.(Chen et al., 2014میکروبیوتای مفید باکتری های مضر موجود در روده بزرگ را احاطه کرده و ایمنی میزبان را بهبود می بخشد و همچنین تعادل واضحی بین میکروبیوتای دستگاه گوارش و سیستم ایمنی ایجاد می کند. پری بیوتیک مناسب باید معیارهای شامل ۱) برابر اسیدیته معده مقاوم باشند ۲) فرآیندها و اثرات آنزیمی مختلف را آغاز می کند، ۳) توانایی بهبود هضم در دستگاه گوارش را داشته باشند، ۴) تخمیر میکروبی فعال ، ۵) فعالیت میکروب های مطلوب را تحریک کنند تا بر سلامتی و ایمنی میزبان تاثیر مثبت بگذارد (.(Butt et al., 2021 با این حال، پری بیوتیک ها ترکیباتی مناسب برای بهبود پاسخ های ایمنی غیراختصاصی هستند و منجر به مقاومت در برابر عوامل بیماری زا می شوند. بسته به کاربرد آنها انواع مختلفی پروبیوتیک وجود دارد. الف) افزودن پری بیوتیک ها به جیره غذایی آبزیان می تواند جذب گلوکز و دسترسی زیستی عناصر کمیاب را افزایش دهد (.(Bongers et al., 2003ب) پری بیوتیک ها هنگامی که به عنوان یک افزودنی برای یک دوره زمانی خاص به آب محیط پرورش ماهی استفاده می شوند، پاسخ های ایمنی را تحریک و مقاومت در برابر بیماری ها را افزایش می دهند. ج) کپسوله‌سازی زیستی گونه‌های آرتمیا با پری‌بیوتیک‌ها، با اندازه مناسب برای مصرف لارو دارای ارزش غذایی بالا بوده و رشد لارو را تقویت می‌کند (Hamsah, et al., 2019). در جدول ۱ برخی از مطالعات صورت گرفته بر پری بیوتیک ها و کاربرد آنها ارائه شده است.

جدول ۱: مطالعات صورت گرفته بر پری بیوتیک ها و منابع کربن تخمیر شده ارئه شده است.

	منبع پری بیوتیک	گونه آبزی	غلظت و طول دوره پرورش	پاسخ	منبع
فروکتولیگوساکاریدها	ساکاروز، ۱ و ۳ فروکتوز،	L. vannamei	۱ ، ۲ و ۴ گرم بر کیلوگرم غذا برای ۶۰ روز	بهبود قابل توجه در عملکرد رشد و	Hu et al., 2019

	فعالیت آنزیم های گوارشی			نشاسته، لکتین	
Zhou et al., 2007	بهبود عملکرد رشد، کاهش FCR و تاثیر بر جوامع میکروبی روده	۰/۰۴ ، ۰/۰۸ و ۱/۲ و ۱/۶ گرم بر کیلوگرم غذا برای ۸ هفته	L. vannamei	جو و گندم	فروکتولیگوساکاریدهای زنجیره کوتاه
Li et al., 2009	بهبود ایمنی و مقاومت به بیماری	۰/۲ درصد در غذا برای ۲۸ روز	L. vannamei	نشاسته ذرت	الیگوساکاریدهای مانان
Luna-Gonz´alez et al., 2012	بهبود عملکرد رشد و افزایش مقاومت به بیماری	۰ ، ۱/۲۵ ، ۲/۵ ، ۵ و ۱۰ گرم بر کیلوگرم غذا برای ۶۲ روز	L. vannamei	Blue agave	اینولین
Lu et al., 2019	بهبود عملکرد رشد، افزایش مقاومت به بیماری، فعالیت های آنتی اکسیدانی، بهبود ایمنی	۳ گرم بر کیلوگرم (MOS)، بتاگلوکان + MOS (۳ گرم MOS + ۱/۵ گرم بتاگلوکان)، MOS + اینولین (۳ گرم MOS + ۱۰ گرم اینولین در هر کیلوگرم غذا)، ۸ هفته	Eriocheir sinensis		مانان الیگوساکارید (MOS)، بتاگلوکان، اینولین
Tran et al., 2020	تولید اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه، بهبود میکروب های روده	۰/۰۱۲۵ گرم بر میلی گرم محیط کشت، مطالعه آزمایشگاهی	Scylla Paramamosain		گالاکتولیگوساکاریدها
Romano et al., 2018	بهبود کیفیت آب و کارایی بهتر خوراک		Clarias gariepinus		سبوس برنج تخمیر شده
Liñan-Vidriale et al., 2021	بهبود عملکرد رشد و کیفیت آب		L. vannamei		سبوس برنج تخمیر شده
Rodrigues et al., 2018	بهبود عملکرد رشد، بقاء و مقاومت در برابر بیماری ویبریو	۰/۲، ۰/۸ و ۱/۲ گرم بر کیلوگرم غذا	L. vannamei		مانوپروتئین ها

۲-۲- استفاده از غلات تخمیر شده در آبزی پروری

در طی سالهای اخیر مطالعاتی در رابطه با جایگزینی پودر غلات تخمیر شده به عنوان منبع پروتئینی بالقوه با پودر ماهی در جیره غذایی میگو صورت گرفته است. کیفیت غذایی در غلات تخمیر شده نسبت به غیر تخمیر شده افزایش قابل توجهی دارد. بدلیل کمبود اسیدهای آمینه ضروری مانند متیونین، لیزین و تریپتوفان، میزان فیبر زیاد و وجود مواد ضد تغذیه ای در آرد غلات باعث هضم ضعیف و آسیب به رشد آبزی پرورش یافته می شود، فرآیند تخمیر به عنوان تکنیک مناسب میزان مواد نامطلوب را کاهش می دهد و کیفیت غذایی غلات مثل سبوس برنج، سویا و گندم را غنی می کند .(Jannathulla et al., 2019) آبزیانی نظیر میگو را می توان با جیره های غذایی حاوی پودر غلات پرورش داد و محدودیتی بر عملکرد رشد ندارد، به دلیل دانش بدست آمده در رابطه با نیازهای غذایی میگو و در دسترس بودن فناوری های جدید می توان کیفیت اجزای گیاهی موجود در جیره غذایی را بهبود داد (Sabry-neto et al., 2017). سبوس غلات به دلیل در دسترس بودن و قیمت مناسب، پتانسیل زیادی برای استفاده در جیره غذایی آبزیان را دارد و با فرآیند تخمیر می توان کیفیت غذایی آنها را بهبود داد (Shi et al., 2015). توسعه سریع میکروب ها در فرآیند تخمیر منجر به افزایش میزان اسیدهای آمینه در مواد آلی تخمیر شده می شود، میکروارگانیسم ها از کربوهیدرات به عنوان منبع انرژی استفاده می کنند و تبدیل زیستی کربوهیدرات ها به پروتئین میکروبی از طریق متابولیسم واسطه ای ممکن است مسئول افزایش اسیدآمینه در محصولات تخمیر شده باشد. بعلاوه تغییر در ترکیب عناصر غذایی پس از فرآیند تخمیر از دلایل احتمالی افزایش میزان اسید آمینه می باشد (Qiu and Davis, 2018). فرآیند تخمیر به میزان قابل توجهی میزان فیبر و عوامل ضد تغذیه ای را کاهش می دهد در حالی که میزان اسیدآمینه ضروری، به ویژه متیونین، لیزین و تریپتوفان را افزایش می دهد، فرآیند تخمیر توسط باکتری ها، قارچ ها و مخمرها باعث افزایش اسید امینه ضروری در کنجاله سویا می شود (Jannathulla et al., 2019). کنجاله سویا به عنوان گزینه مناسب برای جایگزینی با پودر ماهی است زیرا دارای نوسانات قیمتی کمتری در بازار هست و امکان ذخیره سازی برای مدت زمان طولانی و تولید تجدیدپذیر را دارد. استفاده از کنجاله سویا تخمیر شده در پرورش آبزی منجر به بهبود عملکرد رشد و سلامتی می شود که این امر بدلیل حضور باکتریهای مفید نسبت داده شده است (Catalán et al., 2018). تخمیر یک فرایند بیوتکنولوژی است که عملکرد مواد لیگنوسلولزی را بهبود می بخشد، که علاوه بر افزایش ضریب هضم، می تواند منجر به بازده بالاتر و بهبود ویژگی های تغذیه ای از طریق انتشار آنزیم ها، اسیدهای آلی و سایر ترکیبات فعال زیستی گردد (.(Razak et al., 2017 سبوس برنج از ضایعات کشاورزی می باشد که معمولا به عنوان یک منبع کربن و انرژی در جیره غذایی آبزی استفاده می شود. این ماده کربنی ارزان در دسترس است و به راحتی می توان آن را از بازار تهیه کرد، حاوی مقادیر قابل توجهی از مواد مغذی و دارای فیبر نسبتا بالایی است (Deepak et al., 2020)

سبوس برنج ترجیحا به شکل تخمیر شده مورد استفاده قرار می گیرد، زیرا در این فرم سبوس علاوه بر داشتن ارزش غذایی بالاتر فاکتورهای ضد تغذیه ای آن نیز کاهش می یابد و مواد مغذی بیشتری در آب در دسترس قرار می دهد. با فرآیند تخمیر سبوس برنج میزان فیبر، چربی، خاکستر و اسید فایتیک آن کاهش می یابد (Flores-Miranda et al., 2014). ترکیبات شیمیایی سبوس برنج قبل از تخمیر ۱۲/۱٪، ۱۰/۶۲٪ و ۰/۸۹٪ و بعد از تخمیر ۱۳/۴۰٪، ۷/۷۹٪ و ۰/۹۱٪ به ترتیب برای پروتئین خام، فیبر خام و فسفر مشاهده شده است.مقایسه ترکیب سبوس برنج تخمیر شده و تخمیر نشده نشان می دهد که فرآیند تخمیر به طور قابل توجهی سطح اسیدهای آلی و فعالیت اکسیدانت ها را افزایش می دهند (Razak et al,. 2017). اسیدهای آلی ترکیباتی هستند که از پتانسیل بالایی برای استفاده در آبزی پروری برخوردار هستند و با کاهش پی اچ جیره غذایی از رشد میکروب ها و پروتئین های غیر طبیعی بدن جلوگیری می کند. علاوه بر این مزایا، اسیدهای آلی در دستگاه گوارش با تغییر میکروبیوتای روده فعالیت آنزیم های گوارشی را بهبود می دهند، یون های مهمی (از قبیل Cu^{+2} Fe^{+2}, Mg^{+2}, Ca^{+2} وZn^{+2}) را فراهم می کنند و به عنوان منبع انرژی برای متابولسیم استفاد می شوند.

تاثیر سطوح مختلف سبوس برنج تخمیر شده در جیره غذایی بر عملکرد رشد و فعالیت آنزیم های گوارشی ماهی (Leptobarbus hoevenii Bleeker) مورد بررسی قرار گرفت. با افزایش سطح سبوس برنج تخمیر شده در جیره غذایی بر فعالیت آنزیم آمیلاز افزوده می شود و سطح ۳۰ درصد سبوس برنج تخمیر شده در جیره غذایی مناسب ترین سطح برای بهبود عملکرد رشد و کارایی خوراک برای ماهی گزارش گردید (Yanto et al., 2018). تاثیر سبوس برنج تخمیر شده بهمراه باکتریهای پروبیوتیک Bacillus و Lysinibacillusبر فعالیت میکروبی و عملکرد میگوی سفید غربی مورد بررسی قرار گرفت. مشخص شد سبوس برنج تخمیر شده بهمراه باکتریها پتانسیل بالایی را به عنوان پروبیوتیک ایمن نشان می دهند و جوامع باکتریایی در هپاتوپانکراس میگو را تغییر می دهند. حضور سبوس برنج تخمیر شده منجر به بهبود بقاء و عملکرد رشد میگوی سفید غربی می شود (Liñan-Vidriales et al., 2020)

نتیجه گیری

پری بیوتیک ها و منابع کربن تخمیر شده ترکیبات موثری هستند که استفاده از آنها به عنوان مکمل در پرورش آبزیان منجر به بهبود عملکرد رشد، تقویت پاسخ های ایمنی، مقاومت در برابر انواع بیماری ها، بهبود کیفیت آب، تغییر در میکرو فلور روده، هضم و جذب بهتر خوراک می شود. فرآیند تخمیر بر روی منابع کربن یک فرآیند سریع، کم هزینه و کم خطر است و میزان در دسترس بودن مواد مغذی را برای آبزی پرورش یافته افزایش می دهد. استفاده از اسیدهای آلی به همراه غلات تخمیر شده در پرورش آبزیان بویژه میگو، باعث بهبود نرخ رشد، کارایی بهتر پروتئین، افزایش تعداد هموسیت ها و افزایش میکروبیوتای مفید روده می شود و به طور قابل توجهی میزان هضم را بهبود می بخشد.

منابع

66. Ali, B. and El-Feky, A. 2019. Enhancing growth performance and feed utilization using prebiotics in commercial diets of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings, Egypt. J. Nutr. Feed. 22; 219–225.
67. Bongers, E.G.H.M. 2003. van den Heuvel, Prebiotics and the bioavailability of minerals and trace elements, Food Rev. Int. 19 ; 397–422, https://doi.org/ 10.1081/FRI-120025482.
68. Burr, G., Gatlin, D. and Ricke, S. 2005. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture, J. World Aquacult. Soc., 36; 425–436.
69. Butt, U.D., Lin, N., Akhter, N., Siddiqui, T., Li, S., Wu, B., 2021. Overview of the latest developments in the role of probiotics, prebiotics and synbiotics in shrimp aquaculture. Fish and Shellfish Immunology, 114, 263–281
70. Catalán, N., Villasante, A., Wacyk, J., Ramírez, C., Romero, J., 2018. Fermented soybean meal increases lactic acid bacteria in gut microbiota of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). Probiotics and Antimicrobial Proteins, 10(3), 566–576.
71. Chen, Y., Zhu, X., Yang, Y., Han, D., Jin, J. and Xie, S. 2014. Effect of dietary chitosan on growth performance, haematology, immune response, intestine morphology, intestine microbiota and disease resistance in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), Aquacult. Nutr. 20; 532–546.
72. Deepak, A.P., Vasava, R.J., Elchelwar, V.R., Tandel, D.H., Vadher, K.H., Shrivastava, V., Prabhakar, P., 2020. Aquamimicry: New an innovative apporoach for sustainable development of aquaculture. Journal of Entomology and Zoology Studies, 8(2): 1029-1031
73. Flores-Miranda, C.M., Luna Gonzalez, A., Cortes-Espinosa, D.V., Cortes Jacinto, E., Fierro-Coronado, J.A., Alaves-Ruiz, P., Hctor, A.G.O., Ruth, E.M., 2014. Bacterial fermentation of *Lemna* sp. as a potential subtitute of fish meal in shrimp diets. African Journal of Microbiology Research. 8(14):516-526.
74. Hamsah, H., Widanarni, W., Alimuddin, A., Yuhana, M., Junior, M.Z., Hidayatullah, D. 2019. Immune response and resistance of Pacific white shrimp larvae administered probiotic, prebiotic, and synbiotic through the bio-encapsulation of *Artemia* sp, Aquacult. Int. 27, 567–580, https://doi.org/10.1007/s10499- 019-00346-w.

75. Hu, X., Yang, H.L., Yan, Y.Y., Zhang, C.X., Ye J., Le Lu, K., Hu, L.H., Zhang, J.J., Ruan, L. and Sun, Y.Z. 2019. Effects of fructooligosaccharide on growth, immunity and intestinal microbiota of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed diets with fish meal partially replaced by soybean meal, Aquacult. Nutr. 25; 194–204, https:// doi.org/10.1111/anu.12843.
76. Jannathulla, R., Dayal, J. S., Vasanthakumar, D., Ambasankar, K., Panigrahi, A., Muralidhar, M., 2019. Apparent digestibility coefficients of fungal fermented plant proteins in two different penaeid shrimps—A comparative study. Aquaculture Research, 50(5), 1491–1500.
77. Kühlwein, H. Merrifield, D.L., Rawling, M.D., Foey, A.D. and Davies, S.J. 2014. Effects of dietary β-(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on growth performance, intestinal morphology and haemato-immunological profile of mirror carp (*Cyprinus carpio L.*), J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 98; 279–289.
78. Li, J., Tan, B. and Mai, K. 2009. Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*), Aquaculture, 291; 35–40,
79. Liñan-Vidriales, M.A., Peña-Rodríguez , A., Tovar-Ramírez, D., Elizondo-González, R., Barajas-Sandoval , D.R., Ponce-Gracía, E.I., Rodríguez-Jaramillo, C., Balcázar, J.L., Quiroz-Guzmán, E., 2021. Effect of rice bran fermented with Bacillus and Lysinibacillus species on dynamic microbial activity of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture, 531, 735958.
80. Liñan-Vidriales, M.A., Peña-Rodríguez, A., Tovar- Ramírez, D., Elizondo-González, R., Diana R. Barajas-Sandoval, D.R., Ponce-Gracía, E.I., Rodríguez-Jaramillo, C., Balcázar, J.L., Quiroz-Guzmán, E., 2020. Effect of rice bran fermented with *Bacillus* and *Lysinibacillus* species on dynamic microbial activity of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735958.
81. Lu, J., Bu, X., Xiao, S., Lin, Z., Wang, X., Jia, Y., Wang, X., Qin, J.G., Chen, L., 2019. Effect of single and combined immunostimulants on growth, anti-oxidation activity, nonspecific immunity and resistance to Aeromonas hydrophila in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*), Fish Shellfish Immunol. 93, 732–742, https://doi.org/ 10.1016/j.fsi.2019.08.027.
82. Luna-Gonzalez, A., Almaraz-Salas, J.C., Fierro-Coronado, J.A., Flores- Miranda, M. del C., Gonz´alez-Ocampo, H.A. and Peraza-G´omez, V. 2012. The prebiotic inulin increases the phenoloxidase activity and reduces the prevalence of WSSV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions, Aquaculture, 362–363; 28–32.
83. Qiu, X., Davis, D. A., 2018. Evaluation of dried fermented biomass as a feed ingredient in plant-based practical diets for juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei.* Aquaculture Nutrition, 24(1), 383–391.
84. Razak, D. L., Rashid, N.Y., Jamaluddin, A., Sharifudin, S. A., Kahar, A., Long, K., 2017. Cosmeceutical potentials and bioactive compounds of rice bran fermented with single and mix culture of *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae.* Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 16 (2), 127–134.
85. Rodrigues, M.S., Bolívar, N., Legarda, E.C., Guimarães, A.M., Guertler, C., Santo, C.M.E., Mouriño, J.L.P., Seiffert, W.Q., Fracalossi, D.M., Vieira, F.M., 2018. Mannoprotein dietary supplementation for Pacific white shrimp raised in biofloc systems. Aquaculture, 488, 90-95.
86. Romano, N., Dauda, A.B., Ikhsan, N., Karim, M., Kamarudin, M.S., 2018. Fermenting rice bran as a carbon source for biofloc technology improved the water quality, growth, feeding efficiencies, and biochemical composition of African catfish *Clarias gariepinus* juveniles. Aquaculture Research, 49(12), 3691-3701.
87. Sabry-Neto, H., Lemos, D., Raggi, T., Nunes, A. J. P., 2017. Effects of soy protein ratio, lipid content and minimum level of krill meal in plant-based diets over the growth and digestibility of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Nutrition, 23(2), 293–303.
88. Shi, C., He, J., Yu, J., Yu, B., Huang, Z., Mao, X., Zheng, P., Chen, D., 2015. Solid state fermentation of rapeseed cake with *Aspergillus niger* for degrading glucosinolates and upgrading nutritional value. Journal of Animal Science and Biotechnology, 6(13), 4618.
89. Tran, N.T., Tang, Y., Li, Z., Zhang, M., Wen, X., Ma, H., Li, S., 2020. Galactooligosaccharides and resistant starch altered microbiota and short-chain fatty acids in an in vitro fermentation study using gut contents of mud crab (*Scylla paramamosain*), Front. Microbiol. 11, 1352, https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01352.
90. Yanto, H., Junianto, Rostika, R., Andriani, Y., Tanuwiria, U.H., 2018. Effect of different levels of fermented rice bran for the growth of jelawat, *Leptobarbus hoevenii.* Nusantara Bioscience. 10(2); 81-86.

91. Zhou, Z., Ding, Z. and Huiyuan, L.V. 2007. Effects of dietary short-chain fructooligosaccharides on intestinal microflora, survival, and growth performance of juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, J. World Aquacult. Soc. 38; 296–301.

The management and proper nutrition efficiency in aquaculture

Mohammad Hossein Khanjani*[1], Gholamreza Ghaedi[2]

14- Department of Fisheries Sciences and Engineering, Faculty of Natural Resources, University of Jiroft.

15- Ph.D. in Aquaculture,Graduated from Khorramshahr University of Marine Science and Technology.

**Corresponding Author Email address: m.h.khanjani@ujiroft.ac.ir*

Abstract

Aquaculture is experiencing rapid growth and development. Using new technologies to attain sustainable development is essential. In order to achieve sustainable development, nutritional management and subsequent nutrients derived from aquatic nutrition will be important aspects. Aquaculture has recently begun to apply the concept of accurate nutrition management. In the case of accurate nutrition, researchers claim that the nutrients in the feed should optimize animal performance and have minimal impact on the environment. In practice, accurate nutrition should include a comprehensive review of the animal's genetic background, life habits, metabolic characteristics, water environmental conditions, and other factors. Nutrition fine-tuning occurs at all levels, from genes to cells and tissues to the whole organism. As a result, in order to achieve proper nutrition management, four processes must be addressed: precise nutrition, precise metabolism, proper performance, and precise support. This study demonstrates how proper nutrition management leads to sustainable development and high-quality products.

Keywords: Aquaculture, nutrition management, proper performance, output, support

مدیریت و کارایی مناسب تغذیه در آبزی پروری

محمدحسین خانجانی[۱]، غلامرضا قائدی[۲]

[۱]- گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، کرمان، ایران
[۲]- دکتری تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
m.h.khanjani@ujiroft.ac.ir

چکیده

صنعت آبزی پروری به سرعت در حال رشد و توسعه می باشد. بکارگیری فن آوری های نوین در این صنعت جهت دستیابی به توسعه پایدار ضروری است. مدیریت تغذیه و بدنبال آن مواد مغذی که از تغذیه آبزیان در آب ایجاد می شود نقش مهمی در توسعه پایدار خواهد داشت. اخیرا مفهوم مدیریت تغذیه دقیق و صحیح در آبزی پروری مطرح شده است، برخی از محققان تغذیه دقیق را بدین معنی بیان کرده اند که مواد مغذی موجود در خوراک بایستی الزامات عملکرد تولید بهینه حیوان را فراهم کند و حداقل تاثیر را بر محیط زیست داشته باشد. در عمل، تغذیه دقیق باید شامل یک بررسی جامع از پیشینه ژنتیکی حیوان، عادات زندگی، ویژگی های متابولیک، شرایط محیطی آب و سایر عوامل باشد. تنظیم دقیق تغذیه همه سطوح، از ژن ها، سلول ها و بافت ها گرفته تا کل حیوان را پوشش می دهد. بنابراین برای دستیابی به مدیریت تغذیه صحیح بایستی چهار فرآیند تغذیه دقیق، متابولیسم دقیق، کارایی مناسب و پشتیبانی دقیق را در نظر گرفت. در مطالعه حاضر مدیریت تغذیه صحیح جهت دستیابی به توسعه پایدار و محصولات با کیفیت مورد بررسی قرار می گیرد.

واژگان کلیدی: آبزی پروری، مدیریت تغذیه، متابولیسم، کارایی مناسب، پشتیبانی

۱. مقدمه

آبزیان یکی از منابع غذایی مهم هستند که پروتئین با کیفیت بالا، اسیدهای چرب، ویتامین ها و مواد معدنی بسیار مهمی را برای انسان فراهم می کنند (Yuru et al., 2020). برخی از ماهیان کیفیت بالایی در اسیدهای چرب غیراشباع بلند زنجیره نظیر ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA, 20:5n-3) و دیکوزا هگزانوئیک اسید (DHA, 22:6n-3) دارند (Simopoulos, 2016). تولیدات آبزیان به دو طریق صید و صیادی و آبزی پروری بدست می آید، با توجه به اینکه صید و صیادی در سال های گذشته روند ثابتی را داشته است به دنبال آن افزایش جمعیت جهانی افزایش یافته، برای برقراری تعادل تامین غذا لازم است فعالیت های آبزی پروری بهبود یابد. برای افزایش تولیدات آبزی پروری توجه به اهداف آبزی پروری پایدار ضروی است (FAO, 2018). اهداف آبزی پروری پایدار یعنی اینکه به لحاظ اقتصادی سود آور، به لحاظ اجتماعی مقبولیت داشته باشد و همچنین سازگار با محیط زیست باشد. در آبزی پروری تغذیه دقیق و صحیح بسیار حائز اهمیت است. افزایش توجه به عمل تغذیه و تنظیم زمان تغذیه در پرورش ماهی با توجه به

نوع گونه، مرحله رشد و میزان تاثیرگذاری بر محیط زیست ضروری است (Yuru et al., 2020). درک نیازهای غذایی ماهی و عواملی که نیازهای ماهی را تحت تاثیر قرار می دهد به مدیریت دقیق تغذیه ماهی کمک می کند. مدیریت صحیح غذادهی منجر به کاهش پساب آبزی پروری گردیده که برای محیط زیست مفید بوده و به آبزی پروری پایدار کمک می کند.

۲. مواد و روش ها

تغذیه صحیح در حال حاضر در همه جنبه های زندگی ترویج می شود. هدف اصلی تغذیه صحیح در پزشکی فراهم کردن وضعیتی ایمن و کارآمد برای درمان و مدیریت بیماری با در نظر گرفتن ژنتیک، سبک زندگی، وضعیت متابولیک و وضعیت فیزیولوژیکی افراد می باشد. در کشاورزی هدف از تغذیه دقیق حیوانات این است که به حیوان پرورش یافته خوراکی بدهید که دقیقا نیازهای غذایی آنها را برآورده کند. به منظور دستیابی به مناسب ترین عملکرد رشد، تولید محصولات بهتر که در نتیجه به محیط زیست پاک تر کمک کند و در نهایت منجر به سودآوری بیشتر گردد، و به نوعی اهداف آبزی پروری پایدار را دنبال کند. ابزارهای لازم برای دستیابی به تغذیه دقیق حیوان پرورش یافته شامل بهبود تکنیک ها برای پردازش خوراک و توسعه فرمولاسیون دقیق خوراک می باشد (Reddy and Krishna 2009).

تعریف مناسب برای تغذیه دقیق و صحیح در آبزی پروری صورت گرفته است، تغذیه ای که سطوح مواد مغذی مناسب را برای آبزی پرورش یافته فراهم کند و عملکرد بهینه تولید ماهی و به دنبال آن کمترین ضایعات و هدر روی را داشته باشد. تخمین نحوه و زمان تغذیه ماهی با توجه به نیازهای تغذیه ای مراحل مختلف زندگی ماهی، برای ایجاد یک مدل مدیریتی موثر توصیه شده است (Cheng and Wei, 2016). تکنیک های دقیق آبزی پروری عمدتا بر فناوری های نوین متمرکز شده اند (Fore et al., 2018. Khanjani and Sharifinia, 2020)

تغذیه دقیق ماهی شامل یک بررسی جامع از پیشینه ژنتیکی ماهی، شرایط زندگی در طبیعت، ویژگی های متابولیکی، ویژگی های فیزیکوشیمیایی آب و سایر عوامل مرتبط می باشد. مدیریت دقیق تغذیه شامل همه سطوح ژن ها، سلول ها، بافت ها و در نهایت آبزی پرورش یافته می باشد. از طریق تعامل با ژن ها، بیان و سنتز پروتئین، چربی ها، عناصر کمیاب و اسیدهای چرب غیراشباع اتفاق می افتد (Simopoulos 2010) بصورت تئوریکی و سیستماتیکی تغذیه دقیق شامل تغذیه دقیق، متابولیسم دقیق، کارایی مناسب و پشتیبانی دقیق می باشد. بصورت مفهومی غذادهی دقیق به توسعه مناسب غذا برای ماهی بر اساس گونه، جنس، مرحله زندگی و رشد، فاکتورها و شرایط محیطی آب بستگی دارد (Cheng and Wei, 2016). "متابولیسم دقیق" شامل شناسایی ژن ها و مسیرهای که در متابولیسم کربوهیدرات ها، لیپیدها، پروتئین ها، مواد معدنی، ویتامین ها و سایر عوامل تغذیه ای نقش دارند (Roques et al., 2020; Zhang et al., 2018). کارایی مناسب به محصولات غنی از مواد مغذی خاص، مانند اسیدهای چرب ضروری و اسیدهای آمینه ضروری مربوط می شود (Schram et al., 2010) و هدف از پشتیبانی دقیق توسعه فن آوری ها و تئوری های جدید متنوع است که می تواند به نفع توسعه پایدار آبزی پروری باشد (Parra et al., 2018).

۲-۱-غذادهی مناسب

تغذیه دقیق یک تکنیک مهم برای کاهش ضریب تبدیل غذایی و در نتیجه سود بیشتر می باشد. در عمل، همیشه یک یا چند ماده مغذی بیش از حد یا ناکافی وجود دارد که نتیجه آن به هدر رفتن ترکیبات غذایی، افزایش هزینه و آلودگی محیط زیست می باشد.

برای بهبود استفاده از مواد مغذی، کاهش پساب و دستیابی به محیط زیست پاک، تغذیه دقیق به درک خوبی از زمینه ژنتیک، نیازهای تغذیه ای، محیط زندگی گونه پرورشی و درک روشنی از نیاز ماهی شامل پروتئین ها، اسیدهای چرب، عناصر کمیاب، ویتامین ها و سایر نیازها و اینکه در چه زمانی و چه مقدار مورد نیاز است. گونه های مختلف از نظر نیازهای غذایی، متفاوت هستند. نیاز به پروتئین، کربوهیدرات و لیپید در بین گونه های ماهی متفاوت است. ماهی های گوشت خوار به پروتئین و چربی بیشتری نسبت به ماهی های همه چیز خوار نیاز دارند. محدوده پروتئینی مورد نیاز ماهیان در گونه های مختلف بین ۲۴ درصد تا ۷۰ درصد می باشد (Teles et al., 2019). میزان کربوهیدرات مورد نیاز در تغذیه ماهیان گوشت خوار کمتر از ۲۰ درصد در حالی که ماهیان همه چیز خوار حدود ۳۰ تا ۴۰ درصد است (National Research Council, 2011). در آبزی پروری، مکمل های مختلفی بر غذاهای فرموله اضافه می گردد که عملکرد رشد، بقاء و ایمنی آبزی پرورش یافته را بهبود می دهد (Wong et al., 2016). در مطالعات مختلف انواع آنزیم ها، پروبیوتیک ها، پربیوتیک ها، اسیدهای آمینه، ویتامین ها، مواد معدنی و افزودنی های گیاهی به جیره غذایی اضافه شده اند (Feckaninova et al., 2017). جایگزینی پودر و روغن ماهی در صنعت آبزی پروری از مواردی است که در مدیریت تغذیه صحیح حائز اهمیت است. کمبود پروتئین با کیفیت بالا و افزایش قیمت روغن و پودر ماهی منجر به استفاده از جایگزین های گیاهی و حیوانی شده است که مواد تشکیل دهنده در صنعت خوراک آبزیان هستند (Hua et al., 2019). برای مثال ضایعات کارخانجات تن ماهی می توانند جایگزین ۲۵ تا ۳۰ درصد از پودر ماهی در جیره غذایی ماهی *Lutjanus guttatus* شود (Hernandez et al., 2014). همچنین پیشنهاد شده است که ضایعات کارخانجات تن ماهی می تواند تا ۷۵ درصد جایگزین پودر ماهی در جیره جوونایل های *Sebastes schlegeli* گردد. (Kim et al., 2018)

۲-۲- متابولیسم

کربوهیدرات ها، لیپیدها و پروتئین های جیره غذایی باید به به ترتیب به مونوساکاریدها، اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه تشکیل دهنده آنها، تجزیه شوند قبل از اینکه بتوانند توسط روده جذب شده و در اندام های هدف متابولیزه شوند. هدف متابولیسم دقیق دستیابی به تنظیم دقیق در سطح ژن و شفاف سازی مسیرهایی که در فرآیند متابولیک نقش دارند. در ماهی ها، محور مغز- کبد- روده برای تنظیم رفتار تغذیه و متابولیسم مهم است (Zhang et al, 2018). مغز (هیپوتالاموس و مغز عقب)، کبد و روده اندام های کلیدی هستند که هموستاز تغذیه ای را تعدیل می کنند. هیپوتالاموس، به عنوان یک مرکز یکپارچه سازی سیگنال، سطوح مواد مغذی را با تنظیم بیان اورکسین و سایر نوروپپتیدها تشخیص می دهد (Delgado et al., 2017). استفاده کارآمد از پروتئین هدف اصلی ساخت خوراک آبزیان با کیفیت بالا می باشد. در مقایسه با جانوران خشکی، سطح پروتئین مورد نیاز در ماهی بالاتر است. در ماهی سرعت سنتز پایین پروتئین ماهیچه با با راندمان بالایی رسوب پروتئین در تنقاض است (Kaushik and Seiliez, 2010). با این وجود، ماهیچه ها از ارگان های اصلی هستند که پروتئین در آن ذخیره می شود و پروتئین ها در ماهیچه حدود ۵۰ درصد از کل پروتئین موجود در ماهی را تشکیل می دهد. کربوهیدرات ها یک سوخت بیولوژیکی، و منبع انرژی ارزان در خوراک ماهی هستند. جذب، استفاده، متابولیسم و مکانیسم تنظیم کربوهیدرات ها همیشه موضوع داغ مطالعات تغذیه ای آبزیان بوده است (Panserat et al, 2009). در مقایسه با پستانداران، ماهی ها ظرفیت استفاده کمتری از کربوهیدرات را دارند. هنگام تغذیه با جیره غذایی حاوی کربوهیدرات بالا سطح قند خون در ماهی (به ویژه در گونه های گوشتخوار) به طور قابل توجهی افزایش می یابد (Polakof et al,

2012). هنگامی که کربوهیدرات های پیچیده موجود در غذا تجزیه می شوند به منوساکاریدهای از قبیل گلوکز، فروکتوز و گالاکتوز تبدیل می شوند. گلوکز ساختار اولیه بدن می باشد. کربوهیدرات موجود در جیره به عنوان واسطه های متابولیکی اصلی هستند که بر سنتز ترکیبات دیگر تاثیر می گذارند(Polakof et al, 2012). به عنوان مثال کربوهیدرات های موجود در جیره متابولیسم چربی در ماهی قزل آلای رنگین کمان را بهبود می دهد (Song et al., 2018). با این حال، در آینده، مطالعات جامع تری از جمله سطوح آنزیم و مکانیسم های اساسی که در این پروسه فعال هستند، مورد نیاز است.

۲-۳- کارایی و خروجی مناسب

همراه با مدرن شدن جامعه، تقاضای مصرف کننده برای کیفیت محصولات آبزی افزایش یافته است. بنابراین، شناسایی روش های ارائه محصولات با کیفیت بالا برای مصرف کنندگان همواره یکی از چالش های مهم آبزی پروری بوده است. برای پاسخگویی به تقاضای بازارهای بین المللی، صنعت آبزیان به توسعه مناسب کیفیت محصولات نیاز دارد (Yu et al., 2017). ماهی و فرآورده های شیلاتی یکی از مهمترین غذاهای کاربردی هستند که به عنوان منبع کلسیم، پروتئین های ضد فشار خون، آنتی اکسیدان و اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیره عمل می کنند (Taylor, 2002). محصولات کاربردی آبزی پروری حاوی مواد سالم مانند اسیدهای چرب ضروری، اسیدهای آمینه ومیکروالمنت ها هستند که بطور قابل توجهی با استفاده از محیط رشد ویژه، نسبت تغذیه خوراک دقیق و بهبود ژنتیک، افزایش می یابد (Cotter et al, 2010). علاوه بر این، محصولات شیلاتی را می توان به عنوان ترکیبات کاربردی برای بهبود سلامت مصرف کنندگان استفاده کرد. به عنوان مثال، روغن ماهی حاوی DHA/EPA بالا می باشد که برای محافظت از شبکیه چشم در برابر آسیب و تقویت رشد مغز کودکان مناسب می باشد (Ostadrahimi et al, 2018)، همچنین بر عملکرد مناسب فعالیت های قلب و عرقی موثر می باشد (Tummala et al, 2019). محل ذخیره بافت چربی در بدن ماهی در کیفیت آن نقش مهی دارد (Weil et al, 2013). چربی ماهی عمدتاً در ماهیچه و کبد ذخیره می شود. نوع و میزان چربی در عضله تعیین کننده کیفیت ماهی بوده و میزان چربی در بین گونه های مختلف ماهی متفاوت است. به عنوان مثال، ماهی های دریایی، کفشک، چربی ماهیچه ای کمتری دارند، در حالی که ماهی قزل آلا و سالمون حاوی مقدار زیادی چربی در ماهیچه های خود هستند.

۲-۴- پشتیبانی

بازار آبزی پروری به شدت رقابتی است و استفاده و توسعه فن آوری ها و روش های جدید که به طور موثر توسعه صنعت شیلات را بهبود دهد اهمیت ویژه ای دارد. "پشتیبانی دقیق" به عنوان استفاده و توسعه زیرساخت‌ها و فن‌آوری‌های جدید حمایتی که از توسعه سالم و پایدار آبزی پروری پشتیبانی می‌کند، تعریف شده است. یکی از روشها و تکنیک های مناسب استفاده از تکنولوژی مولتی اومیکس (آنالیز جامع سیستم های زیستی) برای بهبود و دقت تغذیه می باشد. این تکنولوژی اثرات مثبتی در آبزی پروری نشان داده و نقش مهمی در توسعه غذاهای کاربردی داشته است. یکی دیگر از موارد پشتیبانی دقیق بکارگیری فن آوری های است که بتواند پساب آبزی پروری را کاهش و سازگار با محیط زیست باشد. افزایش غلظت نیتروژن، آمونیاک، فسفر و سایر ترکیبات موجود در آب به دلیل ورود مستقیم فضولات ماهی و غذاهای خورده نشده به یک چالش بزرگ زیست محیطی برای تولید ماهی تبدیل شده است. این مشکل نیاز به بررسی دقیق دارد تا فناوری جدید برای کاهش آلودگی آب مرتبط با آبزی پروری توسعه یابد. فن آوری تصفیه آلودگی برای آبزی پروری شامل روش های فن آوری فیزیکی، شیمیایی و بیواکولوژیکی است (Henares et al., 2018).

تاکنون سیستم های مختلفی جهت کاهش اثرات زیست محیطط آبزی پروری از قبیل سیستم های مداربسته، آکواپونیک و تکنولوژی بیوفلاک استفاده شده است (Khanjani et al., 2021a). در سیستم بیوفلاک به محیط پرورش ماهی مواد آلی کربن دار اضافه شده که منجر به توسعه باکتری های هتروتروف می شود که این باکتری ها نیتروژن غیرآلی را جذب کرده و تولید پروتئین میکروبی می کند (Khanjani et al., 2021b, 2021c). این تکنولوژی می تواند منجر به حذف ترکیبات زائد از طریق فرآیندهای بیولوژیکی شود (Khanjani and Sharifinia, 2021a, 2021b). بطور کلی برای مدیریت و کارایی بهتر تغذیه در آبزی پروری توجه به موارد زیر حائز اهمیت است

- غذادهی مناسب: کمیت و کیفیت خوراک، مکمل های غذایی
- متابولیسم: بهبود متابولیسم چربی، کربوهیدرات و پروتئین
- کارایی و خروجی مناسب: بهبود کیفیت محصولات آبزی پروری
- پشتیبانی مناسب: با بکارگیری فن آوری های جدید نظیر بیوفلاک تکنولوژی، سیستم های مداربسته، آکواپونیک

برای کارایی مناسب تغذیه بایستی ویژگی های از قبیل زمینه ژنتیکی گونه، عادت زندگی، محیط زیست زندگی و نحوی متابولیسم مواد را در نظر گرفت. همچنین عملکرد مناسب تغذیه در آبزی پروری لازم است به متابولسیم، کارایی مناسب خوراک و پشتیبانی صحیح با بکارگیری فن آوری های مناسب در آبزی پروری بطور همزمان توجه نمود.

۳. نتیجه گیری

استفاده از صنعت آبزی پروری برای تغذیه انسان ها به سرعت در حال افزایش است. تولید غذای سالم یک عامل مهم برای توسعه سیستم های آبزی پروری نوین است. در سال های اخیر آبزی پروری متراکم با مشکلات متعددی مربوط به تغذیه، محیط زیست و بیماری مواجه بوده که دستیابی به توسعه سبز و پایدار صنعت شیلات دشوار شده است. برای بهبود شرایط استفاده از فن آوری های نوین سازگار با محیط زیست و مدیریت تغذیه صحیح لازم است. برای مدیریت تغذیه خوب بایستی به چهار فرآیند تغذیه دقیق، متابولیسم دقیق، کارایی مناسب و پشتیبانی دقیق توجه ویژه نمود. به طور کلی، تنظیم دقیق تغذیه به طور جامع تحت تأثیر پیشینه ژنتیکی گونه، عادات زندگی، ویژگی های متابولیک، شرایط محیطی آب و سایر عوامل قرار می گیرد. دستکاری دقیق تغذیه در آبزی پروری پتانسیل بالا و آینده ای بسیار امیدوارکننده دارد. به طور کلی، تغذیه دقیق فقط یک مفهوم تحت اللفظی نیست، بلکه فن آوری منحصر به فرد برای توسعه پایدار آبزی پروری است.

منابع

4. Cheng, C., Wei, D., 2016. Xie Shouqi: How to implement precise nutrition regulation under different freshwater aquaculture models. Current Fisheries (Chinese) 87–88.
5. Cotter, P.A., Craig, S.R., Mclean, E., 2010. Hyper accumulation of selenium in hybrid striped bass: a functional food for aquaculture. Aquaculture Nutrition 14, 215–222.
6. Delgado, M.J., Cerda-Reverter, J.M., Soengas, J.L., 2017. Hypothalamic Integration of Metabolic, Endocrine, and Circadian Signals in Fish: Involvement in the Control of Food Intake. Frontiers in Neuroscience 11, 1–22.

7. FAO, 2018. An Overview of Recently Published Global Aquaculture Statistics. http://www.fao.org/home/en/.
8. Feckaninova, A., Koscova, J., Mudronova, D., Popelka, P., Toropilova, J., 2017. The use of probiotic bacteria against Aeromonas infections in salmonid aquaculture. Aquaculture 469, 1–8.
9. Fore, M., Frank, K., Norton, T., Svendsen, E., Alfredsen, J.A., Dempster, T., Eguiraun, H., Watson, W., Stahl, A., Sunde, L.M., Schellewald, C., Skoien, K.R., Alver, M.O., Berckmans, D., 2018. Precision fish farming: a new framework to improve production in aquaculture. Biosystems Engineering 173, 176–193.
10. Hern´andez, C., Hardy, R.W., Contreras-Rojas, D., L´opez-Molina, B., Gonz´alez- Rodríguez, B., Domínguez-Jimenez, P., 2014. Evaluation of tuna by-product meal as a protein source in feeds for juvenile spotted rose snapper Lutjanus guttatus. Aquaculture Nutrition 20, 574–582.
11. Hua, K., Cobcroft, J.M., Cole, A., Condon, K., Jerry, D.R., Mangott, A., Praeger, C., Vucko, M.J., Zeng, C., Zenger, K., Strugnell, J.M., 2019. The Future of Aquatic Protein: Implications for Protein Sources in Aquaculture Diets. One Earth 1, 316–329.
12. Kaushik, S.J., Seiliez, I., 2010. Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: current knowledge and future needs. Aquaculture Research 41, 322–332.
13. Khanjani, M.H., Alizadeh, M., Mohammadi, M., Sarsangi Aliabad, H. (2021b). Biofloc system applied to Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farming using different carbon sources: growth performance, carcass analysis, digestive and hepatic enzyme activity. Iranian Journal of Fisheries Sciences 20(2), 490-513.
14. Khanjani, M.H., Alizadeh, M., Mohammadi, M., Sarsangi Aliabad, H. (2021c). The effect of adding molasses in different times on performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) raised in a low-salinity biofloc system. Annals of Animal Scienses, 21(4), 1435-1454.
15. Khanjani, M.H., Alizadeh, M., Sharifinia, M., (2021a) Effects of different carbon sources on water quality, biofloc quality, and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings in a heterotrophic culture system. Aquaculture International, 29, 307-321.
16. Khanjani, M.H., Sharifinia, M. (2020). Biofloc technology as a promising tool to improve aquaculture production. Reviwes in Aquaculture 12 (3): 1836-1850.
17. Khanjani, M.H., Sharifinia, M. (2021a). Production of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* reared in a limited water exchange system: The effect of different light levels. Aquaculture, 542, 736912.
18. Khanjani, M.H., Sharifinia, M., (2021b). Biofloc technology with addition molasses as carbon sources applied to *Litopenaeus vannamei* juvenile production under the effects of different C/N ratios. Aquaculture International, https://doi.org/10.1007/s10499-021-00803-5
19. Kim, K.-D., Jang, J.W., Kim, K.-W., Lee, B.-J., Hur, S.W., Han, H.-S., 2018. Tuna by-product meal as a dietary protein source replacing fishmeal in juvenile Korean rockfish Sebastes schlegeli. Fisheries and Aquatic Sciences 21, 29.
20. National Research Council, 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. The National Academies Press, Washington, DC. https://doi.org/10.17226/13039.
21. Ostadrahimi, A., Salehi-Pourmehr, H., Mohammad-Alizadeh-Charandabi, S., Heidarabady, S., Farshbaf-Khalili, A., 2018. The effect of perinatal fish oil supplementation on neurodevelopment and growth of infants: a randomized controlled trial. Eur J Nutr 57, 2387–2397.
22. Panserat, S., Skiba-Cassy, S., Seiliez, I., Lansard, M., Plagnes-Juan, E., Vachot, C., Aguirre, P., Larroquet, L., Chavernac, G., Medale, F., Corraze, G., Kaushik, S., Moon, T.W., 2009. Metformin improves postprandial glucose homeostasis in rainbow trout fed dietary carbohydrates: a link with the induction of hepatic lipogenic capacities? Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 297, 707–715.
23. Parra, L., Lloret, G., Lloret, J., Rodilla, M., 2018. Physical Sensors for Precision Aquaculture: A Review. Ieee Sensors Journal 18, 3915–3923.
24. Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J.L., Moon, T.W., 2012. Glucose metabolism in fish: a review. Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology 182, 1015–1045.
25. Reddy, D.V., Krishna, N., 2009. Precision animal nutrition: a tool for economic and eco-friendly animal production in ruminants. Livestock Research for Rural Development 21, 203–222.
26. Roques, S., Deborde, C., Richard, N., Skiba-Cassy, S., Moing, A., Fauconneau, B., 2020. Metabolomics and fish nutrition: a review in the context of sustainable feed development. Reviews in Aquaculture 12, 261–282.

27. Schram, E., Pedrero, Z., C´amara, C., Heul, J.W., Luten, J.B., 2010. Enrichment of African catfish with functional selenium originating from garlic. Aquaculture Research 39, 850–860.
28. Simopoulos, A.P., 2016. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. Nutrients 8, 10–18.
29. Song, X., Marandel, L., Skiba-Cassy, S., Corraze, G., Dupont-Nivet, M., Quillet, E., Geurden, I., Panserat, S., 2018. Regulation by Dietary Carbohydrates of Intermediary Metabolism in Liver and Muscle of Two Isogenic Lines of Rainbow Trout. Front Physiol 9, 1579–1583.
30. Taylor, T., 2002. Seafoods — Quality, Technology and Nutraceutical Applications. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 978-3-662-09836-3.
31. Teles, A.O., Couto, A., Enes, P., Peres, H., 2019. Dietary protein requirements of fish – a meta-analysis. Reviews in Aquaculture 1–33.
32. Tummala, R., Ghosh, R.K., Jain, V., Devanabanda, A.R., Bandyopadhyay, D., Deedwania, P., Aronow, W.S., 2019. Fish Oil and Cardiometabolic Diseases: Recent Updates and Controversies. Am J Med 132, 1153–1159.
33. Weil, C., Lefevre, F., Bugeon, J., 2013. Characteristics and metabolism of different adipose tissues in fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries 23, 157–173.
34. Wong, M.H., Mo, W.Y., Choi, W.M., Cheng, Z., Man, Y.B., 2016. Recycle food wastes into high quality fish feeds for safe and quality fish production. Environ Pollut 219, 631–638.
35. Yu, E.-M., Zhang, H.-F., Li, Z.-F., Wang, G.-J., Wu, H.-K., Xie, J., Yu, D.-G., Xia, Y., Zhang, K., Gong, W.-B., 2017. Proteomic signature of muscle fibre hyperplasia in response to faba bean intake in grass carp. Scientific Reports 7, 45950.
36. Yuru, Z., Ronghua, L., Chaobin, Q., Guoxing, N., 2020. Precision nutritional regulation and aquaculture. Aquaculture Reports, 18, 100496
37. Zhang, Y.R., Qin, C.B., Yang, L.P., Lu, R.H., Zhao, X.Y., Nie, G.X., 2018. A comparative genomics study of carbohydrate/glucose metabolic genes: from fish to mammals. Bmc Genomics 19, 14.

The Protective Effect of Portulaca oleracea Hydro-alcoholic Extract on Blood Lipid Profile in Rats Against Bisphenol A Toxicity

Davood Fazli [1*]

34- 1- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Payame Nour University(PNU), Tehran, Iran.

**Corresponding Author Email address: Fazlibio57@gmail.com*

Abstract

In recent years, coronary diseases are of the most important and common diseases. These diseases are associated with atherosclerosis which is the most important cause of death in developed countries. Some studies illustrated that endocrine disrupting chemicals including bisphenol A (BPA) play important roles in obesity. This material is used in the plastics and canning industry. Since Portulaca oleraceaa is used as a the blood lipid profiles decreasing agent in traditional medicine. So, in the present study the effect of ethanolic extracts of Portulaca oleraceaa was evaluated on the lipid profile in rat blood. In this study, forty nine rats were randomly divided into 7 groups: control group, vehicle group (500 µg of corn oil / kg BW), group receiving toxin (500 µg of bisphenol A / kg BW), positive control (100 mg of hydroalcoholic extract of portulaca oleracea / kg BW), 3 treatment groups receiving purslane hydroalcoholic extract (500 µg of bisphenol A + 50, 100, 150 mg of hydroalcoholic extract of purslane hydroalcoholic extract/ kg BW, respectively).All injections are done by Intraperitoneal Route for 14 consequently days. At the end of the injection time, the serum was isolated to measure the tested factors. The obtained data were analyzed by SPSS software (ANOVA and Tukey tests). According to data, a significant decreasing ($p<0.05$) in cholesterol, triglyceride and LDL serum levels and significant increasing ($p<0.05$) levels in each purslane treated groups comparing to the bisphenol A group were observed. Also the results of this study showed non-significant decrease of HDL level and significant increase of cholesterol, triglyceride and LDL levels in serum in the BPA group in comparison with control group($p\leq0.05$).

Keywords: HDL, LDL, Cholesterol, Triglyceride

اثر محافظتی عصاره هیدروالکلی خرفه بر میزان پروفایل لیپیدی خون در رت طی مسمومیت با بیسفنول A

داود فضلی [1*]

۱- استادیارگروه زیست شناسی، دانشکده علوم- دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: fazlibio57@gmail.com

چکیده

در سال‌های اخیر، بیماری‌های کرونر از جمله آترواسکلروز از مهمترین و شایعترین بیماری‌ها هستند. این بیماری ها در حال حاضر بیشترین علت مرگ در کشورهای پیشرفته است. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که مواد شیمیایی مختل کننده غدد درون‌ریز از جمله بیسفنول A نقش مهمی در چاقی دارند. این ماده در صنعت پلاستیک‌سازی و ساخت قوطی کنسرو مورد استفاده قرار می‌گیرد. از آنجا که گیاه خرفه به عنوان کاهش دهنده پروفایل لیپیدی خون در طب سنتی استفاده می‌شود؛ بنابراین، در مطالعه حاضر اثر عصاره هیدروالکلی گیاه خرفه بر پروفایل لیپیدی خون موش رت مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۴۹ رت به طور تصادفی به ۷ گروه ۷ تایی تقسیم شدند: کنترل، شم (۵۰۰ میکروگرم روغن ذرت/کیلوگرم وزن بدن)، گروه دریافت کننده سم (۵۰۰ میکروگرم بیسفنولA/کیلوگرم وزن بدن)، کنترل مثبت (۱۰۰ میلی‌گرم عصاره هیدروالکلی گیاه خرفه/کیلوگرم وزن بدن)، ۳ گروه تیمار دریافت کننده خرفه (۵۰۰ میکروگرم بیسفنولA + ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم عصاره هیدروالکلی گیاه خرفه/کیلوگرم وزن بدن). تمام تزریقات از طریق روش درون صفاقی و طی ۱۴ روز پیاپی انجام شد. در پایان، سرم خون برای سنجش پروفایل لیپیدی جداسازی گردید. در پایان نمونه خون گرفته شد و غلظت سرمی پروفایل لیپیدهای خون تعیین شد. داده‌های بدست آمده توسط نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج نشان داد که غلظت سرمی کلسترول، LDL و TG گروه های تحت تیمار با بیسفنول A به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود. همچنین تیمار با عصاره خرفه نیز اثرات بیسفنول A را تعدیل نموده و پروفایل چربی خون را بهبود می بخشد.

واژگان کلیدی: HDL، LDL، کلسترول، تری‌گلیسرید

۱.مقدمه

بیسفنول (BPA) یک ماده شیمیایی است که در بسیاری از وسایلی که انسان روزانه از آنها استفاده می‌کند از قبیل بطری‌های آب، آسترهای فلزی قوطی‌ها، اسباب‌بازی‌ها و سایر محصولات از جمله پلاستیک‌های پلی‌کربنات وجود دارد و در گرما و شرایط اسیدی می‌توانند از این محصولات خارج گردیده و به همراه مواد غذایی وارد بدن جانوران بویژه انسان گردد (Welshon et al., 2006; Lang et al., 2008). قرار گرفتن در معرض BPA باعث بروز عوارض جانبی مانند تسریع در بلوغ و افزایش وزن بدن می‌گردد (Honma et al., 2002). همچنین توانایی اتصال BPA به گیرنده‌های استروژنی ممکن است باعث بروز اختلالات مختلفی از قبیل فشار خون بالا، تصلب شرایین، اختلال عملکرد کبد، دیابت و چاقی شود (Alonso-Magdalena et al., 2006; marmugi et al., 2014). اگرچه تاکنون

مکانیسم اثرات BPA بر متابولیسم گلوکز و پروفایل لیپیدی به طور کامل توضیح داده نشده است ولی شاید BPA با کاهش دفاع در برابر آنتی‌اکسیدان‌ها اثرات سمی خود را نشان می‌دهد (Moghaddam et al., 2015; Song et al., 2014).

بیماری‌های عروق کرونر از مهم‌ترین و شایع‌ترین بیماری‌های سال‌های اخیر می‌باشند که در بسیاری از کشورهای پیشرفته و فقیر، در همه سنین به‌ویژه در میانسالی شیوع یافته است (Pavk., 2011). علت اصلی بیماری عروق کرونر، آترواسکلروز است که گسترش این بیماری به طور خاص به کلسترول و متابولیسم لیپید نسبت داده می شود (Komarova et al., 2011). به استناد گزارش‌های مختلف، در ایران بیماری‌های قلبی-عروقی دلیل بیش از ۴۰ درصد از مرگ و میرها است (Ghazanfari et al., 2010). سطوح بالای کلسترول خون باعث تصلب شرایین و بیماری‌های شریانی شده و اغلب منجر به حمله قلبی می‌شود (Roughani et al., 2004).

در طی سال‌های اخیر پژوهشگران همیشه به دنبال درمان بهینه‌ای بوده‌اند که بتواند با کمترین عوارض جانبی بر هیپرلیپیدمی غلبه کند. از این رو استفاده از داروهای گیاهی، مورد توجه بسیاری قرار گرفته است و خرفه یکی از گیاهانی است که می‌توان در این زمینه مورد استفاده قرار داد (Zargari, 2001; Farhadi and Gavadifar, 2008).

گیاهان دارویی با خواص آنتی‌اکسیدانی بسیاری وجود دارند که از جمله آنها خرفه می‌باشد. گیاه خرفه با نام علمی *Oleracea Portulaca* L.، گیاهی یک ساله از خانواده Portulacaceae است. قسمت‌های قابل استفاده گیاه خرفه اندام های جوان به ویژه برگ و ساقه‌های ترد آن با مزه ای شبیه به می‌باشد (Rashed et al., 2003).

این گیاه دراای اثرات دیورتیک، کاهنده تب، ضد اسپاسم، ضدعفونی، ضد باکتری، ضد التهاب، ضد درد، شل کننده عضلانی و ترمیم‌کنندگی زخم می باشد. مواد موثره این گیاه شامل اگزالیک اسید، کینامیک اسید، کافئیک اسید، فلاونوئیدها، آلانین، تانن، و آلکالوئیدها می‌باشد. خرفه همچنین غنی‌ترین منبع گیاهی اسیدهای چرب امگا ۳ و منبع بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند آلفا توکوفرول، اسید آسکوربیک، گلوتاتیون، ویتامین A، B1، B2، C، E، بتا کاروتن و سایر اسید آمینه‌های ضروری است (Xiang et al., 2005; Yang et al., 2009; Gatreh-samani et al., 2011).

افزایش مصرف اسیدهای چرب امگا ۳ اغلب با کاهش خطر بیماری‌های قلبی-عروقی و کاهش مرگ و میر ناشی از این بیماری همراه است (Gatreh-samani et al., 2011; Shidfar et al 2007).

با توجه به عدم مطالعه اثرات عصاره گیاه خرفه بر پروفایل لیپیدی ناشی از سمیت بیسفنول A، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثرات این گیاه بر پروفایل لیپیدی شامل کلسترول، تری‌گلیسیرید، LDL و HDL در رت‌ها انجام شد.

۲.مواد و روش ها

در این مطالعه ۴۹ سر رت نر بالغ نژاد ویستار (۲۵۰±۱۰ گرم) مورد استفاده قرار گرفت. رت‌ها از حیوانخانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرند تهیه گردیدند و به مدت یک هفته قبل از تیمار جهت سازگاری با محیط آزمایشگاهی، به آزمایشگاه انتقال داده شدند. حیوانات در طول آزمایش تحت شرایط کنترل شده (دمای ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۲:۱۲ساعت تاریکی/روشنایی) نگهداری شدند.

پودر بیسفنول A خریداری شده از شرکت سیگما در روغن ذرت در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن تهیه گردید.

برای تهیه عصاره الکلی گیاه خرفه از روش‌های استاندارد عصاره‌گیری استفاده گردید. پس از جمع‌آوری، گیاه خرفه توسط متخصص علوم گیاهی شناسایی شد. سپس خشک و بخش‌های هوایی گیاه آسیاب شد و الکل طبی ۹۶ درصد به پودر به دست آمده اضافه گردید. به مخلوط حاصله حدود ۷۲ ساعت فرصت داده شد تا خوب خیس بخورد. پس از صاف کردن سانتریفوژ شد و پس از قرار دادن در حمام آب گرم (برا ی تبخیر الکل) با قرار دادن عصاره در دما ی ۴۰ درجه سانتیگراد فور آبگیری انجام

شد. عصاره مذکور به علت دارا بودن ترکیبات کاروتینوئیدی و روغنی به صورت کـاملاً خشک و پودر مانند نیست (Changizi-Ashtiyani et al., 2013; Zarei et al., 2014).

رت‌ها به طور تصادفی به ۷ گروه ۷ تایی تقسیم شدند: کنترل، شاهد (۵۰۰ میکروگرم روغن ذرت/کیلوگرم وزن بدن)، گروه دریافت کننده سم (۵۰۰ میکروگرم بیسفنولA/کیلوگرم وزن بدن)، کنترل مثبت (۱۰۰ میلی‌گرم عصاره هیدروالکلی گیاه خرفه/کیلوگرم وزن بدن)، ۳ گروه تیمار دریافت کننده خرفه (۵۰۰ میکروگرم بیسفنولA + ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم عصاره هیدروالکلی گیاه خرفه/کیلوگرم وزن بدن). تمام تزریقات از طریق روش درون صفاقی و طی ۱۴ روز پیاپی انجام شد. پس از اتمام زمان تزریقات (۱۴ روز) تمامی حیوانات با تزریق درون صفاقی کلرال هیدرات به میزان ۴۰۰ میلی گرم/ کیلوگرم وزن بدن بیهوش شده و نمونه خونی دریافت و سرم آن جداسازی و تا زمان سنجش پروفایل لیپیدی شامل تری‌گلیسرید، کلسترول، HDL و LDL توسط کیت‌های شرکت پارس ازمون در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای آنالیز داده‌ها از نرم افزار آماری spss استفاده شد. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شدند. تفاوت بین میانگین در بین گروه‌های مختلف با کمک آزمون آنووای یک طرفه و با تست تعقیبی توکی بررسـی گردیـد. مقادیر ۰/۰۵ >pبه‌عنوان حداقل سطح معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

۳.نتایج و بحث

میانگین ± انحراف معیار فاکتور های مورد سنجش در بین هفت گروه مورد آزمایش به تفکیک در جدول ۱ نشـان داده شده است.

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار پروفایل لیپیدی در بین گرو های مورد آزمایش با استفاده از آزمون ANOVA

گروه	کلسترول mg/dl میانگین ± انحراف معیار	تری‌گلیسرید mg/dl میانگین ± انحراف معیار	LDL mg/dl میانگین ± انحراف معیار	HDL mg/dl میانگین ± انحراف معیار
کنترل	^{b}۱۳۷/۳±۸/۸	^{b}۸۹/۶±۲/۶	^{b}۸۵/۶±۴/۲	۴±۵۸/۲
شم (۵۰۰ میکروگرم/ کیلوگرم وزن بدن روغن ذرت)	^{b}۱۳۹/۴±۸/۲	^{b}۸۹/۶±۹/۷	^{b}۸۷/۶±۸/۴	۵۸/۴±۹/۵
بیسفنول (۵۰۰ میکروگرم/ کیلوگرم وزن بدن بیسفنولA)	^{a}۱۶۴/۷±۸/۳	^{a}۹۳/۷±۸/۳	^{a}۱۰۵/۸±۴/۷	±۴/۵۷¼
خرفه (۱۰۰ میلی‌گرم / کیلوگرم وزن بدن عصاره خرفه)	^{b}۱۱۷/۳±۶/۵	^{b}۷۷/۵±۴/۷	^{b}۷۲/۵±۶/۷	^{b}۳±۴۳/۲
گروه تیمار ۱ (۵۰۰ میکروگرم / کیلوگرم وزن بدن بیسفنول A + ۵۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن عصاره خرفه)	۱۵۳/۵±۸/۲	۸۲/۵±۶/۱	^{b}۵±۶۶/۳	۸۵/۵±۵/۷
گروه تیمار ۲ (۵۰۰ میکروگرم/ کیلوگرم وزن بدن بیسفنول A + ۱۰۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن عصاره خرفه)	۱۵۰/۵±۶/۲	^{b}۷۷/۵±۸/۸	^{b}۵۴/۴±۲/۸	^{b}۹۴/۶±۴/۴

گروه تیمار ۳ (۵۰۰ میکروگرم / کیلوگرم وزن بدن بیسفنول A + ۱۵۰ میلی‌گرم / کیلوگرم وزن بدن عصاره خرفه)	۱۵۴/۵±۲/۶	۸۶/۶±۶/۱	[b]۷۷/۵±۴/۸	۷۴/۵±۸/۱

[a]: نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها و گروه کنترل (p<۰/۰۵)

[b]: نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها و گروه بیسفنول (p<۰/۰۵)

طبق جدول ۱، میانگین ± انحراف استاندارد کلسترول در تمامی گروه‌ها تفاوت نشان داد و میزان آن در گروه بیسفنول A در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی دار و در گروه‌های تیمار با خرفه نسبت به گروه بیسفنول کاهش معنی‌داری یافته بود. همچنین میزان کلسترول در گروه‌های تیمار بعلاوه خرفه ۵۰،۱۰۰و ۱۵۰ نسبت به گروه بیسفنول کاهش یافته بود ولی این کاهش معنی دار نبود (p>۰/۰۵).

میانگین ± انحراف معیار تری‌گلیسرید در تمامی گروه‌ها تفاوت نشان داد و میزان آن در گروه بیسفنول A در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی دار و در گروه تیمار با خرفه نسبت به گروه‌ها بیسفنول کاهش معنی‌داری یافته بود (p<۰/۰۵). همچنین میزان تری‌گلیسرید در گروه‌های تیمار با بیسفنول بعلاوه خرفه ۵۰،۱۰۰ و ۱۵۰ نسبت به گروه بیسفنول کاهش یافته بود ولی این کاهش فقط در گروه بیسفنول بعلاوه خرفه ۱۰۰ معنی دار (p<۰/۰۵) بود.

میانگین ± انحراف معیار LDL در تمامی گروه‌ها تفاوت نشان داد و میزان آن در گروه بیسفنول A در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی دار و در گروه تیمار با خرفه نسبت به گروه‌ها بیسفنول کاهش معنی‌داری یافته بود (p<۰/۰۵). همچنین میزان LDL در گروه‌های تیمار با بیسفنول بعلاوه خرفه ۵۰،۱۰۰ و ۱۵۰ نسبت به گروه بیسفنول کاهش معنی داری نشان داد(p<۰/۰۵).

میانگین ± انحراف معیار HDL در گروه بیسفنول A در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداد(p>۰/۰۵) ولی در گروه‌های تیمار با خرفه نسبت به گروه بیسفنول کاهش معنی‌داری یافته بود (p<۰/۰۵). همچنین میزان HDL در گروه‌های تیمار با بیسفنول بعلاوه خرفه ۵۰،۱۰۰ و ۱۵۰ نسبت به گروه بیسفنول افزایش نشان داد ولی این افزایش فقط در گروه بیسفنول بعلاوه خرفه ۱۰۰ معنی دار بود(p<۰/۰۵).

طبق نتایج این پژوهش میزان کلسترول، تری‌گلیسرید، LDL در گروه بیسفنول نسبت به گروه‌های دیگر افزایش معنی‌داری یافته بود ولی میزان HDL تفاوت معنی‌داری را نشان نداده است. نتایج این تحقیق همسو با برخی مطالعات دیگر نشان می‌دهد که بیسفنول A می‌تواند باعث افزایش کلسترول، تری‌گلیسرید، LDL و کاهش HDL در جانوران تحت آزمایش گردد. اگرچه تاکنون مکانیسم اثرات BPA بر متابولیسم گلوکز و پروفایل لیپیدی به طور کامل توضیح داده نشده است ولی احتمالاً BPA با کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی اثرات سمی خود را نشان می‌دهد.

مقدم و همکاران در سال (۲۰۱۵) گزارش داند تزریق داخل صفاقی ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن BPA به مدت ۴ هفته باعث افزایش سطح گلوکز سرم، کلسترول تام، تری‌گلیسرید و LDL و کاهش سطح HDL در موش‌های صحرایی نر شد.

عبدالوهاب در سال (۲۰۱۴) گزارش داد که تجویز خوراکی ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز BPA به مدت ۴ هفته باعث افزایش قابل توجهی در سطح کلسترول تام، تری‌گلیسرید و LDL و کاهش در سطح HDL می‌گردد (Abdel-Wahab., 2014).

Marmugi و همکاران در سال (۲۰۱۲) اظهار داشتند که دوزهای ۵، ۵۰، ۵۰۰ و ۵۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم BPA که به صورت خوراکی به مدت ۲۸ روز تجویز می‌شود، تأثیر قابل توجهی بر گلوکز پلاسما، کلسترول تام، LDL و HDL ندارد (Marmugi et al., 2012).

در مطالعه ozydin و همکاران در سال (۲۰۱۸) هیچ تفاوت آماری معنی‌داری بین رت‌های دریافت کننده بیسفنول با دوزهای ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن با گروه کنترل در سطح کلسترول، تری‌گلیسیرید، LDL و HDL پلاسما وجود نداشت (Ozaydin et al., 2018).

مطالعه Oguazu و همکاران در سال (۲۰۱۷) نشان داند که BPA باعث افزایش تری‌گلیسیرید و LDL خون موش‌های صحرایی در هر دو فاز تیمار حاد و مزمن در موش‌های دریافت کننده بیسفنول در دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم در هرکیلوگرم وزن بدن می‌شود. همچنین باعث کاهش معنی‌دار HDL در تیمار حاد و افزایش معنی‌دار در تیمار مزمن می‌گردد (Oguazu and Ezeonu., 2017).

طبق نتایج این تحقیق میزان کلسترول، تری‌گلیسرید در گروه خرفه نسبت به سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌درای نشان می‌دهد ولی LDL در گروه خرفه نسبت به گروه‌های کنترل و بیسفنول کاهش معنی‌دار و در گروه‌های تیمار نسبت به گروه‌های خرفه، بیسفنول و کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد. میزان HDL نیز در گروه‌های تیمار نسبت به گروه‌های بیسفنول، کنترل و خرفه افزایش معنی‌داری نشان داد.

نتایج مطالعه Changizi-Ashtiyani و همکاران در سال (۲۰۱۳) نشان می‌دهد که مصرف خوراکی عصاره الکلی خرفه می‌تواند مانند استفاده از آتورواستاتین نقش مهمی در کاهش سطح کلسترول داشته باشد که این عملکرد احتمالا بیشتر به تراکم بالای آنتی‌اکسیدان‌ها و امگا ۳ موجود در این گیاه و مکانیسم‌های مهار سنتز کلسترول مربوط می‌شود (Changizi-Ashtiyani et al., 2013).

بنابراین با توجه به اینکه گیاه خرفه حاوی اسیدهای چرب غیراشباع، با ارزش غذایی بالا از جمله اسید اولئیک، اسید لینولئیک و اسید لینولنیک با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی و همچنین آلکالوئیدها، فیبر، کوآنزیم Q10 و مقادیر فراوان امگا ۳ می‌باشد، به همین دلیل می‌توانند در تنظیم مهار آنزیم‌های گلیکولیز و لیپوژنسیس(چربی سازی) نقش داشته باشند (Murray et al., 2009; Changizi-Ashtiyani et al., 2013). بنابراین کاهش سطح لیپیدهای سرم از جمله کلسترول، تری‌گلیسرید و LDL و افزایش سطح HDL توسط این گیاه قابل توجیه است.

۴.نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این تحقیق می‌توان از عصاره گیاه خرفه بعنوان مکمل و یا درمان دارویی برای بهبود پروفایل لیپیدی و کاهش سمیت حاصل از بیسفنول A استفاده نمود.

منابع

4. Abdel-Wahab, W. M. 2014. Thymoquinone attenuates toxicity and oxidative stress induced by bisphenol A in liver of male rats. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, *17*(11), 1152-1160.

5. Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E., & Nadal, A. 2006. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic β-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environmental health perspectives*, *114*(1), 106-112.
6. Changizi-Ashtiyani, S., Zarei, A., Taheri, S., Rasekh, F., & Ramazani, M. 2013. The effects of Portulaca oleracea alcoholic extract on induced hypercholesteroleomia in rats. *Zahedan J Res Med Sci*, *15*(6), 34-39.
7. Farhadi, A., & Gavadifar, K. 2008. Effects of Berberise Vulgaris fruit extract on blood cholesterol and triglyceride in hyperlipidemic patients. *koomesh*, 211-215.
8. Gatreh-Samani, K., Farrokhi, E., Khalili, B., Rafieian, M., & Moradi, M. 2011. Purslane (Portulaca oleracea) effects on serum paraoxanase-1 activity. *Journal of Shahrekord University of medical sciences*, *13*(1), 9-14.
9. Ghazanfari, Z., Alizadeh, S. M., Azizzadeh Furozi, M., & Bahodini, N. 2010. Prevalence of coronary artery diseases risk factors in Kerman. *Iran J Crit Care Nurs*, *3*(1), 29-32.
10. Honma, S., Suzuki, A., Buchanan, D. L., Katsu, Y., Watanabe, H., & Iguchi, T. 2002. Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reproductive toxicology*, *16*(2), 117-122.
11. Lang, I. A., Galloway, T. S., Scarlett, A., Henley, W. E., Depledge, M., Wallace, R. B., & Melzer, D. 2008. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *Jama*, *300*(11), 1303-1310.
12. Marmugi, A., Ducheix, S., Lasserre, F., Polizzi, A., Paris, A., Priymenko, N., ... & Mselli-Lakhal, L. 2012. Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. *Hepatology*, *55*(2), 395-407.
13. Marmugi, A., Lasserre, F., Beuzelin, D., Ducheix, S., Huc, L., Polizzi, A., ... & Mselli-Lakhal, L. 2014. Adverse effects of long-term exposure to bisphenol A during adulthood leading to hyperglycaemia and hypercholesterolemia in mice. *Toxicology*, *325*, 133-143.
14. Moghaddam, H. S., Samarghandian, S., & Farkhondeh, T. 2015. Effect of bisphenol A on blood glucose, lipid profile and oxidative stress indices in adult male mice. *Toxicology mechanisms and methods*, *25*(7), 507-513.
15. Nechepurenko, I. V., Boyarskikh, U. A., Komarova, N. I., Polovinka, M. P., Filipenko, M. L., Lifshits, G. I., ... & Tolstikov, G. A. 2011. LDLR up-regulatory activity of berberine and its bromo and iodo derivatives in human liver HepG2 cells. In *Doklady Chemistry* (Vol. 439, No. 1, pp. 204-208). SP MAIK Nauka/Interperiodica.
16. Oguazu, C. E., & Ezeonu, F. C. 2017. Bisphenol A (BPA) increases blood triglycerides and low density lipoproteins in albino wistar rats.journal of experimental research,591),24-27.
17. Ozaydın, T., Oznurlu, Y., Sur, E., Celik, I., Uluısık, D., & Dayan, M. O. 2018. Effects of bisphenol A on antioxidant system and lipid profile in rats. *Biotechnic & Histochemistry*, *93*(4), 231-238.
18. Park, K. 2011. Park's textbook of preventive and social medicine. Jabalpur. *Banarasidas Bhanot*, *463*.
19. Rashed, A. N., Afifi, F. U., & Disi, A. M. 2003. Simple evaluation of the wound healing activity of a crude extract of Portulaca oleracea L.(growing in Jordan) in Mus musculus JVI-1. *Journal of ethnopharmacology*, *88*(2-3), 131-136.
20. Rodwell, V. W., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., & Weil, P. A. 2018. *Harper's illustrated biochemistry*. New York (NY): McGraw-Hill Education.
21. Roghani, M., Baluchnejadmojarad, T. O. U. R. A. N. D. O. K. H. T., Sohrabi, Z., & Sadeghi, M. 2004. Anti-hyperlycemic and hypolipidemic effect of oral administration of Capsicum frutescens in male STZ-diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants*, *3*(10), 47-52.
22. Shidfar, F., Yarahmad,i SH., Jalali, M., et al. 2007. Effects of purified omega–3 fatty acids in postmenopausal women with type-2 diabetes. J Endocrinol Meta, 9(3, 229-234
23. Song, S., Zhang, L., Zhang, H., Wei, W., & Jia, L. 2014. Perinatal BPA exposure induces hyperglycemia, oxidative stress and decreased adiponectin production in later life of male rat offspring. *International journal of environmental research and public health*, *11*(4), 3728-3742.
24. Welshons, W. V., Nagel, S. C., & vom Saal, F. S. 2006. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*, *147*(6), s56-s69.
25. Xiang, L., Xing, D., Wang, W., Wang, R., Ding, Y., & Du, L. 2005. Alkaloids from Portulaca oleracea L. *Phytochemistry*, *66*(21), 2595-2601.

26. Yang, Z., Liu, C., Xiang, L., & Zheng, Y. 2009. Phenolic alkaloids as a new class of antioxidants in Portulaca oleracea. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, *23*(7), 1032-1035.
27. Zarei, A., Changizi Ashtiyani, S., & Taheri, S. 2014. The effects of hydroalcoholic extract of Portulaca Oleracea on the serum concentreation of Hepatic enzymes in Rats. *ISMJ*, *17*(5), 889-899.
28. Zargari, A. 2001. Medical plants. Tehran: Tehran University Press, 451-453. 8.

Structure and thermal stability of ribosomal 18S gene in *Tigriopus* species

Fatemeh Nazari[1], Razieh Razavi Parizi*[2]

1- Department of Biology, Faculty of Science, University of Jiroft, Jiroft, Iran
2-Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Jiroft, Jiroft, Iran

**Corresponding Author Email address: fatemeh.nazari62@ujiroft.ac.ir*

Abstract

Biodiversity studies are commonly conducted using 18S rRNA genes to study the intra-species diversity. To calculate the energy stability of partial fragment of 18S which include of 60 nucleotides, we applied MM-UFF quantum method for species of the genus *Tigriopus*. We have used fully atomistic molecular dynamics simulations to study the structure and stability these DNA sequences. Since the actual structure cannot be determined by experiments, computer simulation is used to model the structure and stability. The result show that the amount of thermal stability of selected sequence is approximately similar in different species.

Keywords: DNA, computer simulation, molecular mechanic, crustacea, copepod

ساختار و پایداری دمایی ژن ربیوزومی 18S گونه‌های *Tigriopus* Norman, 1869

فاطمه نظری*[۱]، راضیه سادات رضوی پاریزی[۲]

۱- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جیرفت

۲- استادیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جیرفت

*ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: *fatemeh.nazari62@ujiroft.ac.ir*

چکیده

در مطالعات تنوع زیستی به طور معمول از ژن 18S استفاده می‌شود که به خوبی می‌تواند تغییرات بین گونه‌ای را نشان دهد. با استفاده از روش کوانتومی MM-UFF پایداری دمایی اولیگونوکلئوتیدی به طول ۶۰ نوکلئوتید از ناحیه یکسانی از ژن ریبوزومی 18S گونه‌های جنس *Tigriopus* را محاسبه شد. ما از شبیه سازی دینامیک مولکولی کاملاً اتمی برای مطالعه ساختار و پایداری انرژی این توالی‌های ژنی استفاده کردیم. از آنجایی که ساختار حقیقی را نمی‌توان به صورت تجربی تعیین کرد بنابراین از شبیه‌سازی کامپیوتری برای مدل سازی ساختار و تعیین پایداری استفاده شد. براساس نتایج به دست آمده مقدار محاسبه شده برای توالی انتخاب شده تقریباً در همه گونه‌ها یکسان بود.

واژگان کلیدی: DNA، شبیه‌سازی کامپیوتری، مکانیک مولکولی، سخت‌پوست، پاروپایان

۱.مقدمه

الگوهای تغییرات اقلیمی ممکن است ترکیبات جدیدی از شرایط غیر زیستی را بر جانوران تحمیل کند. درک اثرات متقابل امروزی عوامل استرس‌زای متعدد هنوز نامشخص است. موجودات دریازی با افزایش عوامل استرس‌زای چندگانه به خصوص افزایش دما و کاهش غلظت اکسیژن مواجه هستند. اینگونه پیشنهاد می‌گردد که تحمل دمایی، به ویژه در جانوران آبزی، به غلظت اکسیژن در دسترس بستگی دارد (Burton et al., 2005).

سیستم‌های زنده استثنائاتی را نسبت به قانون دوم ترمودینامیک نشان می‌دهند هر چند که گذرا باشد. سلول‌ها به وسیله ایجاد یک شیب گرادیان انتروپی گذرنده در یک سیستم ترمودینامیکی باز به دور از تعادل از طریق انواع مکانیسم‌های تبادل انتروپی پایداری خود را حفظ می‌کنند. اطلاعات ذخیره شده در DNA و ترجمه این اطلاعات به پروتئین در مرکز حفظ تعادل ترمودینامیکی است که از طریق افزایش نظم حاصل از ساخت ماکرومولکول‌های خاص از پیش‌سازهای منومریک گرما و دیگر محصولات واکنش را به محیط انتقال می‌دهند. بنابراین، ذخیره و پردازش اطلاعات مرکز توانایی سلول برای حفظ پایداری حالت انتروپی می‌باشد (Gatenby and Frieden, 2005). از طرفی پیش‌بینی پایداری DNA دو رشته‌ای از روی توالی بازها یک موضوع

امروزی می‌باشد. دقت محاسبه انرژی آزاد DNA دو رشته‌ای یک جنبه مهم برای همه روش‌های پیش‌بینی است (Tulpan et al., 2010). پیوندهای هیدروژنی سهم قابل توجهی در پایداری DNA دو رشته‌ای دارند. محتوای GC به علت وجود پیوندهای هیدروژنی، یک فاکتور تعیین کننده برای پایداری اسیدهای نوکلئیک است. درکل، تعداد پیوند هیدروژنی بیشتر موجب پایداری بیشتر می‌شود. با توجه به اهمیت برهمکنش مولکول‌های زیستی در یک سیستم ابرمولکولی، تعیین فاکتورهای مختلف که در انرژی برهمکنش یک سیستم زنده سهم دارند به درک برخی از پدیده‌های زیستی کمک می‌کند. درک برهمکنش‌های زیستی یک انگیزه برای استفاده و بهبود روش‌های شیمی محاسباتی می‌باشد (Chen and Skylarus, 2021). در این مطالعه هدف تعیین میزان پایداری دمایی ژن ریبوزومی 18S گونه‌های جنس Tigriopus Norman 1869 است از آنجایی که این پاروپایان سخت پوست در زیستگاه‌هایی به شدت نامتعادل از نظر دمایی و سایر فاکتورهای اکولوژیکی یافت می‌شوند.

۲.مواد و روش‌ها

توالی‌های ژن ریبوزومی 18S متعلق به هفت گونه Tigriopus برای مطالعات ترمودینامیکی و ژئومتری مورد بررسی قرار گرفتند. برای انجام آنالیزهای مورد نظر، کل ژنوم گونه‌های *T. iranicus* و *T. raki* با استفاده از Chelex استخراج شد. سپس با استفاده از پرایمر مناسب ژن ریبوزومی 18S، توالی مورد نظر در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکثیر گردید و به شرکت ماکروژن جهت توالی یابی ارسال گردید. علاوه‌براین، توالی ژنی 18S گونه‌های *T. fulvus*، *T. kingsejongensis*، *T. calfornicus*، *T. brevicornis* و *T. japonicus* نیز از بانک ژنی انتخاب و در آنالیزها مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). با استفاده از نرم‌افزار BioEdit 7.0.5 ویرایش و همتراز کردن هفت توالی به منظور انتخاب ناحیه ژنی مورد نظر جهت آنالیزهای ژئومتری و تعیین میزانی پایداری دمایی صورت گرفت. همتراز کردن توالی‌ها بدین منظور انجام شد تا بتوان توالی مربوط به ناحیه یکسانی را در همه ژن‌های 18S انتخاب نمود.
توالی به طول ۶۰ نوکئوتید از قطعه ژنی 18S جهت بررسی میزان پایداری و شباهت انتخاب و آنالیز شد. محاسبات کوانتومی با استفاده از روش کوانتومی MM-UFF در نرم‌افزار ArgusLab صورت گرفت. در این محاسبات بهینه سازی ژئومتری تمام توالی‌ها نوکلئوتیدی انجام شد. علاوه‌براین، پایداری انرژی توالی‌های انتخاب شده نیز محاسبه گردید.

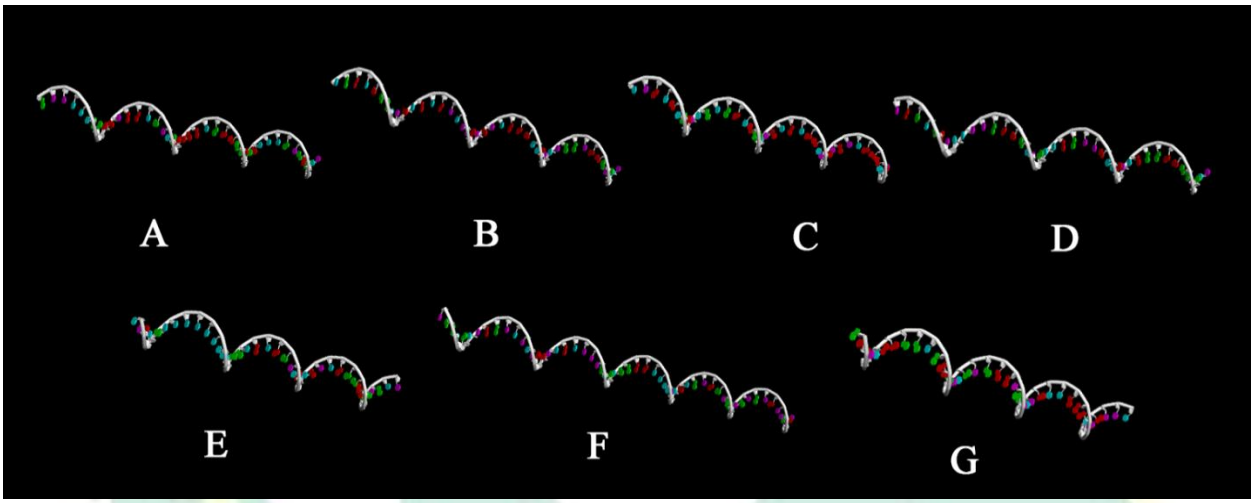
۳. نتایج و بحث

ساختار DNA و خواص جفت بازهای مکمل آن موجب می‌شود که یک مولکول زیستی جذاب برای مطالعات مختلف باشد. پیش‌بینی محاسباتی پایداری دمایی برای توالی از ژن ریبوزومی 18S به طول ۶۰ نوکلئوتید با استفاده از روش کوانتومی MM-UFF صورت گرفت. نتایج به دست آمده (جدول ۱) نشان داد که پایداری انرژی توالی نوکلئوتیدی انتخاب شده ژن ریبوزومی 18S در گونه‌های مختلف جنس *Tigriopus* به میزان زیادی مشابه یکدیگر است. علاوه‌براین، ساختار توالی نوکلئوتیدهای انتخاب شده نیز ترسیم شده است (شکل ۱).

جدول ۱: پایداری انرژی محاسبه شده برای توالی ۶۰ نوکلئوتیدی ژن 18S در گونه‌های جنس Tigriopus

نام علمی تاکسون	محدوده پراکنش گونه	کد بانک ژنی	انرژی (Kcal/mol)
Tigriopus fulvus	Mediterranean Sea	EU370430.1	-12407.03
Tigriopus raki	New Zealand	-	-127756.83
Tigriopus iranicus	Oman Sea	-	-12554.71
Tigriopus kingsejongensis	Antarctica	EU520441.1	-11989.84
Tigriopus californicus	California Gulf	AY588138.1	-12700.14

Tigriopus brevicornis	North Atlantic	AM083338.1	-12929.30
Tigriopus japonicus	Japan	EU057579.1	-12.472.29



شکل ۱: ساختار توالی ۶۰ نوکلئوتیدی ژن ریبوزومی 18S گونه‌های جنس Tigriopus: A: *T. brevicornis*؛ B: *T. californicus*؛ C: *T. fulvus*؛ D: *T. japonicus*؛ E: *T. kingsejongensis*؛ F: *T. raki*؛ G: *T. iranicus*. (رنگ‌ها به ترتیب نشانگر بازهای : آبی: C؛ قرمز: T؛ سبز: A؛ بنفش: G).

پیش‌بینی محاسباتی پایداری ترمودینامیکی مجموعه اسیدهای نوکلئیک، آنالوگ و مشتقات آن‌ها چشم انداز گسترده‌ای را برای انواع فناوری‌ها، کابردها و ابزارها در مهندسی و علوم پایه باز می‌کند. روش‌های شناخته شده تا به امروز، از جمله متداولترین روش‌های مورد استفاده رویکرد نزدیکترین همسایه (Nearest neighbor approach)، پیش‌بینی‌های دقیقی از پارامترهای ترمودینامیکی را فراهم کرده‌اند. به علاوه، مطالعاتی در زمینه ترمودینامیک و انژری پایداری DNA صورت گرفته است که تخمین میزان انرژی آزاد DNA دو رشته‌ای هیبریدی در آزمایشات ریزآرایه‌ها و پایداری ترمودینامیکی تکرارهای کوتاه پالیندرومی با فاصله منظم خوشه‌ای (Lossada et al., 2021) را محاسبه نموده‌اند. همچنین، در یک رویکرد شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پایداری دمایی دوپلکس‌های اولیگونوکلئوتیدی محاسبه شده است. در این مطالعه نتایج به دست آمده نشان داد که شبیه‌سازی دینامیک مولکولی امکان محاسبه پایداری دمایی کمپلکس DNA/DNA را به خوبی فراهم می‌کند (Lomzov et al., 2015).

میزان پایداری دمایی نسبتاً یکسان محاسبه شده توالی ۶۰ نوکلئوتیدی ژن 18S در گونه‌های جنس Tigriopus، علی‌رغم تفاوت قابل ملاحظه در شرایط اکولوژیکی زیستگاهی گونه‌های مختلف نشان دهنده میزان بالای شباهت این توالی نوکلئوتیدی و حفاظت این ژن در طی تکامل می‌باشد.

۴. نتیجه‌گیری

امروزه اصـــول فیزیکی و تئوری محاســـبات هیبریدی فوق ســـریعی را خلق کردند که روز به روز جالب‌تر می‌شـــوند. همچنین پیشـرفت‌های اخیر در زمینه سـخت‌افزاری کامپیوترها و پیشـرفت در شـبیه‌سـازی‌های کامپیوتری، روش‌های محاسـباتی دینامیک و

مکانیک مولکولی به طور روزافزون برای شبیه‌سازی ویژگی‌های پلیمرهای زیستی توسط شبیه‌سازی کامپیوتری سیلیکون (insilico) به کار می‌رود.

منابع

66. Burton RS., Metz EC., Flowers JM. and Willett CS. 2005. Unusual structure of ribosomal DNA in the copepod Tigriopus californicus: intergenic spacer sequences lack internal subrepeats. Gene. 344: 105-113.
67. Gatenby RA. And Frieden BR. 2008. The role of non-genomic information in maintaining thermodynamic stability in living system. Mathematical Bioscience. 2(1): 43-51.
68. Lomzov AA., Vorobjev Yn. And Pyshnyi DV. 2015. Evaluation of the Gibbs free energy changes and melting temperatures by molecular dynamics simulation. The Journal of Physical Chemistry. 119: 15221-15234. DOI: 10.1021/acs.jpcb.5b09645
69. Tulpan D., Andronescu M. and Leger S. 2010. Free energy estimation of short DNA duplex hybridizations. BMC Bioinformatics. 11(105): 1-22.
70. Lossada CA., Fernandez-Marteran FV., Parra MM., Moncayo L., Romero F., Paz JL., Villalobos JV., Perez AE., Portillo E., Alvarado YJ. And Gonzalez-Paz LA. 2021. Biological significance of the thermodynamic stability of CRISPER structure associated with unconventional functions. Biointerface Research in Applied Chemistry. 11(3): 10381-10392.
71. Chen H. and Skylaris CK. 2021.Analysis of DNA interations and GC content with energy decomposition in large-scale quantum mechanical calculations. Physical Chemistry Chemical Physics. 23: 8891-8899.

Phylogenetic relationships of the genus *Tigriopus* Norman, 1869 (Copepoda) using mitochondrial gene Cytochrome C Oxidase I (COI)

Fatemeh Nazari[1]
1-Department of Biology, Faculty of Science, University of Jiroft, Jiroft, Iran

**Corresponding Author Email address: fatemeh.nazari62@ujiroft.ac.ir*

Abstract
The genus *Tigriopus* Norman, 1869, distributed worldwide in coastal splash-pools, has been recognized as a potential model for genetic studies, evolutionary and environmental hypothesis in marine ecosystem. In order to investigate the phylogenetic relationships in the genus we used mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene of available species. The Bayesian analysis of COI revealed that the genus *Tigriopus* is monophyletic. Two main lineages were identified in the consensus tree. *Californicus-japonicus* lineage consist of the species from the North Pacific and in *fulvus-raki* lineage there is species of rook-pools from west Indo-Pacific, the Mediterranean Sea, the North Atlantic and the South Pacific.

Keywords: Rock-pool, Harpacticoida, Crustacea, Bayesian analysis

مطالعه روابط تبارزادی گونه‌های جنس Tigriopus Norman, 1869 (Copepoda) با استفاده از ژن میتوکندریایی COI

فاطمه نظری
استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جیرفت
*ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: fatemeh.nazari62@ujiroft.ac.ir

چکیده
از آنجایی‌که پاروپایان جنس Tigriopus Norman, 1869 در حوضچه‌های صخره‌ای در امتداد سواحل یافت می‌شوند یک مدل بالقوه برای مطالعات ژنتیکی، تکاملی و محیط زیستی در اکوسیستم دریایی هستند. به منظور مطالعه روابط تبارزادی بین گونه‌های جنس Tigriopus از توالی ژن میتوکندریایی سیتوکروم C اکسیداز I (COI) به طول ۶۵۰ جفت نوکلئوتید استفاده شد. توالی‌های ژنی گونه‌های T.californicus، T.fulvus، T. japonicus و T.brevicornis از بانک ژنی به دست آمد و توالی گونه‌هایT. iranicus و T.raki استخراج گردید. تحلیل‌های بیزین این ژن نشان داد که جنس Tigriopus وضعیت تک‌نیایی دارد. دو دودمان اصلی در درخت بیزین مشاهده گردید. کلاد californicus-japonicus شامل گونه‌هایی از محدوده اقیانوس آرام شمالی است و کلاد fulvus-raki که گونه‌های پراکنش یافته در حوضچه‌های صخره‌ای ساحلی از ناحیه هند آرام غربی، دریای مدیترانه، اطلس شمالی و آرام جنوبی را شامل می‌شود.

واژگان کلیدی: حوضچه‌های صخره‌ای، سخت‌پوستان، هارپکتیکوئیدا، تحلیل بیزین

۱. مقدمه

پاروپایان راسته Harpacticoida، یکی از فراوان‌ترین تاکسون‌های مایوفون‌های دریایی هستند (Giere, 2009). برخلاف اکثر گروه‌های ماکروبنتوز، هارپکتیکوئیدها اغلب اوقات در نواحی بنتیک ساکن هستند و فاز پراکنش پلاژیک ندارند. بیشتر پاروپایان راسته Harpacticoida، همانند بیشتر گونه‌های بنتیک، توزیع گسترده یا حتی جهان شمول دارند (Chertoprud et al., 2010).
گونه‌های جنس Tigriopus Norman, 1869 از سخت‌پوستان پاروپایای آزادزی هستند که در حوضچه‌های صخره‌ای سواحل دریایی در سرتاسر دنیا پراکنش دارند. حوضچه‌های صخره‌ای، محیط‌های به شدت متغییر هستند و تغییرات شیمیایی و فیزیکی زیادی را نشان می‌دهند. گونه‌های جنس Tigriopus در محدوده اقلیمی از استوا تا قطب مشاهده می‌شوند. گونه‌های این جنس به عنوان یک مدل مناسب برای مطالعات ژنتیک جمعیت (Burton et al., 2005)، فیزیولوژی (Seo et al., 2006)، اکوتوکسیکولوژی (Leung, 2005)، ژنومیک (Lee et al., 2005) و توکسیکوژنومیک استفاده شده‌اند (Seo et al., 2006). این پاروپایان به راحتی در آزمایشگاه قابل پرورش هستند (Kim et al., 2003). تاکنون، ۱۶ گونه از جنس Tigriopus از سواحل صخره‌ای در سرتاسر دنیا

گزارش شده است اما در مناطق توزیع گونه‌ها هم‌پوشانی مشاهده نمی‌شود (Nazari et al., 2021). با این حال، ابهام قابل توجهی در تشخیص بین گونه‌های مختلف و یا جمعیت‌های یک گونه وجود دارد (Jung et al., 2006).

آگاهی در مورد توالی‌های ژنی موجودات زنده محور دامنه وسیعی از پژوهش‌های زیستی مانند مطالعات پراکنش گونه، مدیریت حفاظت، زیست‌شناسی تهاجم و توضیح تاریخ تکاملی می‌باشد (Wood et al., 2017). در سال‌های اخیر کاربرد روش‌های مولکولی انقلابی را در شناسایی و طبقه‌بندی تاکسون‌های مختلف ایجاد کرده است. در بیشتر جانوران DNA میتوکندریایی (mtDNA) به علت داشتن ویژگی‌های خاصی از قبیل وراثت مادری، وجود تعداد زیادی از کپی آن در درون میتوکندری، عدم وجود اینترون، نرخ بالای جایگزینی بازها و عدم امکان وقوع نوترکیبی به عنوان یک ماکرومولکول مناسب برای شناسایی گونه‌های مختلف می‌باشد (Raupach et al., 2015).

۲. مواد و روش‌ها

۱۱ توالی ژن COI متعلق به شش گونه از جنس Tigriopus آنالیز شدند. DNA جهت تکثیر ژن میتوکندریایی سیتوکروم c اکسیداز زیرواحد ۱ (COI) گونه‌های *T.* iranicus و *T.* raki از نمونه‌های تثبیت شده در الکل ۹۹٪ استخراج شد. نمونه‌های *T.* raki جهت استخراج DNA از طریق Dr. Janet Bradford از نیوزیلند تأمین گردید. *T.* iranicus نیز از محل پراکنش آن در سواحل دریای عمان نمونه برداری شد. برای استخراج DNA به ویال حاوی نمونه کامل ۲۵ میکرولیتر (InstaGene Matrix, Bio-Red) Chelex اضافه شد و نمونه‌ها در دستگاه سایکلر در دمای ۵۶ درجه به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۹۹ درجه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند (Estoup et al., 1996). سپس DNA استخراج شده از نمونه‌ها جهت انجام PCR به ویال‌های جدید منتقل شدند. با استفاده از پرایمر مناسب ژن COI (COI-COX) این قطعه ژنی تکثیر گردید. بعد از توالی‌یابی، قطعات ژنی تکثیر شده با استفاده از نرم‌افزار Geneious 9.0.5 ویرایش و همتراز کردن توالی‌ها انجام شد. سپس از تحلیل بیزین در نرم‌افزار MrBayes v3.1.2 (Ronquist et al., 2012) برای ترسیم درخت‌های تبارزادی استفاده شد. برای ارزیابی میزان تأیید گره‌های درخت تبارزادی بیزین از معیار Bayesian Posterior Probability (BPP) استفاده شد. کلادهای با احتمال پسین بیشتر یا مساوی ۹۵٪ (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) برای درخت بیزین به عنوان کلادهای تأیید شده انتخاب شدند. توالی ژن سایر گونه‌ها نیز از بانک ژنی استخراج گردید (جدول ۱).

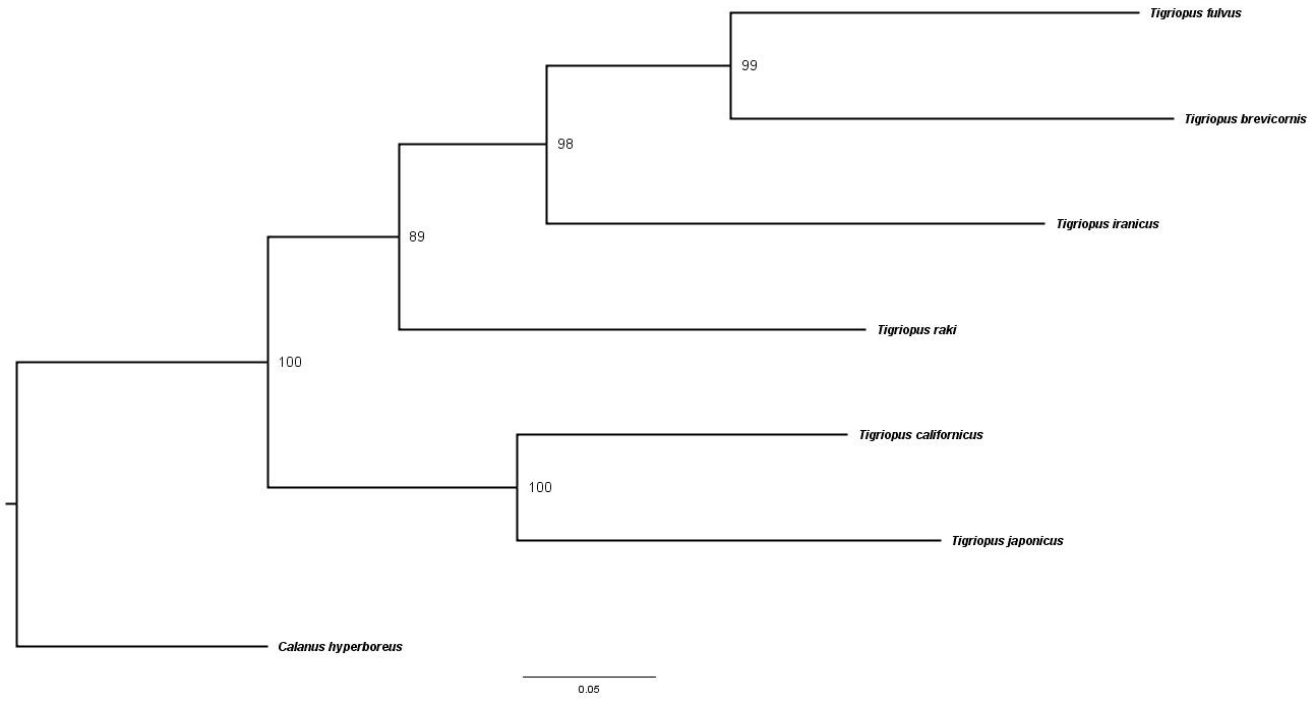
جدول ۱: گونه‌های جنس Tigriopus و کدهای بانک ژنی برای هر گونه

نام تاکسون	کد بانک ژنی	محدوده پراکنش
Tigriopus brevicornis	MK211364.1	اطلس شمالی
Tigriopus californicus	AF096974.1 AF096949.1	خلیج کالیفرنیا
Tigriopus fulvus	MK211347.1	دریای مدیترانه
Tigriopus japonicus	KY290509.1 AF096937.2	سواحل کره جنوبی و ژاپن
Tigriopus iranicus	-	خلیج فارس و دریای عمان
Tigriopus raki	-	نیوزیلند
Calanus hyperboreus	MG320041.1	-

۳. نتایج و بحث

برای بازسازی روابط تبارزدای گونه‌های جنس Tigriopus از توالی ژن میتوکندریایی COI موجود در بانک ژنی و گونه‌های در دسترس استفاده شد. درخت تبارزادی گونه‌های جنس Tigriopus با استفاده از نرم‌افزار MrBayes برای توالی نوکلئوتیدی ۶۵۰ جفت بازی گونه‌های مورد نظر ترسیم شد. گونه Calanus hyperboreus به عنوان outgroup درتحلیل تبارزادی در نظر گرفته شد و برای ریشه‌دار کردن درخت از آن استفاده گردید. در تحلیل‌های بیزین ۲۵٪ اول درخت‌ها به عنوان burn-in کنار گذاشته شدند.

نتایج تحلیل بیزین تک‌نیایی جنس Tigriopus را با احتمال پسینی ۱۰۰٪ تأیید کرد (شکل ۱). به علاوه، دو کلاد اصلی درون جنس Tigriopus با احتمال پسین ۱۰۰٪ مشخص شده است که شامل ۱) کلاد fulvus-raki است که در سواحل صخره‌ای محدوده هند-آرام غربی (T. iranicus) ، آرام جنوبی (T. raki) ، دریای مدیترانه (T. fulvus) و اقیانوس اطلس شمالی (T. brevicornis) پراکنش دارند؛)۲کلاد californicus-japonicus که در محدوده آرام شمالی توزیع یافته است.



شکل ۱:درخت بیزین گونه‌های جنس Tigriopus براساس بهترین گروه‌بندی ۶۵۰ جفت باز COI، مقادیر احتمال پسین بیشتر از ۸۰٪ برای هر گروه آورده شده است.

اولین انشعاب گونه T. japonicus را جدا می‌کند. براساس نتایج منتشر نشده (Nazari and Gómez) مطالعه بیوجغرافی و کلادیستی صفات ریخت‌شناسی منشأ پیدایش جنس جایی در محدوده پراکنش کنونی این گونه تعیین شده است. علاوه‌براین، در مطالعه‌ای روابط تبارزادی چهار گونه از این جنس با استفاده از ژنوم کامل میتوکندریایی و با استفاده از روش تحلیل حداکثر احتمال (Maximum Likelihood) بررسی شده است. در درخت ML حاصل، دو گونه T. fulvus و T. brevicornis در یک گروه و T. californicus با T. japonicus نیز در کنار هم در یک انشعاب قرار گرفته‌اند (Jung et al., 2006). در مطالعه حال حاضر که نسبت به مطالعات قبلی از توالی‌های COI تعداد گونه‌های بیشتری جهت بررسی روابط تبارزادی جنس Tigriopus استفاده شده است و

می‌توان گفت که تاکنون کاملترین مطالعه در این زمینه می‌باشد. همچنین، در درخت بیزین گونه‌های *T.* fulvus و T. brevicornis و گونه‌های T. japonicus و T. californicus با هم گروه‌بندی شده‌اند. بنابراین، نتایج حاصل از تحلیل بیزین در این مطالعه با نتایج مطالعات قبلی در زمینه روابط تبارزادی بین گونه‌ها براساس داده‌های مولکولی و ریخت‌شناسی مطابقت دارد. زمانی می‌توان روابط بین گونه‌ای و مطالعات تبارزادی را با دقت و صحت بیشتری بررسی کرد که توالی‌های ژنی تمامی گونه‌ها در دسترس باشد.

۴. نتیجه‌گیری

در این مطالعه، براساس توالی ژن میتوکندریایی ۶۵۰ نوکلئوتیدی روابط تبارزادی بین گونه‌های جنس Tigriopus نشان داده شد. زمانی بود که گونه‌زایی به عنوان یک مخاطره در مسیری محسوب می‌شد که فیلوژنی در آن به علت طبیعت همزاد دودمان‌ها گام برنمی‌داشت. اما امروزه به علت استفاده از مارکرهای میتوکندریایی به علت وراثت مادری این خط سیر نقض شده است. DNA میتوکندریایی با وراثت مادری، ساختار ساده، سازماندهی حفاظتی، اندازه ژنوم کوچک و نرخ جهش بالا شناخته می‌شود. با توسعه تکنولوژی توالی‌یابی ژن‌ها، توالی‌های ژنی میتوکندری نیز به طور وسیع در بازسازی روابط تبارزادی، ژنتیک جمعیت، ژنومیکس تکاملی و مقایسه‌ای به کار می‌رود.

منابع

11. Chertoprud ES., Garlitska LA. and Azovsky AI. 2010. Large-scale patterns in marine harpacticoid (Crustacea, Copepoda) diversity and distribution. Marine Biodiversity. 40: 301-315.
12. Giere O. 2009. Meibenthology: The microscopes motile fauna of aquatic sediments. Springer, Berline/Heidelberg.
13. Wood LE., Grave SD. And Daniels SR. 2017. Phylogenetic patterning among two codistributed shrimp species (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) reveals high levels of connectivity across biogeographic regions along the South African coast. PlOS one. DOI: 10.1371/journal.pone.0173356.
14. Jung SO., Lee YM., Park TJ., Park HG., Hagiwara A., Leung KMY., Dahms HU., Lee W. and Lee JS. 2006. The complete mitochondrial genome of the intertidal copepod Tigriopus sp. (Copepoda, Harpacticidae) from Korea and phylogenetic considerations. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 333: 251-262.
15. Raupach MJ., Barco A., Steinke D., Beermann J., Laakmann S., Mohrbeck I., Neumann H., Kihara TC., Pointer K., Radulovici A., Segelken-Voigt A., Wesse C. and Kenbelsberger T. 2015. The application of DNA barcodes for the identification of marine crustacean from the North Sea and adjacent regions. POLS one. 10(9): doi: 10.1371/journal.pone.0139421.
16. Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres DL., Darling A., Höhna S., Larget, B., Liu L., Suchard MA. & Huelsenbeck J.P. 2012. Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Systematic Biology, 61, 539–542.
17. Huelsenbeck JP. And Ronquist F. 2001. Mrbayes: Bayesian inference of phylogenetic tree. Bioinformatics. 17: 754-755.
18. Estoup A., Largiader CR., Perrot E. and Chourrout D. 1996. Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. Molecular Marine Biology. Biotechnology. 5 (4): 295-298.

The Role of Chronic Stress and the Excess Levels of Glucocorticoids in Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease

Mahnaz Ghowsi[1*]; Farshad Qalekhani[2]

1- Assistant professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran
2- Pharmaceutical Sciences Research Center, Health Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

** Ghowsi.Mahnaz@gmail.com; Ghaousi.mahnaz@razi.ac.ir*

Abstract

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease that has negative effects on the health and social ability of people with Alzheimer's disease. Some studies suggest that chronic stress and the presence of excess glucocorticoids may be important factors in the development of cognitive problems and predicting Alzheimer's disease. In this review study, the scientific sources published in English in Google Scholar and PubMed series from2015to2021were examined by using chronic stress, glucocorticoid, cortisol, memory, Cognitive impairment and Alzheimer's disease keywords. The chronic stress and long-term exposure to glucocorticoids can inhibit long term potentiation (LTP) through synaptic plasticity disruption and may be important factors in the development of Alzheimer's disease. Therapies that target the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) may be a suitable target for the production of anti-dementia drugs and slow the progression of Alzheimer's diseases.

Keywords: Chronic stress, Cortisol, Memory, Alzheimer's disease, Cognitive impairment

نقش استرس مزمن و مقادیر اضافی گلوکوکورتیکوئیدها در ایجاد آسیب شناختی و بیماری آلزایمر

مهناز قوسی[۱*]؛ فرشاد قلعه‌خانی[۲]

۱- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی

۲-پژوهشگر مرکز تحقیقات علوم دارویی مؤسسه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

Ghowsi.Mahnaz@gmail.com; Ghaousi.mahnaz@razi.ac.ir

چکیده

بیماری آلزایمر یک بیماری نورودژنراتیو است که اثرات منفی بر سلامت و توانایی اجتماعی افراد مبتلا به این بیماری دارد. برخی مطالعات حاکی از آن است که استرس مزمن و حضور مقادیر اضافی گلوکوکورتیکوئیدها ممکن است فاکتورهای مهمی در ایجاد مشکلات شناختی و پیش بینی ابتلا به بیماری آلزایمر باشند. مطالعه مروری حاضر به جمع‌آوری شواهدی پرداخته که نشان می‌دهند استرس مزمن و گلوکوکورتیکوئیدها در ایجاد آسیب‌های شناختی و بیماری آلزایمر نقش دارند. در این مطالعه مروری، مقالات علمی چاپ شده با زبان انگلیسی در مجموعه‌های Google scholar و PubMed از سال ۲۰۱۵ تا ۲۰۲۱ با استفاده از کلمات کلیدی استرس مزمن، گلوکوکورتیکوئید، کورتیزول، حافظه، آسیب شناختی و بیماری آلزایمر بررسی گردید. نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهند که استرس مزمن و قرارگیری طولانی-مدت در معرض گلوکورتیکوئیدها می‌توانند از طریق تخریب پلاستیسیتی سیناپسی موجب مهار تقویت طولانی مدت (LTP) شده و ممکن است فاکتورهای مهمی برای ابتلا به بیماری آلزایمر باشند و استراتژی‌های درمانی که محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال (HPA) را مورد هدف قرار می‌دهند ممکن است است یک هدف مناسب برای تولید داروهای ضد زوال عقل و کاهش سرعت پیشرفت بیماری آلزایمر باشند.

واژگان کلیدی: استرس مزمن، کورتیزول، حافظه، بیماری آلزایمر

۱.مقدمه

با افزایش امید به زندگی در جهان، شیوع بیماری¬های نورودژنراتیو نیز رو به افزایش است (De Nicola et al., 2020). بیماری آلزایمر (AD)[۳۴۲] یکی از اصلی ترین بیماری های نورودژنراتیو در جهان است. این بیماری بوسیله آسیب پیشرونده عملکرد شناختی که با از

[342] Alzheimer's disease (AD)

بین رفتن سیناپس ها و نورون ها، حضور پلاک های پیری[343] و کلافه های نوروفیبریلی به هم تابیده (NFT)[344] در مغز همراه است، تشخیص داده می¬شود (Mattson, 2004; Selkoe, 2001). بیماری آلزایمر به چندین فرم دیده می¬شود: فرم خانوادگی و فرم اسپورادیک. فرم خانوادگی آن بدلیل جهش در ژن¬های خاص ایجاد می¬شود و اغلب به ایجاد تغییرات در پپتیدهای آمیلوئید بتا (Aβ)[345] مربوط است اما، در ایجاد فرم اسپورادیک، علاوه بر آمیلوئید، فاکتورهای دیگری نیز نقش دارند (Colom-Cadena et al., 2020).

در مغز افراد دچار بیماری آلزایمر، پپتیدهای Aβ در تشکیل تجمعات خارج سلولی نامحلول در مغز، شرکت دارند. هم چنین در مغز این افراد فسفریلاسیون بیش از حد یا غیرطبیعی یک پروتئین پایدار کننده میکروتوبول بنام Tau در داخل سلول¬ها موجب ایجاد NFT می¬شود (Mattson, 2004; Selkoe, 2001). در هیپوکامپ، آسیب¬های سیناپسی مهم¬ترین دلیل آسیب حافظه و یادگیری است و مکانیسم¬های پاتوژنیک Tau در ایجاد چنین آسیب¬های سیناپسی و شناختی دخالت دارند (Sotiropoulos et al., 2019). فعالسازی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال (HPA)[346] یک سیستم سازشی حیاتی برای افزایش احتمال بقا در مواجهه با چالش¬های فیزیکی و شیمیایی است. محصول نهایی اصلی این محور، هورمون¬های گلوکوکورتیکوئیدی است که بر ارگان¬های مختلفی نظیر مغز اثر می¬گذارند تا تعادل هومئوستاتیک را حفظ کنند. اگرچه وجود گلوکوکورتیکوئیدها در کوتاه مدت برای بقا ضروری است اما در معرض طولانی مدت آنها بودن می¬تواند موجب اختلال عملکرد ایمنی، متابولیکی و روانشناختی شود. استرس مزمن موجب افزایش چشمگیر تون پایه محور HPA و واکنش¬پذیری به استرس می¬شود. بنابراین، مشاهده این تغییرات با وجود استراحت زیاد یا ترشح تجمعی گلوکوکورتیکوئید، نشان می¬دهد که مکانیسم¬هایی برای دور زدن مهار بازخورد منفی سیستم HPA وجود دارد. نتیجه خالص، ترشح بیش از حد گلوکوکورتیکوئید پایه، هیپرتروفی آدرنال و/یا آتروفی تیموس، افزایش در تون مرکزی محورHPA (به عنوان مثال، افزایش هورمون آزاد کننده کورتیکوتروپین (CRH) و سنتز وازوپرسین)، کاهش بیان گیرنده¬های گلوکوکورتیکوئیدی در مناطق فیدبکی کلیدی، تسهیل پاسخ¬های کورتیکواستروئیدی به عوامل استرس¬زای جدید، کاهش در اثربخشی بازخورد منفی گلوکوکورتیکوئید، و تغییرات رفتاری شبیه افسردگی است. همه این پیامدها می¬توانند با تغییراتی که در مسیرهای مرکزی مسئول تنظیم محور HPA بر اثر استرس القا شده¬اند، ارتباط داشته باشند که از جمله این مسیرها، مسیرهای میانجی¬گر واکنش¬های پیش بینی استرس است. مدار عصبی مسئول برای گذار به حالت استرس مزمن هنوز به وضوح مشخص نشده است (Jankord and Herman, 2008). این درحالی است که گلوکوکورتیکوئیدها در چندین پاسخ تحریک شده توسط محرک¬های فیزیولوژیکی و محیطی مختلف دخالت دارند و گلوکوکورتیکوئیدهای سنتتیک برای سرکوب آلرژی، التهاب و اختلالات ایمنی استفاده می¬شوند (Rodriguez et al., 2016).

یک ویژگی بیشتر بیماری¬های نورودژنراتیو فعالیت بیش از حد گلوکوکورتیکوئیدها به دلیل فعالسازی بیش از حد محور HPA، هیپرکورتیزولمی و گسترش ریتم سیرکادین کورتیزول است (De Nicola et al., 2020). در بیماری¬های استرس مزمن اختلال در تنظیم طبیعی محور HPA دیده می¬شود و سطح کورتیزول بالاست (Perrin et al., 2019). مطالعات نشان می¬دهند که افزایش سطح کورتیزول ممکن است اثرات مخربی بر شناخت داشته و در پاتولوژی AD نقش داشته باشد (Ouanes and Popp, 2019). شواهد مختلف نشان می¬دهند که در مراحل اولیه AD سطح پایه کوتیزول در گردش اغلب بالاست (Elgh et al., 2006) و استرس

[343] Senile plaques
[344] Neurofibrillary tangle (NFT)
[345] Amyloid-β (Aβ)
[346] Hypothalamo-pituitary-adrenocortical (HPA)

مزمن و اختلالات مرتبط با استرس، احتمال ایجاد آلزایمر را بالا می¬برند (Querfurth and LaFerla, 2010). مطالعه مروری حاضر به مطالعه تأثیر استرس مزمن و گلوکورتیکوئیدها در ایجاد آسیب¬های شناختی و بیماری آلزایمر می¬پردازد.

۲.مواد و روش‌ها

در این مطالعه مروری، نویسندگان با استفاده از کلمات کلیدی استرس مزمن، گلوکوکورتیکوئید، کورتیزول، حافظه، آسیب شناختی، و بیماری آلزایمر، منابع الکترونیکی را جستجو و بررسی کردند که توسط محققین مختلف در مجموعه‌های Google و PubMed از آغاز سال ۲۰۱۵ تا دسامبر ۲۰۲۱ با زبان انگلیسی چاپ شده بودند.

۳.نتایج و بحث

۳-۱-نقش گیرنده¬های گلوکوکورتیکوئیدی در یادگیری و شناخت

گیرنده های گلوکوکورتیکوئیدی در نورون ها و سلول های گلیالی نظیر آستروسیت ها، میکروگلی و الیگودندروسیت ها دیده می شوند (Sierra et al., 2008). مطالعات نشان می دهند که گیرنده های گلوکوکورتیکوئیدی برای بسیاری از عملکردهای سیستم اعصاب مرکزی از جمله حافظه و یادگیری ضروری هستند (Roozendaal, 2000).

گلوکوکورتیکوئیدها میل ترکیبی بالایی برای گیرنده های مینرالوکورتیکوئیدی دارند و در چندین ساختار مغزی سیستم لیمبیک نظیر هیپوکامپ، قشر پره فرونتال و آمیگدال حضور دارند. گیرنده های گلوکوکورتیکوئیدی در عملکرد های شناختی دخیل هستند اما گیرنده های مینرالوکورتیکوئید در هیپوکامپ قرار دارند (Jankord and Herman, 2008). در طول استرس، فعال شدن گیرنده های مینرالوکورتیکوئیدی در ناحیه limbic-frontocortical مغز با افزایش تحریک¬پذیری موجب ایجاد یادگیری می شود (De Kloet et al., 2018)شواهد گوناگون نشان می دهند که گیرنده های گلوکوکورتیکوئیدی فعال شده با استروئیدها از طریق فیدبک منفی اثر مهاری روی هیپوکامپ دارند. فعالسازی گیرنده های گلوکوکورتیکوئیدی ریکاوری از استرس را تسهیل کرده و برانگیختگی انگیزشی و ذخیره حافظه را افزایش می دهد. بنابراین گیرنده های مینرالوکورتیکوئیدی و گیرنده های گلوکوکورتیکوئیدی در یک الگوی تکمیل کننده یکدیگر جنبه های مختلف حافظه، یادگیری و سازش رفتاری را تعدیل می کنند (De Kloet et al., 2018; de Kloet, 2014).

۳-۲.ارتباط استرس مزمن و مصرف گلوکورتیکوئیدها با ایجاد آسیب¬های شناختی و بیماری آلزایمر

مطالعات حاکی از آن است که کورتیزول می تواند براحتی از سد خونی مغزی عبور کند (Wolkowitz et al., 2009) و به گیرنده-های خود در نواحی درگیر در عملکردهای شناختی متصل شود و با ایجاد تغییرات ساختاری موجب ایجاد اثرات حاد و درازمدتی در مغز شود (Geerlings et al., 2015). غلظت کورتیزول در مایع مغزی نخاعی در افراد مبتلا به دمانس، آسیب شناختی متوسط و آلزایمر بالاتر از افراد سالم است و نشان داده شده که میزان کورتیزول در مراحل اولیه AD افزایش یافته است (Notarianni, 2017). نتایج یک مطالعه توسط Ennis و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان داد که با سنجش کورتیزول در درازمدت می توان خطر آلزایمر را پیش بینی نمود (Ennis et al., 2017). یک مطالعه دیگر توسط Notarianni و همکاران (۲۰۱۷) نشان داد که کورتیزول، رابط بین بیماری آلزایمر و دیابت ملیتوس است. هم چنین نشان داده شده که سطوح کورتیزول با شدت آسیب شناختی هم بستگی دارد (Notarianni, 2017; Zvěřová et al., 2013).

یک مطالعه دیگر نشان داد که میزان کورتیزول پلاسما یکی از بیومارکرهای اصلی است که امکان پیش بینی دقیق پیشرفت آسیب شناختی متوسط تا AD را فراهم می کند (Lehallier et al., 2016). در افراد بالغ پیری که از نظر شناختی سالم بودند اما تصویربرداری PETآنها از نظر وجود Aβ مثبت بود، سطوح بالای کورتیزول با کاهش سریعتر در شناخت کلی، حافظه ضمنی، و عملکرد اجرایی به طور مستقل از سن، جنس یا علائم اضطرابی همراه بود (Pietrzak et al., 2017). در یک مطالعه توسط Albanese و همکاران (۲۰۱۸) میزان کورتیزول صبحگاهی ۳۰ دقیقه پس از بیداری اندازه¬گیری شد و نتایج نشان داد که میزان بالاتر آن تا حدودی با کاهش شناخت کلی همراه است (Albanese et al., 2018).

یک مطالعه دیگر نشان داد که تیمار مزمن رت ها با کورتیکواسترون در آب به مدت ۴ هفته موجب القاء مسیرهای آمیلوئیدوژنیک در هیپوکامپ و آسیب به کلیرانس Aβ شد و نیز بیان آنزیم های اصلی درگیر در فعال سازی گلوکوکورتیکوئید و فسفریلاسیون Tau را افزایش داد و نشان داد که مصرف مزمن کورتیکواسترون یک ریسک فاکتور اصلی برای بیماری آلزایمر است و نویسندگان پیشنهاد کردند که درمان¬های بر پایه گلوکورتیکوئید در افراد با خطر آلزایمر با احتیاط صورت گیرد (Canet et al., 2021).

در بیماری AD اختلال در تنظیم محور HPA با افزایش میزان گلوکوکورتیکوئیدها (کورتیزول در انسان و کورتیکواسترون در جوندگان) در خون و مایع مغزی نخاعی همراه است (Csernansky et al., 2006; Hoogendijk et al., 2006). با این توصیف، استرس مزمن ممکن است بر پلاستیسیتی ساختاری در هیپوکامپ و قشر پره فرونتال اثر بگذارد و در نتیجه موجب آسیب شناختی شود. علاوه براین، ممکن است اختلالات استرسی موجب تغییر آمیگدال شوند (Vyas et al., 2004). در معرض بیش از حد گلوکوکورتیکوئیدها قرار داشتن و یا تغییر عملکرد گیرنده های گلوکوکورتیکوئیدی ممکن است باعث مسمومیت و تخریب ساختارهای سیستم لیمبیک نظیر هیپوکامپ، قشر پره فرونتال یا آمیگدال شود و بنابراین در ایجاد آسیب شناختی مشارکت کند (McEwen, 2008). ترشح بیش از حد گلوکوکورتیکوئیدها بر ساختار، عملکرد و پلاستیسیتی سیناپس ها در هیپوکامپ اثر می گذارد زیرا استرس های مداوم موجب آتروفی دندریت¬ها در ناحیه CA3 شده و نورون زایی در نورون های شکنج دندانه ای[۳۴۷] را سرکوب می کند (Vyas et al., 2002).

الیگومرهای محلول Aβ در تخریب پلاستیسیتی سیناپسی دخالت دارند و اخیراً نشان داده شده که مهار حاد تقویت طولانی مدت [348] (LTP) در هیپوکامپ به فعالسازی گیرنده های گلوکوکورتیکوئیدی بستگی دارد (Kootar et al., 2018; Li and Selkoe, 2020). نقایص سیناپسی القا شده با Aβ بوسیله وضعیت گلوکوکورتیکوئیدها تنظیم می¬شود و در معرض طولانی مدت کورتیکواستروئیدها بودن می¬تواند از بین رفتن سیناپس ها بر اثر آمیلوئیدها را تشدید کند (Qi et al., 2021).

با توجه به این شواهد بدست آمده درباره اثر استرس و کورتیزول بر پلاستیسیتی سیناپسی، مقاومت به گلوکوکورتیکوئید می¬تواند تا حدودی موجب کاهش شناخت در افراد دچار استرس مزمن شود و خطر ابتلا به AD را افزایش دهد. در این راستا نشان داده شده که بی نظمی محور HPA همراه باAD، شایع¬ترین اختلال نوروآندوکرینی در اختلالات مرتبط با استرس است به طوری که بی نظمی محور HPA یک مرحله مقدماتی و یک فاکتور اصلی در ایجاد AD است که حتی می¬تواند یک فاکتور محرک برای ایجاد AD باشد (Ishijima et al., 2018).به علاوه، بالابودن استروئیدها در سیستم عصبی مرکزی اثرات مخربی دارد. برای مثال بالا بودن طولانی مدت گلوکوکورتیکوئیدها یک سیگنال خطر است زیرا موجب می¬شود که میکروگلی¬ها از طریق افزایش TNF-α اینترلوکین¬ها و NLRP3 inflammasome به LPS پاسخ دهند (Frank et al., 2019). یک مطالعه در مدل OAβ25-35 که یک مدل برای آلزایمر حاد است، تجویز یک آنتاگونیست غیرانتخابی گیرنده¬های گلوکوکورتیکوئیدی موجب بهبود نقایص شناختی را بهبود داد (Pineau).

[347] Dendate gyrus
[348] Long-term potentiation (LTP)

(et al., 2016حتی دیده شده که آگونیست سنتتیک دگزامتازون فعالسازی و تکثیر میکروگلیا در نواحی CA1 و CA3 هیپوکامپ موش¬های 3xTg-AD مدل آلزایمر را افزایش می¬دهد و موجب کاهش تراکم خارها[۳۴۹] و تغییرات رفتاری می¬شود (Pedrazzoli et al., 2019).

علی¬رغم آنکه گلوکوکورتیکوئیدها اثر ضدالتهابی دارند اما مقادیر اضافی گلوکوکورتیکوئیدها موجب فعالسازی NLPR1 inflammasome القاء و فعالیت بیش حد نوروترانسمیشن گلوتامات ارژیک می¬شود (Sorrells et al., 2014). نورودژنریشن، التهاب نورونی، استرس و سمیت تحریکی یک پیش زمینه پاتولوژیکی را بوجود می¬آورند که در آن گلوکوکورتیکوئیدها یک وضعیت پیش التهابی را ایجاد می¬کنند (Duque and Munhoz, 2016).

علاوه بر این، در معرض بیش از حد گلوکوکورتیکوئیدها بودن موجب کاهش بیان گیرنده¬های گلوکوکورتیکوئیدی می¬شود که باعث فعالیت بیش اندازه نسبی گیرنده‌های مینرالوکورتیکوئیدی می¬شود (De Nicola et al., 2020). در اکثر بیماران AD و دچار زوال عقل، تجویز گلوکوکورتیکوئید سنتتیک دگزامتازون موجب سرکوب کورتیزول درون زاد نمی¬شود که نشان دهنده آن است که افزایش در معرض گلوکوکورتیکوئیدها بودن می-تواند به طور مستقیم موجب راه اندازی پردازش آمیلوئیدوژنیک APP شده و ممکن است به جامعیت سد خونی مغزی آسیب برساند و بر پاسخ نوروایمنی اثر بگذارد. در نتیجه این امر توانایی کلیرانس Aβ در مغز را کاهش داده و در نتیجه تجمع Aβ در مغز افزایش می-یابد (Lesuis et al., 2018). در اغلب بیماران مبتلا به آلزایمر علائم اختلال افسردگی ماژور دیده می¬شود که بیماری است که خطر بیماری آلزایمر را دوبرابر افزایش می¬دهد (Cherbuin et al., 2015). به نظر می¬رسد که مکانیسم¬های مربوط به گلوکوکورتیکوئیدها واسطه مشترک بین این دو بیماری باشد (Qi et al., 2021) زیرا نشان داده شده که مصرف برون زاد کورتیکواستروئیدها در طول چندین هفته موجب ایجاد علائم سندرم¬های افسردگی در جوندگان بالغ می شود و نیز موجب آغاز مشکلات شناختی وابسته به سن در این حیوانات می¬گردد (Sterner and Kalynchuk, 2010).

همانگونه که در بالا اشاره گردید، مصرف درازمدت گلوکوکورتیکوئیدها موجب پاتولوژی سیناپسی و Tau شده و در نتیجه پاتولوژی آمیلوئید را تشدید می¬کند. در این راستا نشان داده شده که مصرف مزمن گلوکوکورتیکوئیدها باعث تسریع ته نشست آمیلوئید و نقایص شناختی در حیوانات مدل آلزایمر خانوادگی می¬گردد (Green et al., 2006). در واقع انسداد گیرنده¬های گلوکوکورتیکوئیدی می¬تواند نقایص سیناپسی و حافظه را برطرف کرده و نیز بار آمیلوئید در موش¬های ترانسژنیک APP را کاهش دهد (Green et al., 2006; Pedrazzoli et al., 2019). مطالعات جدید نشان می¬دهند که ایجاد اختلال در پلاستیسیتی سیناپسی توسط Aβ محلول نیازمند فعالسازی گیرنده¬های گلوکوکورتیکوئیدی است و در برش¬های هیپوکامپ، مهار حاد LTP توسط Aβ به فعالسازی گیرنده گلوکوکورتیکوئیدی بستگی دارد (Kootar et al., 2018) و حتی ممکن است از طریق فعال¬سازی بیش از حد آنزیم¬های glycogen synthase kinase 3β (GSK-3β) و cyclin dependent kinase 5 (Cdk5) بر میزان فسفریلاسیون Tau اثر بگذارند (Canet et al., 2018; Dey et al., 2017; Yi et al., 2017).

۴. نتیجه‌گیری

در کل، شواهد مختلفی ذکر شده در بالا نشان می‌دهند که ممکن است استرس مزمن و در معرض بیش از حد گلوکوکوتیکوئیدها قرار داشتن با تحت تاثیر قرار دادن سیستم Tau، به صورت غیر مستقیم باعث افزایش تولید Aβ شده و نیز از طریق تغییر عملکرد گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی ممکن است باعث آسیب ساختارهای درگیر در حافظه و یادگیری شامل هیپوکامپ، قشر پره فرونتال یا آمیگدال شود و بنابراین موجب ایجاد آسیب‌های شناختی گردد. کورتیکواستروئیدها و Aβ می توانند قویاً با مکانیسم‌های

[349] Spines

پلاستیسیتی سیناپسی در هیپوکامپ تداخل کرده و اثرات مخربی بر LTP داشته باشند. در کل مطالعات حاکی از نقش مرکزی بی نظمی محور HPA در اتیولوژی AD است و نشان می‌دهد که کنترل این محور و گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی ممکن است یک هدف مناسب برای تولید داروهای ضد زوال عقل و کاهش سرعت پیشرفت بیماری آلزایمر باشند.

سپاسگزاری

نویسندگان از گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه رازی بخاطر فرهم آوردن تسهیلات لازم برای انجام این مطالعه تشکر می‌کنند.

منابع

21. Albanese E., Preisig M., Castelao E., Ouanes S. and Popp J .2018. P2-608: Salivary cortisol and 5y change in cognitive function in community dwelling, cognitively healthy older adults: the psycolaus cohort study. Alzheimer's & Dementia 14:P972-P972 .
22. Canet G., Chevallier N., Zussy C., Desrumaux C. and Givalois L. 2018. Central role of glucocorticoid receptors in Alzheimer’s disease and depression. Frontiers in neuroscience, 12: 739.
23. Canet G. Zussy C., Hernandez C., Chevallier N., Marchi N., Desrumaux C.,·Givalois L. 2021. Chronic glucocorticoids consumption triggers and worsens experimental Alzheimer’s disease-like pathology by detrimental immune-modulations [Abstract]. Neuroendocrinology,
24. Cherbuin N., Kim S. and Anstey K.J. 2015. Dementia risk estimates associated with measures of depression: a systematic review and meta-analysis. BMJ open, 5(12): e008853.
25. Colom-Cadena M., Spires-Jones T., Zetterberg H., Blennow K., Caggiano A., DeKosky S.T., Fillit H., Harrison J.E., Schneider L.S. and Scheltens P. 2020. The clinical promise of biomarkers of synapse damage or loss in Alzheimer’s disease. Alzheimer's research & therapy, 12(1): 1-12.
26. Csernansky J.G., Dong H., Fagan A.M., Wang L., Xiong C., Holtzman D.M. and Morris J.C. 2006. Plasma cortisol and progression of dementia in subjects with Alzheimer-type dementia. American Journal of Psychiatry, 163(12): 2164-2169.
27. De Kloet E., Meijer O.C., de Nicola A.F., de Rijk R.H. and Joëls M. 2018. Importance of the brain corticosteroid receptor balance in metaplasticity, cognitive performance and neuro-inflammation. Frontiers in neuroendocrinology, 49: 124-145.
28. De Kloet E.R. 2014. From receptor balance to rational glucocorticoid therapy. Endocrinology, 155(8): 2754-2769.
29. De Nicola A.F., Meyer M., Guennoun R., Schumacher M., Hunt H., Belanoff J., de Kloet E.R. and Gonzalez Deniselle M.C. 2020. Insights into the therapeutic potential of glucocorticoid receptor modulators for neurodegenerative diseases. International journal of molecular sciences, 21(6): 2137.
30. Dey A., Hao S., Wosiski-Kuhn M. and Stranahan A.M. 2017. Glucocorticoid-mediated activation of GSK3β promotes tau phosphorylation and impairs memory in type 2 diabetes. Neurobiology of aging, 57: 75-83.
31. Duque Ed.A. and Munhoz C.D. 2016. The pro-inflammatory effects of glucocorticoids in the brain. Frontiers in endocrinology, 7: 78.
32. Elgh E., Åstot A.L., Fagerlund M., Eriksson S., Olsson T. and Näsman B. 2006. Cognitive dysfunction, hippocampal atrophy and glucocorticoid feedback in Alzheimer’s disease. Biological psychiatry, 59(2): 155-161.
33. Ennis G E , An Y , Resnick SM, Ferrucci L , O'Brien R J and Moffat S D. 2017. Long-term cortisol measures predict Alzheimer disease risk. Neurology, 88(4): 371-378.

34. Frank M.G., Annis J.L., Watkins L.R. and Maier S.F.. 2019. Glucocorticoids mediate stress induction of the alarmin HMGB1 and reduction of the microglia checkpoint receptor CD200R1 in limbic brain structures. Brain, behavior, and immunity, 80:678-687.
35. Geerlings M.I., Sigurdsson S., Eiriksdottir G., Garcia M.E., Harris T.B., Gudnason V. and Launer L.J. 2015. Salivary cortisol, brain volumes, and cognition in community-dwelling elderly without dementia. Neurology, 85(11): 976-983.
36. Green K.N., Billings L.M., Roozendaal B., McGaugh J.L. and LaFerla F.M. 2006. Glucocorticoids increase amyloid-β and tau pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. Journal of Neuroscience, 26(35):9047-9056.
37. Hoogendijk W.J., Meynen G., Endert E., Hofman M.A. and Swaab D.F. 2006. Increased cerebrospinal fluid cortisol level in Alzheimer's disease is not related to depression. Neurobiology of aging, 27(5):780. e781-780. e782.
38. Ishijima S., Baba H., Maeshima H., Shimano T., Inoue M., Suzuki T. and Arai H. 2018. Glucocorticoid may influence amyloid β metabolism in patients with depression. Psychiatry research, 259:191-196.
39. Jankord R. and Herman J.P. 2008. Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. Annals of the New York Academy of Sciences, 1148: 64.
40. Kootar S., Frandemiche M.-L., Dhib G., Mouska X., Lorivel T., Poupon-Silvestre G., Hunt H., Tronche F., Bethus I. and Barik J. 2018. Identification of an acute functional cross-talk between amyloid-β and glucocorticoid receptors at hippocampal excitatory synapses. Neurobiology of disease, 118: 117-128.
41. Lehallier B., Essioux L., Gayan J., Alexandridis R., Nikolcheva T., Wyss-Coray T., Britschgi M. and Initiative As.D.N. 2016. Combined plasma and cerebrospinal fluid signature for the prediction of midterm progression from mild cognitive impairment to Alzheimer disease. JAMA neurology, 73(2): 203-212.
42. Lesuis S.L., Hoeijmakers L., Korosi A., de Rooij S.R., Swaab D.F., Kessels H.W., Lucassen P.J. and Krugers H.J. 2018. Vulnerability and resilience to Alzheimer's disease: early life conditions modulate neuropathology and determine cognitive reserve. Alzheimer's research & therapy, 10(1): 1-20.
43. Li S and Selkoe D. J. 2020. A mechanistic hypothesis for the impairment of synaptic plasticity by soluble Aβ oligomers from Alzheimer's brain. Journal of neurochemistry, 154(6): 583-597.
44. Mattson M.P. 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. Nature, 430 (7000): 631-639.
45. McEwen B.S. 2008. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. European journal of pharmacology, 583(2-3): 174-185.
46. Notarianni E. 2017. Cortisol: mediator of association between Alzheimer's disease and diabetes mellitus? Psychoneuroendocrinology, 81:129-137.
47. Ouanes S. and Popp J. 2019. High cortisol and the risk of dementia and Alzheimer's disease: a review of the literature. Frontiers in aging neuroscience, 11:43.
48. Pedrazzoli M., Losurdo M., Paolone G., Medelin M., Jaupaj L., Cisterna B., Slanzi A., Malatesta M., Coco S. and Buffelli M. 2019. Glucocorticoid receptors modulate dendritic spine plasticity and microglia activity in an animal model of Alzheimer's disease. Neurobiology of disease, 132: 104568.
49. Perrin A.J., Horowitz M.A., Roelofs J., Zunszain P.A. and Pariante C.M. 2019. Glucocorticoid resistance: is it a requisite for increased cytokine production in depression? A systematic review and meta-analysis. Frontiers in psychiatry, 10: 423.
50. Pietrzak R.H., Laws S.M., Lim Y.Y., Bender S.J., Porter T., Doecke J., Ames D., Fowler C., Masters C.L. and Milicic L. 2017. Plasma cortisol, brain amyloid-β, and cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease: A 6-year prospective cohort study. Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging, 2(1): 45-52.
51. Pineau F., Canet G., Desrumaux C., Hunt H., Chevallier N., Ollivier M., Belanoff J.K. and Givalois L. .2016. New selective glucocorticoid receptor modulators reverse amyloid-β peptide–induced hippocampus toxicity. Neurobiology of aging, 45: 109-122.
52. Qi Y., Klyubin I., Ondrejcak T., Hu N-W. and Rowan M.J. 2021. Enduring glucocorticoid-evoked exacerbation of synaptic plasticity disruption in male rats modelling early Alzheimer's disease amyloidosis. Neuropsychopharmacology, 46(12): 2170-2179.
53. Querfurth H.W. and LaFerla F.M. 2010. Mechanisms of disease. N Engl J Med, 362(4): 329-344.

54. Rodriguez J.M., Monsalves-Alvarez M., Henriquez S., Llanos M.N. and Troncoso R. 2016. Glucocorticoid resistance in chronic diseases. Steroids, 115: 182-192.
55. Roozendaal B. 2000. Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. Psychoneuroendocrinology 25(3): 213-238.
56. Selkoe D.J. 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. Physiological reviews.
57. Sierra A., Gottfried-Blackmore A., Milner T.A., McEwen B.S. and Bulloch K. 2008. Steroid hormone receptor expression and function in microglia. Glia, 56(6): 659-674.
58. Sorrells S.F., Munhoz C.D., Manley N.C., Yen S. and Sapolsky R.M. 2014. Glucocorticoids increase excitotoxic injury and inflammation in the hippocampus of adult male rats. Neuroendocrinology, 100(2-3): 129-140.
59. Sotiropoulos I., Silva J.M., Gomes P., Sousa N. and Almeida O.F. 2019. Stress and the Etiopathogenesis of Alzheimer's Disease and Depression. Advances in experimental medicine and biology, 1184:241-257.
60. Sterner E.Y. and Kalynchuk L.E. 2010. Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: relevance to depression. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. 34(5): 777-790.
61. Vyas A., Mitra R., Rao B.S. and Chattarji S. 2002. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. Journal of Neuroscience, 22(15): 6810-6818.
62. Vyas A., Pillai A. and Chattarji S. 2004. Recovery after chronic stress fails to reverse amygdaloid neuronal hypertrophy and enhanced anxiety-like behavior. Neuroscience, 128(4): 667-673.
63. Wolkowitz O.M., Burke H., Epel E.S. and Reus V.I. 2009. Glucocorticoids: mood, memory, and mechanisms. Annals of the New York Academy of Sciences, 1179(1): 19-40.
64. Yi J.H., Brown C., Whitehead G., Piers T., Lee Y.S., Perez C.M., Regan P., Whitcomb. and Cho K. 2017 Glucocorticoids activate a synapse weakening pathway culminating in tau phosphorylation in the hippocampus. Pharmacological research, 121: 42-51.
65. Zvěřová M., Fišar Z., Jirák R., Kitzlerová E., Hroudová J. and Raboch J. 2013. Plasma cortisol in Alzheimer's disease with or without depressive symptoms. Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research, 19: 681.

Molecular detection of equine herpesvirus types 1 and 4 and the study of serum level of interleukin 10 in East Azerbaijan horses

Mohammadreza Ghorani[1*]; Yaser Jafari Khatailou[1]; Fereydon Rezazadeh Zavoshti[2]

1- Assistant Professor, Pathobiology Department, University of Tabriz, Tabriz- Iran
2- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, University of Tabriz, Tabriz- Iran

**Corresponding Author Email address: mo_gh66@yahoo.com*

Abstract

Throughout history, horses have been considered the most important domestic animals, which have always had close interactions with human beings. By the passage of time, these interactions have become economically significant, to the degree that these days, the horse industry is an important business .Nowadays, in Iran, the horse industry is flourishing extremely fast, so veterinarians are to have enough knowledge about various types of diseases in these animals and be well equipped to be able to handle and manage different diseases in horses, including infectious diseases, mainly viral ones. Some of the most lethal viruses which cause severe diseases in horses and are widespread all over the world are Herpes Viruses, so studying about them and knowing their features, pathogenesis etc., is of most importance. Till now, nine types of herpes viruses are known and well-studied; among these nine types, type 1-5 cause serious diseases in domestic horses. In this study, we investigated EHV-1 and EHV-4, which according to the newest studies, have led to severe economic problems. EHV-4 is one of the leading causes of upper respiratory system diseases. EHV-1 is more dangerous and causes more sever health and economic issues. This virus causes consecutive abortions among mares, and sometimes respiratory diseases. These viruses (EHV-1 and EHV-4) can lead to neurobiological diseases, such as myeloencephalopathy in horses. Regarding all the above, we can conclude that these types of viruses are highly lethal and can result in problematic economic situations. Hence, veterinarians are to fight these viruses and their following side effects. Besides, the principal routine function of IL-10 appears to be to limit and ultimately terminate inflammatory responses. Uniquely among hemopoietic cytokines, IL-10 has closely related homologs in several virus genomes, which testify to its crucial role in regulating immune and inflammatory responses, so measuring the serum level of this cytokine is of importance in viral infections. The purpose of this study is the detection of EHV-1 and EHV-4 in 40 horse blood samples (taken from East Azerbaijan horses) by applying PCR test, which is a fast and precise detecting test, and also the study of serum level of IL-10 (which is an inhibitory factor and suppresses the production of critical cytokines from host Th2 cells so that it would suppress the host immune response against viruses; thus, measurement of this type of IL, in EHV-related infections is critical). The four horses were female and the rest were male. The mean age

of the horses was 10±0.8. We did this study by applying the Elisa test. The results of the PCR test demonstrated that seroprevalence of EHV-1 and EHV-4 were negative in all samples, and the results of the Elisa test indicated that the serum level of IL-10 was approximately normal in all animals, which were chosen in this study.

Keywords: Herpesvirus, Interleukin, Equine, Polymerase Chain Reaction, Elisa

شناسایی مولکولی هرپس ویروس‌های اسبی تیپ ۱ و ۴ و بررسی میزان سرمی اینترلوکین ۱۰ در اسب‌های استان آذربایجان شرقی

محمدرضا قرآنی[۱*]؛ یاسر جعفری خطایلو[۱]؛ فریدون رضازاده زاوشتی[۲]

۱- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز

2- دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: mo_gh66@yahoo.com

چکیده

هرپس ویروس‌های اسبی از پاتوژن های بسیار مهم در صنعت اسب‌داری هستند. از میان هرپس‌ها، هرپس‌های تیپ ۱ و ۴ (EHV-1 و EHV-4) از اهمیت بیش تری برخوردارند. EHV-1 که ویروس سقط اسب هم نامیده می‌شود، از عوامل اصلی سقط جنین در مراکز نگه داری و پرورش اسب است. EHV-4 ویروس التهاب ریه و بینی تک سمی‌ها نیز نامیده می‌شود. از آن جایی که عفونت‌های EHV-1 و EHV-4 اغلب پنهان بوده و بیماری فاقد علائم بالینی مشخص می‌باشد، شناسایی عفونت و یا بیماری به خصوص در اسب‌های به ظاهر سالم دشوار است. از این رو شناسایی ویروس در خون توسط روش های جداسازی ویروس، ایمونوفلورسانس مستقیم و ایمونوهیستوشیمی اغلب مشکل است. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روشی سودمند است که سریع، بسیار حساس و قابل اعتماد می تواند ویروس های EHV-1 و EHV-4 را شناسایی کند. اینترلوکین ۱۰ یک سایتوکاین ضد التهابی بوده که سبب کنترل و کاهش اثرات تخریبی پاسخ ایمنی ایجاد شده توسط دستگاه ایمنی میزبان بر بافت‌های خودی شده و از سوی دیگر به واسطه همین ویژگی، سبب گریز ویروس از اثرات دستگاه ایمنی می‌گردد. بنابراین سنجش سطح سرمی این اینترلوکین در بیماری‌های ویروسی، از جمله آلودگی با هرپس ویروس‌ها، حائز اهمیت است.در این مطالعه ۴۰ نمونه خون، از اسب‌های به ظاهر سالم، از استان آذربایجان شرقی اخذ شد. تعداد چهار اسب ماده و مابقی نر بودند. میانگین سنی اسب ها ۰.۸±۱۰ بود. نمونه‌ها از نظر آلودگی به هرپس ویروس‌های تیپ ۱ و ۴ با روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد بررسی قرار گرفتند. هم چنین میزان اینترلوکین ۱۰ در سرم اسب ها اندازه گیری شد. نتایج این مطالعه حاکی از این است که هیچ نمونه ای به لحاظ حضور هرپس ویروس‌های تیپ ۱ و ۴ مثبت نبوده و میانگین غلظت سرمی اینترلوکین ۱۰، در محدوده نرمال گزارش گردید. نتایج حاصل از آزمایش الایزا در خصوص سطح سرمی اینترلوکین ۱۰، با نتایج منفی حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، تطابق دارد.

واژگان کلیدی: هرپس ویروس، اینترلوکین، اسب، واکنش زنجیره ای پلی مراز، الایزا

۱.مقدمه

اسب از جمله حیوانات اهلی است که همواره تعاملی شایان توجه با انسان داشته و از دیرباز مورد توجه جوامع انسانی بوده است. با گذر زمان، این تعامل جنبه اقتصادی پیدا نموده، به گونه ای که امروزه صنعت پرورش اسب، از حوزه‌های مهم اقتصادی، به لحاظ اشتغال‌زایی و گردش مالی محسوب می‌گردد. امروزه در کشور ما، صنعت اسب‌داری با سرعت چشم‌گیری رو به رشد بوده و از این روی داشتن آمادگی کافی جهت رویارویی با بیماری‌های مختلف در این زمینه، از مسائل حائز اهمیت در حوزه دامپزشکی می‌باشد. در این میان، مطالعه و بررسی عوامل بیماری‌زای عفونی در تک سمی‌ها و بالاخص هرپس ویروس‌ها، به سبب پراکندگی جهانی، ایجاد نرخ بالای مرگ و میر و شدت بیماری‌های حاصله، از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند.

تا کنون در حدود نه تیپ هرپس ویروس شناخته شده است که در میان آن‌ها، هرپس ویروس‌های تیپ یک تا پنج، سبب ایجاد بیماری در اسب‌های اهلی می‌گردند. این مطالعه، به بررسی هرپس ویروس های تیپ ۱ و ۴ می‌پردازد که طبق مطالعات اخیر، آسیب‌های اقتصادی زیادی به بدنه صنعت اسب‌داری وارد آورده اند. هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمی‌ها، سبب ابتلای اسب‌ها (بالغین و کره‌ها) به بیماری های قسمت فوقانی دستگاه تنفسی می‌گردند (Constable et al., 2017). هرپس ویروس تیپ ۱ تک سمی‌ها، مخاطرات بیش‌تری را برای این حیوانات به دنبال داشته و به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بروز بیماری‌هایی هم‌چون بیماری‌های تنفسی در اسب‌های جوان، بروز سقط و نیز برخی بیماری‌های عصبی نظیر میلوآنسفالوپاتی[۳۵۰]، در میان اسب‌ها، شناخته شده است (Reed et al., 2004; Patel et al., 2005).

هدف از انجام این مطالعه، تشخیص هرپس ویروس‌های تیپ ۱ و ۴، با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و نیز اندازه‌گیری سطح سرمی اینترلوکین ۱۰ با استفاده از روش الایزا در نمونه های خونی جمع‌آوری شده از اسب‌های استان آذربایجان شرقی می‌باشد.

۲.مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه گیری و آماده سازی نمونه ها

در این مطالعه ۴۰ نمونه خون از اسب‌های به ظاهر سالم (از هر نژاد، جنس و سن) از باشگاه‌های استان آذربایجان شرقی (سردار ملی، آراز و سبلان) گرفته شد. به منظور ثبت دقیق تاریخچه هر اسب، اطلاعات هر اسب شامل سن، جنس و نژاد ثبت گردید. جهت تسهیل مطالعه و بررسی، حیوانات در پنج گروه سنی طبقه بندی و به لحاظ نژاد و جنس تفکیک شدند که در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۸: مشخصات اسب‌های مورد مطالعه

جنس و نژاد / سن	مادیان عرب	نریان عرب	نریان عرب-ایرانی	نریان کرد	نریان دوخون	تعداد کل

[350] Myeloencephalopathy

۰-۵	۳ (٪۷.۵)	۵ (٪۱۲.۵)	-	-	-	۸ (٪۲۰)
۵-۱۰	۱ (٪۲.۵)	۹ (٪۲۲.۵)	۳ (٪۷.۵)	۳ (٪۷.۵)	۳ (٪۷.۵)	۱۹ (٪۴۷.۵)
۱۰-۱۵	-	۴ (٪۱۰)	-	۲ (٪۵)	-	۶ (٪۱۵)
>۱۵	-	۱ (٪۲.۵)	۱ (٪۲.۵)	۱ (٪۲.۵)	۴ (٪۱۰)	۷ (٪۱۷.۵)
تعداد کل	۴ (٪۱۰)	۱۹ (٪۴۷.۵)	۴ (٪۱۰)	۶ (٪۱۵)	۷ (٪۱۷.۵)	۴۰
میانگین سنی	~۱۰ ± ۰/۸					

خون‌گیری از ورید وداج صورت گرفت. نمونه خون به میزان ۷ میلی لیتر از هر حیوان اخذ شد. ۵ میلی لیتر از خون به لوله های حاوی ماده ضدانعقاد حاوی EDTA منتقل شد و ۲ میلی لیتر از آن به لوله های فاقد ماده ضدانعقاد انتقال یافت. نمونه ها ی خون در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه، نمونه های خون با دور ۱۵۰۰ gx به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، قسمت بافی‌کوت نمونه‌های جمع‌آوری شده در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد (جهت انجام آزمایشات مولکولی؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز) و قسمت سرم نمونه‌های جمع‌آوری شده در لوله‌های فاقد ماده ضد انعقاد (جهت انجام آزمایش الایزا؛ بررسی سطح سرمی اینترلوکین ۱۰)، توسط سمپلر جدا و تا زمان انجام آزمایش های مربوطه، در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد نگه‌داری شدند.

۲-۲- واکنش زنجیره ای پلی مراز

برای استخراج DNA، از کیت استخراج DNA شرکت یکتاتجهیزآزما (تولید شرکت Favorgen، کشور تایوان) استفاده شد. گلیکوپروتئین B اعضای تحت خانواده آلفا هرپس ویرینه، جزئی از لیگاند این ویروس‌ها بوده که حاوی توالی‌های بسیار اختصاصی گونه‌ها بوده و امکان تفریق بین هرپس ویروس تیپ ۱ و ۴، که بسیار مشابه هستند، را فراهم می‌کند.

پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق که گلیکوپروتئین B را هدف قرار می‌دهند، پیشنهادی سازمان OIE هستند (Wagner WN et al., 1992).

توالی پرایمرهای فوروارد و ریورس مربوط به هرپس ویروس تیپ ۱ اسب:

5'-GGG-GTT- CTT-AAT-TGC-ATT-CAG-ACC-3'

5'-GTA-GGT-GCG-GTT-AGA-TCT-CAC-AAG-3'

* باند الکتروفورز مورد انتظار: 88 bp

توالی پرایمرهای فوروارد و ریورس مربوط به هرپس ویروس تیپ ۴ اسب:

5'-TAG-CAA-ACA-CCC-ACT-AAT-AAT-AGC-AAG-3'

5'-GCT-CAA-ATC-TCT-TTA-TTT-TAT-GTC-ATA-TGC-3'

* باند الکتروفورز مورد انتظار: 96 bp

برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به شرح زیر است:

۱۹. ۹۵ درجه سانتی‌گراد (مرحله باز شدن دو رشته DNA)..... ۵ دقیقه
۲۰. ۹۵ درجه سانتی‌گراد ..... ۳۰ ثانیه
۲۱. ۵۷ درجه سانتی‌گراد (مرحله چسبیدن پرایمرها به هدف) ..... ۱ دقیقه
۲۲. ۷۲ درجه سانتی‌گراد (مرحله طویل شدن)..... ۱ دقیقه
۲۳. ۷۲ درجه سانتی‌گراد ..... ۷ دقیقه

* مراحل ۲ تا ۴، در ۳۵ سیکل انجام پذیرفتند

(Carvalho et al., 2000).

پس از انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز، به میزان ۱۰ میکرولیتر از محصولات به دست آمده، در هر یک از چاهک‌های ژل آگارز ۱.۵ درصد لود گشته و با ولتاژ ۹۵ ولت به مدت ۱ ساعت، الکتروفورز شدند.

۳-۲- الایزا

سنجش سایتوکاین IL-10 به صورت جداگانه و به شیوه الایزای ساندویچی مطابق پروتکل کیت Bendermed، ساخت کشور اسپانیا صورت گرفت.

۳. نتایج و بحث

پس از بررسی محصول به‌دست‌آمده از روش پی‌سی‌آر توسط روش الکتروفورز (از طریق دستگاه ژل داک که برای خوانش نتیجه‌های حاصل از الکتروفورزیس استفاده می‌گردد) در تمامی نمونه‌های مورد مطالعه، حضور هرپس ویروس‌های تیپ ۱ و ۴ در تمامی گروه‌های سنی و جنس‌های متفاوت حیوانات منفی گزارش شدند.

از آنجایی که هرپس ویروس‌ها علاوه بر بیماری‌زایی، می‌توانند عفونت‌های فاقد علامت در اسب‌ها ایجاد کنند و باعث انتقال ویروس به سایر دام‌های سالم بشوند، تشخیص به موقع ویروس در بدن حیوان و جداسازی آن‌ها از سایرین، امری ضروری و مهم می‌باشد.

با استناد به مطالعات محدودی که در برخی مناطق کشور بر روی شیوع هرپس ویروس‌های تیپ ۱ و ۴ اسب انجام شده است، شیوع این ویروس‌ها بسیار کم گزارش شده بود. از آن‌جایی که هیچ مطالعه مولکولی در استان آذربایجان شرقی بر روی هرپس‌های اسب انجام نشده بود، ضرورت این پژوهش مهم به نظر می‌رسید. نمونه‌گیری در این مطالعه از اسب‌هایی صورت گرفت که به لحاظ بالینی، به ظاهر سالم و فاقد علائم اختصاصی مربوط به بیماری‌های ناشی از هرپس ویروس‌های تیپ ۱ و ۴ بودند. به این ترتیب، کسب نتایج منفی در این مطالعه از دلایل نسبتا متقنی برخوردار می‌باشد. در مطالعه ای که تقی پور بازرگانی و همکاران در سال ۱۳۹۲، با بهره‌گیری از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، در شهر گلپایگان، بر روی ۳ راس مادیان با علائم میلوانسفالوپاتی، انجام دادند، وجود هرپس ویروس تیپ ۱ برای اولین بار در ایران به ثبت رسید. بر خلاف مطالعه حاضر (که نمونه گیری از اسب‌های فاقد علامت صورت گرفت) دراین مطالعه نتایج حاصله به لحاظ حضور هرپس ویروس تیپ ۱ تک سمی‌ها، به تمامی مثبت بوده که ناشی از انجام این مطالعه بر روی اسب‌های دارای علائم بیماری عصبی می‌باشد (تقی پور بازرگانی و همکاران، ۱۳۹۲).

در یک مطالعه دیگر که در نواحی شمال شرقی ایران صورت گرفته است، ۳۰۸ راس از تک سمی‌ها این مناطق با روش واکنش زنجیره ای پلی‌مراز با زمان واقعی سایبر گرین[۳۵۱]، مورد بررسی قرار گرفتند که در میان این نمونه‌ها، ۵.۷۴٪ از اسب‌ها و ۸.۱۴٪ از دیگر تک سمی‌ها، آلوده به هرپس ویروس تیپ ۴ بوده اما اثری از آلودگی به هرپس ویروس تیپ ۱، مشاهده نشده است (Sarani et al., 2013). در مطالعه دیگری که در نواحی روستایی شمال شرق ایران (که از جمعیت بالایی از تک سمی‌ها برخوردار است)، نمونه خون ۱۰۸ راس الاغ و قاطر، به لحاظ حضور یا عدم حضور هرپس ویروس‌های تیپ ۱ و ۴ تک سمی‌ها، به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با زمان واقعی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی حاکی از این هستند که DNA مربوط به هرپس ویروس تیپ ۱ تک سمی‌ها در هیچ یک از نمونه‌های خون مشاهده نشد، لیکن نمونه خون ۱۴.۸٪ از الاغ‌ها و قاطرها، آلوده به هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمی‌ها بودند (Sarani Ali and Gholamreza Mohammadi., 2016).

نتایج حاصله در هر دو مطالعه سارانی و همکاران به ترتیب در سال‌های ۲۰۱۳ و ۲۰۱۶ به لحاظ عدم حضور هرپس ویروس تیپ ۱، همسو با مطالعه حاضر بوده، ولی نتایج مربوط به حضور هرپس ویروس‌های تیپ ۴، مغایر با نتایج مطالعه کنونی می‌باشد. این ناهمسویی می‌تواند ناشی از تفاوت در اندازه جمعیت مورد بررسی در دو مطالعه، محل نگه‌داری حیوانات (روستا در مطالعه سارانی و باشگاه‌های سوارکاری در مطالعه حاضر)، تراکم جمعیت حیوانات (در شمال شرق ایران تراکم جمعیت تک سمی‌ها در مقایسه با منطقه شمال‌غرب بیشتر می‌باشد) و نیز تفاوت روش مولکولی مورد استفاده (واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با زمان واقعی در مقایسه با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معمولی)، باشد.

در مطالعه ای در ایران، در شهرهای اصفهان و شهرکرد، به ترتیب در ۵۳ و ۳۷ نمونه خون، به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، حضور هرپس ویروس‌های تیپ ۱ و ۴ مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاکی از این بودند که ۴ عدد از نمونه‌های اصفهان (۱۸.۱۸٪) و ۳ عدد از نمونه‌های شهرکرد (۸.۱۰٪)، به لحاظ حضور هرپس ویروس تیپ ۱، ۹ عدد از نمونه‌های اصفهان (۱۶.۹۸٪) و ۶ عدد از نمونه‌های شهرکرد (۱۶.۲۱٪)، به لحاظ حضور هرپس ویروس تیپ ۴ مثبت بودند، حال آن که ۶ عدد از نمونه‌های اصفهان (۱۱.۳۲٪)

[351] SYBR-Green Real-time Polymerase Chain Reaction

و ۳ عدد از نمونه‌های شهرکرد (۸.۱۰٪)، به لحاظ حضور هر دو تیپ ویروس، مثبت اعلام شدند (Taktaz et al., 2015). علی‌رغم تشابه اندازه جمعیت مورد مطالعه و روش مولکولی استفاده شده، نتایج مثبت به لحاظ حضور هرپس ویروس‌های تیپ ۱ و ۴ تک سمی‌ها حاصل گردید که احتمالا مربوط به تفاوت منطقه جغرافیایی میان این مطالعه و مطالعه حاضر می‌باشد.

در یک مطالعه دیگر در ایران حضور هرپس ویروس‌های تیپ ۴ تک سمی‌ها در میان ۱۵۰ راس اسب از چهار استان تهران، گلستان، خوزستان و آذربایجان غربی، مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌ها در این مطالعه، نمونه خون و سوآب‌های بینی بوده و از اسب‌های دارای علائم بیماری مرتبط با هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمی‌ها یا با سابقه بیماری اخذ گردیدند. روش مولکولی مورد استفاده در این مطالعه، روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با زمان واقعی تکمن بوده که از دقت، حساسیت و ویژگی بسیار بالایی برخوردار می‌باشد. از مجموع ۱۵۰ رأس اسب نمونه‌گیری شده، ۱۸ راس (۱۲٪) از نظر هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمی‌ها مثبت بودند. از نمونه‌های خون ۷ مورد (۴.۶٪) و از نمونه‌های سواب بینی ۱۱ مورد (۷.۳٪) از نظر هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمی‌ها مثبت بودند. از ۴۷ رأس اسب نمونه‌گیری شده از استان گلستان، ۴۵ رأس اسب نمونه‌گیری شده از استان خوزستان، ۳۷ رأس اسب نمونه‌گیری شده از استان تهران و ۲۱ رأس اسب نمونه‌گیری شده از استان آذربایجان غربی به ترتیب ۶ راس (۱۲.۷۶٪)، ۳ راس (۶.۶٪)، ۵ راس (۱۳.۵٪) و ۴ راس (۱۹.۰۴٪) از نظر هرپس ویروس تیپ ۴ تک سمی‌ها مثبت بودند (Tazikeh et al., 2018). علت کسب نتایج مثبت احتمالا ناشی از نمونه گیری از اسب‌های دارای علامت، تفاوت در منطقه جغرافیایی انجام مطالعه و نیز بیشتر بودن دقت، حساسیت و ویژگی روش مولکولی استفاده شده می‌باشد. به علاوه لازم به ذکر است که در این مطالعه، علاوه بر نمونه خون، سوآب‌های بینی نیز اخذ شدند، که همین تفاوت در نوع نمونه نیز می‌تواند در کسب نتایج متفاوت، دخیل باشد.

شایان ذکر است که مقایسه نتایج حاصل از مطالعه حاضر در ارتباط با اینترلوکین ۱۰ و نتایج به دست آمده از مطالعه روی نمونه‌های نرمال (Curto et al., 2016) در ارتباط با فاکتور مذکور، مبین این امر می‌باشد که یافته‌های حاصل تا حد زیادی با یافته‌های مرتبط با نمونه‌های نرمال همپوشانی داشته و فلذا سطح سرمی اینترلوکین ۱۰ در اسب‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر در سطحی نزدیک به سطح نرمال قرار دارند. با توجه به منفی بودن نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، نزدیک بودن میانگین غلظت سرمی اینترلوکین ۱۰ به سطح نرمال در مطالعه حاضر قابل توجیه است

هدف از انجام آزمایش الایزا بر روی نمونه‌ها در این مطالعه، ارائه گزارشی از سطح سرمی اینترلوکین ۱۰ در خون اسب‌های مورد مطالعه بوده است. با توجه به اهمیت این سایتوکاین که یک سایتوکاین ضد التهابی بوده و میان شدت عفونت و شدت پاسخ ایمنی توسط میزبان تعادل برقرار می کند و از اثرات تخریبی سایر عوامل سیستم ایمنی میزبان بر بافت‌های خودی می‌کاهد. البته خود این امر سبب گریختن ویروس از اثرات سیستم ایمنی میزبان گشته و به طولانی و مزمن شدن بیماری حاصل از هرپس ویروس‌ها و یا کمک به بروز حالت نهفتگی در حیوانات می‌انجامد. بنابراین در بیماری های ویروسی از جمله بیماری‌های ناشی از هرپس ویروس‌ها، باید مورد توجه قرار گیرد.

۴. نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر بر روی نمونه خون اخذ شده از ۴۰ راس اسب به ظاهر سالم، هیچ نمونه ای به لحاظ حضور هرپس ویروس‌های تیپ ۱ و ۴ مثبت گزارش نگردید و به تبع آن، همبستگی معنی داری میان سطح سرمی اینترلوکین ۱۰ در این حیوانات با نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، وجود ندارد.

در واقع پژوهش حاضر، یک مطالعه مقدماتی برای بررسی حضور یا عدم حضور هرپس ویروس تیپ ۱ و ۴ اسب در اسب‌های منطقه آذربایجان شرقی بوده است و پیشنهاد می شود در مطالعات بعدی حضور سایر تیپ های هرپس ویروسی در اسب مورد بررسی قرار گیرند. هم چنین بررسی های سرولوژیک هم در کنار مطالعات مولکولی صورت پذیرد.

منابع

۱۷- تقی‌پور بازرگانی ت.، ممتاز ح.، بهارلو ف. و غفاری م. ۱۳۹۲. اولین گزارش وقوع میلوانسفالوپاتی ناشی از هرپس ویروس تیپ ۱ اسبی در ایران. مجله دامپزشکی ایران، جلد دهم، شماره سوم، ص: ۱۰۳-۱۰۰.

18- Carvalho R., Passos L.M .and Martins A.S. 2000. Development of a differential multiplex PCR assay for equine herpesvirus1 and 4 as a diagnostic tool. Journal of Veterinary Medicine. Series B, 47: 351-359.

19- Constable P.D., Hinchcliff K.W., Done S.H. and Grunberg W. 2017. Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. Eleventh edition. Elsevier. Melbourne, Australia, 1040-1042.

20- Curto E., Messenger K., Salmon J. and Gilger B. 2016. Cytokine and chemokine profiles of aqueous humor and serum in horses with uveitis measured using multiplex bead immunoassay analysis. Veterinary Immunology and Immunopathology, 182: 43-51.

21- Tazikeh A., Raoofi A., Madadgar O., Akbarein H., Ghadrdan Mashhadi A. and Sarani A. 2018. A Survey of Equine Herpes Virus 4 Infection in Four Provinces of Iran Using Real Time PCR Taqman Assay. Journal of Veterinary Research, 73(4): 483-490.

22- Patel J.R. and Heldens J. 2005. Equine Herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)-epidemiology, disease and immunoprophylaxis: A brief review. The Veterinary Journal, 170: 14-23

23- Reed S.M. and Toribio R.E. 2004. Equine herpesvirus 1 and 4. Veterinary Clinic: Equine Practice, 20: 631-642.

24- Sarani A. and Mohammadi G. 2016. Detection of equine herpesvirus-1 and equine herpesvirus-4 in mules and donkeys by real time PCR. Veterinary Practitioner, 17: 160-163.

25- Sarani A., Mohammadi G., Mayameei A. and Akbari M. 2013. Investigation of Equine herpesvirus-1 and 4 infections in equine population of Iran by real-time PCR. Human & Veterinary Medicine, 5(1): 29-33.

26- Taktaz T., Nekoei S., Vazirian B., Doosti A., Khamesipour F. and Anyanwu M. 2015. Molecular Detection of Equine Herpesvirus Types 1 and 4 Infection in Healthy Horses in Isfahan Central and Shahrekord Southwest Regions, Iran. BioMed Research International, 7.

27- Wagner W.N., Bogdan J., Haines D., Townsend H.G. and Misra V. 1992. Detection of equine herpesvirus and differentiation of equine herpesvirus type 1 from type 4 by the polymerase chain reaction. Canadian Journal of Microbiology, 38(11): 1193-1196.

Effect of different dietary selenium varieties on molybdenum status during the late pregnancy in Khalkhali goats and their kids

Rasool Kachuee[1*]; Hossein Abdi-Benemar[2]; Yaghoub Mansoori[3]; Jamal Seifdavati[2]; Moeini M. M[4]

1- PhD, Department of Animal Science, College of agricultural sciences, University of Mohaghegh .Ardabili, Iran
2- Associate Professor, Department of Animal Science, College of agricultural sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Iran.
3- Associate Professor, Department of Animal Science, College of agricultural sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Iran.
4- Associate Professor, Department of Animal Science, College of agricultural sciences, University of Razi Kermanshah, Iran.

*rasool.kachuee@gmail.com

Abstract

The present study aims to determine the effect of dietary Se supplement on Khalkhali goats at the last stage of gestation on molybdenum concentrations of goats and placental, colostrum, and milk transfer of this trace mineral from goats to their kids and colostrum .To this end, forty pregnant Khalkhali goats (30 ± 5 kg) were randomly allocated four treatments to receive supplements of 0 (control), 0.6 mg Se $head^{-1}$ d^{-1} of selenomethionin (SM), 0.6 mg Se $head^{-1}$ d^{-1} of selenium nanoparticles (SN) and 0.6 mg Se $head^{-1}$ d^{-1} of sodium selenite (SS), from four weeks before the expected day of delivery. Blood samples were taken from the goats four weeks before the expected day of delivery and on the kidding day, and colostrums were collected from the goats immediately after kidding. Instantly after delivery, newborn kids were taken apart from their dams and their blood samples were collected from the jugular vein, before they drank their first colostrums and at 7, 14, 21, and 28 after birth day. The results demonstrated that the serum molybdenum (Mo) concentration was greater in control group compared with Se supplemented goats ($P < 0.05$). Likewise, the total Mo content of the colostrums was lower in SN than SM ($P < 0.05$) and SS ($P < 0.05$). However, the serum concentration of Mo insignificantly decreased in kids of Se treated goats contrasted with the control ones ($P > 0.05$). Similar indifferences among treatments were observed from examination of the kids' concentration of Mo. Similar observations were recorded for kids on the birth day to the four weeks of their life, where a similar pattern of results appeared for changes in Mo content of milk from 7 days after parturition day to the fourth week of lactation ($P > 0.05$). These results seem to indicate a higher efficacy of colostrums transfer of Mo into kids of selenium treated goats when contrasted with the control ones. It could be concluded that Se supplementation can affect and correlate with Mo
levels, and this effect depends on the chemical or physical variety of Se supplementation.

Keywords:nano-Selenium, Selenomethionine, molybdenum transplacental and Colostrum transfer

اثر مکمل اشکال مختلف مکمل سلنیوم(نانو ذرات، آلی و معدنی) بر غلظت مولیبدن سرم بزها، بزغاله ها، آغوز و شیر

رسول کچویی*[۱]؛حسین عبدی بنمار[۲]؛ یعقوب منصوری[۳]؛ جمال سیف دواتی[۲]؛ محمد مهدی معینی[۴]

۱- دانش آموخته گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

۳- استاد گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه محقق اردبیلی

۴-دانشیار گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی

rasool.kachuee@gmail.com

چکیده

این مطالعه به منظور تعیین اثر منابع مختلف سلنیوم بر غلظت مولیبدن سرم و آغوز بز های خلخالی در اواخر آبستنی و همچنین اثر این منابع بر غلظت مولیبدن سرم بزغاله های آن ها تا چهار هفتگی و غلظت مولیبدن شیر مادران تا هفته چهارم در بزها انجام شد. آزمایش با استفاده از ۴۰ رأس بز خلخالی که در یک طرح بلوک کاملا تصادفی و بلوک بندی بر اساس وزن بزها انجام شد. در ۴ گروه ۱۰ رأسی تقسیم شدند، اجرا شد. گروه شاهد هیچ گونه مکملی دریافت نکردند و تنها جیره پایه را که حاوی ۰/۱ میلی گرم در کیلوگرم ماده خشک بود را دریافت کردند. یکی از تیمارهای آزمایشی ۰/۶ میلی گرم سلنیوم به ازای هر راس در روز به شکل سلنو متیونین و دیگر تیمارهای آزمایشی نیز به همین مقدار سلنیوم به شکل نانو ذرات سلنیوم و سدیم سلنیت دریافت کردند. سه هفته قبل از زایش و روز زایش از بزها خون گیری به عمل آمد. از بزغاله ها نیز در روز زایش و تا چهار هفته بعد از زایش بصورت هفتگی از سیاهرگ وداج خون گیری به عمل آمد. با استفاده از دستگاه ICP-OES غلظت مولیبدن سرم، آغوز و شیر بزها اندازه گیری شد. غلظت مولیبدن سرم بز ها قبل از زایش تقریباً مشابه بود، اما روز زایش غلظت مولیبدن در سرم بز هایی که مکمل دریافت کرده بودند پایین تر بود و از نظر آماری اختلاف بین گروه شاهد و تیمارهای آزمایشی معنی دار بود (P <۰/۰۵). با این حال، تفاوت معنی داری بین منابع معدنی، نانو ذرات سلنیوم دیده نشد. اما غلظت مولیبدن در گروه سدیم سلنیت از لحاظ عددی میزان کمتری از نانو ذرات سلنیوم و سلنومتیونین داشت. نتایج بدست آمده از این آزمایش نشان داد که غلظت مولیبدن آغوز در بزهای دریافت کننده مکمل سلنیوم در مقایسه با سایر گروه ها کاهش معنی داری داشت (P <۰/۰۵). اما تفاوت معنی داری در غلظت مولیبدن آغوز بین منابع آلی، معدنی و نانو ذرات سلنیوم دیده نشد. همچنین، غلظت مولیبدن سرم بزغاله های گروه آزمایشی در هنگام تولد در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی داری نداشت (P >۰/۰۵). به طور مشابه، مولیبدن سرم بزغاله های گروه های دریافت کننده مکمل سلنیوم از هفته اول تا چهارم زندگیشان کاهش معنی داری در مقایسه با گروه شاهد نشان نداد (P >۰/۰۵) و غلظت مولیبدن شیر گروه های دریافت کننده سلنیوم تفاوت معنی داری را نسبت به گروه شاهد نشان نداد (P>۰/۰۵). به نظر می رسد که افزایش مقدار سلنیوم خوراک بزها سبب کاهش غلظت مولیبدن در سرم بزها و آغوز شد. بنابراین هنگامی که از سطوح بالای سلنیوم در جیره دام های آبستن استفاده می شود مقدار مولیبدن در این حیوانات نیز باید کنترل شود.

واژگان کلیدی: نانوذرات سلنیوم، سلنومتیونین، انتقال جفتی و آغوز مولیبدن

۱.مقدمه

عناصر معدنی دارای وظایف مختلف و ضروری در بدن می باشند، سلنیوم یک عنصر ضروری و کمیاب است که به گروه ششم جدول تناوبی عناصر تعلق دارد. از نظر شیمیایی سلنیوم بین تلوریم که یک فلز و گوگرد که یک غیر فلز است قرار دارد. سلنیوم به عنوان یک عنصر سمی خطرناک در خاک شناخته شده بود، اهمیت این عنصر زمانی مشخص گردید که به عنوان یک عنصر کم مصرف دارای نقش های بسیار مهم معرفی شده و نیز احتمال کمبود آن مطرح گردید (Surai, 2006). اهمیت بیولوژیکی سلنیوم به عنوان بخشی از ساختار سلنو آنزیم ها و گلوتاتیون پراکسیداز که در تنظیم فرایند های اکسیداتیو و محافظت غشا سلول نقش دارد و در ترکیب ساختاری ردوکتازهای باکتریایی مشخص گردیده است (Zhang et al 2011). کمبود سلنیوم سبب کاهش سنتز گلوتاتیون پر اکسیداز و در نتیجه آسیب به غشا سلول و میتوکندری می شود (Kojouri an Shirazi, 2007;Zhang et al 2011). بیماری ماهیچه سفید در کشور های بزرگ پرورش دهنده گوسفند در جهان از جمله آفریقای جنوبی ، ترکیه، نیوزلند، انگلستان و آمریکا گزارش شده است. ترکیه بیشترین میزان شیوع این بیماری را در بین کشورها دارد. بین ریزمغذی‌ها و عناصر اصلی در غذا و خون اثرات رقابتی و تقویت‌کنندگی دیده شده است (Moeini et al., 2011). در بین ریزمغذی‌ها نقش و اهمیت مولیبدن به عنوان متالوآنزیم نقش حیاتی را در نشخوارکنندگان ایفا می‌نمایند (Zhang and Gladyshev, 2008). عناصری که در جدول تناوبی جایگاه های نزدیک به هم را اشغال کردند، به دلیل رفتار مشابه شیمیایی در فرایند های طبیعی سلول دارای رقابت هستند، سلنیوم به دلیل ظرفیت های مختلف الکترونی قادر به تاثیر بر فرایندهای جذب و دفع بسیاری از عناصر از جمله مس، سولفور، آهن، روی، کبالت و مولیبدن شود (Kojouri an Shirazi, 2007; Kachuee et al., 2013, 2019). مولیبدن یک ماده غذایی ضروری برای بدن انسان ها و حیوانات است . مولیبدن معمولا در کبد ، کلیه ، غده آدرنال و استخوان متمرکز است . لازم به ذکر است که مولیبدن به عنوان یک جزء سازنده چندین آنزیم ایفا نقش می کند از جمله سولفات اکسیداز که در واکنش ها و متابولیسم های آمینو اسیدهای سولفوردار نقش دارد، گزانتین اکسیداز که در اکسیداسیون پیورین و پیریمیدن و تولید اسید اوریک نقش دارد، آلدهید اکسیداز که در اکسیداسیون آلدهیدها ایفای نقش می کند. در رابطه با برهم کنش سلنیوم و مولیبدن چندین آنزیم دیده شده حاوی مولیبدن و تنگستن که حاوی سلنیوم هستند (Gladyshev, 2002; Wagener et al., 2009) و اخیرا مقاسیه رابطه ژنتیکی، یک رابطه کاربردی میان سلنیوم و مولیبدن در هر سه قلمرو حیات یافت شد (Zhang and Gladyshev, 2008). سلنیوم به عنوان سلنوسیستئین در اگزاترانسفراز های(oxotransferases) حاوی مولیبدن در برخی پروکاریوت ها و یوکاریوت ها، موقعیت مولیبدن در جایگاه اکسید شده آنزیم را هماهنگ می کند(Wagener et al., 2009). با این حال آنزیم های دیگری نیز مانند خانواده هیدروکسیلاز مولیبدن حاوی یک سلنیوم ناپایدار (غیر سلنوسیستئین) در یک شکل ناشناخته است که برای فعالیتشان ضروری است (Zhang and Gladyshev, 2008; Wagener et al., 2009). از طرفی باید در نظر داشت که با توجه به اثر متقابل سه گانه مولیبدن، گوگرد و مس در زنجیره غذایی و همچنین در بدن موجودات ممکن است. از طرفی سنیوم بر میزان مس را ممکن است تحت تاثیر قرار داده (Moeini et al., 2011; Kachuee et al., 2013, 2019) و بر مقدار مولیبدن به طور غیر مستقیم تاثیر بگذارد. داده های حیوانی نشان می دهند که متابولیسم ترکیبات مولیبدن با متابولیسم ترکیبات مس و گوگرد ارتباط تنگاتنگ دارند (Kojouri an Shirazi, 2007; Zhang et al., 2011). رابطه رقابتی بین گوگرد و سلنیوم به دلیل شباهت های شیمیای و خواص فیزیکی آن وجود دارد و سلنیوم به دلیل خواص الکترنگاتیوی قوی تر نسبت به گوگرد، تمایل بیشتری به واکنش با مولیبدن دارد (Wagener et al., 2009).

میزان و شکل های مختلف این عنصر که در جیره منظور می گردد ، ممکن است سبب اثرات کمبود یا بیشبود سایر عناصر حیاتی از جمله مولیبدن در حیوانات مزرعه ای شود. در این راستا، این مطالعه طراحی گردیده است تا اثر مکمل نانو ذرات سلنیوم ، سلنیوم آلی و معدنی در بزهای آبستن بر غلظت مولیبدن سرم بزها، بزغاله ها، آغوز و شیر آن ها را مورد بررسی قرار دهد.

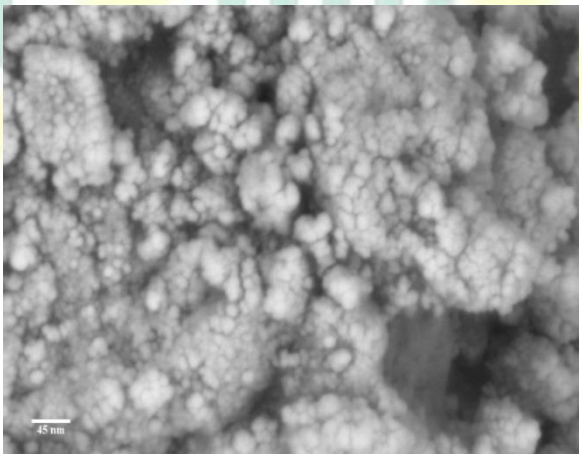
۲.مواد و روش‌ها

این آزمایش در واحد گوسفنداری دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی در اوایل بهمن ماه انجام شد. تعداد ۴۰ رأس بز نژاد خلخالی از سن حدود دو سال (۰/۵±۲) در یک دوره آزمایش ۹۰ روزه برای اجرای این آزمایش در نظر گرفته شد. میانگین وزن اولیه بزها ۳±۳۰ کیلوگرم بود. این دام ها بعد از توزین و بررسی سلامت عمومی دام به قفس های انفرادی(۰/۹۰×۱/۲) منتقل شدند که هر کدام بصورت مجزا به آب و خوراک دسترسی داشتند. تمام بزها به صورت یکسان تغذیه می شدند و دام‌های مورد آزمایش به صورت انفرادی و روزانه دو نوبت با یونجه و کنسانتره (دانه ذرت، گنجاله سویا، دانه جو و سبوس گندم) به نسبت ۵۵ به ۴۵ تغذیه می شدند. بز ها ۹۰ روز قبل از زایش ، در محوطه ای مسقف و در قفس به صورت انفرادی نگهداری می شدند. روزانه در دو نوبت صبح و عصر تغذیه آنها انجام می شد. دام ها مکمل های سلنیوم را به صورت روزانه و انفرادی دریافت می کردند. گروه های آزمایشی شامل:

گروه ۱: گروه شاهد که هیچ مکملی دریافت نکردند. گروه ۲: بزهایی که ۰/۶ میلی گرم مکمل آلی سلنیوم به صورت سلنومتیونین ساخت شرکت سیگما ایالات متحد آمریکا، روزانه و انفرادی در دو نوبت دریافت کردند. گروه ۳: بز هایی که ۰/۶ میلی گرم مکمل معدنی سلنیوم به صورت سدیم سلنیت ساخت شرکت سیگما ایالات متحد آمریکا روزانه و انفرادی در دو نوبت دریافت کردند. گروه ۴: بز هایی که ۰/۶ میلی گرم سلنیوم به فرم نانو ذرات (۴۵ نانومتر) به صورت روزانه و انفرادی در دو نوبت دریافت کردند.

قبل از مصرف مکمل سلنیوم و نیز روز زایش از سیاهرگ وداج کلیه بزها خونگیری شد. از بزغاله ها نیز در روز تولد (قبل از خوردن آغوز) و در ۷ ، ۱۴و ۲۱روزگی از سیاهرگ وداج خونگیری به عمل آمد. پس از زایش بزها به مدت ۴ هفته در قفس باقی مانده و روزانه در دو نوبت صبح و عصر شیردوشی می شدند.

نانو ذرات سلنیوم بر اساس روش کچویی و همکاران (۲۰۱۹) آماده سازی شد اندازه گیری سطح این ذرات با دستگاه میکروسکوپ الکترونی (فیلیپس XL30) با بزرگنمایی k50 در در شکل ۱ نشان داده شده است. این مکمل به صورت خوراکی قابل استفاده است.



شکل ۱: سطح نانودرات آماده سازی شده(۴۵ نانومتر)

این طرح در قالب طرح بلوک کامل تصادفی اجرا شد. دام ها بر اساس وزن بلوک بندی شدند.داده ها با رویه ی MIX ، نرم افزار آماری SAS تجزیه و تحلیل شدند. .میانگین ها توسط آزمون Lsmeans با یکدیگر مقایسه شدند. مدل آماری طرح به صورت زیربود:

$$Yij = \mu + Ti + Bj + \varepsilon ij$$

در این فرمول Yij نشان دهنده مقدار عددی هر مشاهده در آزمایش، μ میانگین کل جامعه ای است که از طریق نمونه ها با فرض صفر مورد بررسی قرار گرفتند، Bj نشان دهنده بلوک Ti نشان دهنده اثر مکمل آزمایشی و εij نشان دهنده اثر خطا است .

مدل آماری استفاده شده برای وزن بزغاله ها و عناصر سرم بزغاله ها بر اساس طرح بلوک تکرار شده در زمان براساس زیر می باشد:

$$Yijk = \mu + Ti + Rj + Bj + TBij + \varepsilon bijk$$

در این فرمول Yijk نشان دهنده مقدار عددی هر مشاهده در آزمایش، μ میانگین کلی مشاهده ها است که از طریق نمونه ها با فرض صفر مورد بررسی قرار گرفتند، Rk نشان دهنده اثر بلوک k، Ti نشان دهنده اثر مکمل آزمایشی و Bj اثر زمان اندازه گیری j، TBij برهم کنش تیمار و زمان اندازه گیری و εbijk اشتباه آزمایش است و سطح معنی داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

۳. نتایج و بحث

با مقایسه میانگین داده ها، از نظر آماری تفاوت معنی داری بین غلظت مولیبدن سرم بزها قبل از مکمل سلنیوم مشاهده نشد،که ممکن است بدلیل مشابهت عوامل مدیریتی، محیطی و شرایط فیزیولوژیکی بز ها باشد.

در این مطالعه میزان مولیبدن سرم بزهای دریافت کننده مکمل های سلنیوم در زمان زایش نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی داری نشان داد ($P < ۰/۰۵$) (جدول ۱) و گروه های دریافت کننده سلنیوم کمترین مقدار مولیبدن را داشتند ($P < ۰/۰۵$). با این حال، همانطور که در جدول ۱ آورده شده است، ، میزان مولیبدن سرم بزغاله ها در روز تولد در گروه های دریافت کننده سلنیوم و گروه شاهد تفاوت معنی داری دیده نشد ($P > ۰/۰۵$). غلظت مولیبدن در آغوز نسبت به غلظت این عنصر در سرم مادران کمتر بود، اما نسبت به شیر، از مقادیر مولیبدن بیشتری برخوردار بود، با این حال، میزان مولیبدن آغوز منعکس کننده تغییرات میزان این عنصر در سرم مادران بود ($P < ۰/۰۵$). مقدار مولیبدن آغوز گروه های دریافت کننده سلنیوم به طور معنی داری نسبت به گروه شاهد کاهش نشان داد ($P < ۰/۰۵$). اگرچه بین گروه دریافت سلنیوم از لحاظ مقدار مولیبدن در سرم و آغوز تفاوت معنی داری وجود نداشت ($P > ۰/۰۵$).

جدول ۱: میانگین غلظت مولیبدن آغوز و سرم بزها و بزغاله ها (میکروگرم در لیتر)

غلظت مولیبدن	گروه شاهد	سلنیوم آلی	سلنیوم معدنی	نانو ذرات سلنیوم
سرم بز قبل از مکمل	۴۲/۷±۰۲/۳۷	۴۰/۸±۳۵/۴۴	۳۹/۷±۷۵/۹۹	۳۸/۷±۹۱/۱۵
سرم بز روز زایش	۴۰/۰۸ ± ۷/۱۵[a]	۲۰/۸۱ ± ۷/ ۴۳ [b]	۲۸/۶۱ ± ۹/۰۷[b]	۲۰/۶±۷۶/۳۸ [b]
آغوز	۱۸/۳±۶۷/۲۷ [a]	۱۱/۱۸ ۳±/۹۹ [b]	۱۳/۰۹ ۴±/۱۵ [b]	۱۱/۳±۳۲/۳۹ [b]
سرم بزغاله روز تولد	±۸۰/۴۴ ۳/۵۶	±۰۱/۴۲ ۴/۶۳	±۸۱/۴۰ ۳/۴۹	±۲۱/۴۴ ۴/۴۹

در هر ردیف میانگین ها با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار بودند($P < 0.05$).(± انحراف استاندارد)

غلظت مولیبدن سرم بزغاله ها تا چهار هفتگی تغییر معنی داری نداشت ($P > ۰/۰۵$) اما گروهی که مادران آن ها سلنیوم را به شکل معدنی دریافت کرده بود از لحاظ عددی کمترین میزان و گروه شاهد بیشترین میزان مولیبدن سرم در بزغاله ها تا چهارهفتگی را داشت (جدول ۲).

جدول ۲: میانگین محتوای مولیبدن بزغاله ها تا هفته چهارم (میکروگرم در لیتر)

غلظت مولیبدن	گروه شاهد	سلنیوم آلی	سلنیوم معدنی	نانو ذرات سلنیوم
هفته اول	۴۳/۵۱± ۳/۴۶	۴۰/۷۸± ۴/۵۱	۳۹/۶۲± ۳/۳۹	۴۲/۹۲± ۴/۳۶
هفته دوم	۴۱/۳۷±۳/۲۹	۳۸/۷۹±۴/۲۸	۳۷/۶۸±۳/۲۲	۴۰/۸۲±۴/۱۱
هفته سوم	۴۱/۸۴±۳/۳۵	۳۹/۲۲±۴/۳۳	۳۸/۱۱±۳/۳۱	۴۱/۲۸± ۴/۲۱
هفته چهارم	۴۰/۸۷±۳/۱۹	۳۷/۷۱±۴/۱۶	۳۶/۶۲±۳/۱۲	۳۹/۶۷±۳/۹۹
		P - values		
		تیمار	زمان	تیمار در زمان
		<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۸۱۷

در هر ردیف میانگین ها با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار بودند ($P < 0.05$).(± انحراف استاندارد)

بین گروه های آزمایشی از نظر میزان مولیبدن شیر در چهار هفته اول شیردهی تفاوت معنی داری دیده نشد ($P >$۰/۰۵) (جدول ۳).

جدول ۳: میانگین محتوای مولیبدن شیر بزها تا هفته چهارم (میکروگرم در لیتر)

غلظت مولیبدن	گروه شاهد	سلنیوم آلی	سلنیوم معدنی	نانو ذرات سلنیوم
هفته اول	۱۲/۸۱ ±۲/۲۵	۱۰/۱۹±۳/۶۴	۱۱/۹۲±۳/۷۸	۱۰/۰۶±۳/۰۷
هفته دوم	۱۲/۱۹±۲/۱۳	۱۰/۴۴±۳/۷۳	۱۲/۰۶±۳/۸۲	۱۰/۳۱±۳/۱۵
هفته سوم	۱۲/۳۳±۲/۰۱	۱۰/۵۵±۳/۶۳	۱۲/۲۰±۳/۹۱	۱۰/۴۲±۳/۱۹
هفته چهارم	۱۲/۰۱±۲/۷۴	۱۰/۴۲±۳/۲۳	۱۲/۶۱±۳/۸۲	۱۰/۰۵±۲/۹۶
		P - values		
		تیمار	زمان	تیمار در زمان
		<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	۰/۷۹۷

در هر ردیف میانگین ها با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار بودند($P < 0.05$).(± انحراف استاندارد)

در بررسی های انجام شده مطالعه ای که بر روی اثر سلنیوم یا اثر فرم های مختلف این عنصر بر میزان مولیبدن در حیوانات آبستن، میزان انتقال مادری و انتقال از طریق آغوز و شیر را مورد بررسی قرار داده باشند یافت نشد. مولیبدن یک عنصر ردیاب مهم و گهگاهی ضروری شناخته می شود. در حیوانات و انسان ها این عنصر بعنوان کوفاکتور آنزیم های اکسید از زانتین (که زانتین را با اسید اوره، اکسید می کند) و اکسید از آلدهید، عمل می کند. تقریباً ۷۵-۲۵ درصد مولیبدن موجود در رژیم غذایی توسط دستگاه هاضمه جذب شده و به سرعت توسط ادرار دفع می گردد. نیمه عمر بیولوژیک این عنصر برای انسان بدرستی تعیین نشده است، اما بیشتر مولیبدن جذب شده در طول چند روز یا هفته دفع می شود. داده های حیوانی نشان می دهند که متابولیسم ترکیبات مولیبدن با متابولیسم ترکیبات مس و گوگرد ارتباط تنگاتنگ دارند(Kojouri an Shirazi, 2007;Zhang et al 2011).

مطالعات و بررسی ها در چین رابطه بین میزان مرگ و میر ناشی از سرطان مری و محتوای مولیبدن، روی، منگنز، سیلیس، نیکل، آهن، بیموت و ید حبوبات و آب آشامیدنی را نشان داد. میزان مولیبدن موجود در سرم خون، مو و ادرار ساکنان مناطق پر خطر کمتر از مناطق، کم خطر بود. مدل های حیوانی که نشان دهنده اثر مولیبدن در سرطان زایی مری، معده و پستان می باشند در آزمایشگاه

ها ساخته شده اند. در رابطه با برهم کنش سلنیوم و مولیبدن چندین آنزیم دیده شده حاوی مولیبدن و تنگستن که حاوی سلنیوم هستند(Gladyshev, 2002; Wagener et al., 2009) و اخیرا مقاسیه رابطه ژنتیکی، یک رابطه کاربردی میان سلنیوم و مولیبدن در هر سه قلمرو حیات یافت شد (Zhang and Gladyshev, 2008) oxotransferases). سلنیوم به عنوان سلنوسیستئین در اگزاترانسفراز های حاوی مولیبدن در برخی پروکاریوت ها و یوکاریوت ها، موقعیت مولیبدن در جایگاه اکسید شده آنزیم را هماهنگ می کند(واگنر و همکاران ۲۰۰۹). با این حال آنزیم های دیگری نیز مانند خانواده هیدروکسیلاز مولیبدن حاوی یک سلنیوم ناپایدار(غیر سلنوسیستئین Zhang and Gladyshev, 2008; Wagener et al.,) در یک شکل ناشناخته است که برای فعالیتشان ضروری است. (هیدروکسیلاز ها نشان دهنده یک نوع از کاربردهای و فعالیت های منحصر به فرد سلنیوم در MoO(OH)Se). جایگاه فعال 2009 طبیعت است. بنابراین باید در نظر داشت که با توجه به اثر متقابل سه گانه مولیبدن، گوگرد و مس در زنجیره غدایی و همچنین در بدن موجودات ممکن است. از طرفی سنیوم بر میزان مس را ممکن است تحت تاثیر قرار داده (Moeini et al., 2011; Kachuee et al., 2013, 2019) و بر مقدار مولیبدن به طور غیر مستقیم تاثیر بگذارد. همچنین شباهت اکترونگاتیوی سلنیوم و گوگرد سبب می شود، سلناید یک عامل کاهیدن قوی تر سولفید است(Wagener et al., 2009.)

۴. نتیجه‌گیری

افزایش نیاز جنین وکاهش ماده خشک مصرفی توسط دام در اواخر آبستنی منجر به کمبود برخی مواد مغذی از جمله سلنیوم، مولیبدن در مادر و نوزاد آن می شود، بنابراین استفاده از مکمل سلنیوم در این دوره توسط بسیاری از محققین پیشنهاد شده است. مکمل سلنیوم با افزایش غلظت این مواد در خون و بهبود عملکرد ایمنی، نقش عمده ای در حفظ سلامت و مقاومت در برابر بیماری ها ایفا می کنند که احتمالا منجر به بهبود وضعیت تولید مثلی و افزایش تولید دام خواهد شد. مقدار مولیبدن در سرم بزهای گروه های آزمایشی کاهش پیدا کرد که این کاهش مولیبدن در سرم و آغوز همزمان بود و اما مقدار مولیبدن در سرم بزغاله ها در روز زایش و هفته اول تا چهارم بعد از زایش به طور معنی داری کاهش نیافت و همچنین مقدار مولیبدن در شیر در چهار هفته اول شیردهی کاهش معنی داری نشان نداد. شاید افزایش مقدار سلنیوم خوراک بزها سبب کاهش غلظت مولیبدن در سرم بزها و آغوز شد. بنابراین چنین می توان نتیجه گیری کرد که در دام های آبستنی که خوراک آن ها دارای سطوح بالای سلنیوم است، مقدار مولیبدن در این حیوانات باید کنترل شود.

سپاسگزاری

این تحقیق توسط دانشگاه محقق اردبیلی پشتیبانی شده است.

منابع

32. Gladyshev, V. N. 2002. Comparison of selenium-containing molybdoenzymes. Metal ions in biological systems .39 :655-672.
33. Harel, A., Häggblom, M.M., Falkowski, P.G. and Yee, N., 2016. Evolution of prokaryotic respiratory molybdoenzymes and the frequency of their genomic co-occurrence. FEMS microbiology ecology .92.
34. Kachuee, R., Abdi-Benemar, H., Mansoori, Y., Sánchez-Aparicio, P., Seifdavati, J., Elghandour, M.M., Guillén, R.J. and Salem, A.Z., 2019. Effects of sodium selenite, L-selenomethionine, and selenium nanoparticles during late pregnancy on selenium, zinc, copper, and iron concentrations in Khalkhali Goats and their kids. Biological trace element research, 191(2), 389-402.
35. Kachuee, R., Moeini, M.M. and Souri, M. 2013. The effect of dietary organic and inorganic selenium supplementation on serum Se, Cu, Fe and Zn status during the late pregnancy in Merghoz goats and their kids. Small Ruminant Research. 110:20-27.

36. Kojouri, G. A. and Shirazi, A. 2007. Serum Concentrations of Cu, Zn, Fe, Mo and Co in Newborn Lambs Following Systemic Administration of Vitamin E and Selenium to the Pregnant Ewes. Small Ruminants Research. 70: 136-139.
37. Moeini M. M., A.Kiani, H. Karami and E. Mikaeili .2011. The Effect of Selenium Administration on the Selenium, Copper, Iron and Zinc Status of Pregnant Heifers and Their Newborn Calves. Journal of Agricultor and Science Technology. 13: 53-59.
38. Surai, P. F. 2006. Selenium in ruminant nutrition. In: Selenium in Nutrition and Health. Nottingham University Press: Nottingham, United Kingdom. 487-561
39. Wagener, N., Pierik, A.J., Ibdah, A., Hille, R. and Dobbek, H., 2009. The Mo-Se active site of nicotinate dehydrogenase. Proceedings of the National Academy of Sciences .106 :11055-11060.
40. Zhang, Y. and Gladyshev, V.N. 2008. Molybdoproteomes and evolution of molybdenum utilization. Journal of molecular biology .379:881-899.
41. Zhang, Y., Rump, S. and Gladyshev, V.N. 2011. Comparative genomics and evolution of molybdenum utilization. Coordination chemistry reviews .255:1206-1217.

Introducing tannins and their nutritional effects for livestock

Mohsen Kazemi

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Animal Science, University of Torbat-e Jam, Torbat-e Jam, Iran

Corresponding Author Email address: phd1388@gmail.com

Abstract

Tannins are a group of water-soluble polyphenolic polymeric materials that have a high molecular weight with a large number of hydroxyphenyl groups, and they have a high capacity to form various complexes especially with proteins and at a low level with carbohydrates, metal ions, and amino acids. Tannins are extensively classified into two classes: hydrolysable and condensed tannins (although tannins are known which have components of both hydrolysable and condensed tannins), and are considered to have both adverse and beneficial effects depending on their concentration and nature besides other factors such as animal species, physiological state of the animal and diet composition. At the beginning of the discovery of tannins, they were considered as anti-nutritional substances, but recently, in many studies, it has been used as a chemically active substance to manipulate and improve the rumen fermentation parameters in some diets and has effects such as reducing ruminal protein degradability, bloating preventive and metanogenic activity inhibitor. The dietary inclusion of tannins has improved daily weight gain, increased wool growth, and improved reproductive performance in livestock. Tannins will affect the protein digestibility of diet via blocking access to the substrate, inhibiting enzymes, and directly affecting ruminal microorganisms. Due to the beneficial and constructive effects of tannins in ruminants, this article has been tried to review the structure of tannins and their effects on ruminants.

Keywords: Tannins, fermentation, protein, rumen, microorganisms

معرفی تانن‌ها و اثرات تغذیه‌ای آن‌ها برای دام

محسن کاظمی

استادیار گروه علوم دامی، مجتمع آموزش عالی تربت‌جام

ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: phd1388@gmail.com

چکیده

تانن‌ها، گروهی از مواد پلیمری پلی‌فنولیکی قابل حل در آب بوده که از وزن ملکولی بالایی برخوردار می‌باشند و با دارا بودن شمار زیادی از گروه‌های هیدروکسی فنیل، دارای ظرفیت تشکیل کمپلکس‌های متنوعی به‌ویژه با پروتئین‌ها و در مقادیر کمتر با کربوهیدرات‌ها، یون‌های فلزی و اسیدهای آمینه می‌باشند. در مجموع تانن‌ها به دو گروه اصلی شامل تانن‌های قابل هیدرولیز و تانن‌های متراکم (هر چند که تانن‌های شناسایی شده دارای هر دو گروه تانن متراکم و هیدرولیز شده می‌باشند) تقسیم می‌شوند که هم دارای اثرات سودمند و هم متغایر بوده و بخشی از این اثرات بستگی به غلظت تانن‌ها و ماهیت آن‌ها داشته و بخش دیگر بستگی به گونه‌های مختلف حیوانی، وضعیت فیزیولوژیکی حیوان و ترکیب جیره نیز دارد. در ابتدای کشف تانن‌ها، از آن‌ها به‌عنوان مواد ضدتغذیه‌ای یاد می‌شد، اما اخیراً در مطالعات بسیاری از آن‌ها به‌عنوان یک مادهٔ فعال شیمیایی در جهت دستکاری و بهبود فرآیند تخمیر شکمبه‌ای در برخی از جیره‌های دامی استفاده شده است و دارای اثراتی از قبیل کاهش نرخ تجزیه‌پذیری پروتئین شکمبه‌ای، جلوگیری از نفخ و ممانعت‌کنندهٔ فعالیت‌های متانوژنز می‌باشند. کاربرد تانن در جیره، سبب بهبود افزایش وزن روزانه، افزایش رشد پشم و بهبود عملکرد تولیدمثلی در دام‌ها شده است. تانن‌ها از طریق ممانعت دسترسی به سوبسترا، مهار آنزیم‌ها و تأثیر مستقیم بر میکروارگانیسم‌های شکمبه، اثرات خود را بر قابلیت هضم مواد مغذی خوراک به‌ویژه پروتئین می‌گذارند. با توجه به اثرات مفید و سازنده تانن در نشخوارکنندگان، در این مقاله سعی شده است تا ساختار تانن‌ها و تأثیر آن در نشخوارکنندگان بیشتر مورد بررسی قرار بگیرد.

واژگان کلیدی: تانن، تخمیر، پروتئین، شکمبه، میکروارگانیسم

1.مقدمه

تانن‌ها گروهی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی و از دسته فنول‌ها بوده که به‌طور وسیعی در میان درختان، درختچه‌ها و گیاهان خانواده لگومینه یافت می‌شود (مک لئود، ۱۹۷۴). به‌دلیل توانایی تانن‌ها در ایجاد کمپلکس با مواد مختلف از قبیل کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها، مواد معدنی، دیواره سلولی باکتری‌ها و آنزیم‌هایی که در هضم کربوهیدارت‌ها و پروتئین‌ها نقش دارند، تأثیر زیادی بر بهره‌وری مواد خوراکی در دام ها ایفا می‌کنند (ون سوئست، ۱۹۹۴؛ رید، ۱۹۹۵). تانن ها قادرند با پروتئین‌های موجود در محیط شکمبه ترکیب شده و در نهایت پروتئین‌ها را از تجزیه‌ی آنزیم‌های میکروبی محافظت نمایند، با این وجود، چگونگی واکنش تانن و پروتئین به ساختار پروتئین و نوع تانن مورد نظر، بستگی خواهد داشت. به‌نظر می‌رسد که بیشتر پروتئین‌های با وزن ملکولی

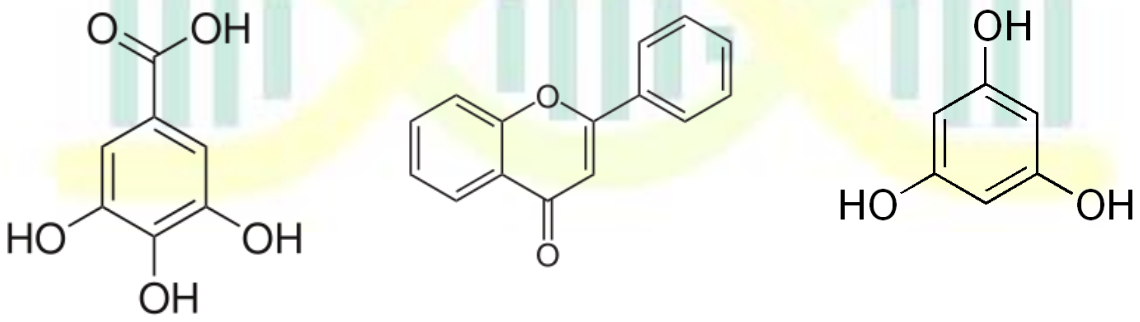
زیاد که سرشار از اسید آمینه پرولین هستند، قادرند با تانن‌ها پیوند قوی تشکیل دهند. تانن‌ها عمدتاً دارای یک گروه فنولی با خاصیت دهندگی قوی یون هیدروژن بوده که قادرند به‌راحتی با گروه‌های کربوکسیل موجود در پروتیین، پیوند برقرار کنند، به‌همین علت، تمایل تانن‌ها برای ایجاد پیوند با پروتیین‌ها نسبت به ملکول‌های نشاسته بیشتر می‌باشد. نتایج مطالعه‌ای نشان داده که استفاده از سطوح مناسب تانن‌ها از طریق کاهش نرخ تجزیه‌پذیری پروتئین و دآمیناسیون اسیدهای آمینه در شکمبه، موجب کاهش تولید آمونیاک شکمبه‌ای شده که متعاقباً نیتروژن اوره‌ای خون (BUN) و نیز دفع نیتروژن از طریق ادرار در حیوانات کاهش یافت (واگهرن و همکاران،۱۹۹۴) از طرفی تانن‌ها قادر به افزایش تولید پروتئین میکروبی در شکمبه بوده، به‌طوری‌که در بسیاری از موارد بهبود عملکرد تولیدی دام مثل تولید شیر با استفاده از خوراک‌های دارای تانن را مربوط به بهبود بازدهی سنتز پروتیین میکروبی می‌دانند (لارنس و همکاران،۱۹۷۴). همچنین تانن‌ها اثر خود را بر هضم کربوهیدرات‌ها بیشتر از طریق ممانعت از اتصال میکروارگانیسم‌ها و باند شدن با آنزیم‌های تجزیه کننده‌ی دیواره سلولی گذاشته و از آنجا که قدم اول در تجزیه مواد مغذی، اتصال به دیواره سلولی خوراک و متعاقباً هضم آن می‌باشد، در نتیجه کل مواد مغذی را تحت تأثیر قرار خواهد داد. مصرف تانن‌ها در مقادیر بالا، بر مصرف خوراک، قابلیت هضم و راندمان تولید حیوانات ممکن است اثرات منفی داشته به‌طوری‌که در غلظت‌های بالا نیز می‌توانند باعث کاهش دسترسی به برخی عناصر و در نهایت افت عملکرد حیوان شوند این اثرات به مقدار و نوع تانن مصرف شده و مقاومت حیوان به تانن بستگی دارد. در حالی‌که در صورت استفاده از تانن در سطوح پایین، جریان اسیدهای آمینه ضروری به‌ویژه متیونین از شکمبه به روده باریک افزایش می‌یابند (باری، ۱۹۸۵). با توجه به موارد ذکر شده، این مقاله با هدف بررسی بیشتر اثرات تانن‌ها در تغذیه نشخوارکنندگان، انجام شده است.

1-1-تانن و ساختار آن

تانن‌ها، گروه ناهمگنی از ترکیبات پلیمریک فنولی بوده که شامل ۱۶-۱۲ گروه فنلی و ۷-۵ حلقه آروماتیکی می‌باشند (لمی و همکاران، ۲۰۱۱). تانن، اولین بار توسط سگوییین برای توصیف مواد موجود در عصاره های گیاهی با هدف بکارگیری آن در صنایع تبدیل پوست حیوانات به چرم، تولید شد. تانن‌ها عمدتاً به شکل ترکیبات پلی‌فنولیک با وزن ملوکولی مختلف در گیاهان تولید می‌شوند. همچنین اصطلاح تانن از یک کلمه قدیمی آلمانی به‌نام *tanna* گرفته شده که بیشتر برای درخت بلوط کاربرد دارد. اصولاً تانن به گیاهان خاصیت دفاعی داده و آن‌ها را در مقابل انواع تنش‌ها از جمله شوری، خشکی، سرما و غیره محافظت می‌نماید به‌طوری‌که در برخی از موارد از آن‌ها به عنوان آفت‌کش گیاهان یاد می‌شود. وجود تانن‌ها در برخی از میوه‌ها باعث شده که اگر به صورت نارس مصرف شوند، باعث جمع شدن و چروکیده شدن بافت مخاطی درون دهان به‌صورت لحظه‌ای شوند. سه گروه از تانن‌ها به‌طور عمده شناسایی شده‌اند که شامل تانن‌های قابل هیدرولیز، تانن‌های متراکم و فلوروتانن‌ها می‌باشند. تانن‌های قابل هیدرولیز، اغلب دارای یک هسته کربوهیدراتی (غالباً گلوکز) استریفیه شده با اسید گالیک و یا اسید الاژیک بوده ولی تانن‌های متراکم، یکسری ترکیبات اولیگومری یا پلیمری از واحدهای فلاوانول (فلاوان-۳-الز) بوده که عموماً از طریق پیوندهای کربن-کربن در موقعیت‌های ۴/۶ یا ۴/۸ با یکدیگر اتصال برقرار می‌کنند. تانن‌های متراکم در برخی موارد تحت عنوان پروآنتوسیانین نیز معروف بوده به این خاطر که در شرایط اسیدی، این گروه از تانن‌ها می‌توانند اکسید شوند هر چند که در شرایط معتدل یا بی‌هوازی، پلیمرهای موجود در تانن‌های متراکم پایدار خواهند ماند. ساختار تانن‌های متراکم متنوع بوده و عملکرد آن‌ها، بستگی به ماهیت واحدهای سازنده آن و موقعیت اتصال واحدهای منومری آن‌ها دارد. وجود واحدهای منومری متنوع از قبیل کاتچین، اپیکاتچین، گالوکاتچین و اپیگالوکاتچین منجر به تولید گروه‌های مختلفی از پلیمرها در ساختمان این گروه از تانن‌ها می‌شود. تانن‌های قابل هیدرولیز نسبت به نوع متراکمش،

از حلالیت بیشتری در آب و وزن ملکولی پایین‌تری برخوردار بوده و نیز نسبت به هیدرولیزهای آنزیمی و غیرآنزیمی نیز حساستر می‌باشند (سیلانیکو و همکاران، ۲۰۰۱). تانن‌ها در بسیاری از فرآورده‌های غذایی و خوراک دام به‌وفور یافت می‌شوند که از آن‌جمله می‌توان به سورگوم، ارزن، نخود، لوبیا، باقلای خشک، جو و انواع مختلفی از میوه‌ها از قبیل انگور، خرما، خرمالو، سیب، موز، توت سیاه و غیره اشاره نمود (سالونخی و همکاران، ۱۹۸۲). تانن‌ها تقریبا در ۸۰ درصد گیاهان دو لپه‌ای چوبی و ۱۵ درصد انواع گیاهان دو لپه‌ای علوفه‌ای نیز یافت می‌شود (مولر، ۱۹۹۹). دامنه‌ی طبیعی تانن موجود در بافت‌های گیاهی معادل ۵-۲ درصد وزن as fed گیاه را عمدتاً شامل می‌گردد (وار و همکاران، ۲۰۱۲). سنتز تانن در گیاهان، عمدتاً ممکن است تحت تأثیر تنش‌های آبی ناشی از قرار گرفتن در معرض اشعه ماورا بنفش خورشید، تنش هیدریکی، درجه حرارت، ازن و فراهمی برخی از مواد مغذی، تحریک شود (تروتر، ۲۰۰۶). تانن‌های قابل هیدرولیز تنها در گیاهان دولپه‌ای یافت می‌شوند ولی تانن‌های متراکم هم در نهاندانگان و هم در بازدانگان یافت می‌شوند (سیلانیکو و همکاران، ۲۰۰۱). گزارشات متعددی در خصوص اثرات محیطی و فصلی بر تولید تانن در گیاهان گزارش شده است. به‌طور خلاصه، درجه حرارت بالا، استرس آبی، شدت نور زیاد و کیفیت پایین خاک باعث افزایش تانن موجود در گیاهان می شود. در طی رشد که گیاه مقدار زیادی توده زنده تولید می کند، منابع اندکی برای سنتز ترکیبات فنولیک در دسترس است، با این وجود، در طی گلدهی، هنگامی‌که که رشد گیاه کاهش می‌یابد، کربن اضافی برای سنتز تانن مورد استفاده قرار می‌گیرد (فروتوز و همکاران، ۲۰۰۴). هر دو نوع تانن های قابل هیدرولیز و متراکم، به طور گسترده‌ای در طبیعت وجود دارند. تانن‌های قابل هیدرولیز غالباً از برگ‌ها و میوه استخراج شده و تانن‌های متراکم از پوست و مغز چوب استخراج می‌شوند (فروتوز و همکاران، ۲۰۰۴). بهترین راه شناخت تانن در مواد خوراکی مزه قابض کننده آن در دهان است که از طریق رسوب گلایکوپروتئین‌های بزاق صورت می‌گیرد (مک لئود، ۱۹۷۴). تانن‌ها عمدتاً در لایه خارجی (لایه اپیدرمی) برگ های گیاهان وجود دارند. به‌نظر می‌رسد نقش اصلی تانن در برگ گیاهان، کاهش میزان خوشخوراکی بوده تا در حقیقت نوعی سیستم محافظتی را در مقابل عوامل مهاجم و حشرات به‌نمایش بگذارد. تانن در دانه‌ها بین پوست و لایه خارجی آندوسپرم قرار داشته که این موضوع، باعث افزایش ماندگاری دانه در هنگام خواب زمستانی و همچنین بلد شدن نقش ضد باکتریایی دانه می‌گردد (ون سوست، ۱۹۹۴).

شکل ۱: ساختمان سه گروه از تانن‌ها



تانن‌های قابل هیدرولیز　　تانن‌های متراکم　　فلوروتانن‌ها

1-2-تانن در جیره نشخوارکنندگان

تانن‌ها دارای اثرات مثبت و منفی در جیره نشخوارکنندگان بوده به‌طوری‌که این اثرات بستگی به ساختار شیمیایی آن‌ها، غلظت تانن در جیره، ترکیب جیرهٔ پایه و سایر فاکتورهای درونی مرتبط با حیوان و شرایط فیزیولوژیکی حیوان دارد (پیلوزا و همکاران، ۲۰۱۴). اثرات متغایر تانن‌ها شامل کاهش مصرف خوراک، کاهش قابلیت هضم فیبر و نیتروژن و در نهایت کاهش عملکرد حیوان می‌باشد (ماکار و همکاران، ۲۰۰۷؛ واگهورن، ۲۰۰۸). در عوض، تانن‌ها ممکن است باعث جلوگیری از ایجاد نفخ، افزایش عملکرد دام، رشد پشم و تولید شیر گردند (پیلوزا و همکاران، ۲۰۱۴). همچنین بعضی از مطالعات نشان داده که تانن‌ها فعالیت آنتی اکسیدانی داشته و وضعیت آنتی اکسیدانی بدن حیوانات را بهبود می‌بخشند (لوپز و همکاران، ۲۰۱۳). نتایج برخی از مطالعات نیز نشان داده که مصرف گیاهان دارای تانن، باعث بهبود سطح کیفی و سلامت اسیدهای چرب موجود در گوشت نشخوارکنندگان و بهبود ماندگاری گوشت در برابر اکسید شدن می‌گردد. برای مدت‌های مدیدی از تانن به‌عنوان یک ترکیب سمی و غیرتغذیه‌ای یاد می‌شد از این‌رو که باعث کاهش مصرف خوراک، کاهش هضم و جذب پروتیین‌ها شده و نیز باعث ایجاد زخم معده، خراش موکوس دیواره روده باریک، ایجاد زخم در کبد و کلیه و در نهایت مرگ می‌گردند (مولر، ۲۰۰۶). بیشترین آسیب بافت‌ها (زخمهای کبدی و کلیوی و در نهایت مرگ) مربوط به تانن‌های قابل هیدرولیز بوده به‌طوری‌که این نوع تانن‌ها پس از مصرف تحت تأثیر تجزیه آنزیمی میکروارگانیسم‌های موجود در شکمبه قرار گرفته و در آنجا اتصالات بین گلوکز و زیرواحدهای فنولیکی شکسته شده و در نتیجه آن اسید گالیک به محیط شکمبه رها یافته که این اسید متعاقباً به پیروگالول و رزورسینول تبدیل شده و این مواد جذب بدن شده و همین دو ماده عواقب و آسیب‌های بعدی را برای بدن به ویژه بافت‌های کبدی و کلیوی به بار خواهند آورد (موردیاتی و همکاران، ۱۹۹۲). در گاو و گوسفند و لاما، چندین مورد از مسمومیت حاد در ارتباط با مصرف مقادیر زیادی از تانن‌های قابل هیدرولیز موجود درگیاهان بلوط به اثبات رسیده است (گارگ و همکاران، ۱۹۹۲). گزارش شده است که تانن‌های متراکم بدون اینکه در شکمبه تجزیه شوند، وارد جریان خون شده و در اغلب موارد احتمال آسیب رساندن به بافت‌های بدن در اثر مصرف این نوع از تانن‌ها کمتر می‌باشد (ماکار، ۲۰۰۳). بر طبق گزارشات ماکار (۲۰۰۳) تنها اندامی که از تانن‌های متراکم دچار آسیب می‌گردد، سلول‌های روده باریک آن‌هم در زمان انتقال اینگونه تانن‌ها به جریان خون می‌باشند. اثرات منفی تانن‌های متراکم در جیره بیشتر به‌خاطر اثرات ضدتغذیه‌ای آن‌ها در کاهش مصرف خوراک و قابلیت هضم پروتیین‌ها و کربوهیدرات‌ها بوده و ممانعت از فعالیت آنزیمی میکروارگانیسم‌ها، نیز از اثرات منفی تانن‌های متراکم محسوب می‌گردد (ییسهاک و همکاران، ۲۰۱۴). تانن‌ها عمدتاً توانایی باند شدن با پروتیین‌ها و در حد کمتر با پلی‌ساکاریدها، اسیدهای نوکلئیک و برخی از یون‌های فلزی را دارا می‌باشند. مهمترین جنبه منفی تانن‌ها، باند شدن پروتیین‌ها در ساختمان آن‌ها می‌باشد (هاگرمن و بوتلر، ۱۹۸۱). کمپلکس‌های تشکیل شده بین تانن‌ها و پروتیین‌ها، بسته به نوع پیوندشان، می‌تواند برگشت پذیر و یا برگشت ناپذیر باشند، اگر نوع پیوند بین پروتیین و تانن غیرکووالانسی باشد (مثل پیوندهای هیدروژنی و یا واندروالسی) این کمپلکس برگشت‌پذیر خواهد بود اما اگر این پیوند از نوع کووالانسی باشد، واکنش برگشت ناپذیر خواهد بود (هاگرمن، ۱۹۸۹). ارتباط بین پروتیین و تانن‌ها، تحت تأثیر غلظت نسبی پروتیین‌ها و تانن موجود در محیط شکمبه، ساختار تانن، ترکیب اسیدهای آمینه موجود در پروتیین‌ها و pH محیط شکمبه خواهد بود. تانن‌هایی که از وزن ملکولی و انعطاف‌پذیری بالا و قدرت جذب کم آب برخوردار باشند، توانایی بیشتری برای جذب پروتیین‌ها خواهند داشت. pH موجود در محیط شکمبه، یک نقش اساسی را در برقراری پیوند بین پروتیین و تانن ایفا خواهد نمود به‌طوری‌که متعادلترین pH برای رسیدن به حداکثر پیوند بین تانن و پروتیین‌ها، pH نزدیک به ایزوالکترولیک پروتیین‌ها می‌باشد. بنابراین تانن‌ها از طریق تشکیل کمپلکس‌های غیرقابل هضم، باعث کاهش نرخ turn over شکمبه‌ای و قابلیت هضم مواد مغذی موجود در خوراک شده که متعاقباً کاهش مصرف خوراک را به‌دنبال خواهد داشت (ماکار، ۲۰۰۳). تانن ها به علت عدم خوشخوراکی یا کاهش هضم مواد مغذی، معمولا باعث کاهش

مصرف خوراک می شوند. دارای خاصیت قابض می باشند که می تواند باعث افزایش ترشح بزاق و همچنین کاهش خوشخوراکی شود (رید و همکاران،۱۹۹۰). اما کاهش در چرخش مواد و نرخ عبور مهمتر از خوشخوراکی است کاهش حجم ماده خشک در شکمبه باعث اختلال در تخلیه دستگاه گوارش می شود، سیگنالهای بوجود آمده در مورد پر بودن دستگاه گوارش به مراکز عصبی کنترل کننده مصرف خوراک فرستاده می شوند (واگهرن و همکاران،۱۹۹۴). غلظت بالای تانن به دلایلی می تواند مصرف خوراک را کاهش دهد (کومار و یتیاناتان،۱۹۹۰) که از آنجمله می‌توان به الف) کاهش خوشخوراکی به علت طعم گس تانن، که بدلیل تشکیل کمپلکس بین تانن و گلیکوپروتئین های بزاق ایجاد می شود. ب) اتصال تانن به پروتئین های بزاقی و موکوسی ج) نفخ فیزیکی شکمبه به علت کاهش هضم ماده خشک و ج) تغییر پاسخ هورمونی (کوله سیستو کینین) در اثر تانن باند شده به دیواره معده اشاره نمود. شیوه مصرف علوفه ممکن است اثرات تانن بر مصرف خوراک را تحت تاثیر قرار دهد. تحقیقات انجام شده نشان می دهد، مصرف علوفه های تانن دار به صورت خشک باعث افزایش مصرف نسبت به علوفه های تازه شده است زیرا خشک کردن باعث پلی مریزاسیون تانن ها شده و گروههای هیدروکسیل کمتری برای باند شدن با پروتئین ها باقی می ماند (کومار و ویتیا ناتان،۱۹۹۰). مطالعات نشان داده است استفاده از ترکیبات باندکننده تانن مثل پلی‌اتیلن گلیکول باعث افزایش مصرف علوفه‌های تانن‌دار می‌شود (سیلناکو و همکاران، ۲۰۰۱). نشاسته موجود در محیط شکمبه دارای قابلیت تشکیل فضای آبگریز بوده که باعث تشکیل کمپلکس با تانن و سایر ترکیبات چربی‌دوست می‌شود. تنها نشاسته در بین مولکول‌های واکنش‌دهنده با تانن دارای چنین خاصیتی می‌باشد. در مورد تداخل کربوهیدرات‌های دیواره سلولی و تانن مطالعات کمی صورت گرفته است، ولی تصور می‌شود واکنش بین اجزاء دیواره سلولی (سلولز و همی سلولز) و تانن مشابه واکنش آن‌ها با لیگنین باشد (هاگرمن و باتلر، ۱۹۸۱). بارهونا و همکاران (۱۹۹۷) گزارش کردند که قابلیت هضم و مصرف خوراک دو نوع لگوم استوایی تحت تأثیر مقدار تانن متراکم قابل استخراج و مقدار ترکیبات دیواره سلولی قرار می‌گیرد. در حضور پروآنتوسیانیدین‌های موجود در گیاه لوتوس، جریان اسیدهای آمینه ضروری به شکمبه و جذب ظاهری ترئونین، والین، هیستیدین، لیزین، تیروزین و فنیل‌آلانین بهبود یافت (واگهرن و همکاران،۱۹۸۷). آزمایشاتی نیز افزایش جذب متیونین و بهره وری از سیستین را در گوسفندان اثبات می‌نماید (مک نب و همکاران،۱۹۹۳). تانن‌ها علاوه بر تداخل با متابولیسم پروتئین‌ها و کربو هیدرات‌ها می‌توانند باعث کاهش قابلیت دسترسی حیوان به مواد معدنی شوند. بیشتر تحقیقات در ارتباط با اثرات متقابل بین تانن‌ها و مواد معدنی بر روی تک معده‌ای‌ها انجام شده است و اطلاعات اندکی در مورد نشخوارکنندگان وجود دارد ولی به‌نظر می‌رسد تانن می‌تواند روی تعادل سولفور نقش داشته باشد زیرا اسیدهای آمینه گوگرددار به‌خصوص متیونین نقش مهمی در سم‌زدایی اسید تانیک موجود در جیره طیور دارند (فولر و همکاران، ۱۹۶۷). پاریچارد و همکاران (۱۹۹۲) نشان دادند، مصرف علوفه مولگا که حاوی سطوح بالای تانن می‌باشد باعث ایجاد علائم کمبود گوگرد، نیتروژن و همچنین کاهش تولید و مصرف خوراک در گوسفند شد. ولی استفاده از مکمل نیتروژن و گوگرد و همچنین تجویز روزانه ۲۴ گرم پلی‌اتیلن‌گلیگول در آزمایش فوق، باعث افزایش مصرف ماده خشک، وزن بدن و رشد پشم شد. اثر تانن روی میکروارگانیسم‌های شکمبه ممکن است به میزان مواد مغذی قابل دسترس در علوفه‌های حاوی تانن بستگی داشته باشد (بروکر و همکاران، ۲۰۰۰). اسکالبرت (۱۹۹۱) سه مکانیسم برای اثر سمی تانن بر میکروارگانیسم‌های شکمبه عنوان کرده است که شامل مهار سوبسترا و یا آنزیم، اثر روی غشای باکتری و مهار یون‌های ضروری می‌باشد که باعث اختلال در عمل میکروارگانیسم‌ها می‌گردد. مهار سوبسترا به‌علت تمایل تانن‌ها به تشکیل کمپلکس با کربو هیدرات‌ها به‌خصوص سلولز بوده که سوبسترای اصلی باکتری‌ها محسوب می‌گردد. ممانعت آنزیمی به‌علت تداخل پروتئین-تانن می‌باشد. همچنین به برخی مکانیسم‌های تدافعی میکروبی در برابر تانن‌ها می‌توان به ترشح پلی‌ساکاریدهای باند شونده با تانن و یا سنتز آنزیم های مقاوم در برابر تانن اشاره نمود. سلول‌های فیبرو باکتر سوکسینوژنز درحضور تانن متراکم رشد کرده و آنزیم‌های میکروبی که استرهای گالوئیل را هیدرولیز می‌کنند، در شکمبه حضور دارند. باکتری *Eubacterium oxidoreducens*، ملکول‌هایی همچون گالات،

فلورگلوسینول و پیروگالول را در حضور هیدروژن و اسید فرمیک به استات و بوتیرات تجزیه می‌کند (کراملز و همکاران، ۱۹۸۶). همچنین سویه *Selenomonas ruminantium* دارای فعالیت تانن-آسیل هیدرولازی می‌باشند (بروکر و همکاران، ۲۰۰۰). از شکمبه بز وحشی سویه‌ی مقاومی تحت عنوان *Streptococcus galloyticus* را جدا کرده‌اند که در برابر اسید تانیک مقاوم می‌باشد. دناوان و همکاران (۲۰۰۱) دو مکانیسم سازگاری باکتری‌ها در مقابل تانن را بیان کرده‌اند که شامل فعالیت آنزیمی گالات دکربوکسیلاز و ترشح پلی ساکاریدهای خارج سلولی می‌باشد. به‌طورکلی به‌نظر می‌رسد تانن‌های آزاد اثر کمتری بر میکروارگانیسم‌های شکمبه دارند زیرا این دسته از تانن‌ها در pH شکمبه با ترکیباتی مثل پلی ساکاریدها، پروتئین‌ها و مواد معدنی واکنش می‌دهند. اگر چه تانن‌ها باعث کاهش قابلیت دسترسی مواد مغذی می‌شوند ولی هر دو نوع تانن متراکم و قابل هیدرولیز نقش تعدیل کننده بر بازدهی سنتز پروتئین میکروبی داشته، به‌طوری‌که پروتئین را از تجزیه شکمبه‌ای حفظ نموده و آن‌ها را برای استفاده کارآمدتر به قسمت‌های دیگر دستگاه گوارش (مثل روده باریک) ارسال می‌نماید. کاهش در نرخ تجزیه‌پذیری خوراک توسط تانن به همزمانی آزاد شدن مواد غذایی کمک کرده و این مسأله می‌تواند مسئول افزایش بازدهی سنتز پروتیین میکروبی باشد. گزارشات نشان می‌دهد که هنگام مصرف علوفه‌های حاوی تانن، میزان نیتروژن غیرآمونیاکی وارد شده به روده باریک بیشتر از نیتروژن مصرفی بوده، که بخشی از آن را به افزایش تولید پروتئین میکروبی ارتباط می‌دهند. در مطالعه‌ای آزمایشگاهی، در اثر افزودن تانن به محیط کشت، تولید پروپیونات افزایش و شمار پروتوزوآ کاهش یافته اما در آزمایش انجام شده بر روی حیوان زنده، شمار پروتوزوآها و سهم مولی VFA تغییر معنی‌داری پیدا نکرد (واگهورن و همکاران، ۱۹۹۴). نتایج حاکی از آنست‌که مقدار کم تانن در جیره ممکن است باعث افزایش راندمان تولید پروتئین میکروبی گردد. فرضیه‌ای وجود دارد که نشان می‌دهد تانن‌ها ممکن است باعث افزایش راندمان بازچرخ نیتروژن در شکمبه شوند. تانن‌ها باز طریق کاهش نرخ تجزیه پروتئین و دآمیناسیون اسیدهای آمینه در شکمبه باعث کاهش غلظت آمونیاک شکمبه می شوند، این مسئله باعث کاهش نیتروژن اوره‌ای پلاسمای خون می‌شود. کاهش نیتروژن اوره‌ای پلاسما به‌مفهوم کاهش دفع ادراری نیتروژن و اتلاف کمتر نیتروژن در بدن خواهد بود. از آنجایی تانن‌ها باعث افزایش ترشح محتوای گلیگوپروتئین‌های بزاق می‌شوند، مقادیر بیشتری از نیتروژن بازچرخ می‌شود (رید و همکاران، ۱۹۹۰). واگهورن و همکاران (۱۹۹۴) گزارش کردند گوسفندانی که از جیره خالص حاوی علوفه لوتس استفاده کردند دارای غلظت کمتر اوره پلاسما بودند ولی در گوسفندانی که پلی اتیلن گلایکول دریافت کرده بودند این اثرات مشاهده نشد، زیرا پلی اتیلن گلایکول قادر به جذب تانن‌ها می‌باشد. تحقیقات نشان داده که مصرف علوفه‌های حاوی تانن متراکم می‌تواند از بروز نفخ جلوگیری کند. در حقیقت علت اصلی نفخ، باقی‌ماندن گازهای حاصل از تخمیر در کف‌های پایدار شکمبه بوده به‌طوری‌که پروتئین‌های محلول در برگ نقش اصلی در تشکیل کف را بازی می‌کنند. عدم وقوع نفخ احتمالاً به‌خاطر رسوب پروتئین‌های محلول توسط تانن می‌باشد. حداقل تانن متراکم برای جلوگیری از نفخ ۰/۱ تا ۰/۵ درصد ماده خشک جیره می باشد. مصرف ۱۷ درصد تانن متراکم در ماده خشک از بروز نفخ در گاوهایی که از یونجه تازه استفاده می‌کردند جلوگیری کرد، همچنین جایگزینی یونجه تازه با ۱۵ـ۱۰ درصد علوفه سینفوین (*Sainfoin*) باعث کاهش بروز نفخ در گاوها شد و میزان پروتئین محلول در مایع شکمبه گاوهایی که سینفوین استفاده می‌کردند کمتر بود (مک‌ماهون و همکاران، ۱۹۹۹). تجزیه میکروبی یکی از روش‌های سازگاری نشخوارکنندگان با تانن در شکمبه می‌باشد. تانن و سایر ترکیبات فنولی ساده هنگام عبور از شکمبه توسط میکروارگانیسم‌ها مورد تجزیه میکروبی قرار می‌گیرند. به‌عنوان مثال در اثر متابولیسم گلوکوسیدهای فنولیک مثل روتین، نارینجین و فلاوونوئیدها در شکمبه، حلقه‌های فنولی تشکیل می‌گردد. گزارش شده است که محصول تجزیه فلاوونوئیدها در شکمبه شامل استات، بوتیرات، دی و منوهیدروکسی فنول می‌باشد. اگرچه فلاوونوئیدهای موجود در گیاهان به سرعت در شکمبه ناپدید می‌شوند ولی در مورد تجزیه فلاوان ـ۳ـ اُلز که واحد تشکیل‌دهنده تانن متراکم می‌باشد اطلاعات کمی وجود دارد. فنول‌های ساده و قابل هیدرولیز به‌وسیله گونه‌های استرپتوکوکوس و سلمونوموناس رومینانتیوم هیدرولیز شده و در نهایت متابولیت‌های اسید

گالیک و الاجیک اسید را تولید خواهند نمود. اسید گالیک در مرحله بعد دکربوکسیله شده و تبدیل به فنول‌های ساده مثل پاراکوماریک اسید و فرولیک می‌شود. تجزیه تانن متراکم در شرایط بی‌هوازی بعید به‌نظر می‌رسد، اما در شرایط تخمیر مصنوعی ظرف مدت ۷ روز این نوع تانن‌ها تجزیه شدند (ماکار، ۲۰۰۳). پروآنتوسیانیدین‌ها در سطوح بالا جذب نمی‌شوند، اما ممکن است بر لایه مخاطی ناحیه هضمی تأثیر گذاشته و جذب سایر مواد مغذی و اسیدهای آمینه های ضروری را کاهش دهند که مهمترین آنها متیونین و لیزین می‌باشند.کاهش دسترسی متیونین می‌تواند مسمویت ترکیباتی چون گلیکوزیدهای سیانوژنیک را افزایش دهد، زیرا متیونین در متیلاسیون سیانید به تیوسیانات مشارکت دارد. به‌نظر می‌رسد توانایی مقابله با تانن قابل هیدرولیز از طریق تخمیر در شکمبه به‌طور گسترده در بین نشخوارکنندگان بسط و توسعه یافته، ولی مکانیسم مقابله با تانن متراکم هنوز به‌صورت واضح، مشخص نشده است. در شرایط تخریب رودۀ باریک در اثر مصرف مقادیر بالای تانن یا دیگر عوامل محرک غشاء رودۀ باریک، تانن‌های متراکم نیز به خون جذب شده و موجب تخریب اندام‌ها همانند تانن‌های قابل هیدرولیز می‌شوند. بهبود تولید پشم پس از تزریق شیردانی پروپیلن گلایکول، اهمیت پس از شکمبه‌ای تانن را نشان داد. حیواناتی که به‌طور معمول از جیره‌های حاوی تانن تغذیه می‌شوند، مکانیسم‌های دفاعی خود را در برابر تانن افزایش می‌دهند. اگرچه برخی میکرواورگانیسم‌ها به سطوح بالای تانن متراکم در شکمبه مقاوم اند، اما شواهدی مبنی بر تجزیه تانن متراکم توسط میکرواورگانیسم‌ها در شکمبه و مدفوع وجود ندارد. میکروب‌های مقاوم، احتمالاً برخی مکانیسم‌های سازگاری با تانن را دارا بوده که آن‌ها را قادر به تجزیۀ سریعتر تانن‌های قابل هیدرولیز و یا کاهش فعالیت آن‌ها از طریق متیلاسیون گروه‌های هیدروکسی فنولیک می‌کند و این میکروب‌ها احتمالاً قادر به فعالیت پر بازده درغلظت‌های بالای تانن هستند. تحمل سطوح بالای تانن ممکن است از طریق حفظ پروتئین‌های کلیدی غشاء با رویکرد توسعۀ چربی‌های غشایی باشد، همچنین ترشح پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی که میل ترکیبی بالا به تانن دارند و یا شکل‌گیری گلیکوپروتئین‌ها در سطح غشاء نیز در اثر مواجهه با تانن‌ها مشاهده شده است. از مکانیسم‌های بسیار مهم بدن، شبکۀ سم‌زدایی کبد است که با حضور مواد فنولیک سبک وزن تحریک می‌شود. اما تانن‌های متراکم درشت مولکول که بعید به‌نظر می‌رسد جذب و به سلول‌ها منتقل شوند، در فعال کردن این شبکه و آداپتاسیون حیوان نقش ایفا نمی‌کنند. (دناوان و همکاران، ۲۰۰۱). قدرت تحمل نشخوارکنندگان نسبت به تانن موجود در جیره به‌ویژه تانن‌های قابل هیدرولیز بالاتر از تک معده‌ای‌هایی همچون طیور می‌باشد. افزایش سطح تانن جیره به حدود ۵-۰/۲ درصد جیره، منجر به کاهش رشد و تولید تخم مرغ شده و مصرف سطوح ۷-۳ درصد آن سبب افزایش مرگ و میر در طیور می‌گردد. نتایج مطالعات نشان داده که تانن‌ها قادر به جذب اسیدهای آمینه ضروری از قبیل متیونین و در نهایت کاهش رشد حیوان می‌باشد (باتلر و همکاران،۱۹۸۶). مصرف تانن متراکم به مقدار ۲ درصد ماده خشک در غذای ماهیان کپوری که به مدت ۸۴ روز تغذیه می‌شدند، تأثیری بر رشد و کیفیت لاشه آن‌ها نداشته اما مصرف اسید تانیک به همین مقدار، منجر به بروز اثرات منفی در این ماهیان شد (بکر و ماکار، ۱۹۹۹). مصرف جیره‌های حاوی ۲۵ درصد کنجالۀ بلوط در مرغان تخمگذار، سبب تولید تخم مرغ‌هایی با زردۀ رنگی و قابلیت تفریخ پایین شد. تانن‌ها بسته به غلظت و نوع آنها در جیره می‌توانند مفید یا زیانبار برای نشخوارکنندگان باشند. به‌نظر می‌رسد مصرف بیش از ۶ درصد تانن در جیره حیوانات نشخوارکننده خطرناک باشد (سالار موئینی و فولادی، ۲۰۰۵). سطح تانن بیش از ۵ درصد مادۀ خشک از طرفی موجب کاهش خوشخوراکی جیره و قابلیت هضم شده و از طرفی از فعالیت آنزیم‌های گوارشی ممانعت کند و برای میکرواورگانیسم‌های شکمبه سمی باشد و نیز دسترسی آهن و سولفور را محدود سازد (کومار و یتیاناتان،۱۹۹۰). تغییرات در پروفایل اسیدهای چرب لاشه و شیر دامهای تغذیه شده با سطوح مختلف تانن، توسط محققان بسیاری بویژه برای اسیدهای پرب غیراشباع با چند پیوند مضاعف (عمدتاً لینولنیک اسید)، رومنیک اسید، واکسینیک اسید و ترانس ۱۸:۱ گزارش شده است (مورالز و آنگرفلد، ۲۰۱۵).

2.نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که سطوح متوسط تانن‌ها بویژه تانن‌های متراکم موجود در علوفه‌ها می‌تواند برای بهبود بازدهی مصرف نیتروژن در نشخوارکنندگان مفید باشند. در برخی از مطالعات، تانن‌های متراکم باعث بهبود رشد پشم، تولید شیر و یا درصد بره‌زایی در گاوها و گوسفندان چراکننده در مراتع دارای گیاه *L. corniculatus* شده است. همچنین در صورت استفادهٔ ناکافی از نیتروژن در جیره نشخوارکنندگان، برای بالاتر بردن بازدهی نیتروژن مصرفی، بایستی استفاده از مواد علوفه‌ای تانن‌دار (بویژه تانن‌های متراکم) در برنامه تغذیه‌ای آن‌ها در نظر گرفته شود تا از این طریق فعالیت پروتئولیزی میکروارگانیسم‌های شکمبه‌ای کاهش یافته و در نهایت راندمان مصرف نیتروژن و متعاقباً عملکرد دام‌های نشخوارکننده بهبود یابد.

منابع

16. Barahona R., Lascano C.E., Cochran R., Morrill J. and Titgemeyer E.C. 1997. Intake, Digestion, and Nitrogen Utilization by Sheep Fed Tropical Legumes with Contrasting Tannin Concentration and Astringency. Journal of Animal Science, 75:1633-1640.
17. Becker K. and Makkar H.P.S. 1999. Effects of dietary tannic acid and quebracho tannin on growth performance and metabolic rates of common carp *Cyprinus carpio* L. Aquaculture. 175: 327–335.
18. Brooker, J.D., O'Donovan L., Skene I. and Sellick G. 2000. Mechanisms of tannin resistance and detoxification in the rumen. In: Brooker, J.D. (Ed.), Tannins in Livestock and Human Nutrition. ACIAR Proceedings No. 92: 117–122.
19. Butler L.G., Rogler J.C., Mehansho H. and Carlson D.M. 1986. Dietary effects of tannins. Plant Flavanoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships. P 141. Alan R. Liss, NY.
20. Donovan O. and Brooker J.D. 2001. Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (S. *caprinus*) and *Streptococcus bovis*. Microbiology, 147: 1025–1033.
21. Donovan O. and Brooker J.D. 2001. Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (S. *caprinus*) and *Streptococcus bovis*. Microbiology. 147: 1025–1033.
22. Frutos P., Hervas G., Giraldez F.J. and Mantecon A.R. 2004. Review. Tannins and ruminant nutrition. Spanish Journal of Agricultural Research, 2(2): 191-20.
23. Fuller H.L., Chang S.I. and petter D.K. 1967. Detoxification of dietary tannic acid. The Journal of Nutrition, 91: 477-481.
24. Garg S.K., Makkar H.P.S., Nagal K.B., Sharma S.K., Wadhwa D.R. and Singh B., 1992. Oak (*Quercus incana*) leaf poisoning in cattle. Veterinary and Human Toxicology, 34: 161-164.
25. Hagerman A.E. 1989. Chemistry of tannin-protein complexation., In: Chemistry and Significance of Condensed Tannins. Hemingway, R. W., Karchesy, J. J. (Eds.). Springer US, New York, pp. 323-333.
26. Hagerman A.E. and Butler L.G. 1981. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. Journal of Biological Chemistry, 256: 4494-4497.
27. Hagerman A.E. and L.G. Butler. 1981. The specificity of proanthocyanidin- protein interactions. Journal of Biological Chemistry, 256: 4494.
28. Jerónimo E., Pinheiro, C., Lamy, E., Dentinho, M.T., Sales-Baptista, E., Lopes, O. and Capela Silva, F. 2016. Tannins in ruminant nutrition: Impact on animal performance and quality of edible products. In book: Tannins: Biochemistry, Food Sources and Nutritional Properties, Chapter: 5, Publisher: Nova Science Publishers Inc, New York, USA, Editors: Combs CA.

29. Krumholz L.R. and Bryant M.P. 1986. *Eubacterium oxidoreducens* sp. nov. requiring or formate to degrade gallate, pyrogallol, phloroglucinol and quercetin. Archives Microbiology, 14: 8-14.
30. Kumar R. and S. Vaithiyanathan. 1990. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. Animal Feed Science and Technology, 30: 21-38.
31. Lamy E., Rawel H., Schweigert F.J., Capela de Silva F., Ferreira A., Costa, A. ., Antunes C., Almeida A.M., Coelho A.V. and Sales-Baptista E. 2011. The Effect of Tannins on Mediterranean Ruminant Ingestive Behavior: The Role of the Oral Cavity. Molecules, 16:2766.
32. López-Andrés P., Luciano G., Vasta V., Gibson T. M., Biondi L., Priolo A. and Muller-Harvey I. 2013. Dietary quebracho tannins are not absorved, but increase the antioxidant capacity of liver and plasma in sheep. British Journal of Nutrition 110: 632-639.
33. Makkar H.P.S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. Small Ruminant Research, 49: 241-256.
34. Makkar H.P.S. Francis G., Becker K. 2007. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. Animal 1: 1371-1391.
35. Mcleod M.N. 1974. Plant tannins-Their role in forage quality. Nutrition Abstracts and Reviews, 44: 803-812.
36. McMahon L.R., Majak W., McAllister T.A., Hall J., Jones G.A., Popp J.D. and Cheng K.J. 1999. Effects of sainfoin on *in vitro* digestion of fresh alfalfa and bloat in steers. Canadian journal of animal science, 79: 203-212.
37. McNabb W.C., Waghorn G.C., Barry T.N. and Shelton I.D. 1993. The effect of condensed tannins in Lotus pedunculatus on the digestion and metabolism of methionine, cystine and inorganic sulphur in sheep. British Journal of Nutrition. 70: 647.
38. Morales R. and Ungerfeld, E.M. 2015. Use of tannins to improve fatty acids profile of meat and milk quality in ruminants: A review. Chilean journal of agricultural research, 75(2): 239-248.
39. Mueller-Harvey I. 1999. Tannins their nature and biological significance, In: Caygill, J. C., Mueller-Harvey, I. (Eds.), *Secondary plant products: antinutritional and beneficial actions in animal feeding*. Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 17-39.
40. Mueller-Harvey I., 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. Journal of the Science of Food and Agriculture, 86: 2010-2037.
41. Murdiati T., McSweeney C. and Lowry J. 1992. Metabolism in sheep of gallic acid, tannic acid and hydrolysable tannin from Terminalia oblongata. Australian Journal of Agricultural Research, 43: 1307-1319.
42. Piluzza G., Sulas L. and Bullitta S. 2014. Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: a review. Grass and Forage Science, 69: 32-48.
43. Pritchard D.A., Martin P.R. and O'Rourke P.K. 1992. The role of condensed tannins in the nutritional value of mulga (*Acacia aneura*) for sheep. Australian Journal of Agricultural Research, 43: 1739–1746.
44. Salarmoini M. and Fooladi H. 2005. Tannin content and nutritional quality of pistachio hull for ruminants. IV International Symposium on pistachio and almond. ISHS_Tehran_ Iran, May 22-25. P 160.
45. Salunkhe D.K., Jadhav S.J., Kadam S.S. and Chavan, J.K. 1982. Chemical, biochemical and biological significance of polyphenols in cereals and legumes. CRC Crit. Rev. Food Science and Nutrition, 17: 277
46. Scalhert A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry, 30: 3875.
47. Seguin A. 1976. Ann. Chim. Paris, 20, 15, 1976. (Cited from Hulse, J. H., Ed., Polyphenols in Cereals and Legumes, International Development Research Center, Ottawa, Canada, 1980).
48. Silanikove N., Perevolotsky A. and Provenza, F.D. 2001. Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. Animal Feed Science and Technology, 91: 69-81.
49. Treutter D., 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. Environmental Chemistry Letters, 4: 147-157.
50. Van Soest P.J. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant. Cornell University Press, Ithaca, USA, 476 p.

51. Waghorn G. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-Progress and challenges. Animal Feed Science and Technology, 147: 116-139.
52. Waghorn G.C., Shelton I.D. and McNabb W.C. 1994. Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its nutritive value for sheep.1. Non-nitrogenous aspects. Journal of Agricultural Science (Cambridge), 123: 99-107.
53. Waghorn G.C., Ulyatt M.J., John A. and Fischer M.T. 1987. The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino acids and other nutrients in sheep fed on *Lotus corniculatus* L. British Journal of Nutrition, 57: 115-126.
54. War A.R., Paulraj M.G., Ahmad T., Buhroo A.A., Hussain B., Ignacimuthu S. and Sharma H.C. 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. Plant Signaling and Behavior, 7: 1306-1320.
55. Yisehak K., De Boever J.L. and Janssens G.P.J. 2014. The effect of supplementing leaves of four tannin-rich plant species with polyethylene glycol on digestibility and zootechnical performance of zebu bulls (*Bos indicus*). Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 98: 417-423.

Study of the species of Acrididae (Orthoptera) in the central parts of Khorasan-e Jonoubi province, Iran

Mohammad Mahdi Rabieh[1*] and Javad Noei[2]

1- Assistant professor at Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran.
2- Associate Professor at Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran.

**Corresponding Author Email address: mmrabie@birjand.ac.ir*

Abstract

Order Orthoptera (Locusts and grasshoppers) is one of the most important groups of insect pests which including many important and dangerous agricultural pests. For the main control campaigns commonly cost many millions of dollars and the large amounts of chemical insecticides used can have serious side effects on the environment. Like many other parts of Iran, there is not a complete checklist for insect pest species and their natural enemies in the Birjand area and other parts of the Khorasan-e Jonoubi province, so far. Any management program in the agricultural ecosystems needs a complete knowledge of systematics and biology of insect pests and their natural enemies, as the main group of animals. Accordingly, the family Acrididae, one of the important families in this order, was selected for this study. Samplings were done in the Birjand area, Khorasan-e Jonoubi province, Iran, during 2018-2021. Samplings were carried out in different altitudes and fruit tree types to collect maximum of the existing species. Totally 1160 specimens were collected from this family. As the result, 21 species belonging to 17 genera from subfamilies Acridinae, Oedipodinae, Gomphocerinae, Calliptaminae, Eyprepocnemidinae and Cyrtacanthacridinae were identified. A list of the identified species with details on the material examined is presented as well as illustrations of the adults. This study was investigated the fauna of Acrididae in the central regions of Khorasan-e Jonoubi province, for the first time and consequently all the identified species are newly reported from this area. The results obtained in this study provided useful information for the next ecological and biological studies on these species in the region.

Keywords: biodiversity, grasshoppers, locusts, agricultural pests

بررسی گونه های ملخ خانواده Acrididae در بخش های مرکزی استان خراسان جنوبی

محمد مهدی ربیعه[1*] و جواد نوعی[2]

۱-استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

۲- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

* نویسنده مسئول مکاتبات: mmrabie@birjand.ac.ir

چکیده

راسته ملخ ها یا راست بالان (Orthoptera) یکی از مهم ترین گروه های حشرات از نظر آفات کشاورزی هستند و گونه های متعددی از آنها به عنوان آفت مهم کشاورزی به حساب می آیند. مدیریت این آفات گاهی میلیون ها دلار هزینه به کشورها تحمیل می کند و میلیون ها لیتر سموم شیمیایی برعلیه این گونه استفاده می شود که تاثیرات زیست محیطی منفی بسیاری به دنبال دارد. در منطقه خراسان جنوبی مانند بسیاری از مناطق دیگر ایران لیست کاملی از فون حشرات آفت و دشمنان طبیعی آنها جهت استفاده در مطالعات مربوط به مدیریت آفت موجود نیست. از طرفی خشکسالی شدید در طی سال های گذشته در استان تأثیرات فراوانی بر فلور گیاهی و به دنبال آن بر فون جانوران خصوصا حشرات داشته است. در مواردی دیده شده است که این پدیده باعث از بین رفتن زیستگاه های طبیعی ملخ ها و حرکت تدریجی برخی گونه ها به سوی مزارع و باغات و بروز آفات جدید شده است. بنابراین آگاهی از فون ملخ های این منطقه و تنوع زیستی آنها اهمیت فراوانی در اجرای برنامه های پایش وضعیت آنها در سال های مختلف و مدیریت کنترل آنها دارد. خانواده Acrididae به عنوان یکی از مهمترین خانواده های این راسته به منظور مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه برداری ها در ناحیه مرکزی استان خراسان جنوبی، از سال ۱۳۹۷ تا ۱۴۰۰، انجام شد و در مجموع ۱۱۶۰ نمونه جمع آوری و به آزمایشگاه انتقال یافت. در مجموع ۲۱ گونه ملخ از خانواده Acrididae متعلق به ۱۷ جنس و از زیرخانوده های Acridinae، Oedipodinae، Gomphocerinae، Calliptaminae، Eyprepocnemidinae و Cyrtacanthacridinae جمع آوری و شناسایی شدند. لیست گونه های جمع آوری شده به تفکیک زیرخانواده ها همراه با جزئیات نمونه های مطالعه شده و تصاویر انها ارائه شده است. این اولین تحقیق در خصوص فون ملخ های ناحیه مرکزی استان خراسان جنوبی می باشد و بنابراین تمامی گونه های شناسایی شده برای اولین بار از محدوده ی تحقیق گزارش می شوند.

واژگان کلیدی: آفات کشاورزی، راست بالان، ملخ های شاخک کوتاه، تنوع گونه ای

۱.مقدمه

راسته راست بالان (Orthoptera) یکی از مهم ترین گروه های حشرات از نظر آفات کشاورزی هستند و گونه های متعددی از آنها به عنوان آفت مهم و خطرناک کشاورزی به حساب می آیند. برخی از گونه ها مانند ملخ دریایی یا ملخ صحرایی با نام علمی *Schistocerca gregaria* (Forskal, 1775) در جمعیت های میلیونی مهاجرت های طولانی دارند و در مسیر خود محصولات کشاورزی را نابود کرده و تاثیرات اقتصادی، اجتماعی و محیط زیستی در مقیاس بین المللی برجای می گذارند. مدیریت این آفات گاهی میلیون ها دلار هزینه به کشورها تحمیل می کند و میلیون ها لیتر سموم شیمیایی برعلیه این گونه استفاده می شود که تاثیرات زیست محیطی منفی بسیاری به دنبال دارد. همچنین مدیریت این حشرات از نظر امنیت غذایی انسان اهمیت زیادی دارد و در اکثر موارد نیازمند حمایت دولت ها و سازمان های بین المللی می باشد (Lecoq and Zhang, 2019). با این وجود، علیرغم اهمیت راست بالان به عنوان آفات کشاورزی، این حشرات به عنوان شاخص های زیستی حساس نشان دهنده سلامت زیست بوم مورد مطالعه قرار میگیرند (Hodjat et al. 2019.).

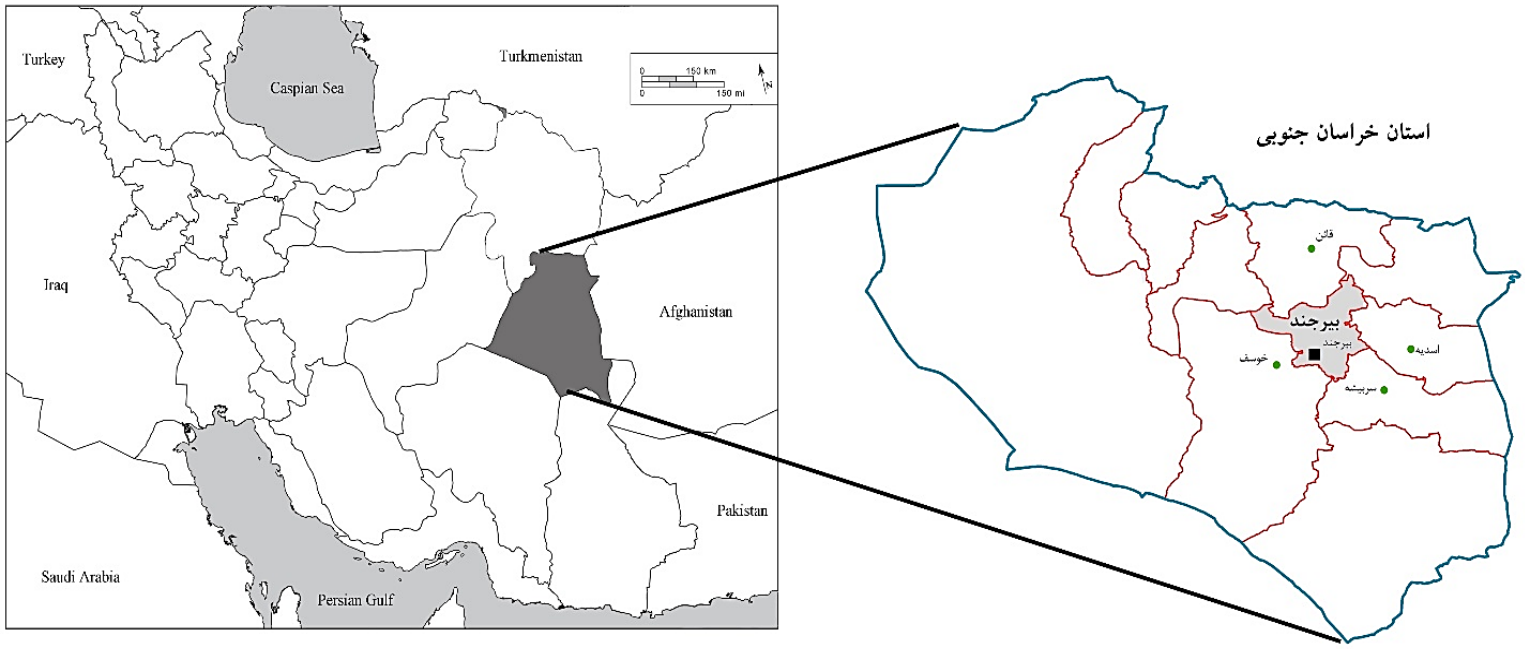
فون راست بالان ایران در طی دهه های گذشته همواره موضوع تحقیق پژوهشگران داخلی و خارجی متعدی بوده است. ابتدایی ترین تحقیقات بر روی راست بالان ایران توسط محققان روس در اواخر قرن ۱۹ انجام شده است و اولین انتشارات و گزارش ها در این زمینه توسط افرادی مانند Uvarov (1912- 1942)، Alexandrov (1947) و Ramme (1939, 1952) ارائه شده است (Garai, 2010). از آخرین تحقیقاتی که در این زمینه در ایران انجام رشده است میتوان به بررسی حسینی و مفیدی نیستانک (۱۳۹۰) اشاره نمود. آنها فون راست‌بالان ۱۳ منطقه‌ی مختلف از استان کردستان را بررسی نموده و ۴۱ گونه از این راسته را از مناطق مورد بررسی گزارش نمودند. مفیدی‌نیستانک و همکاران (۱۳۹۲) تغییرات زمانی و فضایی تنوع زیستی گونه هایی از ملخ های شاخک کوتاه متعلق به زیرخانواده ی Acridinae را به عنوان شاخص های تنوع زیستی در دو استان شمالی و جنوبی (استان اردبیل و استان هرمزگان) به عنوان نمونه ای از تفاوت های اقلیمی در عرض جغرافیا، مورد بررسی قرار دادند. نتایج تحقیق آنها نشان می دهد که با افزایش ارتفاع در منطقه ی کوهستانی دارای عرض جغرافیایی بیشتر (اردبیل)، تنوع زیستی نسبت به منطقه ی هم ارتفاع با عرض جغرافیایی کمتر (هرمزگان) افزایش می یابد ولی این غنای زیستی در مناطق کوهپایه ای و جلگه ای با عرض های جغرافیای بررسی شده تفاوت قابل ملاحظه ای ندارد. همچنین بر اساس شاخص های تنوع زیستی مطالعه شده منطقه ی با عرض جغرافیایی کمتر (متناسب با کاهش ارتفاع) غنای گونه ای افزایش می یابد در حالی که این روند در منطقه ی با عرض جغرافیایی بیشتر برعکس است و غنای گونه ای با کاهش ارتفاع کاهش می یابد. جعفری و همکاران (۱۳۹۵) فون راست بالان شمال استان کرمان را بررسی نموده و تعداد ۱۹ گونه را از پنج خانواده گزارش نمودند که یک گونه از آنها برای اولین بار برای فون ایران گزارش گردید. آنها همچنین برای نخستین بار کلید شناسایی راست بالان این منطقه را ارائه نمودند.

بخش مرکزی استان خراسان جنوبی شامل شهرستان بیرجند به مساحت تقریبی ۳۹۴۹ کیلومتر مربع، دارای آب و هوای نیمه بیابانی با زمستانهای سرد و تابستانهای خشک و گرم است. میزان بارش در این منطقه بسیار کم و برابر با ۱۷۱ میلی متر در سال است. میانگین سالیانه بیشترین و کمترین درجه حرارت این منطقه برابر با ۲۴ و ۸ درجه سانتیگراد و میانگین سالیانه رطوبت نسبی نیز ۳۶٪ است. با وجود اهمیت این منطقه به عنوان بخش مرکزی استان و وجود محصولات کشاورزی متنوع مانند بسیاری از مناطق دیگر ایران لیست کاملی از فون حشرات آفت و دشمنان طبیعی آنها جهت استفاده در مطالعات مربوط به مدیریت آفت موجود نیست. از طرفی خشکسالی شدید در طی سال های گذشته در استان خراسان جنوبی مانند بسیاری از استان های دیگر ایران تأثیرات فراوانی بر فلور گیاهی و به دنبال آن بر فون جانوران خصوصا حشرات داشته است. در مواردی دیده شده است که این

پدیده باعث از بین رفتن زیستگاه های طبیعی ملخ ها و حرکت تدریجی برخی گونه ها به سوی مزارع و باغات و بروز آفات جدید شده است. بنابراین آگاهی از فون ملخ های این منطقه و تنوع زیستی آنها اهمیت فراوانی در اجرای برنامه های پایش وضعیت آنها در سال های مختلف و مدیریت کنترل آنها دارد. بنابراین گونه های خانواده Acrididae به عنوان یکی از مهمترین خانواده های راسته راست بالان (Orthoptera) به منظور فراهم نمودن اطلاعات لازم جهت استفاده در برنامه های آتی مدیریت آفات در این منطقه و چند شهر مهم اطراف آن مورد مطالعه و شناسایی قرار گرفتند.

۲.مواد و روش‌ها

به منظور بررسی فون ملخ های ناحیه مرکزی استان خراسان جنوبی، از سال ۱۳۹۷ تا ۱۴۰۰، در مجموع ۱۱۶۰ نمونه با تور حشره گیری معمولی و یا سایر روش های نمونه برداری (شامل جمع آوری با دست و جذب به انواع تله نوری) از مناطق مختلف زراعی و مرتعی جمع آوری و به آزمایشگاه انتقال یافت. مناطق نمونه برداری شده شامل بخش مرکزی استان خراسان جنوبی (بخش بیرجند) و چهار شهر مهم در اطراف آن شامل خوسف، سربیشه، اسدیه و قائن می باشند (شکل ۱). نمونه های جمع آوری شده پس از اتاله و خشک شدن جهت مطالعه در کلکسیون حشره شناسی گروه گیاهپزشکی دانشگاه بیرجند نگهداری شدند. شناسایی نمونه ها با کمک کلیدهای شناسایی و بررسی ویژگیهای مهم ریخت شناسی مانند اندام های زادآوری خارجی نر و ماده انجام شد.



شکل ۱: موقعیت بخش مرکزی بیرجند و شهرهای خوسف، سربیشه، قائن و اسدیه در اطراف آن در استان خراسان جنوبی، ایران.

۳. نتایج و بحث

در مجموع ۲۱ گونه ملخ از خانواده Acrididae متعلق به ۱۷ جنس و از زیرخانوده های Acridinae، Oedipodinae، Gomphocerinae، Calliptaminae، Eyprepocnemidinae و Cyrtacanthacridinae جمع آوری و شناسایی شدند. لیست گونه های جمع آوری شده به تفکیک زیرخانواده ها همراه با جزئیات نمونه های مطالعه شده در ادامه ارائه شده است. همچنین تصاویر گونه های شناسایی شده در ادامه لیست گونه ها آمده است. ترتیب گونه های موجود در هر زیرخانواده براساس حروف الفبا می باشد. این اولین تحقیق در خصوص فون ملخ های ناحیه مرکزی استان خراسان جنوبی می باشد و بنابراین تمامی گونه های شناسایی شده برای اولین بار از محدوده ی تحقیق گزارش می شوند.

گونه های شناسایی شده به تفکیک زیرخانواده:

زیرخانواده Acridinae MacLeay, 1821

گونه Truxalis eximia eximia Eichwald, 1830 شکل (۱)

مشخصات نمونه های مطالعه شده: بخش مرکزی، امیرآباد، ۱♀، ۱۳۹۷/۰۴/۰۱؛ بخش مرکزی، چهکند، ۱♀، ۱۴۰۰/۰۴/۰۵، اسدیه، ۱♀، ۱۳۹۷/۰۳/۲۵.

زیرخانواده Oedipodinae Walker, 1871

گونه Acrotylus insubricus inficitus (Walker, 1870)(شکل ۱)

مشخصات نمونه های مطالعه شده: بخش مرکزی، امیرآباد، ۱♂، ۱♀، ۱۳۹۷/۰۴/۰۱، ۱۳۹۸/۰۴/۰۸، ۱۴۰۰/۰۳/۱۲؛ بخش مرکزی، چهکند، ۱♀، ۱۳۹۹/۰۵/۱۸، ۱۳۹۸/۰۳/۱۰، بخش مرکزی، رزگ، ۱♀، ۱۳۹۸/۲/۳۰؛ بخش مرکزی، خوسف، ۱♂، ۱♀، ۱۳۹۹/۰۳/۰۴، ۱۳۹۸/۴/۵؛ بخش مرکزی، گیوک، ۱♀، ۱۳۹۸/۰۵/۱۹؛ قائن، ۱♀، ۱۳۹۹/۰۳/۱۷.

گونه *Aiolopus strepens* (Latreille, 1804) (شکل ۱)

مشخصات نمونه های مطالعه شده: بخش مرکزی، چهکند، ۱♀، ۱۳۹۸/۰۳/۱۰.

گونه *Brunnerella mirabilis siasovi* Moritz, 1928 (شکل ۱)

مشخصات نمونه های مطالعه شده: بخش مرکزی، خوسف، ۲♀، ۱۳۹۹/۰۳/۰۴، ۱۳۹۸/۴/۵؛ بخش مرکزی، بیرجند، ۱♀، ۱۳۹۸/۰۳/۲۳.

گونه *Helioscirtus moseri moseri* Saussure, 1884 (شکل ۱)

مشخصات نمونه های مطالعه شده: بخش مرکزی، امیرآباد، ۱♂، ۲♀، ۱۳۹۷/۰۴/۰۱، ۱۳۹۸/۰۴/۰۸، ۱۴۰۰/۰۳/۱۲؛ بخش مرکزی، خوسف، ۳♀، ۱۳۹۹/۰۳/۰۴، ۱۳۹۸/۴/۵.

گونه *Oedaleus decorus* (Germar, 1825) (شکل ۱)

مشخصات نمونه های مطالعه شده: بخش مرکزی، امیرآباد، ۲♀، ۱۳۹۷/۰۴/۰۱، ۱۴۰۰/۰۳/۱۲؛ بخش مرکزی، نوفرست، ۱♀، ۱۳۹۹/۰۶/۱۱؛ بخش مرکزی، چهکند، ۱♀، ۱۳۹۸/۰۳/۱۰، ۱۳۹۷/۰۵/۱۹؛ بخش مرکزی، رزگ، ۱♀، ۱۳۹۸/۲/۳۰؛ بخش مرکزی،

خوسف، ۲♀، ۱۳۹۹/۰۳/۰۴؛ بخش مرکزی، سربیشه، ۱♀، ۱۳۹۹/۰۶/۰۲؛ اسدیه، ۱♀، ۱۳۹۷/۰۳/۲۵؛ بخش مرکزی، بیرجند، ۱♀، ۱۳۹۸/۰۳/۲۳.

گونه O. senegalensis Bolivar 1902 (شکل ۱)

مشخصات نمونه های مطالعه شده: بخش مرکزی، گیوک، ۱♀، ۱۳۹۸/۰۵/۱۹؛ قائن، ۲♀، ۱۳۹۹/۰۳/۱۷؛ بخش مرکزی، سربیشه، ۱♀، ۱۳۹۹/۰۶/۰۲.

گونه Oedipoda miniata (Pallas, 1771) (شکل ۱)

مشخصات نمونه های مطالعه شده: بخش مرکزی، امیرآباد، ۱♂، ۴♀، ۱۳۹۷/۰۴/۰۱، ۱۳۹۸/۰۴/۰۸، ۱۴۰۰/۰۳/۱۲؛ بخش مرکزی، نوفرست، ۳♀، ۱۳۹۹/۰۶/۱۱؛ بخش مرکزی، چهکند، ۳♂، ۷♀، ۱۳۹۹/۰۵/۱۸، ۱۳۹۸/۰۳/۱۰، ۱۳۹۷/۰۵/۱۹؛ بخش مرکزی، رزگ، ۳♀، ۱۳۹۸/۲/۳۰؛ بخش مرکزی، خوسف، ۱♂، ۱♀، ۱۳۹۹/۰۳/۰۴، ۱۳۹۸/۴/۵؛ بخش مرکزی، گیوک، ۳♀، ۱۳۹۸/۰۵/۱۹؛ قائن، ۱♀، ۱۴۰۰/۰۳/۱۸؛ بخش مرکزی، سربیشه، ۵♀، ۱۳۹۹/۰۶/۰۲؛ اسدیه، ۲♀، ۱۳۹۷/۰۳/۲۵؛ بخش مرکزی، بیرجند، ۳♀، ۱۳۹۹/۰۳/۲۸.

گونه Pyrgodera armata Fischer von Waldheim, 1846 (شکل ۱)

مشخصات نمونه های مطالعه شده: بخش مرکزی، امیرآباد، ۱♀، ۱۴۰۰/۰۳/۱۲؛ بخش مرکزی، بیرجند، ۱♀، ۱۳۹۹/۰۳/۲۸.

گونه Scintharista notabilis brunneri Saussere, 1884 (شکل ۱)

مشخصات نمونه های مطالعه شده: بخش مرکزی، نوفرست، ۱♀، ۱۳۹۹/۰۶/۱۱؛ بخش مرکزی، چهکند، ۲♀، ۱۳۹۸/۰۳/۱۰، ۱۳۹۷/۰۵/۱۹؛ بخش مرکزی، سربیشه، ۱♀، ۱۳۹۹/۰۶/۰۲؛ اسدیه، ۱♀، ۱۳۹۷/۰۳/۲۵؛ بخش مرکزی، بیرجند، ۱♀، ۱۳۹۹/۰۳/۲۸.

گونه Sphingoderus angustus Descamps, 1967 (شکل ۱)

مشخصات نمونه های مطالعه شده: بخش مرکزی، چهکند، ۲♀، ۱۳۹۹/۰۵/۱۸؛ بخش مرکزی، بیرجند، ۱♀، ۱۳۹۸/۰۳/۲۳.

گونه Sphingonotus nebulosus discolor Uvarov 1933 (شکل ۱)

مشخصات نمونه های مطالعه شده: بخش مرکزی، امیرآباد، ۱♀، ۱۴۰۰/۰۳/۱۲؛ اسدیه، ۱♀، ۱۳۹۷/۰۳/۲۵، ۱۴۰۰/۰۵/۱۱؛ بخش مرکزی، بیرجند، ۱♀، ۱۳۹۸/۰۳/۲۳، ۱۳۹۹/۰۳/۲۸.

گونه S. savignyi Saussure, 1884 (شکل ۲)

مشخصات نمونه های مطالعه شده: بخش مرکزی، امیرآباد، ۸♂، ۲۴♀، ۱۳۹۷/۰۴/۰۱، ۱۳۹۸/۰۴/۰۸، ۱۴۰۰/۰۳/۱۲؛ بخش مرکزی، چهکند، ۵♂، ۱۶♀، ۱۳۹۹/۰۵/۱۸، ۱۳۹۸/۰۳/۱۰، ۱۳۹۷/۰۵/۱۹؛ بخش مرکزی، رزگ، ۳♀، ۱۳۹۸/۲/۳۰؛ بخش مرکزی، خوسف، ۱♂، ۵♀، ۱۳۹۹/۰۳/۰۴، ۱۳۹۸/۴/۵؛ قائن، ۱♀، ۱۳۹۹/۰۳/۱۷؛ بخش مرکزی، بیرجند، ۱♀، ۱۳۹۸/۰۳/۲۳، ۱۳۹۹/۰۳/۲۸.

گونه S. salinus (Pallas, 1773) (شکل ۲)

مشخصات نمونه های مطالعه شده: بخش مرکزی، نوفرست، ۱♀، ۱۳۹۹/۰۶/۱۱؛ بخش مرکزی، چهکند، ۱♂، ۲♀، ۱۳۹۹/۰۵/۱۸، ۱۳۹۸/۰۳/۱۰، ۱۳۹۷/۰۵/۱۹.

گونه S. satrapes Saussure, 1884 (شکل ۲)

مشخصات نمونه های مطالعه شده: بخش مرکزی، امیرآباد، ۱♂، ۳♀، ۱۳۹۷/۰۴/۰۱، ۱۳۹۸/۰۴/۰۸، ۱۴۰۰/۰۳/۱۲؛ قائن، ۳♀، ۱۳۹۹/۰۳/۱۷، ۱۴۰۰/۰۳/۱۸؛ بخش مرکزی، سربیشه، ۱♀، ۱۳۹۹/۰۶/۰۲؛ اسدیه، ۱♀، ۱۳۹۷/۰۳/۲۵.

زیرخانواده Gomphocerinae Fieber, 1853

گونه *Dociostaurus tartarus* Stshelkanovtzev, 1921 (شکل ۲)

مشخصات نمونه های مطالعه شده: بخش مرکزی، امیرآباد، ۲۱♂، ۸♀، ۱۳۹۷/۰۴/۰۱، ۱۳۹۸/۰۴/۰۸، ۱۴۰۰/۰۳/۱۲؛ بخش مرکزی، بیرجند، ۳♀، ۱۳۹۸/۰۳/۲۳، ۱۳۹۹/۰۳/۲۸.

گونه *Ramburiella foveolata* Tarbinsky, 1931 (شکل ۲)

مشخصات نمونه های مطالعه شده: بخش مرکزی، امیرآباد، ۱♀، ۱۳۹۷/۰۴/۰۱، بخش مرکزی، چهکند، ۱♀، ۱۳۹۹/۰۵/۱۸، بخش مرکزی، بیرجند، ۱♀، ۱۳۹۸/۰۳/۲۳.

زیرخانواده Calliptaminae Jacobson, 1905

گونه *Sphodromerus luteipes* Uvarov, 1933 (شکل ۲)

مشخصات نمونه های مطالعه شده: بخش مرکزی، نوفرست، ۱♀، ۱۳۹۹/۰۶/۱۱؛ بخش مرکزی، سربیشه، ۱♀، ۱۳۹۹/۰۶/۰۲؛ اسدیه، ۱♀، ۱۳۹۷/۰۳/۲۵.

زیرخانواده Eyprepocnemidinae Brunner von Wattenwyl, 1893

گونه *Heteracris adspersa* (Redtenbacher, 1889) (شکل ۲)

مشخصات نمونه های مطالعه شده: بخش مرکزی، رزگ، ۱♀، ۱۳۹۸/۲/۳۰؛ خش مرکزی، گیوک، ۱♀، ۱۳۹۸/۰۵/۱۹؛ قائن، ۲♀، ۱۳۹۹/۰۳/۱۷، ۱۴۰۰/۰۳/۱۸؛ بخش مرکزی، سربیشه، ۲♀، ۱۳۹۹/۰۶/۰۲؛ اسدیه، ۱♀، ۱۳۹۷/۰۳/۲۵؛ بخش مرکزی، بیرجند، ۴♀، ۱۳۹۸/۰۳/۲۳، ۱۳۹۹/۰۳/۲۸.

زیرخانواده Cyrtacanthacridinae Kirby, 1910

گونه *Anacridium aegypticum* (Linnaeus, 1764) (شکل ۲)

مشخصات نمونه های مطالعه شده: بخش مرکزی، امیرآباد، ۱♂، ۵♀، ۱۳۹۷/۰۴/۰۱، ۱۳۹۸/۰۴/۰۸، ۱۴۰۰/۰۳/۱۲؛ بخش مرکزی، نوفرست، ۱♀، ۱۳۹۹/۰۶/۱۱؛ بخش مرکزی، چهکند، ۱♂، ۶♀، ۱۳۹۹/۰۵/۱۸، ۱۳۹۸/۰۳/۱۰، ۱۳۹۷/۰۵/۱۹؛ بخش مرکزی، رزگ، ۱♀، ۱۳۹۸/۲/۳۰؛ بخش مرکزی، خوسف، ۱♂، ۳♀، ۱۳۹۹/۰۳/۰۴، ۱۳۹۸/۴/۵؛ بخش مرکزی، گیوک، ۱♀، ۱۳۹۸/۰۵/۱۹؛ قائن،

۱♀، ۱۳۹۹/۰۳/۱۷؛ بخش مرکزی، سربیشه، ۱♀، ۱۳۹۹/۰۶/۰۲؛ اسدیه، ۱♀، ۱۳۹۷/۰۳/۲۵؛ بخش مرکزی، **بیرجند**، ۱♀، ۱۳۹۸/۰۳/۲۳.

گونه *Schistocerca gregaria* (Forskal, 1775) (شکل ۲)

مشخصات نمونه های مطالعه شده: بخش مرکزی، سربیشه، ۳♀، ۱۳۹۹/۰۶/۰۲.

شکل ۱: گونه های ملخ شناسایی شده از بخش های مرکزی استان خراسان جنوبی، ایران.



Truxalis eximia | *Acrotylus insubricus* | *Aiolopus strepens*



Brunnerella mirabilis | *Helioscirtus moseri* | *Oedaleus decorus*

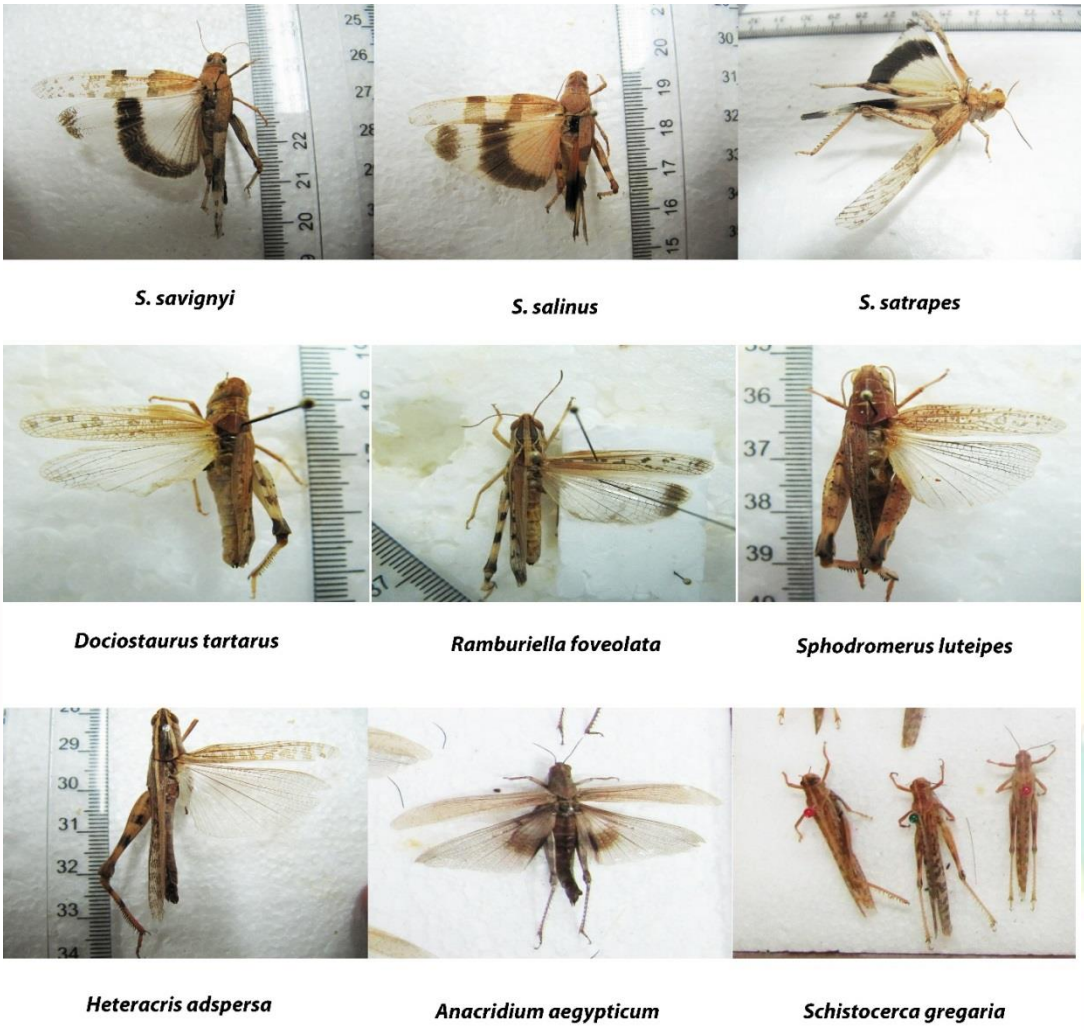


O. senegalensis | *Oedipoda miniata* | *Pyrgodera armata*



Scintharista notabilis | *Sphingoderus angustus* | *Sphingonotus nebulosus*

شکل ۲:گونه های ملخ شناسایی شده از بخش های مرکزی استان خراسان جنوبی، ایران.



۴. نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر با نمونه برداری به مدت حدود چهار سال از مناطق مختلف با گیاهان و ارتفاع متنوع در بخش مرکزی استان خراسان جنوبی در مجموع ۲۲ گونه ملخ از خانواده Acrididae متعلق به ۱۷ جنس و شش زیرخانوده جمع آوری و شناسایی شدند که تمامی گونه های شناسایی شده برای اولین بار از محدوده ی تحقیق گزارش می شوند. با توجه به پلی فاژ بودن اغلب گونه های راست بالان همه گونه های جمع آوری شده در این تحقیق علاوه بر محصولات زراعی توانایی ایجاد خسارت در گیاهان دارویی استان را نیز دارند. از آنجا که گیاهان دارویی یکی از تولیدات مهم استان خراسان جنوبی به حساب می آید بررسی ارتباط گونه های جمع آوری شده ملخ با گونه های مختلف گیاهان دارویی در منطقه اهمیت زیادی دارد. ادامه نمونه برداری ها به منظور شناسایی حشرات مرتبط با گونه های جمع آوری شده در این منطقه خصوصا دشمنان طبیعی آنها از راسته های بال غشاییان و دوبالان اهمیت زیادی دارد. مطالعات زیست شناسی و بوم شناسی بر روی هریک از گونه های گزارش شده در این مقاله مشخص کننده دقیق میزبان های گیاهی

و تغییرات جمعیت آنها در منطقه بیرجند خواهد بود و اطلاعات حاصله در برنامه های مدیریت زیست بوم های منطقه از اهمیت بالایی برخوردار است.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب تشکر خود را از همکاری صمیمانه دکتر Adrienne Garai از مجارستان در شناسایی نمونه های جمع آوری شده ابراز می دارند. این مطالعه از اعتبار تامین شده در طرح شماره ۹۷۰۲۴۷۴۸ زیرنظر صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) انجام شده است.

منابع

۱۹. **حسینی، ع. و مفیدی نیستانک م. ۱۳۹۰.** بررسی فونستیک و تاکسونومیک ملخهای استان کردستان. حشره شناسی گیاهان زراعی، ۱ (۳): صفحه ۹-۲۶.

۲۰. **جعفری گدنه، ز.، مفیدی نیستانک م. و ملکی راد الف. ۱۳۹۵.** تحقیقی در فون راست بالان (Hexapoda: Orthoptera) شمال استان کرمان. بیست و دومین کنگره گیاهپزشکی ایران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج.

۲۱. **مفیدی‌نیستانک، م.، کریم‌زاده‌اصفهانی، ج.، عسکری‌سیاهوئی، م.، تقی‌زاده، م. و حاجی‌اسمعیلیان، الف. ۱۳۹۲.** مطالعه‌ی تنوع زیستی ملخ‌های شاخک‌کوتاه (Orthoptera, Acridinae) در استان‌های اردبیل و هرمزگان. گزارش نهایی طرح پژوهشی موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، ۴۴ص.

22. **Garai A. 2010.** Contribution to the knowledge of the Iranian Orthopteroid insects I. (Plates 61, 62). Esperiana 15: 393-417.

23. **Hodjat S.H., A. Saboori and M. Husemann 2019.** A view on the historic and contemporary acridid fauna (Orthoptera: Caelifera: Acrididae) of Iran-A call for conservation efforts. Journal of Crop Protection 8(2): 135-142.

24. **Lecoq, M. and Zhang L.2019.** Encyclopedia of Pest Orthoptera of the World. China Agricultural University Press. 325 pp.

Effect of dried rice straw with MDCS on performance and some blood parameters in fattening lambs

Nozar Karami, Mohammad Mehdi Moeini, Mohammad Ebrahim Nourian Sarvar

1- Student of Animal Sciences, Agriculture Campus, Razi University

2-Associate Professor, Department of Animal Sciences. Agricultural Campus .Razi University

*mmoeini@razi.ac.ir**

Abstract

Present study was designed and implemented to investigate the effects of effect of sing dried rice straw with MDCS on performance and some blood parameters in fattening lambs, as well as to reduce feed costs, reduce the effects and contamination of biofuels of the processing industry and agricultural to the environment. For this purpose, the number of 18 Sanjabi lamb breed with an average weight of 40±0.05 kg were assigned to three experimental groups in a completely randomized design. Treatments were: control (basal diet based on wheat straw and unprocessed rice straw), second treatment (rice straw soaked in molasses effluent for 24 hours); the third treatment (rice straw boiled in molasses effluent for 1 hour).The effects of experimental diets on weight gain and feed conversion ratio were investigated. Blood samples were taken from the vein of all lambs and blood glucose, total protein, triglycerides, urea and blood serum cholesterol were measured.Those lambs fed rice straw soaked in molasses distiller for 1 hour had a higher daily weight gain and total weight gain as well as dry matter intake than the other two experimental groups, and the feed conversion ratio in this group was lower than the other two groups. . However, none of the blood parameters were affected by the treatments and their differences with the control group were not significant.

Keywords: rice straw, molasses distiller condensed soluble, growth performance, feed conversion ratio

بررسی اثر استفاده از کاه برنج فرآوری شده با پساب تقطیری ملاس بر عملکرد رشد و برخی فراسنجه‌های خونی بره های پرواری

نوذر کرمی ؛محمد مهدی معینی ؛محمد ابراهیم نوریان سرور

۱-دانشجوی گروه علوم دامی. پردیس کشاورزی .دانشگاه رازی

۲-دانشیار گروه علوم دامی .پردیس کشاورزی .دانشگاه رازی

*mmoeini@razi.ac.ir**

چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات استفاده از کاه برنج فرآوری شده با پساب تقطیری ملاس بر فراسنجه‌های رشد و عملکرد و برخی فراسنجه‌های خونی بره‌های پرواری و همچنین کاهش هزینه‌های خوراک، کاهش اثرات و آلودگی‌های زیست محیطی اجرا شد. بدین منظور تعداد ۱۸ رأس بره نژاد سنجابی با میانگین وزنی ۰/۵±۴۰ کیلوگرم در قالب یک طرح کاملاً تصادفی به سه گروه آزمایشی اختصاص داده شد. تیمارها شامل: تیمار شاهد (کاه برنج فرآوری نشده)، تیمار دوم (کاه برنج خیسانده در پساب ملاس به مدت ۲۴ ساعت)؛ تیمار سوم (کاه برنج جوشانده در پساب ملاس به مدت ۱ ساعت) بود. اثرات جیره‌های آزمایشی بر افزایش وزن روزانه و رشد بره‌ها و ضریب تبدیل خوراک بررسی شد.جهت بررسی اثر تیمارها بر فراسنجه‌های خونی، از سیاهرگ وداج همه دام‌ها نمونه خون اخذ و غلظت گلوکز، پروتئین کل، تری‌گلیسیرید، اوره و کلسترول سرم خون اندازه‌گیری شد. طبق نتایج حاصل، بره‌های تغذیه شده با کاه برنج خیسانده در پساب ملاس افزایش وزن روزانه ، افزایش وزن کل و همچنین ماده خشک مصرفی بیشتری نسبت به دو گروه آزمایشی دیگر داشتند و ضریب تبدیل خوراک در این گروه نسبت به دو گروه دیگر بهتر بود. اما هیچ یک از فراسنجه‌های خونی تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت و تفاوت معنی داری با گروه شاهد نداشتند.

کلمات کلیدی: کاه، عملکرد رشد، مصرف خوراک ضریب تبدیل خوراک

1.مقدمه

افزایش روزافزون جمعیت و نیاز بشر به منابع خوراکی به‌ویژه منابع پروتئین حیوانی و به‌خصوص تولیدات دامپروری باعث شده است که بیش از پیش این افزایش تولیدات مورد توجه انسان قرار گرفته و توجه و یژه‌ای به صنعت دامپروری شودکه در این راستا تغذیه دام پرهزینه‌ترین بخش دامداری به حساب می‌آید و برای کاهش این هزینه‌ها و افزایش راندمان تولید تلاشی صورت گیرد. سالانه بخش انبوهی از ضایعات کشاورزی و همچنین پسماندهای صنایع تبدیلی در کشور تولید می‌گرددکه بخودی خود فاقد ارزش تغذیه‌ای در خوراک دام‌ها می‌باشد ضمن اینکه یکی از منابع آلوده کننده محیط زیست به‌شمار می‌آیند اما با فرآوری به طرق مختلف شیمیایی و فیزیکی قرار می‌توانند به‌عنوان منبع غذایی با ارزش در تغذیه دام به‌حساب استفاده شوند (Torbati Nejad, 1995؛Onol et al., 1998). پساب تقطیری ملاس یکی از محصولات جانبی کارخانه-

های صنایع تولید اتانول است که می‌تواند در تغذیه دام مورد استفاده قرارگیرد (معینی و همکاران، ۲۰۱۴). مخلوط کردن پساب تقطیری ملاس با کاه یا سبوس می‌تواند منجر به تولید محصولی با ارزش تغذیه‌ای بالا برای نشخوارکنندگان گردد. کاه غلات به دلیل فراهمی بالا و تولید انبوه سالانه منبع عظیمی از انرژی است (Buranov and Mazza. 2008). اگرچه این بقایای زراعی انرژی خام مشابه سایر منابع علوفه‌ایی دارد (McDonald et al., 2002). یعنی انرژی خام کاه غلات تقریبا معادل سایر علوفه‌هاست (Jung et al., 1999). کاه برنج بر خلاف کاه غلات دیگر (گندم و جو) نسبت ساقه کمتر و برگ بیشتری دارد. ولی ساقه کاه برنج بهتر از ساقه کاه گندم هضم می‌شود و حتی در برخی ارقام برنج بهتر از برگ کاه گندم نیز هضم می‌شود (Zhang & Jenkins, 2004).

روش‌های مختلف تیمار کردن کاه راندمان استفاده از آن در جیره نشخوارکنندگان را بهبود می‌بخشد. مخلوط کردن محصولات فرعی حاصل از تقطیر دانه‌های خشک شده با پساب ملاس منجر به تولید دانه‌های تیره تقطیری می‌شود (وزمیار، ۱۳۹۴، معینی و همکاران، ۲۰۱۴).پساب ملاس خشک شده با سبوس دارای مزایایی چون هزینه نگهداری کمتر، حمل و نقل راحتتر و استفاده آسان در جیره دام را به همراه دارد(مصطفایی و همکاران، ۱۳۹۷).بررسی‌ها نشان داده است که استفاده از پساب تقطیری ملاس به صورت پلت در بره‌های پرواری سنجابی سبب افزایش قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی و الیاف حاصل از شوینده خنثی می‌گردد (معینی و همکاران، ۲۰۱۳). اگرچه اثر معنی‌داری بر عملکرد تولیدی یا متابولیت‌های خون در مطالعه بر روی بره‌های لری مشاهده نشد (معینی و همکاران، ۲۰۱۴).

با توجه به سیستم پیچیده و منحصر دستگاه گوارش نشخوارکنندگان عمل آوری محصولات کشاورزی ارزان قیمت و در دسترس به طرق مختلف ضمن اینکه می‌تواند باعث افزایش خوش خوراکی و ارزش تغذیه‌ای آن گردد و نشخوارکنندگان آن را به محصولات دامی با ارزش تبدیل کنند و ازآلودگی های زیست محیطی ناشی از رها سازی پسماندهای صنایع تبدیلی و بقایای کشاورزی به محیط زیست هم جلوگیری می شود. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات استفاده از کاه برنج فرآوری شده با پساب تقطیری ملاس بر فراسنجه‌های رشد و عملکرد و برخی فراسنجه‌های خونی بره‌های پرواری و همچنین کاهش هزینه‌های خوراک، کاهش آلودگی زیست محیطی حاصل از دور ریز پساب حاصل از کارخانجات الکل سازی طراحی و اجرا شد.

2.مواد و روش‌ها

2-1-حیوانات و جیرهٔ آزمایشی

مطالعه حاضر در سال ۱۳۹۸ در واحد گوسفنداری دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی دانشگاه رازی کرمانشاه انجام گرفت. به منظور شروع عملیات اجرایی طرح تعداد ۱۸ رأس بره نژاد سنجابی با میانگین وزن ۰/۵ ± ۴۰ کیلوگرم و میانگین سنی ۴/۵ ماه به مدت ۷۴ روز به ۳ گروه آزمایشی اختصاص داده شد. قبل از شروع دورهٔ آزمایشی ۱۴ روز برای عادت‌دهی بره‌ها به جایگاه و جیره‌های آزمایشی درنظر گرفته شد. تیمارها شامل: تیمار شاهد (جیره کاه برنج فرآوری نشده)، تیمار دوم (کاه برنج خیسانده در پساب ملاس به مدت ۲۴ ساعت)؛ تیمار سوم (کاه برنج جوشانده در پساب ملاس به مدت ۱ ساعت) بود. جیره پایه براساس جدول احتیاجات غذایی NRC (2007) تنظیم شد (جدول ۱). خوراک روزانه در دو نوبت صبح و عصر داده می‌شد و آب تازه بصورت همیشگی در دسترس بره‌ها قرار داشت.

جیره ها بصورت مخلوط و روزانه در دو نوبت صبح و عصر در اختیار دام‌ها قرار می‌گرفت و هر روز صبح بقایای خوراک روز قبل جمع آوری و جهت محاسبه میزان مصرف خوراک توزین می شد. بطور هفتگی وزن‌کشی با استفاده از باسکول دیجیتال با دقت ۰/۵ گرم انجام می‌شد. جهت اندازه‌گیری ماده خشک مصرفی روزانه خوراک عرضه شده بر اساس درصد ماده خشک از باقی مانده خوراک بر اساس درصد ماده خشک کسر شد. بر اساس اطلاعات حاصل از توزین دام‌ها و خوراک افزایش وزن روزانه، افزایش وزن کل و ضریب تبدیل خوراک (FCR) محاسبه شد. شاخص ضریب تبدیل خوراک بر اساس رابطه زیر محاسبه شد.

FCR=ماده خشک مصرفی کل دوره (کیلوگرم) ÷ افزایش وزن کل (کیلوگرم

آنالیز آزمایشگاهی نمونه‌های خون

در پایان دوره آزمایشی قبل از مصرف خوراک وعده صبح از همه بره‌ها از سیاهرگ وداج خونگیری شد. جهت جداسازی سرم و پلاسمای نمونه‌های خون شده بلافاصله پس از انتقال به آزمایشگاه به مدت ۱۵ دقیقه باسرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (Hettich,Rotina 46) شد و تا زمان اندازه‌گیری فراسنجه‌های مربوطه در فریزر با دمای منفی ۲۰ – درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. میزان گلوکز، کلسترول، اوره، تری‌گلیسیرید و پروتئین کل سرم خون با استفاده از کیت‌های مخصوص شرکت پارس آزمون بررسی شد.(توضیح بیشتر نیاز است)

آنالیز آماری داده‌ها

داده‌ها با نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از رویه GLM تجزیه و تحلیل شدند. مقایسات میانگین ها در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت. طرح آماری استفاده شده استفاده شده به شرح زیر

$$Yij = \mu + Ai + Bj + ebij$$

Y_{ij} : مشاهده مربوط به تیمار i و زمان اندازه‌گیری j؛ μ: میانگین کلی مشاهده‌ها ؛ A_i: اثر تیمار؛Bj: اثر حیوان (وزن اولیه بعنوان کوواریت) ؛ Eb_{ij} : خطای آزمایش

3.نتایج و بحث

3-1-اثر بر عملکرد

نتایج اثر استفاده از کاه برنج فرآوری شده با پساب تقطیری ملاس بر فراسنجه‌های رشد و عملکرد بره‌های پرواری در جدول ۱ نشان داده شده است. همانطور که در جدول مشاهده می‌شود بره‌های تغذیه شده با کاه برنج جوشانده در پساب ملاس به مدت ۱ ساعت افزایش وزن روزانه و افزایش وزن کل بیشتری نسبت به دو گروه آزمایشی دیگر داشتند (P<۰/۰۵) اما بره‌های تیمار دوم با شاهد تفاوت معنی‌داری را در افزایش وزن نشان ندادند. ماده خشک مصرفی بره‌ها در میان گروه‌های آزمایشی تفاوتی معنی‌داری نشان داد بطوریکه بره‌های تیمار اول (کاه برنج خیسانده در پساب ملاس به مدت ۱۲ ساعت) بیشترین ماده خشک مصرفی را داشتند (P<۰/۰۵). گروه شاهد کمترین میزان ماده خشک مصرفی را داشتند. ضریب تبدیل خوراک تیمار اول (کاه برنج خیسانده) نسبت به دو گروه دیگر کمتر بود (P<۰/۰۵). تغییرات وزن بدن بره‌ها در طول دوره آزمایشی در نمودار ۱ نشان داده شده است. اگر چه با وجود اختلاف نسبی در این فراسنجه تفاوت بین تیمارها معنی‌دار نبود.

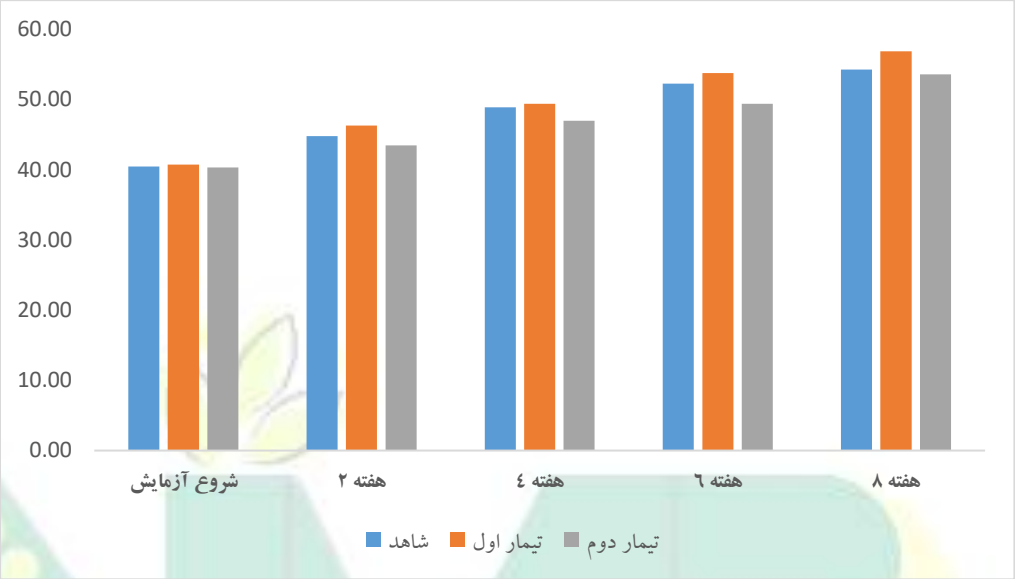
افزایش مصرف ماده خشک می‌تواند به این حقیقت مربوط باشد که تیمار کردن کاه (با مکمل یا فرآوری کردن) سبب مصرف آن شده و همچنین محیط مطلوبی را در شکمبه برای افزایش تخمیر مواد خشبی فراهم آورده باشد و بنابراین سنتز پروتئین میکروبی، نرخ هضم و به تبع مصرف ماده خشک افزایش می یابد (Tekliye et al., 2018). استفاده از ملاس در جیره علاوه بر اینکه سبب خوش خوراکی آن شده، بعنوان یک منبع انرژی سهل الوصول برای میکروفلورای شکمبه جهت سنتز پروتئین میکروبی عمل می‌کند (Sheikh et al., 2017). احتمالاً در مطالعه حاضر با فرآوری کاه، میزان خوراک مصرفی و تجزیه‌پذیری شکمبه افزایش یافته و همین امر سبب افزایش مصرف خوراک و افزایش وزن دام شده است. در مطالعات پیشین نشان داده شده است که فرآوری پسماندهای کشاورزی با آلکالین هیدروژن پراکسید سبب بهبود مصرف خوراک بسته به سطح کاه در جیره به میزان ۱۴ تا ۷۷ درصد می‌شود (Kerley et al., 1985). قریب و همکاران (۱۹۷۵) در آنالیز آزمایشگاهی ۱۵۰ روزه، ثابت کردند که اکسید کلسیم (آهک) به اندازه هیدروکسید سدیم (سود) در افزایش قابلیت هضم آزمایشگاهی پوسته درخت سپیدار مؤثر است. البته باید توجه داشت که در جیره‌های بر پایه علوفه کم کیفت، فرآوری آن همراه با تأمین سایر مواد مغذی مثل نیتروژن و مواد معدنی سبب حداکثر مصرف خوراک می‌گردد (Doyle et al., 1986). تئوری دیگر درمورد بهبود مصرف خوراک با خیساندن کاه این است که احتمالاً با خیساندن گرد و غبار از کاه پاکسازی می‌شود و از همین طریق بر مصرف خوراک مؤثر است (Doyle et al., 1986).

جدول 1: اثر استفاده از کاه برنج فرآوری شده با پساب تقطیری ملاس بر فراسنجه‌های رشد و عملکرد بره‌های پرواری (میانگین ± خطای استاندارد)

فراسنجه	تیمار			معنی‌داری
	شاهد	تیمار اول	تیمار دوم	
وزن اولیه (کیلوگرم)	۴۰/۱±۴۶/۰۰	۴۰/۱±۷۳/۰۰	۴۰/۱±۳۵/۰۰	۰/۹۹
وزن نهایی (کیلوگرم)	۵۴/۰±۱۳/۹۷	۵۶/۰±۸۸/۹۷	۵۴/۰±۲۵/۹۷	۰/۳۷
افزایش وزن روزانه (گرم در روز)	^{b}۲۲۷/۹±۷۸/۵۵	^{a}۲۶۹/۹±۱۷/۵۵	^{b} ۲۳۱/۹±۶۷/۵۵	۰/۰۵
افزایش وزن نهایی (کیلوگرم)	^{b}۱۳/۰±۶۶/۵۷	^{a}۱۶/۰±۱۵/۵۷	^{b}۱۳/۰±۹۰/۵۷	۰/۰۵
ماده خشک مصرفی روزانه (کیلوگرم)	^{b}۱/۰±۸۶/۰۰	^{a}۱/۰±۸۷/۰۰	^{b}۱/۰±۸۶/۰۰	<۰/۰۰۰۱
ماده خشک مصرفی کل (کیلوگرم)	^{b}۱۱۱/۰±۳/۱۷	^{a}۱۱۱/۰±۹/۱۷	^{b}۱۱۱/۰±۵/۱۷	<۰/۰۰۰۱
ضریب تبدیل خوراک	^{a}۸/۰±۳۴/۳۵	^{b}۷/۰±۰۰/۳۵	^{a}۸/۰±۰۶/۳۵	۰/۰۵

حروف غیر مشترک نشان دهنده معنی‌داری در سطح P≤ ۰/۰۵.

تیمار اول: کاه برنج خیسانده در پساب ملاس به مدت ۱۲ ساعت؛ تیمار دوم: کاه برنج جوشانده در پساب ملاس به مدت ۱ ساعت.



نمودار ۱:تغییرات وزن بدن بره¬ها در طول دوره آزمایشی

3-2-اثر بر فراسنجه‌های خونی

در جدول ۲ اثر استفاده از کاه برنج فرآوری شده با پساب تقطیری ملاس بر برخی فراسنجه‌های خونی بره‌های پرواری نشان داده شده است. بر این اساس هیچ یک از فراسنجه‌های خونی تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت و تفاوت آن‌ها با گروه شاهد معنی‌دار نشد (P>۰/۰۵). در اکثر مطالعات صورت گرفته تیمار کردن کاه با تیمارهای مختلف اثری بر فراسنجه‌های خونی نداشت. Salem و همکاران (۲۰۱۱)، Rivero و همکاران (۲۰۱۳) و Ganai و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که تغذیه از آنزیم‌های اگزوژنوس تاثیری بر فراسنجه‌های خونی نداشت. درحالیکه Gomaa و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که بره‌های تغذیه شده با کاه تیمار شده با اوره-ملاس غلظت پروتئین کل بالاتری داشتند، اما بین غلت گلوکز، نیتروژن اوره‌ای و کراتین سرم در بین تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. همچنین در تایید نتایج ما مطالعات زیادی عدم تأثیر پساب تقطیری ملاس چغندرقند غلظت گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسرید، اوره، کراتینین و آلبومین بر بره‌های مختلف را گزارش کرده‌اند (معینی و همکاران، ۲۰۱۳؛ معینی و همکاران، ۲۰۱۴؛ علامه صدر و معینی، ۱۳۹۱). اما در بررسی استفاده از سطوح پساب تقطیری ملاس در جیره گوساله‌های پرواری افزودن نه درصد پساب تقطیری ملاس چغندرقند در مقایسه با گروه شاهد میانگین پروتئین کل خون گوساله‌های را افزایش داد (ورمزیار، ۱۳۹۴).

جدول ۲: اثر استفاده از کاه برنج فرآوری شده با پساب تقطیری ملاس بر برخی فراسنجه‌های خونی بره‌های پرواری (میانگین ± خطای استاندارد)

فراسنجه	تیمار	معنی‌داری

	شاهد	تیمار اول	تیمار دوم	
گلوکز(mg/dL)	۷۹/۲±۲۱/۲۳	۸۰/۲±۶۳/۲۳	۷۸/۲±۶۱/۲۳	۰/۹۴
پروتئین کل(g/dL)	۷/۰±۰۵/۲۲	۷/۰±۷۰/۲۲	۷/۰±۵۱/۲۲	۰/۵۱
تری‌گلیسیرید(mg/dL)	۷۹/۳±۰۴/۳۶	۸۴/۳±۰۷/۳۶	۷۵/۳±۰۸/۳۶	۰/۵۷
اوره (mg/dL)	۳۷/۰±۷۳/۶۸	۳۷/۰±۲۹/۶۸	۳۶/۰±۸۱/۶۸	۰/۸۸
کلسترول(mg/dL)	۸۰/۲±۲۷/۲۸	۶۹/۲±۰۷/۲۸	۷۴/۲±۸۳/۲۸	۰/۱۳

حروف غیر مشترک نشان دهنده معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ ≥P.

تیمار اول: کاه برنج خیسانده در پساب ملاس به مدت ۲۴ ساعت؛ تیمار دوم: کاه برنج جوشانده در پساب ملاس به مدت ۱ ساعت.

3-3-اثر بر ترکیب شیمیایی

مقایسه ترکیب شیمیایی تیمارهای مختلف کاه گندم و کاه برنج در جدول ۳ آورده شده است. براساس اطلاعات این جدول مخلوط کردن کاه گندم و کاه برنج نسبت به کاه گندم یا کاه برنج میزان پروتئین بیشتری داشت (P<۰/۰۵). فرآوری کاه برنج با جوشاندن یا خیساندن در پساب ملاس سبب کاهش ماده خشک، کاهش فیبر نامحلول در شوینده خنثی، فیبر نامحلول در شوینده اسیدی و افزایش پروتئین و عصاره اتری آن گردید (P<۰/۰۵). پسماندهای کشاورزی حاصل از برداشت و اتحصال محصولات زراعی، مواد خشبی بوده که مقدار قابل توجهی از خوراک دام را تأمین می‌کنند. این مواد دارای خصوصیاتی مثل حجیم بودن، الیاف خام و لیگنین بالا، ارزش غذایی و هضمی پایین و پروتئین خام پایین هستند (فضائلی، ۱۳۷۴) که تلاش می‌شود با روش‌های مختلف ارزش تغذیه‌ای آن‌ها بالا برده شود. همسو با نتایج ما افزایش محتوای پروتئین خام و کاهش میزان NDF و ADF کاه برنج را با تیمار کردن آن با ملاس اوره و آنزیم فیبرولایتیک را محققان زیادی گزارش کردند. Sheikh و همکاران (۲۰۱۷)؛ Polyorach and Wanapat (۲۰۱۵)؛ Sheikh و همکاران (۲۰۱۴)؛ Wanapat و همکاران (۲۰۰۹) بهبود در پروتئین خام کاه برنج تیمار شده را گزارش کردند در حالیکه کاهش فیبر نامحلول در شوینده خنثی و فیبر نامحلول در شوینده اسیدی در مطالعه حاضر مطابق با نتایج گزارش شده قبلی توسط Sheikh و همکاران (۲۰۱۷)؛ Samsudin و همکاران (۲۰۱۳)؛ فضائلی و همکاران (۲۰۰۶)، Singh و همکاران (۱۹۹۰) می‌باشد. نشان داده شده است که فعالیت آنزیم‌های فیبرولایتیک مثل سلولاز، بتا-گلوکوزیداز و زایلاناز سبب کاهش ترکیبات لیگنوسلولوزی در کاه برنج شده است (Gomaa و همکاران، ۲۰۱۲؛ Pothiraj و همکاران، ۲۰۰۶).

جدول ۳. اثر فرآوری کردن کاه برنج به روش‌های مختلف بر ترکیبات شیمیایی آن (میانگین ± خطای استاندارد)

فراسنجه	تیمارها			معنی‌داری
	کاه برنج	کاه جوشانده شده در پساب ملاس	کاه خیسانده شده در پساب ملاس	
ماده خشک	۹۳/۴۳±۰/۱۴	۹۳/۴۱±۰/۱۴	۹۳/۳۵±۰/۱۴	۰/۹۷
پروتئین	۶/۳۲±۰/۲۶^{b}	۷/۵۱±۰/۲۶^{a}	۷/۵۶±۰/۲۶^{a}	۰/۰۵
عصاره اتری	۱/۴۸±۰/۱۳^{b}	۲/۳۱±۰/۱۳^{a}	۱/۸۳±۰/۱۳^{ab}	۰/۰۰۱
ADF	۵۵/۸۶±۵/۴۱^{a}	۲۱/۰۶±۵/۴۱^{c}	۲۶/۳۷±۵/۴۱^{b}	<۰/۰۰۰۱
NDF	۷۰/۷۲±۴/۳۲^{a}	۴۲/۰۰±۴/۳۲^{c}	۴۸/۹۴±۴/۳۲^{b}	<۰/۰۰۰۱
کلسیم	۰/۶۵±۰/۰۲	۰/۶۸±۰/۰۲	۰/۶۲±۰/۰۲	۰/۶۰
فسفر	۰/۲۱±۰/۰۱	۰/۲۵±۰/۰۱	۰/۱۹±۰/۰۱	۰/۲۴
خاکستر	۱۵/۲۶±۰/۸۴^{a}	۹/۹۲±۰/۸۴^{b}	۱۳/۰۲±۰/۸۴^{a}	۰/۰۰۳

حروف غیر مشترک نشان دهنده معنی‌داری در سطح P≤ ۰/۰۵.

NDF: فیبر نامحلول در شوینده خنثی، ADF: فیبر نامحلول در شوینده اسیدی.

۳-۴-ضریب اقتصادی

همانطور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود ضریب اقتصادی در تیمار کاه برنج خیسانده به دلیل هزینه کمتر جیره و ضریب تبدیل غذایی بهتر به طور معنی‌داری از تیمار شاهد و تیمار جوشانده بهتر بود. کرم پور علمی (۱۳۹۸) نشان داد هنگام استفاده از کاه جوشانده در جیره‌ی بز های شیرده هزینه تمام شده جیره کاه غنی شده ارزان‌تر شد. مصطفایی و همکاران (۱۳۹۸) نیز گزارش کردند که استفاده از مخلوط پساب ملاس تقطیری با سبوس باعث کاهش قیمت تمام شده‌ی خوراک تا سطح ۵۰ درصد کنسانتره گردید اما بر روی عملکرد رشد و فراسنجه‌های خونی اثری نداشت.

جدول ۴: محاسبه میانگین ضرایب اقتصادی جیره ها(تومان)

تیمارهای آزمایشی	قیمت کل جیره مصرفی*	قیمت کل اضافه وزن بره**	ضریب اقتصادی***
شاهد	۶۷۱×۱۸۷۷=۱۲۴۹۴۶۷	۴۶۰۰۰×۸۲=۳۷۷۲۰۰۰	۰/۳۳۲^{a}
تیمار کاه خیسانده	۶۷۳×۱۷۱۰=۱۱۵۰۸۳۰	۴۶۰۰۰×۹۶/۷=۴۴۵۲۸۰۰	۰/۲۵۸^{c}

تیمار کاه جوشانده	۶۷۰×۱۷۱۵=۱۱۴۹۰۵۰	۴۶۰۰۰× ۸۳/۴=۳۸۳۶۴۰۰	۰/۳۰۱[b]
معنی داری	-	-	<۰/۰۰۱

*قیمت کل جیره مصرفی: مقدار خوراک مصرف شده در دوره ضرب در قیمت یک کیلو گرم جیره

**قیمت کل اضافه وزن: مقدار اضافه وزن در دوره ضرب در قیمت یک کیلو گرم وزن زنده

***ضریب اقتصادی : قیمت کل جیره مصرفی تقسیم بر قیمت کل اضافه وزن بره ها

4.نتیجه گیری

بره‌های تغذیه شده با کاه برنج خیسانده در پساب تقطیری ملاس افزایش وزن روزانه ،افزایش وزن کل و همچنین ماده خشک مصرفی بیشتری نسبت به دو گروه آزمایشی دیگر داشتند و ضریب تبدیل خوراک در گروه کاه خیسانده نسبت به دو گروه دیگر به طور معنی داری بهتر بود. هیچ یک از فرانسجه های خونی تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت و تفاوت معنی داری با گروه شاهد نداشتند. هزینه جیره در تیمار های کاه برنج خیسانده و جوشانده نیز به طور قابل توجهی کاهش داشت. کاه برنج خیسانده یا جوشانده شده با پساب تقطیری ملاس با قیمت تمام شده‌ی کمتر به عنوان یک ترکیب غذایی جدید و ارزان می‌تواند جایگزین بخشی از جیره شود و سودآوری قابل توجهی برای پرورش دهندگان دام فراهم کند و از طرفی استفاده از پساب حاصله باعث کاهش آلودگی محیط زیست می شود

پیشنهادات

با توجه به عدم وجود اختلاف معنی دار در روش خیساندن و جوشاندن و راحتی کار و هزینه کمتر، روش خیساندن کاه در پساب تقطیری ملاس پیشنهاد می گردد. درآزمایش بعدی درصد بیشتری از کاه برنج در پساب تقطیری ملاس خیسانده و تعداد بره های بیشتری نیز استفاده شود. همچنین پیشنهاد میشودازمایشاتی نیز روی دام های داشتی و میش یا بزهای خشک انجام شود.

منابع

۱. فضائلی، حسن . ۱۳۷۴ . جزوه آموزشی تغذیه دام دوره های ضمن خدمت.

۲. علامه صدر و و معینی م م . ۱۳۹۱. اثرسطوح مختلف پساب تقطیری ملاس بر عملکرد و خصوصیات لاشه جوجه‌های گوشتی. پنجمین کنگره علوم دامی ایران، ۹-۸ شهریور، اصفهان، ایران.

۳. ورمزیار ب، شکرالهی ب و معینی م م. ۱۳۹۴. بررسی اثر استفاده از سطوح مختلف پساب تقطیری تغلیظ شده ملاس بر عملکرد و برخی پارامترهای بیوشیمیایی گوساله‌های هلشتاین. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته علوم دامی گرایش تغذیه دام و طیور. دانشگاه کردستان.

43- Buranov, A.U. and G. Mazza. 2008. Lignin in straw of herbaceous crops. *Ind. Crops Prod*. 28: 237–259.

44- Doyle, P. T., C. Devendra and G. R. Pearce. 1986. *Rice straw as a feed for ruminants*. IDP, Canberra, Australia.

45- Doyle, P. T., C. Devendra and G. R. Pearce. 1986. *Rice straw as a feed for ruminants*. IDP, Canberra, Australia.

46- Fazaeli H, Azizi A, Amile M. Nutritive value index of treated wheat straw with Pleurotus fungi fed to sheep. Pakistan Journal of Biological Science. 2006; 9(13):2444-2449.
47- Ganai AM, Sharma T, Dhuria RK. Effect of yeast (*Saccharomyces cervevisiae*) supplementation on ruminal digestion of bajra (*Pennisetum glaucum*) straw and bajra starw based complete feed *in vitro.* Animal Nutriion and Feed Technology. 2015; 15:145-153.
48- Gomaa R, Gado HM, El-Sayed H, Abd El Mawla S. Usage of treated rice straw with exogenous anaerobic bacterial enzymes (ZAD) for Ossimi sheep. Annals of Agricultural Sciences. 2012; 57:183-190.
49- Gomaa R, Gado HM, El-Sayed H, Abd El Mawla S. Usage of treated rice straw with exogenous anaerobic bacterial enzymes (ZAD) for Ossimi sheep. Annals of Agricultural Sciences. 2012; 57:183-190.
50- Jung, H. G., V.H. Varel, P. J. Weimer and J. Ralph. 1999. Accuracy of Klason lignin and acid detergent lignin methods as assessed by bomb calorimetry. *J. Agr. Food Chem*. 47: 2005-2008.
51- Kerley, M. S., G. C. Fahey Jr, L. L. Berger, J. M. Gould and F. L. Baker. 1985. Alkaline hydrogen peroxide treatment unlocks energy in agricultural byproducts. *Science*. 230: 820.
52- McDonald, P., R. A. Edwards, J. F. D. Greenhalgh, and C. A. Morgan. 2002. *Animal Nutrition*. 6th ed., Pearson Education Limited, Harlow.
53- Moeini M M, Veyskarami S and Hozhabri F (2014) Effect of Molasses Distillers Condensed Soluble on Nutrients Digestibility, Performance and Some Blood Biological Parameters in Lambs. Annual Research and Review in Biology.4: 443.
54- Moeini M, Sadr V, Hozhabri F and Sanjabi M (2013) The effects of dietary inclusion rate of molasses distillers soluble on nutrients digestibility, performance and some blood biological parameters of finishing lambs. Journal of Agricultural Technology. 9:349-359.
55- Polyorach, Wanapat. Improving the quality of rice straw by urea and calcium hydroxide on rumen ecology, microbial protein synthesis in beef cattle. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 2015; 99(3):449-56.
56- Pothiraj C, Kanmani P, Balaji P. Bioconversion of cellulose materials. Mycobiology. 2006; 34(4):159-165.
57- Rivero N, Salem AZM, Ronquillo MG, Cerrillo-Soto MA, Camacho LM, Gado H *et al*. Effects of exogenous enzymes and *Salix babylonica* L. extract on cellular immune response and its correlation with average daily weight gain in growing lambs. Animal Nutriion and Feed Technolog. 2013; 13:411-422.
58- Saleem AZM, El-Adawy MM, Gado H, Camacho LM, González-Ronquillo M, Alsersy H *et al*. Effects of exogenous enzymes on nutrients digestibility and growth performance in sheep and goats. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 2011; 14:867-874.
59- Samsudin AA, Masori MF, Ibrahim A. The effects of effective microorganisms (em) on the nutritive values of fungal treated rice straw. Malasian Journal of Animal Science. 2013; 16(1):97-105.
60- Sheikh GG, AM Ganai, FA Sheikh, Shakil A Bhat, Danish Masood, Shabir Mir, Ishfaq Ahmad and Mudasir Ahmad Bhat. 2017. Effect of feeding urea molasses treated rice straw along with fibrolytic enzymes on the performance of Corriedale Sheep. Journal of Entomology and Zoology Studies 2017; 5(6): 2626-2630
61- Sheikh GG, Sarkar TK, Ganai AM, Ahmad HA, Islam S. Effect of feeding urea molasses impregnated paddy straw on nutrient utilization, milk yield and economics of feeding in crossbred cows. Indian Journal of Animal Nutrition. 2014; 2:152-155.
62- Singh K, Rai SN, Rakatan, Han YW. Biochemical profiles of solid state fermented wheat straw with *Coprinus fimetarius*. Indian Journal of Dairy Sciences. 1990; 60:984-990.
63- Wanapat M, Polyorach S, Boonnop K, Mapato C, Cherdthong A. Effect of treating rice straw with urea or urea and calcium hydroxide upon intake, digestibility, rumen fermentation and milk yield of dairy cows. Livestock Science. 2009; 125:238-243.
64- Warly, L., T. Matsui, T. Harumoto and T. Fujihara. 1992. Study on the utilization of rice straw by sheep: Part I. The effect of soybean meal supplementation on the eating and rumination behavior. *Asian-Austr. J. Anim Sci*. 5: 695-698.
65- Zhang, R., & Jenkins, B.M. (2004). Commercial uses of straw. Agricultural Mechanization and Automation. Vol II. California: USA.

The effect of different ratios of forage to concentrate on the process of degradation of feed nutrients in the in vitro conditions of small ruminants

Abdolmansour Tahmasbi[1*]; Abasali Naserian[1]; Reza Valizadeh[1]; Mehrdad Movahednasab[2]; Nayereh Hasanzade [3]

1-Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

2-Master student, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

3-Graduate, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

Corresponding author: tahmasebi@ferdowsi.um.ac.ir

Abstract

The above experiment was designed and implemented to investigate the effect of different ratios of forage to concentrate on nutrient degradability. In this experiment, five different ratios of forage to concentrate including 90: 10, 80: 20, 70: 30, 60: 40 and 50:50 were used to determine the chemical composition, gas production parameters and nutrient degradability. Increasing the ratio of forage to concentrate caused a significant decrease in DM and CP ($P < 0.05$). It also caused a significant increase in ADF and NDF ($P < 0.05$). Gas production potential decreased significantly with increasing forage to concentrate ratio ($P < 0.05$). Gas production rate increased with increasing forage to concentrate ratio but was not statistically significant. Different ratios of forage to concentrate at different planting hours than 24 hours had no significant effect on pH but ammonia nitrogen decreased at different planting hours with increasing forage to concentrate ratio. Experimental treatments had a significant effect on the disappearance of DM and CP NDF in 24 hours. The highest and lowest rates of dry matter disappearance were observed in the ratios of 90: 50 and 50:50 forage to concentrate, respectively. Also, the lowest CP degradability and the highest cell wall degradability in 24 hours were observed in 50:50 and 90:10 forage concentrate treatments, respectively.

Keywords: Forage to concentrate ratio, Degradability, Gas production, Ammonia nitrogen

تأثیر نسبت های مختلف علوفه به کنسانتره بر روند تجزیه پذیری مواد مغذی خوراک در شرایط برون تنی نشخوارکنندگان کوچک

عبدالمنصور طهماسبی[1*]؛ عباسعلی ناصریان[1]؛ رضا ولی زاده[1]؛ مهرداد موحدنسب[2]؛ نیره حسن زاده[3]
۱ استاد، گروه علوم دامی ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲ دانشجو کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳ دانش آموخته، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
*نویسنده مسئول: tahmasebi@ferdowsi.um.ac.ir

چکیده
به منظور بررسی اثر نسبت های مختلف علوفه به کنسانتره بر تجزیه‌پذیری موادمغذی خوراک آزمایش حاضر طراحی و اجرا گردید. در این آزمایش از پنج نسبت مختلف علوفه به کنسانتره شامل۴۰:۶۰،۳۰:۷۰،۲۰:۸۰،۱۰:۹۰و۵۰:۵۰ برای تعیین ترکیب شیمیایی، فراسنجه های تولیدگاز و تجزیه پذیری مواد مغذی استفاده گردید. افزایش نسبت علوفه به کنسانتره باعث کاهش معنی‌داری در میزان DM وCP گردید (P<۰/۰۵). همچنین سبب افزایش معنی‌داری در میزان ADF و NDF شد(P<۰/۰۵). پتانسیل تولیدگاز با افزایش نسبت علوفه به کنسانتره کاهش معنی داری داشت (P<۰/۰۵). نرخ تولیدگاز با افزایش نسبت علوفه به کنسانتره افزایش یافت اما به لحاظ آماری معنی‌دار نبود. نسبتهای مختلف علوفه به کنسانتره در ساعت های مختلف کشت غیر از ۲۴ ساعت اثر معنی داری بر pH نداشت اما نیتروژن آمونیاکی درساعات مختلف کشت با افزایش نسبت علوفه به کنسانتره کاهش یافت. تیمارهای آزمایشی برناپدیدشدن DM، CP وNDF در مدت زمان ۲۴ ساعت آزمایش اثر معنی داری داشتند. بالاترین و پایین ترین میزان ناپدیدشدن ماده خشک به ترتیب در نسبتهای۹۰:۱۰ و ۵۰:۵۰ علوفه به کنسانتره دیده شد. همچنین پایین ترین میزان تجزیه‌پذیریCP و بیشترین میزان تجزیه‌پذیری دیواره سلولی در زمان ۲۴ ساعت، به ترتیب در تیمارهای ۵۰:۵۰ و۹۰:۱۰ علوفه به کنسانتره دیده شد
کلمات کلیدی: نسبت علوفه به کنسانتره، تجزیه پذیری، تولید گاز، نیتروژن آمونیاکی

1. مقدمه
تأمین خوراک دام مسئله حیاتی در صنعت پرورش دام می باشد. در مناطق خشک و نیمه خشک به دلیل دسترسی پایین به چراگاه، خوراک نشخوارکنندگان براساس کنسانتره می باشد (Danesh Mesgaran and Stern., 2005). در حال حاضر صنعت گاو شیری بیشتر متمرکز بر سیستم های فشرده است، به همین جهت هزینه و انرژی بالایی صرف آن می شود. کاهش نسبت کنسانتره در جیره گاوهای شیری می تواند هزینه های این روش پرورش را کاهش دهد، امایافتن جیرهای بر پایه علوفه که بتواند سطوح مناسب تولید را حفظ کند، شناخته نشده است. یک رویکرد جدید در این رابطه فرموله کردن جیره‌ها با استفاده از مدل های هضمی است که پاسخ حیوان به خوراک ها را پیش بینی می‌کند (Russell., 1998).
مطالعات اختصاصی بسیاری برای بهبود فهم فرآیند های درگیر در هضم نشخوارکنندگان وجود دارد که با استفاده از مدل های حاصل از آزمایش های هضمی برون تنی و درون تنی گرد آوری شده است. البته مدل‌سازی هضم نشخوارکنندگان با استفاده از سیستم های هضمی برون تنی می‌تواند در توضیح جنبه های ویژه هضم مانند تغییرات در pH، مفیدتر باشد و به فهم بهتر مکانیسم

های هضمی و بنابراین به بهترشدن پیش بینی پاسخ گاو به جیره های جدید منجرشود (Calsamiglia et al., 2002). استفاده از یک نوع ماده غذایی به تنهایی نمی تواند تمام احتیاجات دام را برطرف کند، زیرا از طرفی حجم شکمبه و دستگاه گوارش حیوان محدود است و از سوی دیگر بدن حیوان به مجموعه‌ای از مواد غذایی احتیاج دارد، که باید برحسب احتیاجات نگهداری واحتیاجات تولیدی حیوان و نوع مواد غذایی و با توجه به جنبه‌های مالی آن تهیه و تنظیم گردد.

مصرف موادمغذی مهمترین عامل‌تأثیر گذار بر عملکرد حیوان است و عبور موادرد فرآیندهای هضمی می تواند مصرف و بهره وری از علوفه ها را در نشخوارکنندگان محدود می‌کند (Fimbres et al., 2002). برای بهبود مصرف علوفه نرخ جابه جایی از شکمبه باید بوسیله افزایش نرخ هضم، نرخ عبور یا هردو افزایش یابد (Fimbres et al., 2002). تنوع در کیفیت علوفه می تواند بر مصرف ماده خشک، دانسیته انرژی خوراک، مقادیر مکمل پروتئین و غلات خوراک، قیمت خوراک، عملکرد گاوهای شیری و سلامت گاو تأثیر گذار باشد. بنابراین مصرف علوفه با کیفیت بالاتر می تواند باعث کاهش مصرف و قاعدتا کاهش قیمت خوراک شود (Ball et a., 2001).

2.مواد و روش ها

این پژوهش در سال۱۳۹۳ در آزمایشگاه های گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی انجام گرفت و به منظور تهیه تیمارهای آزمایشی جیره‌ای براساس نیاز یک گاو شیری پرتولید (NRC،۲۰۰۱) نوشته و نسبت‌های مختلف علوفه به کنسانتره شامل ۹۰:۱۰، ۸۰:۲۰، ۷۰:۳۰، ۶۰:۴۰ و ۵۰:۵۰ تهیه شد. در ابتدا اقلام خوراک با الک ۱ میلی‌متر آسیاب شد و آنالیز شمیایی اقلام خوراکی بر اساس روشهای استاندارد تعیین گردید . اجزاء و مقادیر جیره کاملا مخلوط در جدول ۱ گزارش شده است. برای اندازه گیری مقدار گاز تولیدی در تیمار های مختلف از روش ارائه شده توسط منک و استینگاس (۱۹۸۸) استفاده شد. فشار گاز تولید شده در زمان های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۴۸،۷۲و ۹۶ اندازه گیری شد. روش قرائت فشار به وسیله فشارسنج برای مشخص کردن گاز تولید شده استفاده شد (Theodorou et al., 1994). تولید تجمعی گاز با استفاده از مدل ارسکوف و کدونالد (۱۹۷۹) بر حسب زمان محاسبه و بر اساس برازش بهینه سازی شده‌ی Y=b(1-exp-ct) به کمک نرم افزار آماری sas ویرایش ۹/۱ پتانسیل تولید گاز (b) و نرخ تولید گاز در زمان (c) به دست آمد.

برای تخمین قابلیت هضم ماده آلی از حجم گاز تولیدی براساس ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک در طول ۲۴ ساعت و رابطه زیر استفاده شد (Menk and Steingass., 1988).

OMD =۱۴/۸۸ + ۰/۸۸۹۳GP +۰/۴۴۸CP +۰/۰۶۵۱Ash

OMD: قابلیت هضم ماده آلی(g/kg DM)

GP: حجم گاز تولیدی تصحیح شده برای ۲۴ ساعت (ml/ 200 mg of DM)

CP: پروتئین خام (g/kg DM)

ASH: خاکسترخام (g/kg DM)

برای محاسبه پارامتر انرژی قابل متابولیسم از رابطه زیر استفاده گردید (منک و استینگاس، ۱۹۸۸).

ME = ۲/۲ +۰/۱۳۵۷GP + ۰/۰۵۷CP + ۰/۰۰۲۸۵۹CP2

ME: انرژی قابل متابولیسم (مگا ژول در کیلوگرم ماده خشک)

GP: حجم گاز تولیدی (ml/200mg DM in 24h)

CP: پروتئین خام (g/kg DM)

برای برآورد اسیدهای چرب زنجیرکوتاه تمام مراحل آماده سازی محلول ها و مواد خوراکی و محیط مشابه روش تولید گاز انجام شد. زمان انکوباسیون در این روش شامل ۲، ۴، ۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت بود. پس از زمان های مشخص شده بطری ها آزمایشی از انکوباتور خارج و تا انجام آنالیز های آزمایشی در سردخانه ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند و از فرمول زیر برای برآورد اسید های چرب زنجیرکوتاه استفاده شد

SCFA (mmol/200 mg DM)=۰/۰۲۲۲GP -۰/۰۰۴۲۵

برای محاسبه نیتروژن آمونیاکی بطری‌های شیشه‌ای حاوی محیط کشت در ساعت‌های ۲، ۴، ۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت انکوباسیون صاف گردید و ۵ میلی‌لیتر از مایع صاف شده به همراه ۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال مخلوط و به سردخانه ۲۰- درجه سانتیگراد منتقل شد. میزان نیتروژن آمونیاکی از طریق فرمول زیر محاسبه گردید.

$$C = (40/A) \times B$$

A: عدد محلول استاندارد که توسط دستگاه نشان داده می شود.

B: عددی که دستگاه برای هر نمونه نشان می دهد.

C: مقدار واقعی نیتروژن آمونیاکی.

پس از هر زمان انکوباسیون، مایع محیط کشت برای مشخص شدن میزان pH آن مورد ارزیابی قرار می گرفت.

جدول 1: ترکیب اجزاء خوراک و مواد مغذی موجود در جیره‌های آزمایشی

اجزاء جیره (درصد کل جیره)	نسبت علوفه به کنسانتره				
	۹۰:۱۰	۸۰:۲۰	۷۰:۳۰	۶۰:۴۰	۵۰:۵۰
یونجه	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵
سیلاژ ذرت	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵
تخم پنبه	۹/۰۴	۸/۰۱	۷/۰۲	۶/۹۰	۵/۰۱
جو	۲۳/۹۹	۲۱/۳۳	۱۸/۶۶	۱۶	۱۳/۳۳
ذرت	۲۳/۹۹	۲۱/۳۳	۱۸/۶۶	۱۶	۱۳/۳۳
سویا	۱۴/۹۹	۱۳/۳۳	۱۱/۶۶	۹/۱۰	۸/۳۳
پودر گوشت	۵/۹۹	۵/۳۳	۴/۶۶	۴	۳/۳۳
سبوس	۵/۹۹	۵/۳۳	۴/۶۶	۴	۳/۳۳
چربی	۳	۲/۶۷	۲/۳۴	۲	۱/۶۷
کربنات کلسیم	۱/۲۱	۱/۰۷	۰/۹۴	۰/۸۰	۰/۶۷
مکمل	۱/۳۵	۱/۲۰	۱/۰۵	۰/۹۰	۰/۷۵
نمک	۰/۴۵	۰/۴۰	۰/۳۵	۰/۳۰	۰/۲۵
مجموع	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
ترکیب مواد مغذی جیره اندازه گیری شده (درصد ماده خشک جیره)					
ماده خشک	۸۰/۳۰	۷۲/۰۰	۶۵/۳۱	۵۹/۷۷	۵۵/۱۲
پروتئین خام	۱۷/۹۰	۱۷/۲۰	۱۶/۴۰	۱۵/۴۰	۱۴/۹۰
عصاره اتری	۷/۷	۷/۱	۶/۵	۶/۰	۵/۳
ME (Mcal/kg)	۲/۶۷	۲/۶۳	۲/۵۹	۲/۵۴	۲/۴۹

(Mcal/kg)NEl	۱/۷۳	۱/۶۹	۱/۶۶	۱/۶۳	۱/۵۸
NDF	۲۱/۶۰	۲۴/۷۰	۲۷/۹۰	۳۱/۴۰	۳۴/۲۰
ADF	۱۲/۱۰	۱۴/۶۰	۱۷/۲۰	۲۰/۰۰	۲۲/۳۰
NFC	۴۷/۵۰	۴۵/۷۰	۴۳/۹۰	۴۲/۰۰	۴۰/۴۰
کلسیم	۱/۲۰	۱/۱۰	۱/۱۰	۱/۰۰	۱/۰۰
فسفر	۰/۷۰	۰/۶۰	۰/۶۰	۰/۵۰	۰/۵۰

3.نتایج و بحث

افزایش نسبت علوفه به کنسانتره باعث کاهش معنی داری در میزان پروتئین خام گردید (P<۰/۰۵). میزان NDFو ADF با افزایش نسبت علوفه به کنسانتره افزایش یافت (جدول ۲) ، به طوری که در جیره حاوی ۹۰ درصد کنسانتره کمترین مقدار ADF و جیره حاوی ۵۰ درصد کنسانتره شامل بیشترین مقدار ADF بود (P<۰/۰۵). میزان ماده آلی در نسبت‌های مختلف با افزایش میزان علوفه ماده آلی کاهش یافت، همچنین میزان خاکستر با افزایش نسبت علوفه به کنسانتره افزایش یافت. جیره ۵۰:۵۰ در مقایسه با سایر نسبت‌ها حاوی بیشترین مقدار خاکستر و جیره ۱۰:۹۰ حاوی کمترین مقدار خاکستر بود. چن و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند با افزایش سطح کنسانتره از ۲۰ به ۵۰ درصد پروتئین خام از ۱۰/۴۶ به ۱۱/۱۶ درصد در TMR افزایش یافت. از طرفی با افزایش نسبت کنسانتره، فیبر خام در جیره کاهش پیدا کرد. در مطالعه‌ای که توسط اگل و همکاران (۲۰۱۰) صورت گرفت، با افزایش کنسانتره از ۵۲ درصد به ۷۲ درصد گزارش شد که مقادیر NFC از ۴۲ به ۴۸/۶ افزایش و مقادیر CP از ۱۶/۵ به ۱۶/۴ و NDF از ۳۲/۴ به ۲۶/۳ کاهش یافت. در مطالعه دیگری که با دو نسبت علوفه به کنسانتره ۷۵:۲۵ و ۲۵:۷۵ انجام شد، گزارش گردید که مقادیر CP از ۱۵/۵ به ۱۸/۸ و ME از ۲/۲۹ به ۲/۸۱ افزایش و NDF وADF به ترتیب از ۴۶/۵ به ۲۷/۶، ۲۷/۹ به ۲۷/۷ کاهش یافت (McLeod and Baldwin., 2000). به طور کلی نتایج این آزمایش نشان داد که با افزایش نسبت علوفه به کنسانتره در جیره‌های کاملا مخلوط به دلیل افزایش کربوهیدرات های ساختمانی میزان NDF، ADF وخاکسترافزایش و میزان CP، DM و OM به دلیل افزایش فیبر جیره کاهش یافت.

جدول۲: ترکیب شیمیایی جیره های کاملا مخلوط استفاده شده در آزمایش برون تنیاول

ترکیب شیمیایی (براساس درصد ماده خشک)	نسبت کنسانتره‌به علوفه[1]					SEM	*P-Value*
	۱۰:۹۰	۲۰:۸۰	۳۰:۷۰	۴۰:۶۰	۵۰:۵۰		
ماده خشک	۹۵/۶۲^{a}	۹۱/۳۲^{ab}	۸۶/۶۸^{bc}	۸۲/۶۸^{c}	۵۶/۷۹^{d}	۱/۴۸۳	<۰/۰۰۰۱
پروتئین خام	۱۷/۹۴^{a}	۱۷/۶۵^{ab}	۱۷/۲۷^{ab}	۱۶/۵۵^{b}	۱۵/۱۱^{c}	۰/۳۱۲	۰/۰۰۷

الیاف نامحلول در شوینده خنثی	۳۰/۶۰^{b}	۳۲/۰۰^{b}	۳۳/۹۰^{ab}	۳۸/۰۰^{ab}	۴۲/۹۰^{a}	۲/۷۱۴	۰/۱۰۶
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی	۸/۸۰^{d}	۱۳/۳۰^{c}	۱۵/۷۰^{bc}	۱۸/۰۰^{b}	۲۳/۶۰^{a}	۰/۶۴۵	<۰/۰۰۰۱
ماده آلی	۹۴/۰۰	۹۳/۲۰	۹۳/۰۲	۹۲/۹۲	۹۲/۴۷	۰/۴۳۴	۰/۲۹۵
خاکستر	۶/۰۰	۶/۸۰	۶/۹۷	۷/۰۷	۷/۵۲	۰/۴۳۴	۰/۲۹۵

در هر ردیف میانگین های باحروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دارمی‌باشند (P<۰/۰۵).

با افزایش نسبت علوفه به کنسانتره در جیره تولید گاز کاهش یافت (جدول ۳). افزایش نسبت علوفه به کنسانتره در TMR بر نرخ تولید گاز (C) اثر معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). در بین تیمارها کمترین میزان تولید گاز مربوط به نسبت ۵۰:۵۰ و بیشترین میزان مربوط به نسبت ۱۰:۹۰ بود (P<۰/۰۵).

تولیدگاز به طور معمول برای برآورد قابلیت هضم در نشخوارکنندگان استفاده می شود (Menke et al., 1979). از آنجایی که ترکیب محصولات نهایی مقدار تولید گاز را تحت تأثیر قرار می دهد، ارتباط نزدیکی بین این دو گزارش شده است (Menk and Steingass., 1988). ابرو و همکاران، ۱۹۹۷بیان کردند که سطح کربوهیدرات های غیر فیبری با پتانسیل تولید گاز در زمان های ۶، ۲۴و ۴۸ ساعت انکوباسیون رابطه مثبتی داشت که این با مطالعه حاضر سازگار بود. گتاچو و همکاران (۲۰۰۵) رابطه منفی را بین مقدار پروتئین خام خوراک و پتانسیل تولید گاز گزارش کردند. اثر پروتئین مازاد بر نیاز میکروب ها بر کاهش تولید گاز به این خاطر است که در محیط کشت، افزایش پروتئین خام خوراک تا حدی که بتواند نیاز میکروب ها را تأمین کند، باعث افزایش تولید گاز می شود، اما غلظت نیتروژن آمونیاکی بالا مانع تولید گاز می شود (به دلیل ماهیت بازی بالاتر آن) (Cone and van Gelder., 1999). آمونیاک حاصل از تخمیر پروتئین طی واکنش با CO2تشکیل NH_4HCO_3 را می‌دهد. بنابراین منجر به کاهش سهم CO2 در گاز تولید شده می‌گردد و پروتئین خام در مقایسه با کربوهیدرات ها گاز کمتری تولید می‌کند.

جدول ۳: تأثیرنسبت های مختلف کنسانتره به علوفه در جیره های آزمایشی بر میزان و نرخ تولید گاز در زمان های مختلف انکوباسیون

ترکیب شیمیایی (براساس درصد ماده خشک)	نسبت کنسانتره‌به علوفه[1]					SEM	*P-Value*
	۱۰:۹۰	۲۰:۸۰	۳۰:۷۰	۴۰:۶۰	۵۰:۵۰		
پتانسیل‌تولید گاز(ml/gDM)	۱۰/۷۴۰^{a} ۹	۱۰/۴۸۲^{ab} ۰	۹۸/۶۲۹^{b}	۹۷/۵۸۱^{b}	۹۴/۷۸۴^{b}	۲/۹۶۱۳	۰/۰۹۲۰
نرخ‌تولید گاز(٪/ساعت)	۰/۰۶۵	۰/۰۶۵	۰/۰۶۶	۰/۰۶۶	۰/۰۶۷	۰/۰۰۰۹	۰/۶۱۹۴

درهرردیف میانگین های باحروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دارمی‌باشند (P<۰/۰۵).

جدول ۴:تأثیر نسبت های مختلف کنسانتره به علوفه در جیره بر حجم گاز تولیدی در ۲۴ ساعت ، انرژی قابل متابولیسم، قابلیت هضم ماده آلی و اسیدهای چرب زنجیر کوتاه تخمین زده شده

فاکتورهای بررسی شده	نسبت کنسانتره به علوفه[1]					SEM	*P-Value*
	۱۰:۹۰	۲۰:۸۰	۳۰:۷۰	۴۰:۶۰	۵۰:۵۰		
حجم گازتولیدشده در ۲۴ ساعت(ml/gDM	۳۳/۸	۳۱/۱۲^{ab}	۳۰/۳۷^{ab}	۳۰/۰۷^{ab}	۲۹/۵۶^{b}	۲/۱۸۳	۰/۰۰۶۸
انرژی قا بل متابولیسم(MJ/g DM)	۸/۷۴^{a}	۸/۳۲^{ab}	۸/۱۲^{bc}	۸/۰۵^{bc}	۷/۷۲^{c}	۰/۱۳۹	۰/۰۲۶
قابلیت هضم ماده آلی(٪)	۵۳/۴۹^{a}	۵۰/۹۳^{ab}	۴۹/۸۲^{b}	۴۹/۶۹^{b}	۴۸/۴۳^{b}	۰/۹۱۰	۰/۰۶۸
اسیدهای چرب زنجیرکوتاه(µmol)[4]	۰/۷۵^{a}	۰/۶۹^{ab}	۰/۶۷^{ab}	۰/۶۶^{ab}	۰/۶۵^{b}	۰/۰۲۳	۰/۱۴۶

درهرردیف میانگین های باحروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵).

به طور کلی تولید گاز همراه با افزایش کنسانتره در جیره افزایش می‌یابد. اما برخی گزارشات نتایج متنوعی را بر تولید گاز بوسیله نسبت کنسانتره به علوفه نشان دادند (Chen et al., 2009).

ماو و همکاران (۲۰۰۶) با مقایسه سه جیره با مقادیر علوفه بالا، متوسط و پایین افزایش در تولید گاز را مشاهده کردند که البته این افزایش معنی دار نبود. افزایش بخش کنسانتره جیره به دلیل داشتن اجزاء با سرعت تخمیر بالا تولید گاز در واحد زمان را افزایش می دهد، اما مقدار گاز تولیدی به ازای ماده خشک هضم شده کاهش می‌یابد چون به نظر می‌رسد اسید تولیدی از این خوراک ها بیشتر پروپیونات بوده که کمترین تولید گاز را در مقایسه با سایر اسیدهای چرب فرار دارد. از طرفی بخش علوفه ای جیره به دلیل داشتن فیبر که به سختی هضم می‌شود، تولید گاز را کاهش می‌دهد. اثر نسبت های مختلف علوفه به کنسانتره بر حجم گاز تولیدی در ساعت های مختلف انکوباسیون در شکل ۱ نشان داده شده است. با پیشرفت زمان انکوباسیون حجم تولید گاز افزایش یافت به طوری که کمترین حجم گاز تولیدی در دو ساعت اولیه انکوباسیون و بیشترین گاز تولیدی در ۹۶ ساعت دیده شد. همچنین حجم گاز تولیدی در بین نسبت های مختلف با یکدیگر تفاوت داشت. نسبت ۱۰:۹۰ کنسانتره به علوفه بیشترین حجم گاز تولیدی و نسبت ۵۰:۵۰ کمترین حجم گاز تولیدی را در بین نسبت ها دارا بود. چون با افزایش میزان علوفه توقف مواد در شکمبه کاهش می یابد و در نتیجه نرخ خروج افزایش می یابد بنابراین حجم گاز تولیدی با افزایش نسبت علوفه به کنسانتره کاهش یافت.

براساس نتایج گزارش شده در جدول ۴، تفاوت معنی‌داری (P<۰/۰۵) در بین تیمارها مشاهده گردید.. میزان انرژی قابل متابولیسم در تیمار ۱۰:۹۰ در مقایسه با سایر تیمارها بیشترین مقدار و در تیمار ۵۰:۵۰ کمترین مقدار بود. قابلیت هضم ماده آلی در تیمار ۱۰:۹۰ در مقایسه با سایر تیمارها بیشترین مقدار بود، اما در نسبت های ۵۰:۵۰، ۴۰:۶۰ و ۳۰:۷۰ تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵). میزان اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر (SCFA) بر حسب میکرومول نیز در این آزمایش محاسبه گردید که بالاترین

میزان به ترتیب در نسبت ۱۰:۹۰ و ۲۰:۸۰ مشاهده شد. میزان SCFA در سایر نسبت‌ها تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). میزان SCFA رابطه مستقیمی با میزان تولید گاز در آزمایش برون تنی دارد. همانطور که در جدول ۴ مشخص است میزان تولید گاز در زمان ۲۴ ساعت در تیمار ۱۰:۹۰ در

مقایسه با سایر تیمارها بالاتر است، پس می‌توان گفت ارتباط مثبتی بین میزان تولید گاز در ۲۴ ساعت و SCFA وجود دارد.

اثر نسبت‌های مختلف کنسانتره به علوفه بر pH محیط کشت در جدول ۵ نشان داده شده است. با افزایش نسبت علوفه pH افزایش یافت، اما این افزایش به لحاظ آماری معنی دار نبود(P>۰/۰۵). تنها در ۲۴ ساعت افزایش در pH معنی دار بود(P<۰/۰۵).

مقدار pH و نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه پارامترهای مهمی جهت منعکس کردن محیط تخمیری شکمبه هستند (Chen et al., 2009). در برخی مطالعات pH بین جیره‌های با نسبت علوفه به کنسانتره بالا و پایین (۷۰:۳۰و ۳۰:۷۰) تفاوت معنی داری نداشت (Martínez et al., 2011). در مطالعه چن و همکاران (۲۰۰۹) افزودن کنسانتره در روش برون تنی باعث کاهش در pH شد. این احتمال وجود دارد که pH شکمبه بیشتر به غذای مصرفی وابسته است تا نسبت کنسانتره به علوفه. از طرفی آرشمید و همکاران (۱۹۹۷) گزارش نمودند که کاهش هضم فیبر متاثر از کاهش فعالیت باکتریای های سلولولتیک شکمبه می باشد که در نتیجه کاهش pH بروز می نماید.

جدول۵: اثر نسبت‌های مختلف کنسانتره به علوفه بر pH محیط کشت در زمان‌های مختلف انکوباسیون

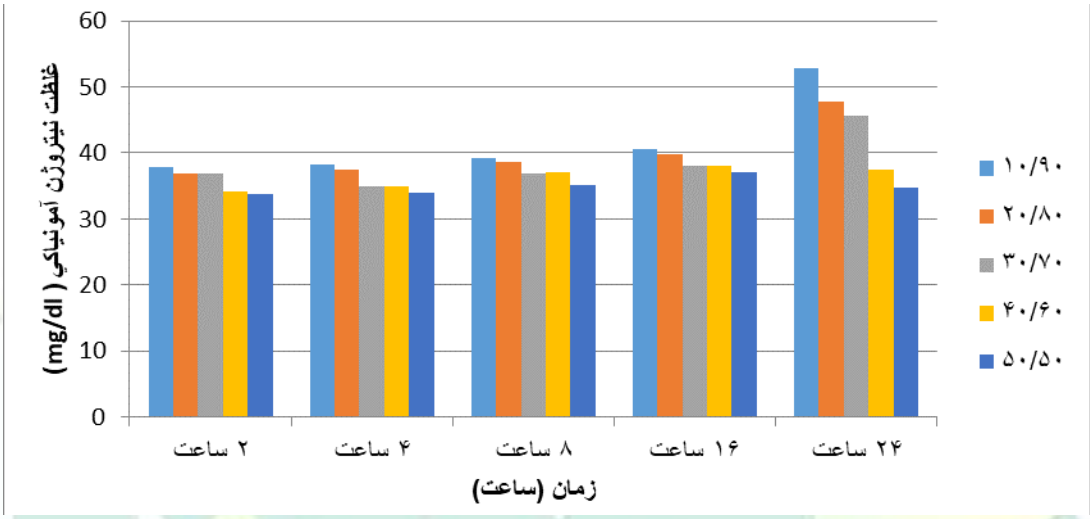
زمان اندازه گیری pH	نسبت کنسانتره به علوفه[1]					SEM	*P-Value*
	۱۰:۹۰	۲۰:۸۰	۳۰:۷۰	۴۰:۶۰	۵۰:۵۰		
۲ ساعت	۶/۸۶	۶/۸۷	۶/۸۹	۶/۹۰	۶/۹۵	۰/۰۳۷	۰/۴۹۸
۴ ساعت	۶/۸۰	۶/۸۱	۶/۸۲	۶/۸۴	۶/۸۶	۰/۰۱۰	۰/۰۴۴
۸ ساعت	۶/۸۷	۶/۹۵	۶/۹۶	۶/۹۹	۷/۳۷	۰/۱۹۷	۰/۴۹۴
۱۶ ساعت	۶/۵۶	۶/۷۵	۶/۷۶	۶/۷۸	۷/۲۱	۰/۱۹۸	۰/۲۸۲
۲۴ ساعت	۶/۷۷^{b}	۶/۹۷^{ab}	۷/۱۳^{a}	۷/۲۹^{a}	۷/۳۰^{a}	۰/۱۰۵	۰/۰۰۷

درهرردیف میانگینهای باحروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵).

در شکل ۱ مشاهده می شود که در بین تیمارها غلظت نیتروژن آمونیاکی در ۱۶ ساعت اول تفاوت معنی داری وجود نداشته است (P>۰/۰۵). درحالی که غلظت نیتروژن آمونیاکی در ۲۴ ساعت افزایش معنی داری یافته است (P<۰/۰۵). در بین نسبت های مختلف، غلظت نیتروژن آمونیاکی در نسبت ۱۰:۹۰ کنسانتره به علوفه در مقایسه با سایر نسبتها بالاتر بود اما این افزایش تنها در ۲۴ ساعت

به لحاظ آماری معنی دار بود (P<۰/۰۵). اگل و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که غلظت نیتروژن آمونیاکی با افزایش کنسانتره در جیره تمایل به کاهش داشته است.

کانتالاپدرا و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند در حالی که غلظت نیتروژن آمونیاکی با افزایش نسبت کنسانتره در بزهایی که جیره‌ای براساس گراس دریافت کرده بودند افزایش یافت، ولی در مورد یونجه خشک این نتیجه حاصل نشد. اما در این مطالعه که



شکل۱:اثرنسبت های مختلف کنسانتره به علوفه برغلظت نیتروژن آمونیاکی درساعت های

از یونجه خشک و سیلاژ ذرت به عنوان بخش علوفه ای استفاده شد، با کاهش میزان کنسانتره غلظت نیتروژن آمونیاکی کاهش یافت. محققان به طور کلی نشان دادند در خوراک‌هایی با غلات بالا غلظت نیتروژن آمونیاکی کاهش پیدا کرد.

جدول۶: اثر نسبت‌های مختلف کنسانتره به علوفه در جیره‌های آزمایشی بر ناپدیدی DM، CP و NDF در زمان ۲۴ ساعت. داده های جدول ۶ نشان میدهد که با افزایش نسبت علوفه میزان ناپدید شدن ماده خشک در زمان ۲۴ ساعت به صورت معنی داری کاهش یافت (P<۰/۰۵). میزان ناپدید شدن ماده خشک در تیمار ۱۰:۹۰ در مقایسه با سایر تیمارها افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). ناپدیدشدن پروتئین خام و الیاف نامحلول در شوینده خنثی هم با افزایش نسبت علوفه به کنسانتره کاهش یافت(P<۰/۰۵).

قابلیت هضم برون تنی ماده خشک (IVDMD) و قابلیت هضم برون تنی پروتئین خام (IVCPD) پارامترهای مهمی برای توصیف قابلیت هضم برون تنی خوراک هستندو می‌توانند برای پیش بینی قابلیت هضم خوراک در شکمبه استفاده شوند (Chen et al., 2009).

IVDMD در جیره هایی با کنسانتره بالا (۳۰٪ یونجه و ۷۰٪ کنسانتره) در مقایسه با کنسانتره پایین (۳۰٪کنسانتره و ۷۰٪ یونجه) به طور معنی داری افزایش یافت، اما IVCPD در بین دو جیره تفاوتی نداشت (Cantalapiedra et al., 2009)

بر اساس مطالعات انتظار می‌رود با افزودن کنسانتره به جیره نشخوارکنندگان، قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی افزایش یابد همچنین ضریب هضم ماده خشک، ماده آلی، ADF،NDF و پروتئین خام در جیره ۷۵ درصد کنسانتره بیشتر گردید. رینولدز و همکاران (۱۹۹۱) بیان نمودند که تفاوت در هضم ظاهری این اجزاء از تفاوت در ترکیب شیمیایی بویژه محتوای فیبر و ترکیبات محلول می‌باشد.

مطالعات نشان داده اند که با کاهش pH تجزیه پروتئین نیز کاهش می‌یابد (Vakili, et al., 2007). فاکتورهای زیادی بر تجزیه پذیری CPدر شکمبه مؤثر هستند؛ مانند نسبت علوفه به کنسانتره در خوراک و pH شکمبه که به وسیله غلظت فیبر خوراک تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Krause et al., 2002). بر اساس مطالعات تفاوت در تجزیه پذیری پروتئین خام می تواند بوسیله تفاوت در محیط شکمبه (نظیرpH)، مقاومت در برابر آنزیم های پروتئولتیک (Ørskov., 1992)، ترکیب و فعالیت میکروب ها (برای مثال باکتری‌های پروتئولتیک و پروتوزواها) و خصوصیت فیزیکی و شیمیایی خوراک (Ørskov., 1992) ایجاد شود.

کانتالاپدرا و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند به دلیل اینکه محتوای CP و قابلیت هضم برون تنی CP (دو فاکتور مؤثر بر غلظت نیتروژن آمونیاکی) در یونجه و کنسانتره مشابه بود، تغییر سطح کنسانتره غلظت نیتروژن آمونیاکی را افزایش نداد.

4.نتیجه‌گیری

در آزمایش فوق اثر نسبت های مختلف علوفه به کنسانتره بر ترکیب شیمیایی، فرآسنجه های تولیدگاز و تجزیه پذیری مواد مغذی مورد بررسی قرار گرفت. با افزایش نسبت علوفه به کنسانتره محتوای DM و CP به طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵) و میزان ADF و NDF به طور معنی‌داری افزایش یافت(P<۰/۰۵). قابلیت تخمیر در روش تولید گاز با افزایش نسبت علوفه به کنسانتره کاهش معنی داری داشت (P<۰/۰۵). میزان انرژی قابل متابولیسم، اسیدهای چرب زنجیر کوتاه و قابلیت هضم ماده آلی در نسبت ۱۰:۹۰ کنسانتره به علوفه در مقایسه با سایر تیمارها افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). نیتروژن آمونیاکی در ساعات مختلف کشت با

افزایش نسبت علوفه به کنسانتره کاهش یافت. تیمارهای مختلف در زمان ۲۴ ساعت تاثیر معنی داری بر ناپدید شدن CP،DM وNDF داشتند (P<۰/۰۵).

منابع

25. **Agle, M., Hristov, A.N., Zaman, S., Schneider, C., Ndegwa, P.M. and Vaddella, V.K., 2010.** Effect of dietary concentrate on rumen fermentation, digestibility, and nitrogen losses in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *93*(9), pp.4211-4222.
26. **AOAC, 1990.** Official method of analysis (15th ed.). Association of Official Analytical Chemists,Inc.,Arlington, Virginia, USA.
27. **Archimède, H., Sauvant, D. and Schmidely, P., 1997.** Quantitative review of ruminal and total tract digestion of mixed diet organic matter and carbohydrates. *Reproduction Nutrition Development*, *37*(2), pp.173-189.
28. **Ball, D.M., Collins, M., Lacefield, G.D., Martin, N.P., Mertens, D.A., Olson, K.E., Putnam, D.H., Undersander, D.J. and Wolf, M.W., 2001.** Understanding forage quality. *American Farm Bureau Federation Publication*, *1*(01).
29. **Calsamiglia, S., Ferret, A. and Devant, M., 2002.** Effects of pH and pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. *Journal of dairy science*, *85*(3), pp.574-579.
30. **Cantalapiedra-Hijar, G., Yáñez-Ruiz, D.R., Martín-García, A.I. and Molina-Alcaide, E., 2009.** Effects of forage: concentrate ratio and forage type on apparent digestibility, ruminal fermentation, and microbial growth in goats. *Journal of Animal Science*, *87*(2), pp.622-631.
31. **Chen, D., Peel, M.D., Olson, K.C., Weimer, B.C. and DeWald, D.B., 2009.** Differential ruminal degradation of alfalfa proteins. *Canadian Journal of Plant Science*, *89*(6), pp.1065-1074.
32. **Cone, J.W. and van Gelder, A.H., 1999.** Influence of protein fermentation on gas production profiles. *Animal Feed Science and Technology*, *76*(3-4), pp.251-264.
33. **Mesgaran, M.D. and Stern, M.D., 2005.** Ruminal and post-ruminal protein disappearance of various feeds originating from Iranian plant varieties determined by the in situ mobile bag technique and alternative methods. *Animal Feed Science and Technology*, *118*(1-2), pp.31-46.
34. **Erfle, J.D., Boila, R.J., Teather, R.M., Mahadevan, S. and Sauer, F.D., 1982.** Effect of pH on fermentation characteristics and protein degradation by rumen microorganisms in vitro. *Journal of Dairy Science*, *65*(8), pp.1457-1464.
35. **Fimbres, H., Kawas, J.R., Hernández-Vidal, G., Picón-Rubio, J.F. and Lu, C.D., 2002.** Nutrient intake, digestibility, mastication and ruminal fermentation of lambs fed finishing ration with various forage levels. *Small Ruminant Research*, *43*(3), pp.275-281.
36. **Getachew, G., DePeters, E.J., Robinson, P.H. and Fadel, J.G., 2005.** Use of an in vitro rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its impact on fermentation products. *Animal Feed Science and Technology*, *123*, pp.547-559.

37. **Krause, K.M., Combs, D.K. & Beauchemin, K.A., 2002.** Effects of forage particle size and grainfermentability in midlactation cows. II. Ruminal pH and chewing activity. J. Dairy Sci.85, 1947-1957.

38. **Lindberg, J.E., 1981a.** The effect of basal diet on ruminal degradation of dry matter, nitrogenouscompounds and cell walls in nylon bags: Roughages and cereals in various proportions.Swedish J. agric. Res. 11, 159-169.

39. **Mao, H.L., Wang, J.K., Zhou, Y.Y. and Liu, J.X., 2010.** Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. *Livestock Science*, *129*(1-3), pp.56-62.

40. **Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Ramos, S., Tejido, M.L. and Carro, M.D., 2011.** Protozoa evolution in Rusitec fermenters fed diets differing in forage: concentrate ratio and forage type. *Options Mediterranéennes Serie A*, *99*, pp.97-102.

41. **McLeod, K.R. and Baldwin, R.L., 2000.** Effects of diet forage: concentrate ratio and metabolizable energy intake on visceral organ growth and in vitro oxidative capacity of gut tissues in sheep. *Journal of Animal Science*, *78*(3), pp.760-770.

42. **Menke, K.H. and H. steingass, 1988.** Estimation of the energetic feed value obtained from chemical
43. analyses and gas production using rumen fluid. Animal Res.Develop. 28:7-55.

44. **Menke, K.H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D. and Schneider, W., 1979.** The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *The Journal of Agricultural Science*, *93*(1), pp.217-222.

45. **NTC National Research Council, 2001.** *Nutrient requirements of dairy cattle: 2001*. National Academies Press.
46. **Orskov, E.R., 1982.** *Protein nutrition in ruminants*. Academic Press Inc.(London) Ltd.
47. **Ørskov, E.R. and McDonald, I., 1979.** The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science*, *92*(2), pp.499-503.
48. **Reynolds CK, Tyrrell HF and Reynolds PJ. 1991.** Effect of diet forage -to- concentrate ratio and intake on energy metabolism in growing beef heifers: net nutrient metabo lism by visceral tissues. Journal of Nutrition 121: 1004– 1015.
49. **Russell, J.B., 1998.** The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratioand methane production in vitro. J. Dairy Sci. 81, 3222-3230.

50. **Vakili, S.A., Danesh Mesgaran, M., Heravi Moussavi, A., Valizadeh, R. and Nassiri, M., 2007.** Ruminal peptide and ammonia nitrogen concentrations in Holstein steers fed diets differing in concentrate to alfalfa hay ratios. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6(3) : 392-398.

51. **Van Soest, P.V., Robertson, J.B. and Lewis, B., 1991.** Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of dairy science*, *74*(10), pp.3583-3597.

52. **Theodorou MK. Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB and France J, 1994.** simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Animal Feed Science and Technolgy 74: 3583–3597.

Effect of water hardness on rumen fermentation parameters in Baluchi male lambs

Abdolmansour Tahmasbi [1*]; Abasali Naserian[1]; Mehrdad Movahednasab[2]; Mohsen Mehrabadi[3]

1-Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

2-Master student, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

3-Graduate, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

Corresponding author: (tahmasebi@ferdowsi.um.ac.ir)

Abstract

In order to investigate the effect of different levels of water TDS on digestibility and rumen protozoa population in lambs of Baluchi male from 25 single lambs with mean age (90 days ± 4) and mean weight (28 ± 3) were used. Lambs were randomly divided into five groups based on the amount of water consumed by TDS (5 lambs per group). In the control group, normal water was given to lambs with TDS of 400 mg / L. Four other groups received standard water with TDS 1500, 3000, 5000 and 8000 mg / L respectively. As they were placed in metabolic cages and water was freely available in all groups. The duration of the test was 42 days, which included 14 odds and 28 days of the test period. The amount of water and feed consumed the total amount of urine and stool individually weighed and recorded each morning before giving water and feed. Weight gain, digestibility including crude protein, crude fat, insoluble fiber in acid and neutral detergent, protozoa population. The results showed that feed and water consumption in groups 4 and 5 were significantly different from that of the control group The protozoa population was significantly reduced compared to the control group. In general, the results of this study showed that various levels of TDS of water could alter the rumen microbial population and some blood parameters and electrolytes in the lamb of the Baluchibreed.

Keywords: Baluchi lambs, digestibility, Protozoa, TDS of water

اثر سختی آب بر فراسنجه‌های تخمیری شکمبه در بره‌های نر بلوچی

عبدالمنصور طهماسبی[1*]؛ عباسعلی ناصریان[1]؛ مهرداد موحدنسب[2]؛ محسن مهرآبادی[3]

۱-استاد، گروه علوم دامی ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲-دانشجو کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳-دانش آموخته، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

پست الکترونیک نویسنده مسئول: tahmasebi@ferdowsi.um.ac.ir

چکیده

در این پژوهش به منظوربررسی تاثیر سطوح مختلف TDS برعملکرد، قابلیت هضم و جمعیت پروتوزوآی شکمبه دربره‌های نربلوچی از ۲۵ بره نر تک قلو با میانگین سن (۴ ± ۹۰روز) و میانگین وزن (۳±۲۸) استفاده شد. بره‌ها به طور تصادفی به پنج تیمار براساس میزان TDS آب مصرفی تقسیم شدند. تیمار ها شامل:۱) (شاهد) آب معمولی با TDS ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر و چهار گروه دیگر که به ترتیب آب معمولی با TDS ۱۵۰۰، ۳۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۸۰۰۰ میلی گرم بر لیتر دریافت کردند. بره‌ها در قفس‌های انفرادی متابولیکی قرار گرفتند و بره ها در تمامی گروه‌ها بصورت آزاد به آب دسترسی داشتند. طول مدت آزمایش ۴۲ روز بود (۱۴ روز عادت پذیری، ۲۸ وز دوره اصلی). میزان آب و خوراک مصرفی، کل مقدار ادرار و مدفوع به صورت انفرادی هر روز صبح قبل از دادن آب و خوراک جمع آوری، توزین و ثبت شد. افزایش وزن، قابلیت هضم که شامل پروتئین خام، چربی خام، الیاف نامحلول در شوینده اسیدی و خنثی، جمعیت پروتوزوآ اندازه گیری شدند. نتایج بدست آمده نشان داد که مصرف خوراک و آب در گروه ۴و ۵ نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی داری داشت. جمعیت پروتوزوآ در تمامی تیمارهای حاوی TDS بالا نسبت به گروه شاهد کاهش چشمگیری داشت. این آزمایش نشان داد که سطوح مختلف TDS آب می‌تواند باعث تغییر جمیت میکربی شکمبه در بره نژاد بلوچی شود.

واژه‌های کلیدی: بره‌های نر بلوچی، پروتوزوآ، قابلیت هضم، TDS آب

1.مقدمه

آب مهمترین ماده برای انتقال مواد مغذی بین سلولها و به عنوان یک ماده حیاتی برای متابولیسم درون سلولی محسوب می گردد. کیفیت خوب می‌تواند تحت تاثیر عوامل متعددی همچون طعم، بو، شفافیت، هدایت الکتریکی، وجود یا عدم وجود مواد معدنی (کل مواد جامد محلول یا TDS) قرار گیرد. سطح شوری آب بطور مستقیم از طریق TDS و یا بصورت غیر مستقیم از طریق هدایت الکتریکی اندازه گیری می شود. نیاز و کیفیت آب بسته به گونه های مختلف حیوانی، مرحله فیزیولوژیکی و محیطی که حیوان در آن قرار میگیرد متفاوت است (Attia-Ismail et al., 2009). مک‌گریگور (۲۰۰۴a) حیوانات به آب فراوان و با کیفیت برای تخمیرطبیعی

شکمبه و متابولیسم مواد غذایی، جریان مناسب مواد غذایی دردستگاه گوارش و جذب آن در اندام‌های مختلف و نیز برای داشتن حجم طبیعی خون نیازدارند (Adam and Sharpe., 1995). افزایش برخی از یون‌های معدنی مانند کلسیم، منیزیم، سدیم، کلر،سولفات وبیکربنات در آب آشامیدنی حیوانات ممکن است اثرات سوئی در سلامتی حیوان، کاهش عملکرد و ضعیف داشته باشد و در شرایط حاد باعث بیماری یا حتی مرگ شود (Astiz et al., 2017).

کل مواد جامد محلولTotal dissolved solids(TDS)، شامل تمام مواد آلی و غیر آلی موجود درآب، بصورت یونیزه یا میکروگرانول (سلول کلوئیدی) است. مواد غیر آلی حل شده در آب شامل مواد معدنی، فلزات و گازها می‌باشند. درشرایط استاندارد استفاده از آب با انرژی متابولیسمی ناشی از مصرف خوراک ارتباط دارد(NRC., 2001). حیوانات می‌توانند با آب آشامیدنی شور سازگارشوند، با این حال افزودن تدریجی نمک توصیه می‌شود، زیرا تغییر ناگهانی می‌تواند تاثیر منفی بر مصرف غذا و آب داشته باشد. گزارشات تحقیقاتی در استرالیا نشان می‌دهد که بهنگام وجود سایبان برا گوسفند و بز، بزها آب کمتری نسبت به گوسفند مصرف می کنند و زمانیکه سایبان برداشته شود بزها آب بیشتری مصرف خواهند کرد از طرفی بزها تمایل به مصرف اب شور بیشتری دارند و آب با TDS بیش از ۱۲۵۰۰ ppm را ترجیح می دهند. این گزارش نشان داد که بزهای آداپته شده تا ۹۵۰۰ TDS قادر به مصرف طبیعی ماده می باشند ولی افزایش بیشتر از منجر به کاهش خوراک مصرفی می گردد (McGregor., 2004). با توجه به عدم اطلاعات کافی و یا اطلاعات ناقص در زمینه حد تحمل اکو تیپ های مختلف گوسفندان ایرانی به شوری آب این آزمایش به منظور بررسی TDS های مختلف بر روی عملکرد و سلامتی و قدرت تحمل گوسفندان بلوچی طراحی گردید.

2.مواد و روش ها

این آزمایش در اوایل مرداد ماه ۱۳۹۶ تا نیمه شهریور ماه ۱۳۹۶ به مدت ۴۲ روز در مرکز تحقیقاتی و آموزشی گوسفندداری دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام گرفت. جهت انجام این تحقیق از ۲۵ راس بره نر نژاد بلوچی موجود در مرکز تحقیقاتی دام و طیور دانشگاه فردوسی مشهد با میانگین وزن ۳± ۲۸ کیلو گرم و سن ۴±۹۰ روز استفاده شد. در ابتدای آزمایش بره‌ها پس از وزن کشی در قفس‌های متابولیکی یکسان از نظر نور و سایر شرایط محیطی قرار گرفتند. بره‌ها بدون هیچگونه تغییری در جیره غذایی آنها با آنچه که قبلا در ایستگاه تحقیقاتی استفاده می‌کردند به طور کاملا تصادفی به یکی از ۵ تیمار مورد آزمایش اختصاص داده شدند. تیمار های آزمایش شامل:۱) دسترسی آزاد به آب با سختی ۴۰۰ میلی گرم در لیتر (شاهد) ۲) دسترسی آزاد به آب با سختی۱۵۰۰ میلی گرم در لیتر ۳) دسترسی آزاد به آب با سختی ۳۰۰۰ میلی گرم در لیتر ۴) دسترسی آزاد به آب با سختی ۵۰۰۰ میلی گرم در لیتر ۵) دسترسی آزاد به آب با سختی ۸۰۰۰ میلی گرم در لیتر بودند، جهت آماده سازی آب برای تیمارهای مختلف، آب معمولی (TDS ۴۰۰میلی گرم بر لیتر) تحت تجهیزات اسمز معکوس(OSMOTIKA Model OI-7.0- . Entre Ríos, Argentina) F; قرار گرفت.

جدول۱: غلظت‌های مختلف مواد معدنی در TDS های متفاوت تهیه شده برای آب مصرفی

نوع نمک مصرفی (گرم)	TDS(PPM)			
	۱۵۰۰	۳۰۰۰	۵۰۰۰	۸۰۰۰
کلرید کلسیم	۱۲۰۰	۲۴۰۰	۴۰۰۰	۶۴۰۰
سولفات منیزیم	۱۲۰۰۰	۲۴۰۰۰	۴۰۰۰۰	۶۴۰۰۰
سولفات سدیم	۷۵۰۰	۱۵۰۰۰	۲۵۰۰۰	۴۰۰۰۰
بیکربنات سدیم	۳۰۰۰	۶۰۰۰	۱۰۰۰۰	۱۶۰۰۰
کلرید سدیم	۶۰۹۴۰	۱۲۱۸۷۵	۲۰۳۱۲۵	۳۲۵۰۰۰

در طول مدت آزمایش بره‌ها دسترسی آزاد به آب و خوراک داشتند، آب و خوراک سه نوبت در روز در ساعت ۸، ۱۲، ۱۶ در اختیار آنها قرار می گرفت. خوراک به صورت کاملا مخلوط با نسبت ۶۰ به ۴۰ (کنسانتره و علوفه) بر اساس توصیه NRC (۱۹۸۹) تنظیم گردید. اجزای خوراکی و مواد مغذی موجود در تیمارهای آزمایشی در جدول۲ آورده شده است.

جدول ۲: نوع و ترکیب مواد مغذی جیره‌های آزمایشی (درصد ماده خشک)

ماده خوراکی	**(درصد ماده خشک)**
یونجه خشک	۳۰٪
کاه	۵٪
دانه جو	۳۵٪
کنجاله سویا	۹٪
ذرت	۱۵٪
سبوس گندم	۵٪
مکمل مواد معدنی و ویتامین [۱]	۰٪/۵
آهک	۰٪/۲
نمک	۰٪/۲۵
توکسین بایندر	۰٪/۰۵
ترکیب شیمیایی مواد مغذی موجود در جیره آزمایشی	**(درصد ماده خشک)**

ماده خشک	۸۷/۶۷
پروتئین خام (درصد ماده خشک)	۱۵/۷
الیاف نامحلول در شوینده خنثی (درصد ماده خشک)	۳۱/۷
کربوهیدرات غیر الیافی (درصد ماده خشک)[۳]	۴۳/۲
چربی خام(درصد ماده خشک)	۲/۷
خاکستر(درصد ماده خشک)	۶/۷
انرژی قابل متابولیسم (مگاکاری در کیلوگرم)[۲]	۲/۵۸

[۱]هر کیلوگرم از پرمیکس بر اساس ماده خشک شامل: ۳۳۰۰۰۰ IU ویتامینA، ۶۰۰۰۰ IU ویتامینD ، ۱۰۰۰ IU ویتامین E، ۱۶۰ گرم کلسیم، ۸۵ گرم فسفر، ۶۳ گرم سدیم، ۴۵ گرم منیزیم، ۲۱۰۰ میلی گرم روی، ۱۵۰۰ میلی گرم منگنز، ۵۳۵ میلی گرم مس، ۱۲ میلی گرم سلنیوم و ۴۵ میلی گرم ید.

[۲]انرژی قابل متابولیسم توسط نرم افزارSRNS (نسخه ۱/۱) محاسبه شد.

[۳]کربوهیدرات غیر فیبری به صورت مقابل محاسبه شد: (درصد چربی + فیبر نامحلول در شوینده خنثی + خاکستر + پروتئین خام) – ۱۰۰

در طول مدت روزهای نمونه برداری از خوراک، میزان مصرف خوراک هر دام پس از کسر مقدار خوراک باقی مانده از مقدار خوراک ریخته شده به صورت روزانه محاسبه و ثبت شد. نمونه برداری از غذای باقیمانده به صورت روزانه انجام شد، بصورتی که پس از ریختن در کیسه نایلونی، به فریزر ۲۰- درجه سلسیوس منتقل شد. در پایان دوره، نمونه‌های جمع آوری شده به نسبت مقدار روزانه مربوط به هر دام مخلوط و یک نمونه جهت تجزیه ترکیبات شیمیایی آماده گردید.

به منظور تعیین میزان نیتروژن ادرار، حجم کل ادرار دفع شده به صورت روزانه اندازه گیری شد و یک نمونه (۲۰درصد) در فریزر با برودت ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

نمونه برداری از شیرابه شکمبه در ساعت‌های ۹، ۱۱، ۱۳، ۱۵، ۱۷ انجام شد و pH آن بلافاصله تعیین گردید. سپس شیرابه شکمبه توسط پارچه متقال چهار لایه صاف گردید، جهت تعیین نیتروژن آمونیاکی ۱۰میلی لیتر شیرابه شکمبه با ۱۰ میلی لیتر اسید هیدروکلریدریک ۰/۲ نرمال مخلوط و برای اندازه گیری میزان اسیدهای چرب فرار ۱۰میلی لیتر شیرابه شکمبه با ۲ میلی لیتر اسید متافسفریک ۲۵٪ ترکیب و در فریزر۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

جهت تعیین جمعیت پروتوزوآ موجود در شیرابه شکمبه، ۳ میلی لیتر از آن با به ۳ میلی لیتر فرمالین ۵٪ ترکیب و در دمای ۴- درجه سلسیوس نگهداری شد.

تجزیه و تحلیل داده های آماری در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم‌افزارSAS۹/۱ و به روش GLM آنالیز شد و میانگین داده ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح آماری ۹۵٪ مقایسه گردید.

۳.نتایج و بحث

افزایش TDS آب منجربه افزایش آب مصرفی گردیده است بطوریکه میانگین آب مصرفی در تیمار حاوی TDS ۵۰۰۰ در مقایسه با گروه کنترل، افزایش معنی داری را نشان داد (۷۵۰۷ میلی لیتر در روز) (جدول ۳). این افزایش معنی دار مصرف آب در تیمار پنجم (TDS ۸۰۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر آب مصرفی) نیز مشاهده شد (p=۰.۰۰۰۱). ابراهیم و همکاران (۲۰۱۶) گزارش نمودند افزودن کلرور سدیم به میزان ۷ گرم در لیتر منجر به افزایش معنی دار اب مصرفی گردیده است.

الشریف و الحسنین (۱۹۹۶) نیز ضمن تائید این مطلب در گوسفندان، بیان داشتند که بخش زیادی از آب اضافی که در تیمارهای پر نمک مصرف می‌شود، در داخل بدن و در نهایت در فضای داخل سلولی (ICF) نگهداری می‌شود. افزایش در مصرف آب نتیجه مشخصی هست که در بیشتر مطالعات انجام شده برای پاسخ حیوانات به دریافت آب شور بدست می‌آید. این افزایش به منظور سازگاری حیوان به میزان نمک موجود در آب یا غذای خود است، به این معنی که حیوان در رژیم‌های آب شور با خوردن آب بیشتر سعی می‌کند تا میزان نمک اضافی موجود در بدن خود را رقیق و خارج کند. افزایش مصرف آب واکنشی به مقدار کل نمک مصرف شده است و تعادل نمک و آب توسط سیستم رنین- آنژیوتانسین (RAAS) کنترل می‌شود (Cowley et al., 1986). طبق نظر یوسفی و همکاران (۲۰۱۶) و مهدی و همکاران (۲۰۱۹)، افزایش میزان فیلتراسیون گلومرولی پس از مصرف آب شور، یکی از روش‌های انطباق اصلی است که توسط گوسفندان برای کاهش بار نمک اضافی استفاده می‌شود. ظاهرا وقتی که TDS آب آشامیدنی کمتر از ۲۰ گرم در لیتر است و طعم این آب برای گوسفندان مطلوب می‌باشد.

مصرف خوراک نیز تحت تاثیر مقدار TDS آب قرار گرفت بطوریکه میانگین مصرف خوراک تیمار پنجم (TDS ۸۰۰۰ میلی گرم بر لیتر آب مصرفی) ۱۲۸۷ گرم در روز بود که کاهش معنی داری را با گروه شاهد (۱۳۶۲/۲۴ گرم در روز) نشان داد (p=۰.۰۰۰۱)(جدول ۳). در گزارشی که توسط ییرگا (۲۰۱۸) بر روی بزهای بوئر صورت گرفت، نشان داده شد که مصرف آب حاوی TDS ۶۵۰۰ میلی گرم بر لیتر کاهش مصرف خوراک می‌شود.

اسد و همکاران(۲۰۰۲) در آزمایشی که با هدف مشخص کردن میزان شوری آب بر روی پارامتر های سلامتی و خونی گوسفندان طراحی کردند به این نتیجه رسیدند که مصرف آب، مصرف خوراک، میزان مواد مغذی دریافتی با افزایش غلظت نمک کاهش پیدا می کند. در آزمایش طراحی شده بر روی گوسفندان توسط مارو و همکاران (۲۰۱۳) مشاهده شد که مصرف بیش از حد سولفات سدیم (Na_2SO_4) موجب کاهش مصرف ماده خشک می‌شود. یوسفی و همکاران (۲۰۱۷) گزارش نمودند که افزودن NaCl به میزان ۱۱ و ۱۵ گرم در لیتر به آب مصرفی گوسفندان باعث افزایش در آب مصرفی آنها می شود، با این حال میزان مصرف خوراک(ماده خشک مصرفی) و نیتروژن دریافتی در این گوسفندان کاهش یافت.

کاهش مصرف خوراک درتیمار پنجم نسبت به گروه شاهد می‌تواند پاسخی به افزایش مصرف آب در این گروه باشد. با توجه به افزایش میزان نمک‌های محلول در آب (TDS) تا حد ۸۰۰۰ میلی گرم در لیتر آب مصرفی، که بالاتر از حد مجاز توصیه شده توسط (NRC، ۲۰۰۱) می‌باشد. توصیه NRC (۲۰۰۱) درمورد آب با TDS ۷۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ میلی گرم در لیتر، اجتناب از استفاده برای حیوانات باردار، شیرده، تحت استرس یا جوان می‌باشد که می‌توانند تحت تاثیر قرار گیرند. درمطالعه ای از ابوحسین و همکاران (۱۹۹۴)

گزارش شد، مصرف آب با TDS ۹۵۰۰ میلی گرم در لیتر، مصرف ماده خشک در گوسفند را کاهش دارد، اما این کاهش مصرف در بز مشاهده نشد، با افزایش غلظت نمک از TDS ۹۵۰۰ به ۱۷۰۰۰ میلی گرم بر لیتر، مصرف ماده خشک هم را در گوسفند و هم در بزها کاهش یافت.

TDS بالای آب مصرفی، می‌تواند تولید حیوانات را از طریق کاهش مصرف غذا کاهش دهد. به نظر می‌رسد که آب آشامیدنی که دارای شوری پایین تا متوسط بر وزن بدن حیوانات تاثیر نمی‌گذارد. در حالی که برخی از آلودگی‌های آب مانند کود ممکن است موجب کاهش قابل توجهی در نرخ رشد شود (Willms et al., 2002; Lardner et al., 2005).

جدول3: میانگین مصرف ماده خشک و آب، اضافه وزن و نسبت مصرف آب به خوراک

متغیرها	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵	SEM	P Value
	TDS (ppm)						
	۴۰۰	۱۵۰۰	۳۰۰۰	۵۰۰۰	۸۰۰۰		
میانگین خوراک مصرفی (گرم در روز)	۱۳۶۲ ^{a}	۱۳۶۳ ^{a}	۱۳۴۲ ^{a}	۱۳۱۷ ^{a}	۱۲۸۷^{b}	۷/۷۴	۰/۰۰۱۱
میانگین مصرف آب (میلی‌لیتر در روز)	۵۷۱۴^{a}	۵۷۲۲^{a}	۵۷۴۷^{a}	۵۷۰۷^{b}	۷۶۱۸^{b}	۱۹/۰۴	۰/۰۰۰۱
نسبت میانگین اب مصرفی به خوراک مصرفی	۴/۱۹^{a}	۴/۲۰^{a}	۴/۳۲^{a}	۵/۷۱^{b}	۵/۹۲^{b}	۰/۱۷	۰/۰۰۱
میانگین وزن اولیه برها (کیلو گرم)	۲۷/۹	۲۸/۱	۲۷/۹	۲۷/۹	۲۸/۳	۱/۲	۱
میانگین وزن نهایی برها (کیلو گرم)	۳۹/۵	۳۸/۴	۳۶/۰	۳۵/۴	۳۲/۰	۰/۵۹	۰/۳۱۲
میانگین افزایش وزن روزانه(گرم درروز)	۲۷۷	۲۴۴	۸۹	۱۹۲	۱۷۹	۲۹/۷۱	۰/۳۳۹

میانگین‌های هرردیف باحروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (p<۰.۰۵)

میزان نیتروژن آمونیاکی، pH شکمبه و پروفایل اسیدهای چرب تحت تاثیرTDS آب قرارنگرفتند. نتایج شمارش پروتوزوآ نشان می‌دهدکه تیمارهای حاوی TDS بالا (TDS ۵۰۰۰ و ۸۰۰۰ میلی گرم بر لیتر آب مصرفی) تمایل به کاهش تعدادکل پروتوزوآها درمایع شکمبه گوسفند را داشتند واین تعداد برای تیمارحاوی TDS ۸۰۰۰ میلی گرم بر لیتر آب مصرفی، کمترین مقدار در هر میلی لیترمایع شکمبه بود (P=۰/۰۰۰۱) (جدول ۵).

داده های بدست آمده از این آزمایش نشان می‌دهد که تخمیر شکمبه در بره‌ها تحت تأثیر نوشیدن آب نمکی قرار نگرفته است. pH قبل از توزیع غذای صبح، در محدوده (۶-۶/۵) بود که منطبق با نتایج گزارش شده در مطالعات متعدد می‌باشد (Nasri et al., 2011; Wanapat et al., 2014; Baluch-Gharaeia et al., 2015). غلظت نیتروژن آمونیاکی(NH3-N) در مایع شکمبه، بدون

توجه به تداخلات و زمان‌های پس از تغذیه، بالاتر ازغلظت توصیه شده (۵ میلی گرم بر دسی لیتر) برای فعالیت میکروبی مطلوب بود (Satter and Slyter., 1974; Lu et al., 2021). غلظت پروتوزوا در شیرابه شکمبه در محدوده گزارش شده توسط دیگر نویسندگان (Rouissi and Guesmi., 2004) بود. نتایج آزمایش فوق نشان می‌دهد که، احتمالا TDS آب بر میزان هضم پروتئین مصرفی، پروتئین خام، چربی خام و پایداری غلظت NH3-N در پنج گروه آزمایشی اثر گذار بوده است. لویس (۱۹۵۱) و ویلار و همکاران (۲۰۲۱) باوردارند که نیتریت محصول واسطه در کاهش نیترات به آمونیاک بوسیله میکروارگانیسم های شکمبه است و نتیجه گیری می‌کند که زمانی که غلظت نیترات موجود در شکمبه گوسفند بین ۱۰ تا ۲۵ گرم باشد، نیتریت و آمونیاک به طور پیوسته برای چند ساعت افزایش می‌یابد. اختلاف این یافته‌ها با نتایج ما عمدتا به دلیل تفاوت در دوزهای نیتریت استفاده شده در آزمایش های گوناگون می‌باشد. این امر می‌تواند ناشی از افزایش فشار اسمزی در شکمبه باشد، بطور کلی با مصرف آب حاوی TDS بالا، ممکن است غلظت الکترولیت‌ها در شکمبه تغییر کند(به ویژه غلظت سدیم و پتاسیم) که در نتیجه فشار اسمزی شکمبه ممکن است افزایش یابد.

مطالعه حاضر نشان داد که TDS آب در کاهش تعداد پروتوزوآی شکمبه موثر می‌باشد و این میزان برای تیمار پنجم (TDS ۸۰۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر آب مصرفی) بیشتر از دیگر تیمار ها بود، با افزایش کلرید سدیم و سولفات سدیم آب آشامیدنی کاهش چشمگیری در جمعیت پروتزوآی مشاهده شد. محققان گزارش کردند با افزایش غلظت افزودنی های ضد پروتوزوآیی، کاهش جمعیت پروتوزوآ ایجاد می‌شود (Abdullah et al., 1995; Baah et al., 2007). آب مصرفی با TDS بالا به دلیل بارالکتریکی نمک‌های محلول درسطح آن با تداخل در حرکت پروتوزوآی مژکدار، فعالیت آنها راکاهش داده واین عمل سبب کاهش بلعیده شدن میکروبها توسط پروتوزوآها گردیده که نهایتا سبب باقیماندن جمعیت باکتریایی وقارچی بیشتری را درمایع شکمبه می‌گردد. مطالعات والاسونی وبولد (۱۹۹۱) نشان داد بنتونیت سدیم باتوجه به خاصیت چسبندگی وماندگاری طولانی درشکمبه، ازطریق مهارحرکت مژکداران سبب کاهش حرکت و مرگ آنها به خصوص هولوتریش‌ها می‌شود.

به نظر می‌رسد افزایش سطوح مختلف TDS آب می‌تواند به عنوان یک افزودنی ضد پروتوزوآیی در کاهش جمعیت پروتوزوآها در گوسفند مفید باشد. بدین صورت که افزایش قابل ملاحظه مصرف آب با TDS بالا توسط گوسفند ممکن است باعث افزایش فشار اسمزی در شکمبه باشد، بطور کلی با مصرف آب حاوی TDS بالا، ممکن است غلظت الکترولیت‌ها در شکمبه تغییر کند(به ویژه غلظت سدیم و پتاسیم) که در نتیجه فشار اسمزی شکمبه ممکن است افزایش یابد که باعث مصرف بیشتر آب می شود و این امر خود سبب افزایش میزان رقت محتویات شکمبه و کاهش غلظت پروتوزوآ شود. صرف نظر از کیفیت آب، کاهش میزان غلظت پروتوزوآ پس از تغذیه می‌تواند به دلیل افزایش ترشح بزاق (رقیق شدن بزاق) و افزایش نرخ عبور آن از شکمبه باشد (Dehority., 2005).

جدول 4: اثر سطوح مختلف سختی آب برمیزان نیتروژن آمونیاکی و جمعیت پروتوزوآی شکمبه

متغیر	TDS (ppm)					SEM	P Value
	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵		

	۴۰۰	۱۵۰۰	۳۰۰۰	۵۰۰۰	۸۰۰۰		
ازتآمونیاکی شیکمبه(میلی گرم بر دسی لیتر)	۲۵/۶۳	۲۵/۹۳	۲۵/۹۹	۲۶/۳۹	۲۶/۴۵	۰/۸۳	۰/۹۸۲
اسید استیک (مول بر ۱۰۰ مول)	۴۴/۴۶	۴۴/۲۶	۴۴/۰۴	۴۴/۱۸	۴۴/۰۸	۰/۴۷	۰/۹۷۰
اسید پروپیونیک (مول بر ۱۰۰ مول)	۱۷/۲۴	۱۷/۲۲	۱۷/۱۰	۱۶/۹۶	۱۶/۹۳	۰/۳۰	۰/۹۱۳
اسید بوتیریک (مول بر ۱۰۰ مول)	۱۴/۶۹	۱۴/۵۵	۱۴/۱۷	۱۴/۲۸	۱۴/۲۶	۰/۲۸	۰/۶۴۲
اسید والریک (مول بر ۱۰۰ مول)	۱/۱۶۷	۱/۱۴۹	۱/۱۴۶	۱/۱۴۴	۱/۱۴۲	۰/۰۵	۰/۸۹۲
اسید ایزو والریک (مول بر ۱۰۰ مول)	۰/۳۷۴	۰/۳۷۰	۰/۳۶۲	۰/۳۳۴	۰/۳۱۲	۰/۰۳	۰/۹۶۲
پروتوزوآ (سلول بر میلی لیتر)	۱۸/۸۹^{a}	۱۶/۸۵^{a}	۱۳/۳۴^{a}	۱۱/۱۲^{b}	۴/۳۲^{b}	۱۶۷۲۴۷	۰/۰۰۰۱
pH شکمبه	۶/۶۱	۶/۵۴	۶/۵۵	۶/۵۸	۶/۶۱	۰/۰۵	۰/۸۴۴

میانگین‌های هرردیف باحروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.($p<۰.۰۵$)
جمعیت پروتوزوآ در ۱۰^۵ ضرب شود.

TDS آب بر قابلیت هضم الیاف نامحلول در شوینده خنثی، الیاف نامحلول در شوینده اسیدی، پروتئین خام، چربی خام، ماده آلی اثر معنی دار نداشت (جدول۶). معنی دار نشدن اثر TDS آب آشامیدنی در قابلیت هضم ظاهری می‌تواند به علت غلظت پایین نمک‌هایی که در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفته است، باشد. آتیا اسماعیل و همکاران (۲۰۰۹) بیان کردند که آب شور (TDS ۱۲۴۹۴ ppmآب رقیق شده دریا) متابولیسم نیتروژن را تحت تأثیر تغییرات فشار اسمزی در شکمبه، قرار می‌دهد و بنابراین بر اکوسیستم شکمبه تاثیر می‌گذارد. غلظت TDS آب مورد استفاده در آزمایش فعلی (از TDS ۴۰۰ تا ppm۸۰۰۰) کمتر از آنچه که توسط این نویسنده استفاده شده است می‌باشد. این یافته‌ها با نتایج به دست آمده در بز (Deng and mao., 2008) و بره (Morrow et al., 2013)، هماهنگ بود. علاوه بر متابولیسم ناشی ازنیتروژن، میزان مصرف خوراک بدون تغییر در تیمارهای آب، عدم وجود تفاوت قابل ملاحظه ای از کارایی سنتز نیتروژن میکروبی را توجیه می‌کند. بزرا و همکاران در مطالعه خود کاهش قابلیت هضم عصاره اتری را در بره‌هایی که علوفه با کیفیت پایین دریافت کرده بودند را مشاهده کرد و دلیل این امر را به کاهش مصرف خوراک حیوان و کیفیت پایین علوفه که میزان مواد معدنی و الیاف نامحلول در شوینده خنثی به میزان بالایی دارد، نسبت دادند.

جدول 5: اثر سطوح مختلف سختی آب برفاکتورهای قابلیت هضم در بره‌های موردآزمایش

متغیرها	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵	SEM	P Value
	TDS (ppm)						
	۴۰۰	۱۵۰۰	۳۰۰۰	۵۰۰۰	۸۰۰۰		
الیاف نامحلول در شوینده خنثی (درصد)	۵۱/۲	۵۵/۲	۵۱/۲	۵۱/۴	۵۲	۰/۴۲۴	۰/۶۹۴
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (درصد)	۳۳/۳	۳۳/۴	۳۳/۴	۳۴/۲	۳۴/۳	۰/۶۹۶	۰/۶۴۰

پروتئین خام(درصد)	۶۲/۶	۶۲/۶	۶۲/۶	۶۲/۶	۶۲/۷	۰/۲۶۳	۰/۹۹۵
چربی خام(درصد)	۶۶/۶	۶۶/۶	۶۶/۷	۶۵/۶	۶۵/۵	۰/۲۲۷	۰/۷۸۴
ماده آلی(درصد)	۶۸/۳	۶۸/۳	۶۸/۴	۶۸/۸	۶۹/۲	۰/۳۶۲	۰/۲۳۶

میانگین‌های هرردیف باحروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند($p<0.05$)

4.نتیجه گیری

داده‌های آزمایش نشان داد که افزایش TDS آب آشامیدنی با نمک‌های اضافه شده به آن (کلرید سدیم، کلرید کلسیم، سولفات سدیم، سولفات منیزیم و جوش شیرین) در قالب تیمارهای مختلف (۸۰۰۰، ۵۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی گرم در لیتر) باعث افزایش مصرف آب و کاهش مصرف خوراک شد، فقط آب با TDS بالا (۸۰۰۰ TDS میلی گرم در لیتر) توانست مصرف خوراک حیوان را کاهش دهد. قابلیت هضم ظاهری مواد مغذی در برها مورد تاثیر تیمارهای آب قرار نگرفتند. به طور پیش فرض، این موضوع می‌تواند دلیل معنی دار نشدن بر نرخ رشد بره‌ها باشد. جمعیت پروتوزوآ کاهش چشمگیری در این تحقیق نشان داد.

منابع

7. **Abou Hussien, E.R.M., Gihad, E.A., El-Dedawy, T.M., and Abdel Gawad, M.H. 1994.** Response ofcamels, sheep and goats on saline water. 2. Water and mineral metabolism. *Egyptian Journal ofAnimal Production. Supplement Issue November: 387-401.*

8. **Abdullah, N., Hanita, H., Kudo, H., Jalaludin, S., and Ivan, M. 1995.** The effects of bentonite on rumen protozoa population and rumen fluidcharacteristics of sheep fed palm kernel cake. *Asian Australian Journal of Animal Science, 8(3): 249-254.*

9. **Adams, R. S., and Sharpe,W. E.1995.** Water intake and quality for dairy cattle. Pennsylvania state university.*Extension Publication Dairy and Animal Science, 34: 95-8.*

10. **Assad, F. and El-Sherif, M.M.A., 2002.** Effect of drinking saline water and feed shortage on adaptive responses of sheep and camels. *Small Ruminant Research*, *45*(3), pp.279-290.

11. **Astiz, S., Gonzalez-Bulnes, A., Elvira-Partida, L., Perez-Villalobos, N., Cerviño-Lopez, M. and Gonzalez-Martin, J.V., 2017.** Bovine neonatology. *Encyclopedia of life support systems. Animal and plant productivity. Oxford, United Kingdom: UNESCO: EOLSS*.

12. **Attia-Ismail, S.A. H.M.,Elsayed, A.R., and Zaki.E.A. 2009.** Effect of different buffers on rumen kinetics of sheep fed halophyte plants. *Journal of Environmental Science, 19(1): 89–106.*

13. **Baah, J. M., Ivan, A. N., Hristov, K.M., Koenig, L.M., Rode, T. and McAllister, A. 2007.** Effects of potential dietary antiprotozoal supplements on rumen fermentation and digestibility in heifers. *Animal Feed Science and Technology, 137: 126–137.*

14. **Baluch-Gharaeia, H., Rouzbehana,Y., Fazaelib, H., and Rezaeia, J. 2015.** Effect of deep-stackingbroiler litter on pathogenic bacteria, intake, digestibility, microbial protein supply and rumen parameters in sheep. *Animal Feed Science and Technology,199: 73-83.*

15. **Collins, R., Mcleod, M., Hedley, M., Donnison, A., Close, M., Hanly, J., Horne, D., Ross, C., Davies-Colley, R., Bagshaw, C. and Matthews, L., 2007.** Best management practices to mitigate faecal contamination by livestock of New Zealand waters. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, *50*(2), pp.267-278.

16. **Cowley, A. W., Skelton, M. M., and Merrill, D. C., 1986.** Osmoregulation during high salt intake:relative importance of drinking and vasopressin secretion. *Journal of Animal Physiology, I,251(5); R878-R886.*

17. **Deng, W.and Mao, H .2008 .**The use of moleculartechniques based on ribosomal RNA and DNA forrumen microbial ecosystem studies .review. *Molecular Biology Reports, 35(2):265–274*

18. **Dehority, B.A. 2005.** Effect of pH on viability of Entodinium caudatum, Entodinium exiguum, Epidiniumcaudatum, and Ophryoscolex purkynjei in vitro. *Journal of Eukaryotic Microbiology, 52: 339–342.*

19. **El-Sherif, M.M.A., and El-Hassanein, E.E. 1996.** Influence of drinkingsaline water on growth and distribution of body fluids in sheep.*AlexanderiaJournal Agriculture Research, 41 (3): 1–9.*

20. **Lardner, H.A.,Kirychuk,B.D.,Braul,L.,Willms,W.D., andYarotski,J. 2005.**The effect of water quality on cattle performance on pasture.*Australian Journal Agriculture Research, 56:1–8.*

21. **Lewis, D. 1951b.** The metabolism of nitrate and nitrite in the sheep. 2. Hydrogen donators innitrate reduction by rumen micro-organisms in vitro. *BiochemistryJournal, 49: 149–153*

22. **Lu, Z., Xu, Z., Shen, Z., Tian, Y. and Shen, H., 2021.** Corrigendum: Dietary Energy Level Promotes Rumen Microbial Protein Synthesis by Improving the Energy Productivity of the Ruminal Microbiome. *Frontiers in Microbiology*, *12*.

23. **Mcgregor, B.A. 2004a.** Water quality and provision for goats.Australian government. Rural industries research anddevelopment corporation, 19p.

24. **McGregor, B.A., 2004b.** *Water quality and provision for goats*. RIRDC

25. **Mehdi, W.G. and Ben Salem, H., 2019.** Effect of drinking high salt water from weaning to adulthood in Barbarine male lambs. *Options Méditerranéennes. Série A, Séminaires Méditerranéens*, (123), pp.157-162.

26. **Morrow, L. A., Felix, T. L., Fluharty, F. L., Daniels, K. M., and Loerch, S. C. 2013.** Effects ofsulfur and acidity on performance and digestibility in feedlot lambs fed dried distillers grains with solubles. *Journal Animale Science, 91: 2211–2218.*

27. **Nasri, S., Ben Salem, H., Vasta, V., Abidi, S., Makkar, H.P.S., Priolo, A. 2011.** Effect ofincreasing levels of Quillaja saponaria on digestion, growth and meat quality of Barbarine lamb. *Animal feed science and technology, 199: 73–83.*

28. **NRC. 2001.** *Nutrient requirements of dairy cattle. 7th Rev. Edn. Washington. D.C. National Academy of Sciences. PP: 1-408.*

29. **Rouissi, H., and Guesmi, A. 2004.** Etude comparée de la population des protozoaires ciliés dansle rumen des ovins et caprins. Option Méditerranéenne, Série A: 57-59.

30. **Satter, L. D., and Slyter, L. L. 1974.** Effect of ammonia concentration on rumen microbial proteinproduction in vitro. *British Journal of Nutrition, 32: 199-208.*

31. **Villar, M.L., Godwin, I.R., Hegarty, R.S., Erler, D.V., Farid, H.T. and Nolan, J.V., 2021.** Nitrate and nitrite absorption, recycling and retention in tissues of sheep. *Small Ruminant Research*, *200*, p.106392.

32. **Wallace, R. J. and Newbold, C. J. 1991.** Effect of bentonite on fermentation in the rumen simulation technique (Rusitec) and rumen ciliate protozoa. *Journal of Agriculture Science Cambridge, 116: 163-168.*

33. **Wanapat, M., Gunun, P., Anantasook, N. and Kang, S., 2014.** Changes of rumen pH, fermentation and microbial population as influenced by different ratios of roughage (rice straw) to concentrate in dairy steers. *The Journal of Agricultural Science*, *152*(4), pp.675-685.

34. **Willms,W.D.,Kenzie,O.R.,McAllister, T.A.,Colwell,D.,Veira,D.,Wilm-shurst, J.F. ,Entz, T.,and Olson, M.E. 2002.** Effects of water quality on cattle performance. *Journal Range Management, 55: 452–460.*

35. **Yirga,H., Puchala,R., Tsukahara,Y., Tesfai,K., Sahlu,T.K., Mengistu,U.L., and Goetsch,A.L .2018.** 128 Effects of level of Brackish water and salinity on feed intake, digestion, and heat energy in growing Boer goat wethers and mature Boer goat and Katahdin sheep wethers. *Journal of Animal Science, Pages 68–69.*

36. **Yousfi, I., Salem, H.B., Aouadi, D. and Abidi, S., 2016.** Effect of sodium chloride, sodium sulfate or sodium nitrite in drinking water on intake, digestion, growth rate, carcass traits and meat quality of Barbarine lamb. *Small Ruminant Research*, *143*, pp.43-52.

37. **Yousfi, I. and Salem, H.B., 2017.** Effect of increasing levels of sodium chloride in drinking water on intake, digestion and blood metabolites in Barbarine sheep. In *Annales de l'INRAT* (Vol. 90, p. 202).

Effect of Green Silver Nanoparticles Synthesized via Phlomis cancellata Bunge Extract on in vitro apparent digestibility and ruminal fermentation parameters

Elias Ibrahimi Khoram Abadi[1*]; Mohsen Kazemi[2]; Somayeh Heidari[3]

1 & 2- Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Animal Science, University of Torbat-e Jam, Torbat-e Jam, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Torbat-e Jam, Torbat-e Jam, Iran.

*Eliiass378@gmail.com

Abstract

The present investigation was carried out to study the effect of green silver nanoparticles synthesized via *Phlomis cancellata Bunge* extract on *in vitro* apparent digestibility and ruminal fermentation parameters. Synthesis of sliver nanoparticles was prepared by adding of 1 ml of the aqueous extract to 4.76 mM sliver nitrate solution (pH= 6.84) allowed to react at 77 °C for 24.79 min in the dark to minimize the photo activation of silver nitrate. The color change of solution from yellow to brown after 3 min of incubation is indicative of the bioreduction of Ag+ ions in the solution to Ag°. The apparent *in vitro* dry matter digestibility and organic matter digestibility and true *in vitro* organic matter digestibility, were not significantly affected by addition of green silver nanoparticles synthesized via *Phlomis cancellata Bunge* extract. Addition of green silver nanoparticles synthesized via *Phlomis cancellata Bunge* extract failed to affect metabolisable energy, short chain fatty acids, partitioning factor, microbial biomass production and microbial biomass production efficiency. For treatment 1, the cumulative gas production over 24 and 48 h was negatively correlated apparent *in vitro* dry matter digestibility and organic matter digestibility. There was significant negative correlation between apparent *in vitro* organic matter digestibility and partitioning factor with cumulative gas production during hours of incubation for treatments 2. No significant correlation was found between apparent in vitro dry matter digestibility and organic matter digestibility and partitioning factor with the volume of cumulative gas produced during different incubation hours in for treatments 3. Supplementing of green silver nanoparticles synthesized via *Phlomis cancellata Bunge* extract could modify the characteristics of gas production and fermentation parameters basal diet and reduce the side effects of the anaerobic microbial fermentation. However, additional microbial studies with different level of green silver nanoparticles are necessary to determine the mode of action.

Keywords: Gas production, Nano Technology, Ration

تأثیر مقادیر مختلف نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید (Phlomis cancellata Bunge) بر قابلیت هضم ظاهری و فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای در شرایط برون‌تنی

الیاس ابراهیمی خرم‌آبادی[۱*]؛ محسن کاظمی[۲]؛ سمیه حیدری[۳]

۱ و ۲- استادیار گروه علوم‌دامی، مجتمع آموزش عالی تربت‌جام، تربت‌جام، ایران.
۳- استادیار گروه شیمی، مجتمع آموزش عالی تربت‌جام، تربت‌جام، ایران.

Eliiass378@gmail.com *

چکیده

این آزمایش با هدف بررسی اثر مقادیر مختلف نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش‌بره سفید بر قابلیت هضم ظاهری و فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای در شرایط برون‌تنی انجام شد. جهت تهیه عصاره گیاه گوش‌بره سفید، یک میلی‌لیتر از عصاره تهیه‌شده از اندام‌های هوایی گیاه به محلول نیترات نقره ۴/۷۶ میلی‌مولار در pH= ۶/۸۴ اضافه گردید و به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۷۷ درجه سلسیوس مورد انکوباسیون قرار گرفت. اثرات افزایش نانو ذرات تولید شده از گیاه گوش‌بره سفید (۰، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) بر خصوصیات تخمیری جیره گاوهای پرتولید با استفاده از روش تولید گاز در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفت. در این آزمایش بین تیمارهای مختلف از نظر قابلیت‌هضم ظاهری ماده خشک، ماده آلی، مقدار ماده آلی هضم‌شده واقعی، انرژی قابل‌متابولیسم، اسیدهای چرب فرار، شاخص بخش‌پذیری، تولید توده میکروبی و بازده آن اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. در تیمار یک (فاقد نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش‌بره سفید) همبستگی منفی و معنی‌دار بین هضم ماده خشک، قابلیت‌هضم ماده آلی با حجم گاز تجمعی تولیدی در ساعات ۱۲ و ۲۴ انکوباسیون و در تیمار دو (حاوی ۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش‌بره سفید) همبستگی منفی و معنی‌دار بین قابلیت‌هضم ماده آلی، شاخص بخش‌پذیری با حجم گاز تجمعی تولیدی در ساعات مختلف انکوباسیون ثبت گردید. مکمل‌کردن مقادیر افزایشی نانو ذرات نقره توانست فراسنجه‌های تولید گاز در خوراک پایه را تغییر دهد. بدیهی است طراحی آزمایشات دیگر به‌منظور دستیابی به درک بهتری از نحوه عملکرد این نانو ذرات در محیط شکمبه ضروری است.

واژگان کلیدی: تولید گاز، جیره، فناوری نانو

۱. مقدمه

فرایند هضم الیاف در شکمبه کارآمد نیست (Buxton et al., 1997; Semnani et al., 2006). بیشتر هیدروژن تولیدشده در شکمبه معمولاً برای تولید متان استفاده می‌شود. گازهای حاصل از تخمیر شکمبه‌ای به‌عنوان مواد زائد به محیط دفع می‌شوند. درگذشته به‌منظور کنترل فرآیند هضم در شکمبه از روش‌های فیزیکی، شیمیایی، زیستی و زیست‌فناوری گوناگونی استفاده شده است که در عمل چندان اثرگذار نبوده‌اند (Kumar, 2017). فناوری نانو به‌عنوان یک راهکار نوین می‌تواند از طریق تولید نانو ذرات استفاده‌شده

در خوراک، شرایط هضم و جذب در نشخوارکنندگان را، بهبود بخشد. بررسی‌ها نشان می‌دهد، افزودن نانو ذرات روی به جیره گاوهای شیری مبتلا به ورم پستان تحت حاد، باعث کاهش میزان ابتلا و افزایش تولید می‌شود (Rajendran, 2013). محققان گزارش کردند افزودن نانو ذرات سلنیوم به جیره بزهای نر در حال رشد تأثیرات قابل‌توجهی بر بهبود عملکرد داشت (Shi et al., 2010; Shi et al., 2011a, Xun et al., 2012). هم‌چنین، تحقیقات جدید نشان می‌دهد نانو ذرات برخی از فلزات مانند اکسید مس، روی و آهن برای جمعیت میکروبی شکمبه سمی بوده (Mortimer et al., 2010) و مانع از تولید متان در شرایط بی‌هوازی می‌شوند (Yang and Sun, 2006; Zhisheng, 2011; Gonzalez-Estrella et al., 2013). نانو ذرات را می‌توان با استفاده از عصاره‌های گیاهی به شیوه‌ای مقرون‌به‌صرفه و سازگار با محیط زیست تولید کرد.

گونه گوش‌بره سفید یا گوش‌بره ایرانی (*Phlomis cancellata* Bunge) گیاهی پایا و یک ساله است و به‌وفور در مراتع استان‌های خراسان، گلستان و مازندران یافت می‌شود (Semnani et al., 2006). جنس گوش‌بره (*Phlomis* sp.) متعلق به تیره نعناعیان بوده و دارای ۷۰ گونه گیاهی علفی چند ساله و معطر می‌باشد که تنها در نقاط محدودی از آسیا شامل ایران، افغانستان، ترکمنستان و عراق یافت می‌شود (Bellamy and Pfisher, 1992). ارزیابی عصاره به‌دست آمده از پیکر رویشی گیاه گوش‌بره سفید نشان می‌دهد عصاره این گیاه غنی از ترکیبات ترپنی (ژرماکرن دی، مونو ترپن آلفا پینن، بتا کاریو فیلن، بایسیکلو ژرماکرن و بتا سلینن) است (Semnani et al., 2006; Akhlaghi and Motevalizadeh, 2010).

استفاده از نانو ذرات در مطالعات تغذیه‌ای دام به‌صورت تخصصی و متنوع می‌تواند ظرفیت بالایی در جهت بهبود تولیدات دامی ایجاد نماید و بازده رشد و تولیدات دامی را به‌نحو چشم‌گیری افزایش دهد (Kumar, 2017). با این حال، اطلاعات و مطالعات انجام‌شده در این زمینه بسیار محدود است (Abd El-Galil et al., 2018). از این رو، با توجه به امکان استفاده از نانو ذرات تولید شده به روش زیستی در تغذیه دام و نظر به کمبود اطلاعات در این زمینه تصمیم گرفته شد تا اثر مقادیر مختلف نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش‌بره سفید بر قابلیت هضم ظاهری و فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای در شرایط برون‌تنی مورد بررسی قرار گیرد.

۲. مواد و روش‌ها

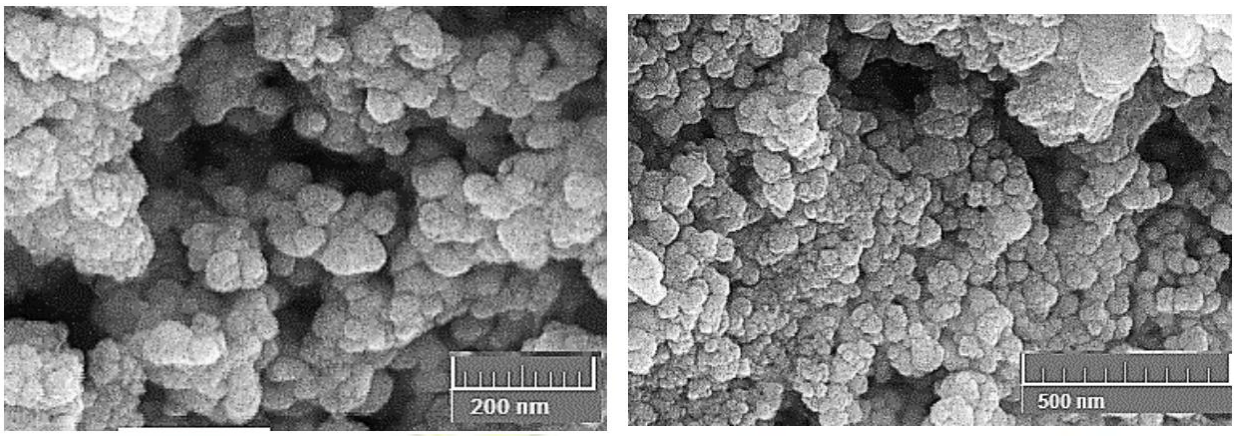
۲-۱. جمع‌آوری و تهیه عصاره گیاه گوش‌بره سفید

تولید نانو ذرات نقره به روش زیستی از عصاره گیاه گوش‌بره سفید در آزمایشگاه مرکزی مجتمع آموزش عالی تربت‌جام انجام شد (Heidari and Hosseinpour, 2018). به‌طور خلاصه می‌توان گفت جهت تهیه عصاره گیاه گوش‌بره سفید، ابتدا اندام‌های هوایی گیاه گوش‌بره سفید (تهیه‌شده از مناطق اطراف شهرستان باخرز واقع در استان خراسان رضوی) با آب مقطر به خوبی شستشو داده شد. در ادامه و پس از کامل‌شدن فرآیند خشک‌شدن در دمای اتاق، برگ‌های خشک‌شده گیاه با قیچی و هاون به خوبی پودر شد. سپس ۱ گرم پودر تهیه‌شده از گیاه گوش‌بره سفید با ۱۰۰ سی‌سی آب دیونیزه مخلوط گردید و به مدت ۳۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سلسیوس حرارت داده شد. عصاره حاصل بعد از سرد شدن، فیلتر شد و برای تولید نانو ذرات، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Heidari and Hosseinpour, 2018).

۲-۲. تولید نانو ذرات به روش زیستی

در ادامه فرآیند تولید نانو ذرات نقره، یک میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده از گیاه گوش‌بره سفید به محلول نیترات نقره (Sigma–Aldrich Chemicals Germany) ۴/۷۶ میلی‌مولار در pH= ۶/۸۴ اضافه گردید و به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۷۷/۶۲ درجه سلسیوس

مورد انکوباسیون قرار گرفت. تغییر رنگ محلول از زرد به قهوه‌ای پس از گذشت سه دقیقه از انکوباسیون نشان‌دهنده کاهش زیستی یون‌های Ag^{+} محلول به Ag^{0} بود (شکل ۱) (Heidari and Hosseinpour, 2018).



شکل ۱: تصویر نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید در میکروسکوپ الکترونی.
Figure 1- SEM micrograph for the biosynthesized AgNPs obtained by mediation of *Phlomis cancellata Bunge.*

۳-۲. آزمون برون‌تنی (*in vitro*) اندازه‌گیری فراسنجه‌های تولید گاز

به‌منظور تعیین اثر سطوح مختلف نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید بر خصوصیات تخمیری جیره گاوهای پر تولید، آزمون تولید گاز بر اساس روش (Menke et al., 1979)، انجام شد. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از: ۱- تیمار یک (جیره پایه فاقد نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید)، ۲- تیمار دو (جیره پایه به اضافه ۱۲۵ میکروگرم نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید در میلی‌لیتر)، ۳- تیمار سه (جیره پایه به اضافه ۲۵۰ میکروگرم نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید در میلی‌لیتر). جیره پایه بر اساس ماده خشک شامل: علوفه (۲۰ درصد سیلوی ذرت و ۲۰ درصد علوفه یونجه) و کنسانتره (۱۶/۵ درصد دانه ذرت، ۱۳/۵ درصد دانه جو، ۱۳/۵ درصد کنجاله سویا، ۷/۰۵ درصد کنجاله کلزا، ۳/۷۵ درصد پودر ماهی، ۱/۳۵ درصد پودر چربی، ۲/۴ درصد پیش مخلوط ویتامینی-معدنی، ۱/۱۱ درصد جوش‌شیرین، ۰/۳۶ درصد دی‌کلسیم‌فسفات، ۰/۲۴ درصد منیزیم، ۰/۱۵ درصد نمک و ۰/۰۹ درصد توکسین بایندر) به نسبت ۴۰ به ۶۰ بود. ترکیب شیمیایی جیره شامل ۱۸ درصد پروتئین‌خام، ۲/۷۶ مگاکالری در کیلوگرم ماده خشک انرژی قابل‌متابولیسم، ۴۱/۱ درصد NFC، ۲۷/۷ درصد NDF، ۱۷/۷ درصد ADF، ۱۹/۲ درصد NDF علوفه‌ای و ۴/۳ درصد عصاره اتری بود.

مایع شکمبه از یک رأس گاو نر هلشتاین با کمک لوله پلاستیکی و پمپ خلاء، قبل از تغذیه صبح جمع‌آوری شد. محتویات شکمبه به‌وسیله چهار لایه پارچه متقال صاف گردید و سپس به درون بطری در داخل فلاسک عایق‌دار آب گرم (۳۹ درجه سلسیوس) قرار داده شد و بلافاصله به آزمایشگاه انتقال یافت. جهت اطمینان از شرایط بی‌هوازی مایع شکمبه صاف شده، گاز دی اکسید کربن به آن تزریق شد و قبل از استفاده جهت انکوباسیون در حمام آب گرم (۳۸/۶ درجه سلسیوس) نگهداری شد. بزاق مصنوعی مطابق روش (Menke et al., 1979) تهیه و با شیرابه شکمبه ۲:۱ (مایع شکمبه: بافر) مخلوط شد. نمونه‌های خوراکی با آسیاب با غربال یک میلی‌متری آسیاب شد (Menke and Steingass, 1988). مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم جیره پایه، ۲۰ میلی‌لیتر بزاق مصنوعی و ۱۰ میلی‌لیتر شیرابه شکمبه به بطری‌های شیشه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتری (برای هر تیمار ۵ تکرار)، اضافه شد. سر بطری‌ها به کمک درپوش پلاستیکی و پوشش آلومینیومی به‌طور کامل بسته و در حمام آب گرم با دمای ۳۸/۶ درجه سلسیوس برای انکوباسیون قرار داده شد.

به‌منظور تصحیح گاز تولید شده ناشی از ذرات باقی‌مانده در مایع شکمبه سه تکرار که بلانک نامیده می‌شود در نظر گرفته شد. فشار گاز تولیدشده در زمان‌های ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون ثبت گردید. بعد از پایان انکوباسیون، از محیط‌های تخمیر، نمونه‌های مایع شکمبه با هدف تعیین ماده آلی تجزیه‌شده واقعی و اسیدهای چرب فرار کل تهیه شد. ضریب تفکیک‌پذیری (نسبت میلی‌گرم ماده آلی تجزیه‌شده به میلی‌لیتر گاز تولیدی) با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (Tomkins et al., 2015).

$$PF = c - (a–b)/ IVGP$$

در این رابطه، c ماده آلی وزن‌شده در هر بطری (میلی‌گرم)، *a* مقدار مواد تجزیه‌نشده در هر بطری (میلی‌گرم) و *b* مقدار خاکستر مواد تجزیه‌نشده در هر بطری (میلی‌گرم) و IVGP گاز تولیدی در ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون است. ماده آلی تجزیه‌شده واقعی نیز به کمک رابطه زیر محاسبه شد (Tomkins et al., 2015).

$$OMDe (mg) = c - (a - b)$$

بعد از اندازه‌گیری حجم گاز تولیدی در طی ساعات نگهداری در حمام آب گرم، محتویات داخل بطری شیشه‌ها به داخل یک بشر انتقال داده شد و توسط محلول شوینده خنثی و حرارت به مدت یک ساعت در دستگاه مجهز به سردکننده شسته شد. سپس محتویات داخل محلول شوینده توسط کاغذ صافی بدون خاکستر تصفیه و باقیمانده توسط آون و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ ساعت خشک شد. با کسر نمودن وزن بوته خالی از بوته با محتویات بعد از آون، مقدار ماده تجزیه‌نشده در هر بطری (a) محاسبه شد. سپس بوته و محتویات داخل آن به کوره انتقال داده شد و در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد مقدار خاکستر آن (b) محاسبه شد. با کسر نمودن میزان b از a ماده آلی تجزیه‌نشده برحسب میلی‌گرم محاسبه شد (Tomkins et al., 2015). مقادیر توده میکروبی تولیدی و بازده تولید توده میکروبی نیز با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (Tomkins et al., 2015).

$$MM (mg) = [c - (a - b)] - [NG (ml) \times 2.2]$$

در این رابطه، MM میلی‌گرم توده میکروبی تولیدشده، c ماده آلی وزن‌شده در هر بطری (میلی‌گرم)، *a* مقدار مواد تجزیه‌نشده در هر بطری (میلی‌گرم) و *b* مقدار خاکستر مواد تجزیه‌نشده در هر بطری (میلی‌گرم) و NG میلی‌لیتر گاز خالص تولیدی و ۲/۲ ضریب استوکیومتری است.

انرژی قابل‌متابولیسم (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک) طبق روش (Menke and Steingass, 1988) و قابلیت‌هضم ماده آلی (درصد) طبق روش (Menke et al., 1979)، محاسبه گردید.

$$ME (MJ/Kg DM) = 2.2 + 0.136 GP + 0.057 CP + 0.0029 CP^2$$
$$IVOMD (\%) = 14.88 + 0.889 GP + 0.45 CP + 0.0651 XA$$

DM: ماده خشک، CP: درصد پروتئین‌خام، XA: درصد خاکستر، GP: میلی‌لیتر گاز تولیدشده از ۲۰۰ میلی‌گرم نمونه خشک پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون است.

اسیدهای چرب کوتاه زنجیر با استفاده از معادله (Getachew et al., 2000) تخمین زده شد.

$$SCFA (mmol/200 mg DM) = 0.0222 GP-0.00425$$

در این رابطه GP، گاز خالص تولیدی پس از ۲۴ ساعت (میلی‌مول/۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) است.

۴-۲. تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی، آنالیز واریانس شدند. نتایج حاصل از آزمایش با مدل GLM برنامه آماری SAS (نسخه ۹/۱)، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح خطای ۵ درصد استفاده شد. مدل آماری طرح به شکل زیر بود:

$$Y_{ij}= \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

که Y_{ijk}= مشاهده مربوط به i امین تیمار در j امین تکرار، μ= اثر میانگین، T_i= اثر i امین تیمار، ε_{ij}= اثر باقی‌مانده می‌باشد.

۳. نتایج و بحث

نتایج مربوط به اثر افزودن مقادیر مختلف نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش‌بره سفید بر قابلیت‌هضم ظاهری ماده خشک و ماده آلی، مقدار ماده آلی هضم‌شده واقعی، انرژی قابل‌متابولیسم، اسیدهای چرب فرار، شاخص بخش‌پذیری، تولید توده میکروبی و بازده تولید توده میکروبی در جدول ۱ گزارش شده است. در این آزمایش بین تیمارهای مختلف از نظر قابلیت‌هضم ظاهری ماده خشک، ماده آلی و مقدار ماده آلی هضم‌شده واقعی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵). بین تیمارهای آزمایشی به‌لحاظ انرژی قابل‌متابولیسم، اسیدهای چرب فرار، شاخص بخش‌پذیری، تولید توده میکروبی و بازده تولید توده میکروبی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵).

جدول ۱: اثر افزودن مقادیر مختلف نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید بر قابلیت‌هضم ماده خشک و ماده آلی، مقدار ماده آلی تجزیه‌شده واقعی، انرژی قابل متابولیسم، اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر، شاخص بخش‌پذیری، تولید توده میکروبی و بازده تولید توده میکروبی .

Table 1: Effect of different levels of biosynthesized AgNPs obtained by mediation of *Phlomis cancellata Bunge* on dry and organic matter digestibility, metabolisable energy, short chain fatty acids, partitioning factor, microbial biomass production and microbial biomass production efficiency

متغیرها Parameters	تیمارهای آزمایشی [۱] Experimental Treatments			SEM [۱۰]	P-value [۱۱]
	تیمار یک Treatment 1	تیمار دو Treatment 2	تیمار سه Treatment 3		
IVDMD [۲]	72.55	72.10	67.03	1.96	0.12
IVOMD [۳]	77.18	73.98	72.92	1.31	0.07
TIVOMD [۴]	143.30	135.40	133.60	3.50	0.13
ME [۵]	10.50	10.28	10.24	0.16	0.51
SCFA [۶]	0.98	0.95	0.94	0.02	0.51
PF [۷]	2.57	2.39	2.29	0.07	0.11
MB [۸]	116.85	108.80	104.52	3.84	0.11
MBE [۹]	81.50	80.34	78.56	1.76	0.51

[۱] تیمار ۱: جیره پایه فاقد نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید، تیمار ۲: جیره پایه به اضافه ۱۲۵ میکروگرم نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید در میلی‌لیتر، تیمار ۳: جیره پایه به اضافه ۲۵۰ میکروگرم نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید در میلی‌لیتر؛ [۲] IVDMD: قابلیت‌هضم ماده خشک (درصد)؛ [۳] IVOMD: قابلیت‌هضم ماده آلی (درصد)؛ [۴] TIVOMD: مقدار ماده آلی هضم‌شده واقعی (میلی‌گرم/گرم ماده خشک)، [۵] ME: انرژی قابل متابولیسم (مگاژول/کیلوگرم ماده خشک)، [۶] SCFA: اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر (میلی‌مول/میلی‌گرم ماده خشک)، [۷] PF: شاخص بخش‌پذیری (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)، [۸] MB: تولید توده میکروبی (میلی‌گرم/گرم ماده خشک)، [۹] MBE: بازده تولید توده میکروبی (میلی‌گرم/میلی‌گرم)، [۱۰] SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها، [۱۱] P-value: درصد معنی‌داری

میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵).

[1]Treatment 1: basal diet, Treatment 2: basal diet + 125µg/ml AgNPs, Treatment 3: basal diet + 250µg/ml AgNPs. [2]IVDMD: *in vitro* dry matter digestibility (%). [3]IVOMD: *in vitro* organic matter digestibility (%).[4]TIVOMD: true *in vitro* organic matter digestibility (mg/gDM). [5]ME: metabolizable energy (MJ/KgDM). [6]SCFA: short chain fatty acids (mM/mgDM). [7]PF: portioning factor (mg/ml). [8]MB: microbial biomass (mg/gDM). [9]MBE: microbial biomass efficiency (mg/mg).
Values with different superscript in each row letters differ significantly (P<0.05).

نظر به اینکه هیچ‌گونه گزارشی راجع به اثر نانو ذرات نقره بر جمعیت میکروبی شکمبه و فراسنجه‌های تخمیری وجود ندارد و با توجه به شباهت شمیایی نقره با دیگر فلزات (Li et al., 2001; Fodevila, 2010) ، نتایج به‌دست آمده در این آزمایش، با نتایج حاصل از تأثیر دیگر نانو ذرات فلزی بر شرایط تخمیری محیط شکمبه، مقایسه می‌شود. بررسی‌ها نشان می‌دهد، نانو ذرات آهن فاقد الکترون ظرفیت تولید شده از عصاره گیاهان چریش، انبه (*Mangifera indica*) و میخک صد پر (Syzygium aromaticum)، نانو ذرات اکسید آهن تولید شده از عصاره گیاهان اکالیپتوس آبی و گواوا و همچنین نانو ذرات اکسید مس تولید شده از عصاره گیاهان آلوئه‌ورا، آب بشقابی و چریش، تأثیر معنی‌داری بر قابلیت‌هضم ظاهری ماده خشک، ماده آلی و و مقدار ماده آلی هضم‌شده واقعی ندارند (Garcia-Gonzales et al., 2006; Luna-delRisco et al., 2011; Gnzalez-Estrella et al., 2013; Kumar, 2017). در مطالعه‌ای دیگر گزارش شد، افزایش نانو ذرات اکسید روی در تیمارهای آزمایشی تأثیر معنی‌داری بر قابلیت‌هضم ظاهری ماده خشک، ماده آلی و و مقدار ماده آلی هضم‌شده واقعی نداشته است (Sarker et al., 2018). با این حال، عدم تأثیرگذاری معنی‌دار نانو ذرات نقره تولید شده از عصاره گیاه گوش‌بره سفید بر قابلیت‌هضم ممکن است ناشی از عواملی هم‌چون غلظت، ظرفیت سطح، اندازه و دیگر خصوصیات نانو ذرات نقره باشد که بر نتایج آزمایش حاضر اثرگذار بوده است. زیرا نانو ذارت به‌منظور اثرگذاری بر تخمیر شکمبه‌ای باید در محیط شکمبه پخش شوند و با میکروارگانیسم‌های شکمبه تماس برقرار نمایند (Kumar, 2017).

مطابق نتایج آزمایش حاضر، (Abd El-Galili and El-Bordeny, 2018) گزارش کردند، که مکمل‌کردن تیمارهای آزمایشی با مقادیر افزایشی نانو ذرات کبالت تأثیر معنی‌داری بر انرژی قابل‌متابولیسم (مگاکالری بر گرم) ندارد. هم‌چنین مشابه نتایج آزمایش حاضر، (Kumar, 2017)، عنوان کرد که نانو ذرات آهن فاقد الکترون ظرفیت تولید شده از عصاره گیاهان چریش، انبه و میخک صد پر، نانو ذرات اکسید آهن تولید شده از عصاره گیاهان اکالیپتوس آبی و گواوا و همچنین نانو ذرات اکسید مس تولید شده از عصاره گیاهان آلوئه‌ورا، آب بشقابی و چریش تأثیر معنی‌داری بر غلظت اسیدهای چرب فرار نداشتند. حجم گاز تولیدی نشان‌دهنده تخمیر مواد خوراکی به اسیدهای چرب فرار است، در نتیجه مقدار گاز تولیدی در تیمارهای آزمایشی، ارتباط مستقیمی با اسیدهای چرب فرار دارد (Blummel and Orskov, 1993). (Yoon et al., 2009) گزارش کردند که با توجه به حساس‌تر بودن ساختار غشای خارجی باکتری‌های گرم مثبت به نانو ذرات نقره، این ترکیبات می‌توانند بر باکتری‌های گرم مثبت در محیط به صورت انتخابی، تأثیرگذار باشند. مهار باکتری‌های گرم مثبت در محیط شکمبه، تولید هیدروژن، متان و نسبت مولی استات به پروپیونات را کاهش می‌دهد (Getachew et al., 2000; Ipharraguerre et al., 2003; Benchar et al., 2008; Khafipour et al., 2009).

مطابق جدول ۱، شاخص بخش‌پذیری، تولید توده میکروبی بازده آن تحت تأثیر مقادیر افزایش نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش‌بره سفید در تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. شاخص بخش‌پذیری بیانگر این واقعیت است که چه مقدار از ماده آلی هضم شده در شکمبه، به سمت تولید اسیدهای چرب فرار یا تولید توده میکروبی رفته است. شاخص بخش‌پذیری بالاتر نشان‌دهنده این موضوع است که مواد هضم‌شده به جای تولید گاز به سمت تولید توده میکروبی هدایت شده و بازده تولید توده میکروبی آن بهبود یافته است (Blummel and Orskov, 1993). در آزمایش حاضر روند تغییرات توده میکروبی تولید شده، همسو با مقادیر شاخص بخش‌پذیری بود. یعنی کاهش تولید توده میکروبی با شاخص بخش‌پذیری کمتر هماهنگ بود (Makkar et al., 2005). از سوی دیگر نرخ تخمیر سوبسترا، همبستگی بالایی با نرخ رشد میکروارگانیسم‌ها دارد، به‌گونه‌ای که تخمیر سریع سوبسترا باعث تولید توده میکروبی بیشتری می‌شود (Noeck, 1988). ((Sarker et al., 2018)) گزارش کردند که همزمان با افزایش نانو ذرات روی از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ (میکروگرم در گرم) در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با تیمار شاهد، شمار توده‌های میکروبی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. (Sarker et al., 2018) ، در تفسیر این نتایج، اثرات ضد باکتریایی نانو ذرات روی را به عنوان مسئول بروز این پدیده، ذکر کردند. از این رو، تولید توده میکروبی کمتر در تیمارهای آزمایشی حاوی نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره

گیاه گوش‌بره سفید نشان‌دهنده محدودشدن فعالیت میکروبی به‌علت وجود اثرات ضد باکتریایی نانو ذرات نقره، کاهش دسترسی به کربوهیدارت‌های سهل‌الهضم (به‌عنوان انرژی قابل‌متابولیسم قابل تخمیر) می‌باشد.

ضرایب همبستگی بین قابلیت‌هضم ماده خشک، قابلیت‌هضم ماده آلی، شاخص بخش‌پذیری و حجم گاز تجمعی تولیدی در ساعات مختلف انکوباسیون در شرایط برون‌تنی در جدول ۲ نشان داده شده است. در تیمار یک همبستگی منفی و معنی‌دار بین قابلیت‌هضم ماده خشک، قابلیت‌هضم ماده آلی و حجم گاز تجمعی تولیدی در ساعات ۱۲ و ۲۴ مشاهده شد (P<۰/۰۵). هیچ‌گونه همبستگی معنی‌دار بین شاخص بخش‌پذیری و حجم گاز تجمعی تولیدی در ساعات مختلف انکوباسیون مربوط به تیمار یک وجود نداشت. در تیمار دو همبستگی منفی و معنی‌دار بین قابلیت‌هضم ماده آلی، شاخص بخش‌پذیری و حجم گاز تجمعی تولیدی در ساعات مختلف انکوباسیون (۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶) ثبت گردید (P<۰/۰۵). قابلیت‌هضم ماده خشک، قابلیت‌هضم ماده آلی و شاخص بخش‌پذیری همبستگی معنی‌داری با حجم گاز تجمعی تولیدی در ساعات مختلف انکوباسیون در شرایط برون‌تنی در تیمار سه نداشتند.

(Blummel and Orskov, 1993) گزارش کردند که همبستگی بالایی بین تولید گاز، قابلیت‌هضم ماده خشک و قابلیت‌هضم ماده آلی وجود دارد. وجود اثرات ضد باکتریایی نانو ذرات نقره در تیمارهای آزمایشی حاوی نانو ذرات نقره تولید شده باعث تولید توده میکروبی کمتر، محدودشدن فعالیت میکروبی، کاهش دسترسی به کربوهیدارت‌های سهل‌الهضم (به عنوان انرژی قابل‌متابولیسم قابل تخمیر) و در نهایت کاهش شاخص بخش‌پذیری می‌گردد. از این رو می‌توان گفت وجود همبستگی منفی و معنی‌دار بین قابلیت‌هضم ماده آلی، شاخص بخش‌پذیری و حجم گاز تجمعی تولیدی در ساعات مختلف انکوباسیون (۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶) در تیمار دو بیان‌کننده این واقعیت است که قابلیت‌هضم ماده آلی و شاخص بخش‌پذیری همزمان با افزایش مقدار حجم گاز تجمعی تولیدی پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون به‌دلیل وجود اثرات ضد باکتریایی نانو ذرات نقره کاهش یافته است.

جدول ۲. ضرایب همبستگی بین قابلیت‌هضم ماده خشک، قابلیت‌هضم ماده آلی، شاخص بخش‌پذیری و حجم گاز تولیدی در ساعات مختلف انکوباسیون در شرایط برون‌تنی

Table 2. Pearson correlation coefficients of dry matter digestibility, organic matter digestibility and partitioning factor with cumulative gas production during different hours of *in vitro* incubation.

متغیرها Parameters	زمان‌های انکوباسیون Incubation Times				
	12	24	48	72	96
تیمار یک[1] Treatment 1					
IVDMD[2]	-0.932*	-0.946**	-0.239	0.140	0.293
IVOMD[3]	-0.946**	-0.979**	-0.366	-0.168	-0.009
PF[4]	-0.857	-0.876	-0.603	-0.257	-0.500
تیمار دو Treatment 2					
IVDMD	-0.622	-0.620	-0.521	-0.507	-0.619
IVOMD	-0.927*	-0.924*	-0.894*	-0.881*	-0.925*
PF	-0.994**	-0.995**	-0.983**	-0.978**	-0.996**
تیمار سه Treatment 3					
IVDMD	0.326	0.540	0.343	0.427	0.625
IVOMD	0.211	0.516	0.334	0.256	0.027
PF	-0.402	-0.519	-0.296	-0.384	-0.588

[۱] تیمار ۱: جیره پایه فاقد نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید، تیمار ۲: جیره پایه به اضافه ۱۲۵ میکروگرم نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید در میلی‌لیتر، تیمار ۳: جیره پایه به اضافه ۲۵۰ میکروگرم نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید در میلی‌لیتر؛ [۲] IVDMD: قابلیت‌هضم ماده خشک (درصد)؛ [۳] IVOMD: قابلیت‌هضم ماده آلی (درصد)؛ [۴] PF: شاخص بخش‌پذیری (میلی‌گرم/میلی‌لیتر). * = $p<0.05$، ** = $p<0.01$.

[1]Treatment 1: basal diet, Treatment 2: basal diet + 125µg/ml AgNPs, Treatment 3: basal diet + 250µg/ml AgNPs. [2]IVDMD: *in vitro* dry matter digestibility (%). [3]IVOMD: *in vitro* organic matter digestibility (%).[4]PF: portioning factor (mg/ml).

۴. نتیجه‌گیری

از نتایج به‌دست آمده از آزمایش حاضر اینچنین استنباط می‌شود که مکمل‌کردن مقادیر افزایشی نانو ذرات نقره توانست فراسنجه‌های تولید گاز در خوراک پایه را تغییر دهد. بدیهی است طراحی آزمایشات میکروبی دیگر با مقادیر متنوع‌تری از نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی به‌منظور دستیابی به درک بهتری از نحوه عملکرد این نانو ذرات در محیط شکمبه ضروری است. همچنین پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری در رابطه با تأثیر نانو ذرات نقره بر عملکرد نشخوارکنندگان (گاو و گوسفند) در سیستم‌های پرورشی مختلف (پرواری و شیری) با توجه به جنس دام و مرحله تولیدی در شرایط درون‌تنی صورت گیرد.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از نتایج طرح تحقیقاتی اجراشده از محل اعتبارات معاونت پژوهشی مجتمع آموزش عالی تربت‌جام می‌باشد.

منابع

39. Abd El-Galil, E.R.I. and El-Bordeny N.E.Y. 2018. Evaluation of nanocobalt particles addition in ruminant rations by in vitro gas production. Egyptian Journal of Nutrition and Feeds, 21(1):91-102.
40. Akhlaghi, H. and Motevalizadeh Kakh'ky A. 2010. Volatile Constituents of Phlomis cancellata Bunge. A Labiate Herb Indigenous in Iran Journal of Essential Oil Research, 13(5):134-137.
41. Bellamy, D, and Pfister A. 1992. World medicine: plants, patients and people. Oxford: Blackwell Publishers, 1321p.
42. Benchaar, C., Calsamiglia S., Chaves A.V., Fraser G.R., Colombatto D., McAllister T.A, and Beauchemin K.A. 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. Animal Feed Science and Technology, 145:209-228.
43. Blummel, M, and Orskov E.R. 1993. Composition of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting food intake in cattle. Animal Feed Science and Technology, 40:109-119.
44. Buxton, D.R. and Redfearn D.D. 1997. Plant limitations to fiber digestion and utilization. The Journal of Nutrition, 127(5):814-818.
45. Fondevila, M. 2010. Handbook of Potential use of silver nanoparticles as an additive in animal feeding, 325-334.
46. García-González, R., López S., Fernández M, and González J.S. 2006. Effects of the addition of some medicinal plants on methane production in a rumen simulating fermenter (RUSITEC). International Congress Series, 1293:172-175.
47. Getachew, G., Makkar H.P.S, and Becker K. 2000. Effect of polyethylene glycol on in vitro degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. British Journal of Nutrition, 84:73-83.
48. Getachew, G., Makkar H.P.S, and Becker K. 2002. Tropical browses: content of phenolic compounds,in vitro gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acids and invitro gas production. Journal of Agricultural Science, 139:341-352.
49. Gonzalez-Estrella, J., Sierra-Alvarez R, and Field J.A. 2013. Toxicity assessment of inorganic nanoparticles to acetoclastic and hydrogenotrophic methanogenic activity in anaerobic granular sludge. Journal of Hazardous Materials, 260:278-285.
50. Heidari, S. and M. Hosseinpour Zaryabi. 2018. Response Surface Methodology for Optimization of Green Silver Nanoparticles Synthesized via Phlomis Cancellata Bunge Extract. Analytical and Bioanalytical Chemistry Research, 5(2):373-386.

51. Ipharraguerre, I.R, and Clark J.H. 2003. Usefulness of ionophores for lactating dairy cows: A review. Animal Feed Science and Technology, 106:39-57.
52. Khafipour, E., Krause D.O, and Plaizier J.C. 2009. Alfalfa pellet-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows increases bacterial endotoxin in the rumen without causing inflammation. Journal of Dairy Science, 92:1712-1724. (In Persian).
53. Li, B.T., Van Kessel A.G., Caine W.R., Huang S.X, and Kirkwood R.N. 2001. Small intestinal morphology and bacterial populations in ileal digesta and feces of newly weaned pigs receiving a high dietary level of zinc oxide. Canadian Journal of Animal Science, 81:511-516.
54. Luna-delRisco, M., Orupõld K, and Dubourguier H.C. 2011 Particle-size effect of CuO and ZnO on biogas and methane production during anaerobic digestion. Journal of Hazardous Materials, 189(1):603-608.
55. Makkar, H.P.S. 2005. In vitro gas methods for evaluation of feeds containing phytochemicals. Animal Feed Science and Technology, 123:291-302.
56. Menke, K.H., Salewski L.A., Steingass H., Fritz D, and Schneider W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolisable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. The Journal of Agricultural Science, 93:217-222.
57. Menke, K.H, and Steingass H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. Animal research and development, 28:7-55.
58. Morteza-Semnani, K., Moshiri K, and Akbarzadeh M. 2006. Essential oil composition of Phlomis cancellata Bunge. Journal of Essential Oil Research, 18(6):672-673. (In Persian).
59. Mortimer, M., Kasemets K, and Kahru A. 2010. Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa Tetrahymena thermophila. Toxicology, 269(2):182-189.
60. Noeck, J.E. 1988. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a Review. Journal of Dairy Science, 71:2051-2069.
61. Ørskov, E.R, and McDonald I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements Weighed according to the rate of passage. The Journal of Agricultural Science, 92:499-503.
62. Rajendran, R. 2013. Application of nano minerals in animal production system.Research. Journal of Biotechnology, 8(3):1-3.
63. Sai Ram Kumar, S. 2017. Green synthesis of nanoparticles using plant extracts and their effect on rumen fermentation in vitro. Thesis.
64. Sarker, N.C., Keomanivong F., Borhan M.D., Rahman S, and Swanson K. 2018. In vitro evaluation of nano zinc oxide (nZnO) on mitigation of gaseous emissions. Journal of Animal Science and Technology, 60:27.
65. Shi, L., Xun W., Yue W., Zhang C., Ren Y., Liu Q., Wang Q, and Shi L. 2011(a). Effect of elemental nano-selenium on feed digestibility, rumen fermentation, and purine derivatives in sheep. Animal Feed Science and Technology, 163(2):136-142.
66. Shi L., Yang R.J., Yue W.B., Xun W.J., Zhang C.X., Ren Y.S., Shi L, and Lei F.L. 2010. Effect of elemental nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male Boer goats. Animal Reproduction Science, 118(2):248-254.
67. Theodorou, M.K., Williams B.A., Dhanoa M.S., McAllan A.B, and France J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology, 48:185-197.
68. Tomkins, N.W., Denmanb S.E., Pilajunc P., Wanapatc M., McSweeney C.S, and Elliot R. 2015. Manipulating rumen fermentation and methanogenesis using an essential oil and monensinin beef cattle feda tropical grasshay. Animal Feed Science and Technology, 200:25-34.
69. Xun, W., Shi L., Yue W., Zhang C., Ren Y, and Liu Q. 2012. Effect of high-dose nano selenium and selenium–yeast on feed digestibility, rumen fermentation, and purine derivatives in sheep. Biological Trace Element Research, 150(1-3):130-136.
70. Yang, Z.P, and Sun L.P. 2006. Effects of nanometer ZnO on growth performance of early weaned piglets. Journal of Shanxi Agriculture Science, 3:024.
71. Yoon, K.Y., byeon J.H., Park J.H, and Hwang J. 2007. Susceptibility contrants of Eschericia coli and Bacillus subtillis to silver and copper nanoparticles. Science of the Total Environment, 373:572-575.
72. Zhisheng, C.J. 2011. Effect of nano-zinc oxide supplementation on rumen fermentation in vitro. Chinese Journal of Animal Nutrition, 8:023.

Effect of Green Silver Nanoparticles Synthesized via *Phlomis cancellata Bunge* Extract on *in vitro* gas production kinetic and parameters.

Elias Ibrahimi Khoram Abadi[1*]; Mohsen Kazemi[2]; Somayeh Heidari[3]

1 & 2- Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Animal Science, University of Torbat-e Jam, Torbat-e Jam, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Torbat-e Jam, Torbat-e Jam, Iran.

**Eliiass378@gmail.com*

Abstract

The present investigation was carried out to study the effect of green silver nanoparticles synthesized via *Phlomis cancellata Bunge* extract on *in vitro* gas production kinetic and parameters. Synthesis of sliver nanoparticles was prepared by adding of 1 ml of the aqueous extract to 4.76 mM sliver nitrate solution (pH= 6.84) allowed to react at 77 °C for 24.79 min in the dark to minimize the photo activation of silver nitrate. The color change of solution from yellow to brown after 3 min of incubation is indicative of the bioreduction of Ag+ ions in the solution to Ag°. Effects of increasing the concentration of green silver nanoparticles synthesized via *Phlomis cancellata Bunge* extract (0, 125 and 250 µg/ml) on rumen fermentation were evaluated using *in vitro* gas production technique. Gas production volumes were recorded at 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 and 96 h of incubation and then gas production kinetic was estimated. The increasing level of green silver nanoparticles synthesized via *Phlomis cancellata Bunge* extract did not significantly affect *in vitro* potential of gas production and gas production rate. For the cumulative gas production, no significant difference was found among the treatments. The lowest and highest in vitro potential of gas production, gas production rate and cumulative gas production was recorded for treatments 3 and 1, respectively. The concentration of green silver nanoparticles synthesized via *Phlomis cancellata Bunge* extract failed to affect gas production and gas production rate. Additionally, further *in vivo* work is needed to assess the effect of green silver nanoparticles inclusion on ruminal fermentation status and animal performance.

Keywords: Gas production, Nano Technology, Ration

تأثیر مقادیر مختلف نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید (Phlomis cancellata Bunge) بر روند تولید گاز و فراسنجه‌های آن در شرایط برون‌تنی

الیاس ابراهیمی خرم‌آبادی[1*]؛ محسن کاظمی[2]؛ سمیه حیدری[3]

۱ و ۲- استادیار گروه علوم‌دامی، مجتمع آموزش عالی تربت‌جام، تربت‌جام، ایران.
۳- استادیار گروه شیمی، مجتمع آموزش عالی تربت‌جام، تربت‌جام، ایران.

Eliiass378@gmail.com *

چکیده

این آزمایش با هدف بررسی اثر مقادیر مختلف نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش‌بره سفید بر روند تولید گاز و فراسنجه‌های آن در شرایط برون‌تنی انجام شد. جهت تهیه عصاره گیاه گوش‌بره سفید، یک میلی‌لیتر از عصاره تهیه‌شده از اندام‌های هوایی گیاه به محلول نیترات نقره ۴/۶۷ میلی‌مولار در pH= ۶/۸۴ اضافه گردید و به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۷۷ درجه سلسیوس مورد انکوباسیون قرار گرفت. اثرات افزایش نانو ذرات تولید شده از گیاه گوش‌بره سفید (۰، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) بر خصوصیات تخمیری جیره گاوهای پر تولید با استفاده از روش تولید گاز و با کمک رابطه (Theodurou et al., 1994) محاسبه شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با کمک معادله (Orskov and McDonald, 1979) $P= b(1-e^{ct})$ و نرم‌افزار SAS (نسخه ۱/۹) انجام شد.. افزایش مقدار نانو ذرات نقره در تیمارهای آزمایشی تأثیر معنی‌داری بر ظرفیت تولید گاز از بخش قابل تخمیر و نرخ تولید گاز نداشت. کمترین و بیشترین ظرفیت تولید گاز از بخش قابل تخمیر به‌ترتیب در تیمارهای ۲۵۰ میکروگرم نانو ذرات نقره و تیمار شاهد، مشاهده شد. نرخ تولید گاز در تیمار حاوی ۲۵۰ میکروگرم نانو ذرات نقره کمترین و در تیمار شاهد بیشترین مقدار را از خود نشان داد. حجم گاز تجمعی تولیدی (میلی‌لیتر/میلی‌گرم ماده خشک) در ساعات مختلف انکوباسیون تحت تأثیر افزایش مقدار نانو ذرات نقره در تیمارهای آزمایشی، قرار نگرفت. با توجه به اینکه هیچ یک از مقادیر نانو ذرات نقره تولید شده از عصاره گیاه گوش‌بره سفید استفاده‌شده در این آزمایش قادر به کاهش معنی‌دار حجم کل گاز تولیدی نبوده‌اند، لذا به‌نظر می‌رسد مقادیر نانو ذرات نقره تولید شده از عصاره گیاه گوش‌بره سفید استفاده‌شده در این آزمایش به‌منظور کاهش معنی‌دار مقدار گاز تجمعی تولیدی، کافی نبوده است. با این حال، درک بهتر نحوه تأثیر مقادیر نانو ذرات نقره تولید شده از عصاره گیاه گوش‌بره سفید بر وضعیت تولیدی حیوان نیازمند انجام مطالعات بیشتری است.

واژگان کلیدی: تولید گاز، جیره، فناوری نانو

۱. مقدمه

فرایند هضم الیاف در شکمبه کارآمد نیست (Buxton et al., 1997; Semnani et al., 2006). بیشتر هیدروژن تولیدشده در شکمبه معمولاً برای تولید متان استفاده می‌شود. گازهای حاصل از تخمیر شکمبه‌ای به‌عنوان مواد زائد به محیط دفع می‌شوند. درگذشته به‌منظور کنترل فرآیند هضم در شکمبه از روش‌های فیزیکی، شیمیایی، زیستی و زیست‌فناوری گوناگونی استفاده شده است که در عمل چندان اثرگذار نبوده‌اند (Kumar, 2017). فناوری نانو به‌عنوان یک راهکار نوین می‌تواند از طریق تولید نانو ذرات استفاده‌شده در خوراک، شرایط هضم و جذب در نشخوارکنندگان را، بهبود بخشد. بررسی‌ها نشان می‌دهد، افزودن نانو ذرات روی به جیره گاوهای

شیری مبتلا به ورم پستان تحت حاد، باعث کاهش میزان ابتلا و افزایش تولید می‌شود (Rajendran, 2013). محققان گزارش کردند افزودن نانو ذرات سلنیوم به جیره بزهای نر در حال رشد تأثیرات قابل‌توجهی بر بهبود عملکرد داشت (Shi et al., 2010; Shi et al., 2011a, Xun et al., 2012). هم‌چنین، تحقیقات جدید نشان می‌دهد نانو ذرات برخی از فلزات مانند اکسید مس، روی و آهن برای جمعیت میکروبی شکمبه سمی بوده (Mortimer et al., 2010) و مانع از تولید متان در شرایط بی‌هوازی می‌شوند (Yang and Sun, 2006; Zhisheng, 2011; Gonzalez-Estrella et al., 2013). نانو ذرات را می‌توان با استفاده از عصاره‌های گیاهی به شیوه‌ای مقرون‌به‌صرفه و سازگار با محیط زیست تولید کرد.

گونه گوش‌بره سفید یا گوش‌بره ایرانی (*Phlomis cancellata* Bunge) گیاهی پایا و یک ساله است و به‌وفور در مراتع استان‌های خراسان، گلستان و مازندران یافت می‌شود (Semnani et al., 2006). جنس گوش‌بره (*Phlomis* sp.) متعلق به تیره نعناعیان بوده و دارای ۷۰ گونه گیاهی علفی چند ساله و معطر می‌باشد که تنها در نقاط محدودی از آسیا شامل ایران، افغانستان، ترکمنستان و عراق یافت می‌شود (Bellamy and Pfisher, 1992). ارزیابی عصاره به‌دست آمده از پیکر رویشی گیاه گوش‌بره سفید نشان می‌دهد عصاره این گیاه غنی از ترکیبات ترپنی (ژرماکرن دی، مونو ترپن آلفا پینن، بتا کاریو فیلن، بایسیکلو ژرماکرن و بتا سلینن) است (Semnani et al., 2006; Akhlaghi and Motevalizadeh, 2010).

استفاده از نانو ذرات در مطالعات تغذیه‌ای دام به‌صورت تخصصی و متنوع می‌تواند ظرفیت بالایی در جهت بهبود تولیدات دامی ایجاد نماید و بازده رشد و تولیدات دامی را به‌نحو چشم‌گیری افزایش دهد (Kumar, 2017). با این حال، اطلاعات و مطالعات انجام‌شده در این زمینه بسیار محدود است (Abd El-Galil et al., 2018). از این رو، با توجه به امکان استفاده از نانو ذرات تولید شده به روش زیستی در تغذیه دام و نظر به کمبود اطلاعات در این زمینه تصمیم گرفته شد تا اثر مقادیر مختلف نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش‌بره سفید بر روند تولید گاز و فراسنجه‌های آن در شرایط برون‌تنی مورد بررسی قرار گیرد.

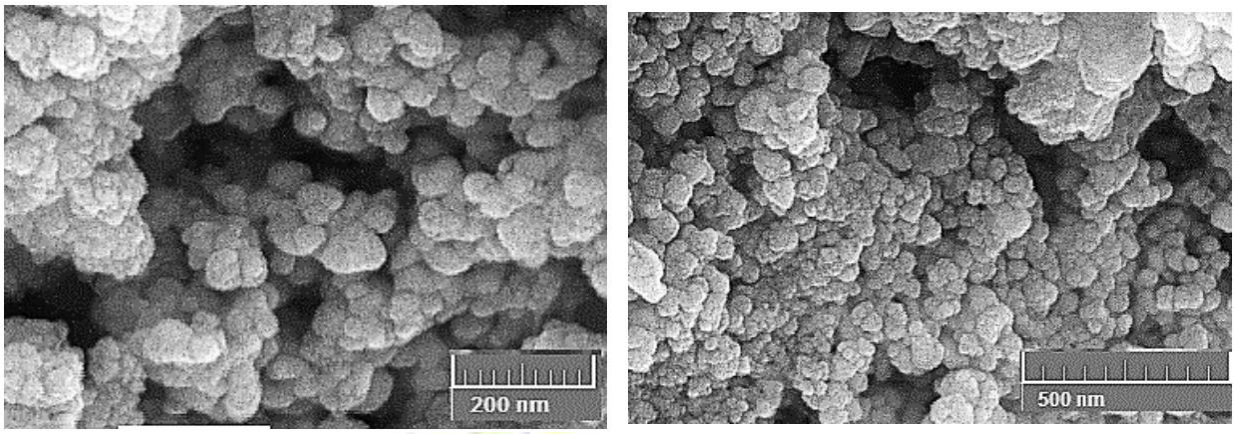
۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. جمع‌آوری و تهیه عصاره گیاه گوش‌بره سفید

تولید نانو ذرات نقره به روش زیستی از عصاره گیاه گوش‌بره سفید در آزمایشگاه مرکزی مجتمع آموزش عالی تربت‌جام انجام شد (Heidari and Hosseinpour, 2018). به‌طور خلاصه می‌توان گفت جهت تهیه عصاره گیاه گوش‌بره سفید، ابتدا اندام‌های هوایی گیاه گوش‌بره سفید (تهیه‌شده از مناطق اطراف شهرستان باخرز واقع در استان خراسان رضوی) با آب مقطر به خوبی شستشو داده شد. در ادامه و پس از کامل‌شدن فرآیند خشک‌شدن در دمای اتاق، برگ‌های خشک‌شده گیاه با قیچی و هاون به خوبی پودر شد. سپس ۱ گرم پودر تهیه‌شده از گیاه گوش‌بره سفید با ۱۰۰ سی‌سی آب دیونیزه مخلوط گردید و به مدت ۳۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سلسیوس حرارت داده شد. عصاره حاصل بعد از سرد شدن، فیلتر شد و برای تولید نانو ذرات، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Heidari and Hosseinpour, 2018).

۲-۲. تولید نانو ذرات به روش زیستی

در ادامه فرآیند تولید نانو ذرات نقره، یک میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده از گیاه گوش‌بره سفید به محلول نیترات نقره (Sigma–Aldrich Chemicals Germany) ۴/۷۶ میلی‌مولار در pH= ۶/۸۴ اضافه گردید و به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۷۷/۶۲ درجه سلسیوس مورد انکوباسیون قرار گرفت. تغییر رنگ محلول از زرد به قهوه‌ای پس از گذشت سه دقیقه از انکوباسیون نشان‌دهنده کاهش زیستی یون‌های Ag^{+} محلول به Ag^{0} بود (شکل ۱) (Heidari and Hosseinpour, 2018).



شکل ۱: تصویر نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید در میکروسکوپ الکترونی.
Figure 1- SEM micrograph for the biosynthesized AgNPs obtained by mediation of *Phlomis cancellata Bunge.*

۳-۲. آزمون برون‌تنی (*in vitro*) اندازه‌گیری فراسنجه‌های تولید گاز

به‌منظور تعیین اثر سطوح مختلف نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید بر خصوصیات تخمیری جیره گاوهای پر تولید، آزمون تولید گاز بر اساس روش (Menke et al., 1979)، انجام شد. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از: ۱- تیمار یک (جیره پایه فاقد نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید)، ۲- تیمار دو (جیره پایه به اضافه ۱۲۵ میکروگرم نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید در میلی‌لیتر)، ۳- تیمار سه (جیره پایه به اضافه ۲۵۰ میکروگرم نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید در میلی‌لیتر). جیره پایه بر اساس ماده خشک شامل: علوفه (۲۰ درصد سیلوی ذرت و ۲۰ درصد علوفه یونجه) و کنسانتره (۱۶/۵ درصد دانه ذرت، ۱۳/۵ درصد دانه جو، ۱۳/۵ درصد کنجاله سویا، ۷/۰۵ درصد کنجاله کلزا، ۳/۷۵ درصد پودر ماهی، ۱/۳۵ درصد پودر چربی، ۲/۴ درصد پیش مخلوط ویتامینی-معدنی، ۱/۱۱ درصد جوش‌شیرین، ۰/۳۶ درصد دی‌کلسیم‌فسفات، ۰/۲۴ درصد منیزیم، ۰/۱۵ درصد نمک و ۰/۰۹ درصد توکسین بایندر) به نسبت ۴۰ به ۶۰ بود. ترکیب شیمیایی جیره شامل ۱۸ درصد پروتئین‌خام، ۲/۷۶ مگاکالری در کیلوگرم ماده خشک انرژی قابل‌متابولیسم، ۴۱/۱ درصد NFC، ۲۷/۷ درصد NDF، ۱۷/۷ درصد ADF، ۱۹/۲ درصد NDF علوفه‌ای و ۴/۳ درصد عصاره اتری بود.

مایع شکمبه از یک رأس گاو نر هلشتاین با کمک لوله پلاستیکی و پمپ خلاء، قبل از تغذیه صبح جمع‌آوری شد. محتویات شکمبه به‌وسیله چهار لایه پارچه متقال صاف گردید و سپس به درون بطری در داخل فلاسک عایق‌دار آب گرم (۳۹ درجه سلسیوس) قرار داده شد و بلافاصله به آزمایشگاه انتقال یافت. جهت اطمینان از شرایط بی‌هوازی مایع شکمبه صاف شده، گاز دی اکسید کربن به آن تزریق شد و قبل از استفاده جهت انکوباسیون در حمام آب گرم (۳۸/۶ درجه سلسیوس) نگهداری شد. بزاق مصنوعی مطابق روش (Menke et al., 1979) تهیه و با شیرابه شکمبه ۲:۱ (مایع شکمبه: بافر) مخلوط شد. نمونه‌های خوراکی با آسیاب با غربال یک میلی‌متری آسیاب شد (Menke and Steingass, 1988). مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم جیره پایه، ۲۰ میلی‌لیتر بزاق مصنوعی و ۱۰ میلی‌لیتر شیرابه شکمبه به بطری‌های شیشه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتری (برای هر تیمار ۵ تکرار)، اضافه شد. سر بطری‌ها به کمک درپوش پلاستیکی و پوشش آلومینیومی به‌طور کامل بسته و در حمام آب گرم با دمای ۳۸/۶ درجه سلسیوس برای انکوباسیون قرار داده شد. به‌منظور تصحیح گاز تولید شده ناشی از ذرات باقی‌مانده در مایع شکمبه سه تکرار که بلانک نامیده می‌شود در نظر گرفته شد. فشار گاز تولیدشده در زمان‌های ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون ثبت گردید و به کمک رابطه (Theodurou et

al., 1994) حجم گاز تولیدشده محاسبه شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با کمک معادله (Orskov and McDonald, 1979) $P= b(1-e^{ct})$ و نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) انجام شد. در این معادله فراسنجه b گاز تولیدی از بخش قابل تخمیر (میلی‌لیتر)، c ثابت نرخ تولید گاز (میلی‌لیتر در ساعت)، t زمان انکوباسیون (ساعت) و P مقدار گاز تولیدی (میلی‌لیتر) در زمان مورد نظر می‌باشد.

۳. نتایج و بحث

ظرفیت تولید گاز از بخش قابل تخمیر (b) و نرخ تولید گاز (c) در شرایط افزودن مقادیر مختلف نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش‌بره سفید به جیره طی ۹۶ ساعت انکوباسیون و همچنین حجم گاز تجمعی تولیدی (میلی‌لیتر/میلی‌گرم ماده خشک) در ساعات مختلف انکوباسیون (۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) در جدول ۱ و شکل ۲ آورده شده است. افزایش مقدار نانو ذرات نقره در تیمارهای آزمایشی تأثیر معنی‌داری بر ظرفیت تولید گاز از بخش قابل تخمیر و نرخ تولید گاز نداشت (P>۰/۰۵). کمترین (۳/۰۸±۵۳/۷۳ میلی‌لیتر) و بیشترین (۲/۶۶±۵۵/۹۰ میلی‌لیتر) ظرفیت تولید گاز از بخش قابل تخمیر به‌ترتیب در تیمارهای ۲۵۰ میکروگرم نانو ذرات نقره و تیمار شاهد، مشاهده شد (جدول ۱). نرخ تولید گاز در تیمار حاوی ۲۵۰ میکروگرم نانو ذرات نقره کمترین (۰/۰±۱۰۰۰/۰۰۲۴ میلی‌لیتر در ساعت) و در تیمار شاهد بیشترین (۰/۰±۱۰۲۹/۰۰۹۲ میلی‌لیتر در ساعت) مقدار را از خود نشان داد (جدول ۱). حجم گاز تجمعی تولیدی (میلی‌لیتر/میلی‌گرم ماده خشک) در ساعات مختلف انکوباسیون (۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) تحت تأثیر افزایش مقدار نانو ذرات نقره در تیمارهای آزمایشی، قرار نگرفت (P>۰/۰۵). در ساعات مختلف انکوباسیون، کمترین و بیشترین حجم گاز تجمعی تولیدی (میلی‌لیتر/میلی‌گرم ماده خشک) به‌ترتیب مربوط به تیمارهای حاوی ۲۵۰ میکروگرم نانو ذرات نقره و تیمار شاهد، بود (جدول ۱).

دی‌اکسیدکربن و متان بخش‌های عمده گاز تولیدشده در شکمبه را شامل می‌شوند (Dehority, 2003). کاهش جمعیت پروتوزوآیی شکمبه، تحریک تولید پروپیونات، کاهش تولید هیدروژن و مهار مستقیم باکتری‌های تولیدکننده گاز متان از جمله راهکارهایی است که می‌توان میزان تولید گاز متان در شکمبه را کاهش داد (Castro-Montaya et al., 2012). نانو ذرات نقره دارای ویژه‌گی‌های متوقف‌کننده و از بین‌برنده باکتریایی می‌باشند. در مقیاس اتمی، نقره توانایی جذب اکسیژن را دارد و می‌تواند به‌عنوان یک کاتالیزور برای انجام واکنش اکسیداسیون، عمل کند. اکسیژن اتمی جذب‌شده در سطح نقره با گروه‌های تیول اطراف سطح باکتری‌ها و ویروس‌ها واکنش می‌دهد که این واکنش منجر به برداشت اتم‌های هیدروژن خواهد شد. تحت این شرایط باکتری توانایی تنفس را از دست می‌دهد و باکتری از بین می‌رود (Hartemann et al., 2015). همچنین دارابودن ویژه‌گی‌های کاتالیزوری و وجود اکسیژن فعال در نقره باعث اکسیدشدن مواد ژنتیکی باکتریایی و ویروسی می‌شود. نانو ذرات نقره از طریق جلوگیری از باز شدن رشته DNA باکتریایی در خلال فرآیند همانندسازی DNA، مانع تکثیر باکتری‌ها می‌شود (Lara et al., 2009; Yang et al., 2009; Li et al., 2011; Cui et al., 2013). با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای با استفاده از نانو ذرات نقره تولید شده از عصاره گیاه گوش‌بره سفید بر شرایط تخمیری محیط شکمبه صورت نگرفته است، می‌توان به‌منظور تفسیر بهتر نتایج به‌دست آمده در این آزمایش، از نتایج حاصل از تأثیر دیگر نانو ذرات فلزی بر شرایط تخمیری محیط شکمبه، استفاده کرد. به‌دلیل مشابهت شیمیایی نقره با فلزاتی همچون روی، کروم و کبالت، تأثیر نقره بر تنوع زیستی میکروبی مسیر هضمی و عملکرد آن‌ها و وضعیت فیزیولوژیکی میزبان (سطح ایمنی، فعالیت آنزیم‌های هاضم و ساختار روده‌ای) مشابه این فلزات خواهد بود (Li et al., 2001; Khafipour et al., 2009; Fondevila, 2010). مشابه نتایج به‌دست آمده در آزمایش حاضر (Sarker et al., 2018) گزارش کردند افزایش غلظت نانو ذرات اکسید روی از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم در گرم تأثیر معنی‌داری بر مقدار کل گاز تولیدی پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون ندارد. از سوی دیگر نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد حجم گاز تجمعی تولیدی (میلی‌لیتر/میلی‌گرم ماده خشک) در ۲۴ ساعت انکوباسیون، تحت تأثیر افزایش مقدار نانو ذرات اکسید آهن تولید شده از عصاره گیاهان اکالیپتوس نیلی (Eucalyptus globulus)، گواوا (Psidium guajava)، نانو ذرات

اکسید روی تولید شده از عصاره گیاهان آلوئه‌ورا (Aloe vera) و نانو ذرات مس تولید شده از عصاره گیاهان آلوئه‌ورا، آب بشقابی (Centella asiatica) و چریش (*Mangifera indica*) از صفر تا ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر قرار نگرفت (Kumar, 2017).

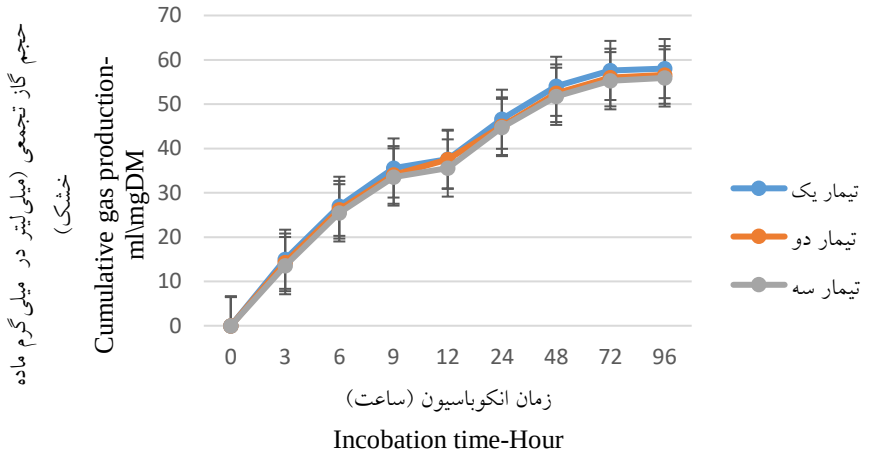
جدول 1: اثر افزودن مقادیر مختلف نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید بر تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیر.

Table 1: Effect of different levels of biosynthesized AgNPs obtained by mediation of *Phlomis cancellata Bunge* on gas production and fermentation parameters.

متغیرها Parameters	تیمارهای آزمایشی [1] Experimental Treatments			SEM [4]	P-value [5]
	تیمار یک Treatment 1	تیمار دو Treatment 2	تیمار سه Treatment 3		
فراسنجه‌های تخمیر Fermentation Parameters					
b (ml/200mgDM) [2]	55.90±2.66	54.23±0.82	53.73±3.08	1.2	0.43
c (ml/h) [3]	0.1029±0.0092	0.1012±0.0067	0.1000±0.0024	0.0033	0.82
(میلی‌لیتر/میلی‌گرم ماده خشک) حجم گاز تجمعی Cumulative Gas Production (ml/200mg of DM)					
12	37.55±1.41	37.51±1.07	37.15±1.24	0.43	1.01
24	46.59±1.87	45.03±1.50	44.73±3.37	1.19	0.51
48	54.02±2.38	52.46±0.58	51.76±3.12	1.14	0.39
72	57.60±2.50	56.00±.0.94	55.28±2.83	1.20	0.40
96	58.02±3.06	56.59±1.07	55.91±2.78	1.23	0.48

[1] تیمار ۱: جیره پایه فاقد نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید، تیمار ۲: جیره پایه به اضافه ۱۲۵ میکروگرم نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید در میلی‌لیتر، تیمار ۳: جیره پایه به اضافه ۲۵۰ میکروگرم نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید در میلی‌لیتر؛ [2] b: ظرفیت تولید گاز از بخش قابل تخمیر؛ [3] c: نرخ تولید گاز؛ [4] SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها، [5] P-value: درصد معنی‌داری میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵).

[1]Treatment 1: basal diet, Treatment 2: basal diet + 125µg/ml AgNPs, Treatment 3: basal diet + 250µg/ml AgNPs. [2]b: The gas production from the fermentable fraction ml/200mgDM. [3]c: Rate constant of gas production during incubation (ml/h). Values with different superscript in each column letters differ significantly (P<0.05).



شکل ۲: اثر افزودن مقادیر مختلف نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش‌بره سفید بر روند تولید گاز.

Figure 2. Effect of different levels of biosynthesized AgNPs obtained by mediation of *Phlomis cancellata Bunge* on cumulative gas production trend.

تیمار ۱: جیره پایه فاقد نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید، تیمار ۲: جیره پایه به اضافه ۱۲۵ میکروگرم نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید در میلی‌لیتر، تیمار ۳: جیره پایه به اضافه ۲۵۰ میکروگرم نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی از عصاره گوش بره.

Treatment 1: basal diet, Treatment 2: basal diet + 125µg/ml AgNPs, Treatment 3: basal diet + 250µg/ml AgNPs.

۴. نتیجه‌گیری

از آنجائیکه شدت تأثیرگذاری نانو ذرات نقره بر جمعیت میکروبی محیط شکمبه وابسته به غلظت نانو ذرات، اندازه آن‌ها و بزرگی جمعیت میکروبی دارد (Arabi et al., 2012; Kumar, 2017) و با توجه به اینکه هیچ یک از مقادیر نانو ذرات نقره تولید شده از عصاره گیاه گوش‌بره سفید استفاده‌شده در این آزمایش قادر به کاهش معنی‌دار حجم کل گاز تولیدی نبوده‌اند، لذا به‌نظر می‌رسد مقادیر نانو ذرات نقره تولید شده از عصاره گیاه گوش‌بره سفید استفاده شده در این آزمایش به‌منظور کاهش معنی‌دار مقدار گاز تجمعی تولیدی، کافی نبوده است. با این حال، درک بهتر نحوه تأثیر مقادیر نانو ذرات نقره تولید شده از عصاره گیاه گوش‌بره سفید بر وضعیت تولیدی حیوان نیازمند انجام مطالعات بیشتری است.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از نتایج طرح تحقیقاتی اجراشده از محل اعتبارات معاونت پژوهشی مجتمع آموزش عالی تربت‌جام می‌باشد.

منابع

31. Abd El-Galil, E.R.I. and El-Bordeny N.E.Y. 2018. Evaluation of nanocobalt particles addition in ruminant rations by in vitro gas production. Egyptian Journal of Nutrition and Feeds, 21(1):91-102.
32. Akhlaghi, H. and Motevalizadeh Kakh'ky A. 2010. Volatile Constituents of Phlomis cancellata Bunge. A Labiate Herb Indigenous in Iran Journal of Essential Oil Research, 13(5):134-137.
33. Arabi, F., Imandar M., Negahdary M., Imandar M., Noughabi M.T., Akbari-dastjerdi H, and Fazilati M. 2012. Investigation anti-bacterial effect of zinc oxide nanoparticles upon life of Listeria monocytogenes. Annals of Biological Research, 7:3679-3685. (In Persian)
34. Bellamy, D, and Pfister A. 1992. World medicine: plants, patients and people. Oxford: Blackwell Publishers, 1321p.
35. Buxton, D.R. and Redfearn D.D. 1997. Plant limitations to fiber digestion and utilization. The Journal of Nutrition, 127(5):814-818.
36. Castro-Montoyaa, J., De Campeneere S., Van Ranst G, and Fievez F. 2012. Interactions between methane

mitigation additives and basal substrates on in vitro methane and VFA production. Animal Feed Science and Technology, 176:47-60.
37. Cui, L., Chen P., Chen S., Yuan Z., Yu C., Ren B. and Zhang K. 2013. In situ study of the antibacterial activity and mechanism of action of silver nanoparticles by surface-enhanced Raman spectroscopy. Analytical Chemistry, 85:5436-5443.
38. Dehority, B.A. 2003. Rumen Microbiology. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
39. Fondevila, M. 2010. Handbook of Potential use of silver nanoparticles as an additive in animal feeding, 325-334.
40. Gonzalez-Estrella, J., Sierra-Alvarez R, and Field J.A. 2013. Toxicity assessment of inorganic nanoparticles to acetoclastic and hydrogenotrophic methanogenic activity in anaerobic granular sludge. Journal of Hazardous Materials, 260:278-285.
41. Hartemann, P., Hoet P., Proykova A., Fernandes T., Baun A., De Jong W., Filser J., Hensten A., Kneuer K., Maillard J.V., Norppa H., Scheringer M, and Wijnhoven S. 2015. Nanosilver: safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance. Materials Today, 18:122-123.
42. Heidari, S. and M. Hosseinpour Zaryabi. 2018. Response Surface Methodology for Optimization of Green Silver Nanoparticles Synthesized via Phlomis Cancellata Bunge Extract. Analytical and Bioanalytical Chemistry Research, 5(2):373-386.
43. Khafipour, E., Krause D.O, and Plaizier J.C. 2009. Alfalfa pellet-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows increases bacterial endotoxin in the rumen without causing inflammation. Journal of Dairy Science, 92:1712-1724. (In Persian).
44. Lara, H.H., Ayala-Nunez N.V., Turrent L.C.I, and Padilla C.R. 2009. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26:615-621.
45. Li, B.T., Van Kessel A.G., Caine W.R., Huang S.X, and Kirkwood R.N. 2001. Small intestinal morphology and bacterial populations in ileal digesta and feces of newly weaned pigs receiving a high dietary level of zinc oxide. Canadian Journal of Animal Science, 81:511-516.
46. Li, W.R., Xie X.R., Shi Q.S, Duan S.S., Ouyang Y.S, and Chen Y.B. 2011. Antibacterial effect of silver nanoparticles on Staphylococcus aureus. Biometals, 24:135-141.
47. Menke, K.H., Salewski L.A., Steingass H., Fritz D, and Schneider W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolisable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. The Journal of Agricultural Science, 93:217-222.
48. Menke, K.H, and Steingass H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. Animal research and development, 28:7-55.
49. Morteza-Semnani, K., Moshiri K, and Akbarzadeh M. 2006. Essential oil composition of Phlomis cancellata Bunge. Journal of Essential Oil Research, 18(6):672-673. (In Persian).
50. Mortimer, M., Kasemets K, and Kahru A. 2010. Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa Tetrahymena thermophila. Toxicology, 269(2):182-189.
51. Ørskov, E.R, and McDonald I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements Weighed according to the rate of passage. The Journal of Agricultural Science, 92:499-503.
52. Rajendran, R. 2013. Application of nano minerals in animal production system.Research. Journal of Biotechnology, 8(3):1-3.
53. Sai Ram Kumar, S. 2017. Green synthesis of nanoparticles using plant extracts and their effect on rumen fermentation in vitro. Thesis.
54. Sarker, N.C., Keomanivong F., Borhan M.D., Rahman S, and Swanson K. 2018. In vitro evaluation of nano zinc oxide (nZnO) on mitigation of gaseous emissions. Journal of Animal Science and Technology, 60:27.
55. Shi, L., Xun W., Yue W., Zhang C., Ren Y., Liu Q., Wang Q, and Shi L. 2011(a). Effect of elemental nano-selenium on feed digestibility, rumen fermentation, and purine derivatives in sheep. Animal Feed Science and Technology, 163(2):136-142.
56. Shi L., Yang R.J., Yue W.B., Xun W.J., Zhang C.X., Ren Y.S., Shi L, and Lei F.L. 2010. Effect of elemental nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male Boer goats. Animal Reproduction Science, 118(2):248-254.
57. Theodorou, M.K., Williams B.A., Dhanoa M.S., McAllan A.B, and France J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology, 48:185-197.
58. Xun, W., Shi L., Yue W., Zhang C., Ren Y, and Liu Q. 2012. Effect of high-dose nano selenium and

selenium–yeast on feed digestibility, rumen fermentation, and purine derivatives in sheep. Biological Trace Element Research, 150(1-3):130-136.
59. Yang, W., Shen C., Ji Q., Wang A.H., Liu J.Q, and Zhang Z. 2009. Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA. Nanotechnology, 2:2121-2134.
60. Yang, Z.P, and Sun L.P. 2006. Effects of nanometer ZnO on growth performance of early weaned piglets. Journal of Shanxi Agriculture Science, 3:024.
61. Zhisheng, C.J. 2011. Effect of nano-zinc oxide supplementation on rumen fermentation in vitro. Chinese Journal of Animal Nutrition, 8:023.

Review of the use of biosensors for the identification of marine toxins

Reza Kazemi Darsanaki[1]; Seyedeh Ainaz Shirangi[*2]

1- M.Sc. Student in Marine Biology, Department of Biology, Faculty of Basic Science and Engineering, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran
2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Science and Engineering, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran

* *a.shirangi@gonbad.ac.ir*

Abstract

Biosensors specifically identify the presence of foreign and undesired stimuli based on natural response systems in the living cell. Biosensors consist of a biological receptor that can be bacteria, enzymes, tissues, nucleic acid, and antibodies, and a transducer that is a physical and chemical component that converts a cellular reaction into a measurable signal. Today, due to the time-consuming nature of traditional methods, it is important to consider rapid diagnostic methods with high sensitivity. Marine toxins are secondary metabolites produced by a group of aquatic organisms such as microalgae including dinoflagellates, diatoms, bacteria, fungi, and marine protozoa that can diseases humans. The aim of this study was to investigate the use of biosensors for the identification of marine toxins.

Keywords: Biosensors, Marine Toxins, Bioreceptor

مروری بر کاربرد بیوسنسورها در شناسایی سموم دریایی

رضا کاظمی درسنکی[۱]؛ سیده آیناز شیرنگی*[۲]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد زیست دریا، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، دانشگاه گنبدکاووس

۲-استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی‌مهندسی، دانشگاه گنبدکاووس

a.shirangi@gonbad.ac.ir

چکیده

بیوسنسورها با تکیه‌بر سیستم‌های پاسخ طبیعی در سلول زنده، وجود محرک‌های بیگانه و نامطلوب را به‌طور اختصاصی شناسایی می‌کنند. بیوسنسورها از یک گیرنده زیستی که می‌تواند، باکتری، آنزیم، بافت، اسید نوکلئیک و آنتی‌بادی باشد و یک مبدل که بخش فیزیکی و شیمیایی است و واکنش سلولی را به شکل سیگنال قابل اندازه‌گیری تبدیل می‌کند، تشکیل می‌شوند. امروزه با توجه به زمان‌بر بودن روش‌های سنتی توجه به روش‌های تشخیصی سریع، با حساسیت بالا دارای اهمیت است. سموم دریایی، متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که توسط گروهی از آبزیان از قبیل ریز جلبک‌ها (دینوفلاژل‌ها و دیاتوم‌ها)، باکتری‌ها، قارچ‌ها و تک‌یاخته‌های موجود دریا تولید شده و می‌توانند سبب آسیب به انسان شوند. هدف این مطالعه، بررسی کاربرد بیوسنسورها در شناسایی سموم دریایی است.

واژگان کلیدی: بیوسنسور، گیرنده زیستی، سموم دریایی

۱. مقدمه

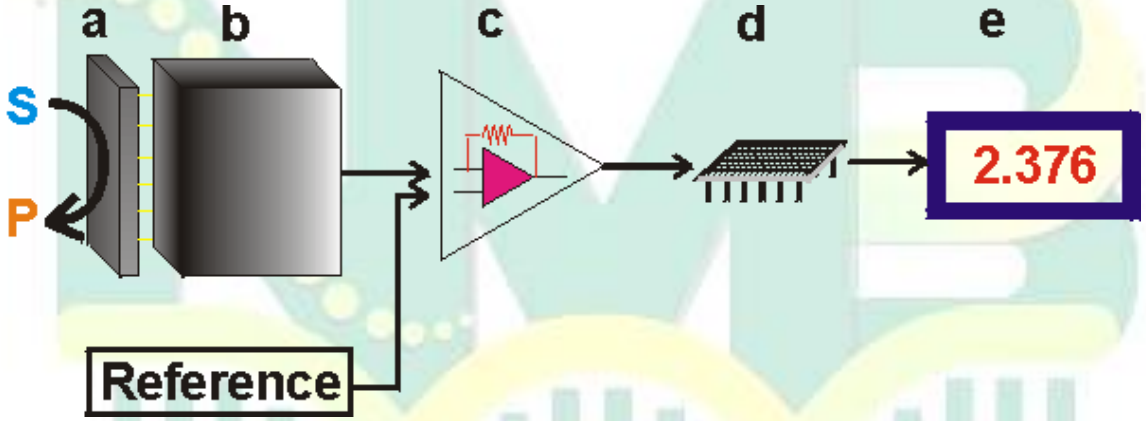
بیوسنسورها کاربرد وسیعی دارند و تحلیل‌کننده‌هایی هستند که از ترکیب و به هم‌آمیخته شدن اجزای بیولوژیکی و مبدل‌های فیزیکی و شیمیایی تشکیل می‌شوند. از اجزای بیولوژیکی شامل بافت‌ها، میکروارگانیسم‌ها، اندامک‌های سلولی، آنزیم‌ها، رسپتورهای سلولی، آنتی‌بادی‌ها، اسیدهای نوکلئیک و از مبدل‌های فیزیکی و شیمیایی نیز می‌توان به پیزوالکتریک‌ها، منگنت‌ها، میکروترانزیستورها، قطعات اپتیکی و گرماسنج‌ها اشاره کرد (شاکری‌زاده، ۱۳۸۴). از کاربردهای مهم بیوسنسور نیز می‌توان به تشخیص پزشکی (دیابت، ماده ژنتیکی، سرطان)، کشاورزی، باغبانی و دامپزشکی، کنترل پروسه تولید و کنترل تخمیر، ردیابی ویروس‌ها و باکتری‌ها، کنترل آلودگی و ردیابی آلودگی‌های محیطی، ردیابی ترکیبات ممنوعه مانند کوکائین، هروئین و اکستازی و همچنین شناسایی مناطق مین‌گذاری، گازهای سمی و صنعتی، مواد منفجره، مواد معدنی، سموم بیولوژیکی و شیمیایی اشاره نمود (حسینی و همکاران، ۱۳۸۴). اقیانوس‌ها مناطق وسیع و متنوعی برای زندگی دریایی فراهم می‌کنند. جانوران دریایی ممکن است سموم مختلفی را جهت شکار و میکروارگانیسم‌های همزیست برای اهداف خود انباشته و استفاده کنند؛ بنابراین، موجودات تولید کننده سم (ریز جلبک‌ها نظیر دینوفلاژل‌ها و دیاتوم‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و تک‌یاخته‌های موجود دریا) در اقیانوس‌ها فراوان هستند. این سموم از مولکول‌های کوچک تا پروتئین‌های با وزن مولکولی بالا؛ متفاوت هستند و ویژگی‌های شیمیایی و بیولوژیکی منحصربه‌فردی را نشان می‌دهند (Leonardo et al., 2016). انواع مختلفی از سموم دریایی وجود دارند که برخی از آن‌ها عبارت‌اند از: (ساکسی‌توکسین (STX)، اسید اوکادائیک (OA)، اسید دوموئیک (DA)، بروی‌توکسین‌ها (BTX)، سموم آزاسپیراسید (AZT)، تترودوتوکسین (TTX)، سیگواتوکسین (CTX) و پالی‌توکسین (PTX) (Wang et al., 2020). هدف این مطالعه کاربرد بیوسنسورها در شناسایی سموم دریایی است.

۲. مواد و روش‌ها

طی این مطالعه مروری با کلیدواژه‌های «بیوسنسور» و «سموم دریایی» به جستجو مطالعات در کاربرد بیوسنسورها در شناسایی سموم دریایی در پایگاه‌های معتبر علمی نظیر PubMed، Science Direct، Springer، Google Scholar و SID پرداخته شد.

2-1- بیوسنسور

امروزه استفاده از بیوسنسورها و نانوبیوسنسورها در حال افزایش پیدا کردن است. بیوسنسورها انواع مختلفی دارند که بر اساس نوع آشکارسازی به بیوسنسورهای الکتروشیمیایی، نوری، پیزوالکتریک و ... تقسیم می‌شوند. یک بیوسنسور، عبارت است از ابزار ردیابی که یک عنصر حسگر بیولوژیکی[352] را با یک القاگر[353] (مبدل) ترکیب می‌کند. حسگر بیولوژیکی از یک دریافت‌کننده زیستی و مولکول بیولوژیکی مانند بافت، میکروارگانیسم‌ها، اندامک‌ها، دریافت‌کننده‌های سلولی، آنتی‌بادی، آنزیم و نوکلئیک اسید تشکیل‌شده که مولکول هدف را بدون کاربرد معرف‌ها شناسایی می‌کند. مبدل یا القاگر قادر است که تشخیص زیستی را به یک سیگنال قابل اندازه‌گیری تبدیل کند و در نهایت از تبدیل سیگنال‌های تولید شده به پیام‌های قابل اندازه‌گیری به‌وسیله پردازشگر، پیام‌ها بر اساس برنامه‌ریزی‌های از قبل انجام شده به اطلاعات دقیقی همچون نوع سم یا میکروارگانیسم مورد سنجش، پردازش می‌گردد (Gharatappeh et al., 2008; حسینی و همکاران ۱۳۸۴) (شکل شماره ۱).



شکل-۱: نمایی از اجزای بیوسنسور (a: بیوکاتالیست؛ b: مبدل؛c: آمپلی‌فایر d: پردازنده e: نمایشگر) (Moosavy and Jalalian, 2009)

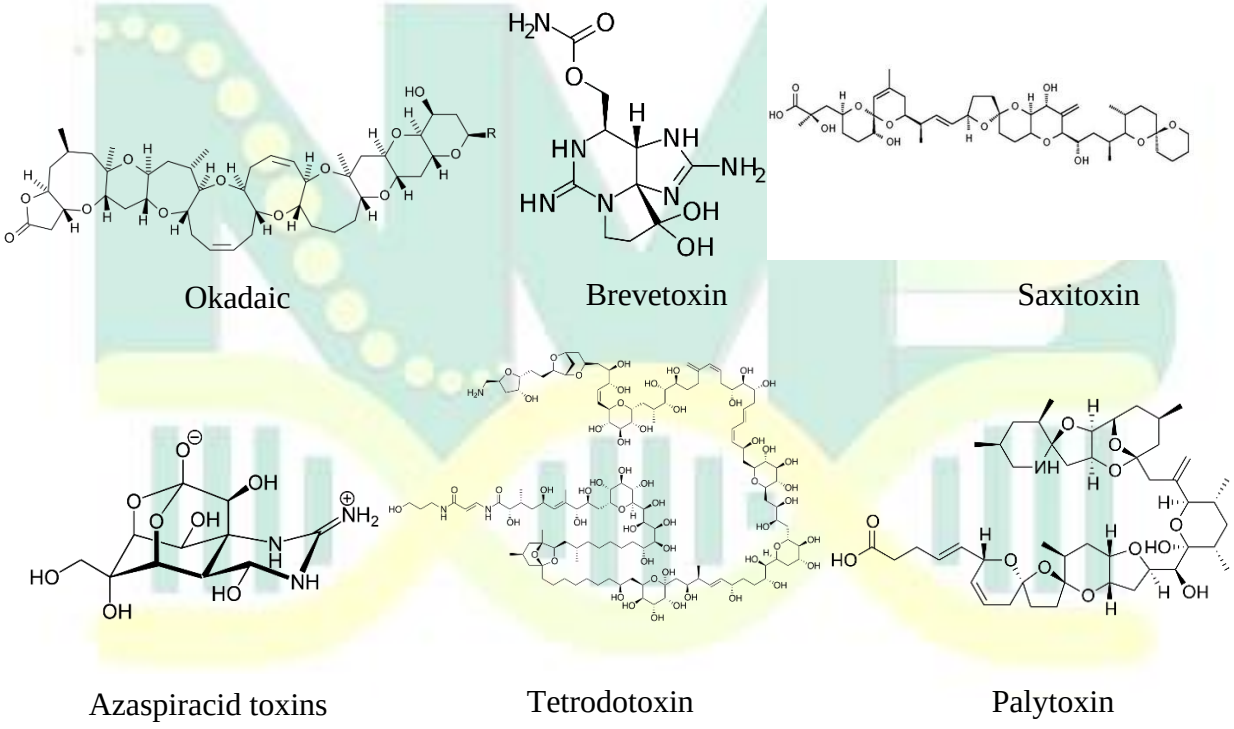
تقسیم‌بندی بیوسنسورها بر اساس گیرنده‌های زیستی (Darsanaki et al., 2013).

- بیوسنسور آنزیمی
- بیوسنسور بر اساس آنتی‌بادی
- بیوسنسور میکروبی
- بیوسنسور بر اساس هیبریدشدن اسیدنوکلئیک
- بیوسنسور بر اساس سلول و بافت
- بیوسنسور بر اساس اندامک‌ها

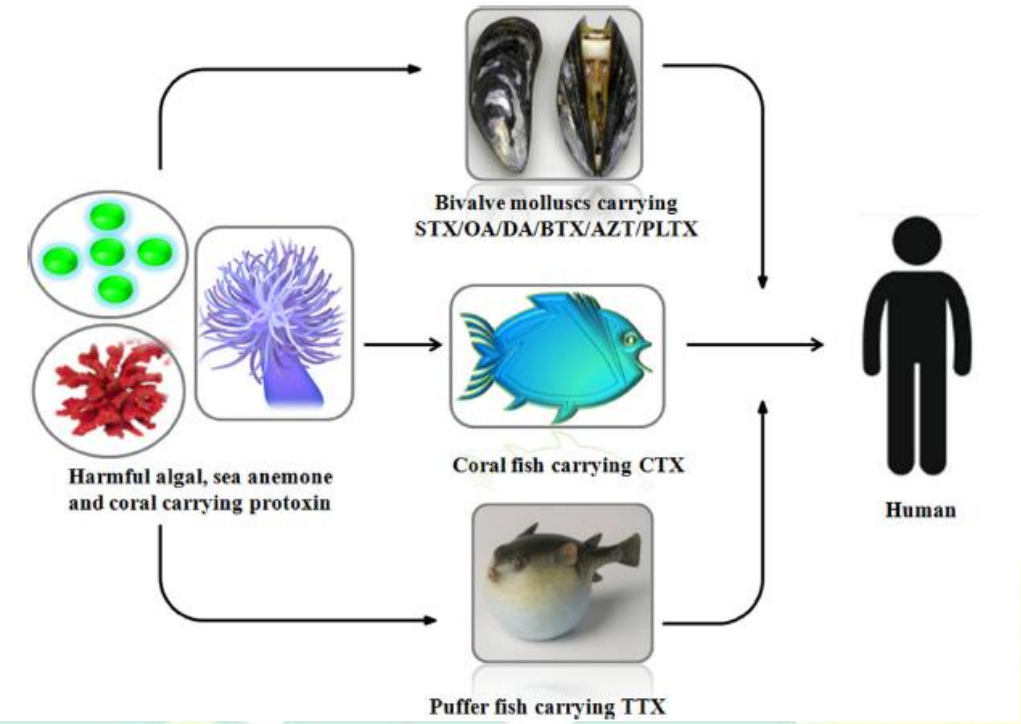
2-2- سموم دریایی

[352] Bioreceptor
[353] Transducer

اقیانوس های جهان بیش از ۷۰ درصد از سطح زمین را پوشش می‌دهند. از آنجایی که گونه‌های دریایی در مقایسه با گونه‌های خشکی نسبتاً غیر قابل دسترس هستند، این احتمال وجود دارد که در حال حاضر تنوع ارگانیسمی دریایی کمتر از واقعیت توصیف شده باشد. انواع حیوانات دریایی دارای پپتیدها و پروتئین‌هایی هستند که برای دفاع و شکار مورد استفاده قرار می‌دهند(Fusetani., 2009). بر اساس خواص شیمیایی سموم دریایی را می‌توان به دو دسته کلی تقسیم کرد: سموم آبدوست و چربی‌دوست. سموم مرتبط با سندروم‌های مسمومیت فراموشی آور (ASP) و مسمومیت فلج‌کننده (PSP) آب‌دوست هستند و وزن مولکولی کمتر از ۵۰۰ دالتون دارند. سموم مرتبط با مسمومیت عصبی (NSP)، مسمومیت اسهالی (DSP)، مسمومیت با آزاسپیراسید (AZP) و سایر سموم همگی دارای وزن بالای ۶۰۰ تا ۲۰۰۰ دالتون هستند. این سموم خاصیت چربی‌دوست قوی دارند؛ و به این سموم عموماً سموم دریایی لیپوفیل می‌گویند (Müller., 2003). سموم دریایی، متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که توسط گروهی از ریزجلبک‌ها نظیر دینوفلاژل‌ها و دیاتوم‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و تک‌یاخته‌های موجود دریا تولید شده و سبب بیماری در انسان می‌شوند (Leonardo et al., 2016). شکل شماره ۲ ساختار شیمیایی برخی از سموم دریایی و شکل شماره ۳ نحوه ورود سموم به زنجیره غذایی انسان و جدول شماره ۱ مهم‌ترین ویژگی‌های برخی از مهم‌ترین سموم دریایی را نشان می‌دهد (Campàs et al., 2007; McPartlin et al., 2016).



شکل۲: ساختار برخی از سموم دریایی (Campàs et al., 2007)



شکل3: راه‌های ورود سموم به زنجیره غذایی انسان (Wang et al., 2020)

جدول۱: ویژگی‌های برخی از سموم دریایی (McPartlin et al., 2016)

سم	ویژگی	فرمول شیمیایی	تولیدکننده	سلول هدف	علائم
Domoic acid (DA)	مسمومیت فراموشی آور با صدف(ASP)	$C_{15}H_{21}NO_6$	*Pseudo-nitzschia* spp., *Nitzschia navis-varingica, Chondria armata*	گیرنده گلوتامات	از دست دادن حافظه کوتاه‌مدت، سرگیجه، استفراغ، اسهال، مرگ
Okadaic acid (OA)	مسمومیت اسهالی با صدف (DSP)	$C_{44}H_{68}O_{13}$	*Dinophysis* spp., *Prorocentrum* spp.	پروتئین فسفاتاز	حالت تهوع، استفراغ، اسهال، گرفتگی (کرامپ) معده
Azaspiracid (AZA)	مسمومیت با آزاسپیراسید (AZP)	$C_{47}H_{71}NO_{12}$	*Azadinium spp., Amphidoma languida*	پروتئین فسفاتاز	حالت تهوع، استفراغ، اسهال، گرفتگی (کرامپ) معده
Saxitoxin (STX)	مسمومیت فلج‌کننده صدف (PSP)	$C_{10}H_{17}N_7O_4$	*Alexandrium* spp., *Gymnodinium catenatum, Pyrodinium bahamense*	کانال سدیم	علائم گوارشی، بی‌حسی در دهان و اندام‌ها، سرگیجه، سردرد، تب، آتاکسی (ناهماهنگی یا بی‌نظمی

					حرکات عضلات)، مشکل تنفسی بسیار شدید، مرگ
Brevetoxin (BTX)	مسمومیت عصبی با صدف (NSP)	$C_{49}H_{70}O_{13}$	*Karenia* spp.	کانال سدیم	علائم گوارشی، بی‌حسی، افت فشارخون، فلج، تشنج، کما
Ciguatoxin (CTX)	مسمومیت با ماهی سیگواترا (CFP)	$C_{60}H_{86}O_{19}$	*Gambierdiscus* spp.	کانال سدیم	علائم گوارشی، بی‌حسی در دهان و اندام‌ها، کوری موقت، برادی کاردی (ضربان قلب پایین)، آتاکسی، فلج
Tetrodotoxin(TTX)	نوروتوکسین	$C_{11}H_{17}N_8O_3$	*Vibrio alginolyticus*	کانال سدیم	ضعف ماهیچه‌ای، فلج کامل اسکلتی (شامل فلج تنفسی)، درد قفسه سینه، سردرد، علائم گوارشی شامل تهوع، استفراغ، اسهال و کاهش دمای بدن

تاثیر سموم دریایی بر روی انسان پس از مصرف غذاهای دریایی، تماس با پوست و استنشاق سم آئروسل شده رخ می‌دهد. فیکوتوکسین‌ها بیشترین دلیل مسمومیت غذایی را دارند. تماس پوستی زمانی اتفاق می‌افتد که قربانی موجود حاوی سم را لمس کند. سموم دریایی ممکن است به صورت آئروسل شده نیز سبب بیماری شوند مطالعاتی نشان داده‌اند بروی‌توکسین طی شکوفایی جلبکی زیاد در خلیج مکزیک به صورت آئروسل در دسترس بود (Bano et al., 2020).

با در نظر گرفتن خطرات ناشی از سموم دریایی برای سلامتی، اتحادیه اروپا[۳۵۴] محدودیت‌های برای هر سم در نظر گرفته است. سازمان ایمنی غذای اروپا[۳۵۵] نیز جهت حفظ سلامت محدودیت‌هایی سخت‌گیرانه‌تری را برای تغییر رنج اتحادیه اروپا ارائه نموده است (جدول ۲). (McPartlin et al., 2016)

جدول2: محدودیت‌های مصرف سموم دریایی (McPartlin et al., 2016)

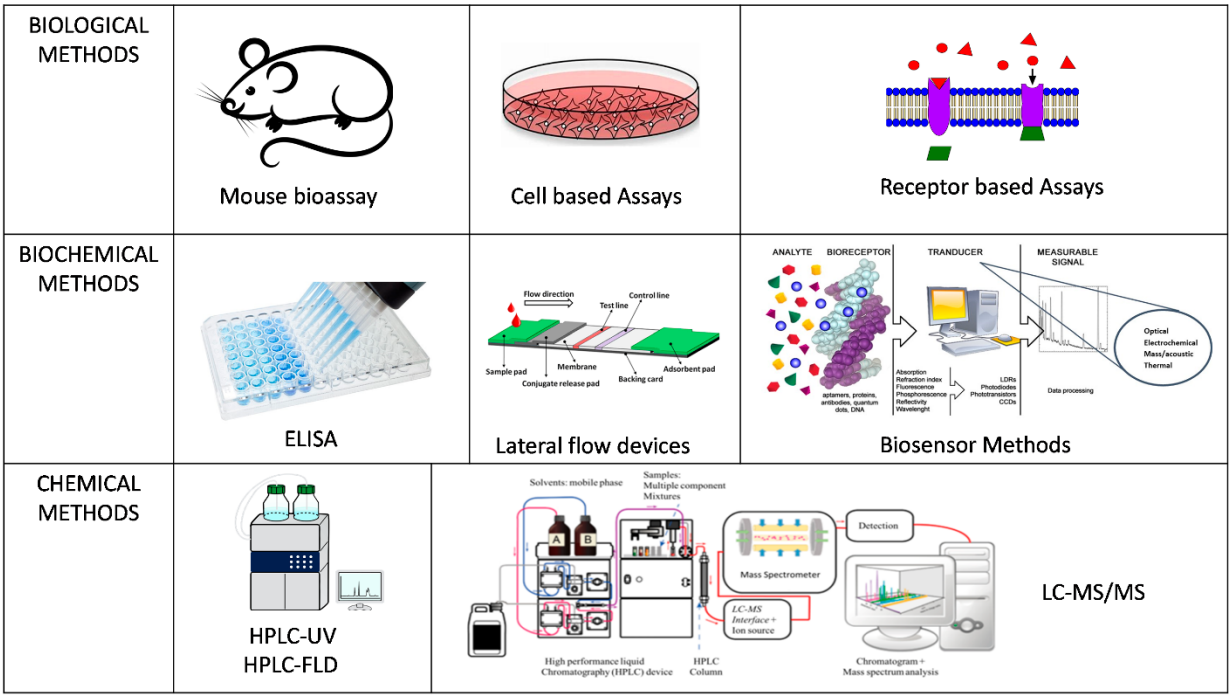
سم	محدودیت اتحادیه اروپا μg of toxin eq./kg of shellfish/fish	محدودیت سازمان ایمنی غذای اروپا *μg of toxin eq./kg of shellfish/fish*

[354] EuropeanUnion
[355] European Food SafetyAuthority

Domoic acid	۲۰۰۰۰	۴۵۰۰
Okadaic acid	۱۶۰	۴۵
Azaspiracid	۱۶۰	۳۰
Saxitoxin	۸۰۰	۷۵
Brevetoxin	Not regulated	-
Ciguatoxin	محصولات شیلاتی حاوی سیگواتوکسین نباید در بازار عرضه شوند	۰.۰۱
Tetrodotoxin	محصولات تترودوتوکسین حاوی سیگواتوکسین نباید در بازار عرضه شوند	-

3-2- بیوسنسورها و ردیابی سموم دریایی

اطلاعات کمی راجع سموم در حال ظهور دریایی موجود است؛ پیچیدگی ساختاری و کمبود استانداردها و ابهام در روش‌های تشخیص ازجمله مشکلات موجود است. روش‌های مختلفی برای تجزیه و تحلیل سموم دریایی وجود دارد که می‌توان آنها را به روش‌های مبتنی بر بیولوژیکی، بیوشیمیایی و شیمیایی طبقه‌بندی کرد (شکل شماره ۴). اگرچه همه آنها به عنوان روش‌های کنترل رسمی برای اهداف نظارتی پذیرفته نمی‌شوند و برخی به عنوان اثبات مفهوم برای کاربردهای فناوری جدید تأیید می‌شوند(Dillon et al., 2021).



شکل ۳: روش های مختلف شناسایی سموم دریایی (Dillon et al., 2021)

بیوسنسورهایی شامل ایمونوسنسور، آپتاسنسور بر پایه نانو ذرات و بیوسنسورهای بر پایه سلول از جمله بیوسنسورهای بررسی شده جهت ردیابی برخی سموم دریایی هستند (Leonardo et al., 2016). برخی از بیوسنسورها و سنسورها و عملکرد آن‌ها در جدول شماره ۳ نشان داده شده است.

جدول-۳: معرفی برخی از بیوسنسورها و سنسورها برای تشخیص سموم دریایی

بیوسنسور	عملکرد	منبع
مبتنی بر کانال سدیم	استفاده از الکترود Na^+ در غشای مثانه قورباغه به‌عنوان بافت برای شناسایی سموم بلوکه کننده کانال سدیم مثل TTX، STX و ...	Cheun et al.,1998 Yoo et al., 2004
ایمونو بیوسنسور	بر اساس ایمونواسی (آنتی‌بادی و گاهی آنتی‌ژن) و رایج‌ترین نوع بیوسنسور مثل توسعه پیزوالکتریک ایمونوبیوسنور برای تشخیص سم OA توسعه بیوسنسور نوری برای تشخیص سم DA توسعه بیوسنسور ایمونوالکتروشیمیایی برای تشخیص STX با استفاده از آنتی‌بادی‌های نشان‌دار شده با گلوکز اکسیداز	Tang et al.2002 Yu et al., 2005 Carter et al.1993
مبتنی بر مهار آنزیم	بیوسنسور مبتنی بر مهار آنزیم‌هایی مانند گلوکز اکسیداز، اوره آز، تیروزیناز، کولین استراز و... هستند. توسعه بیوسنسور الکتروشیمیایی بر اساس مهار PP2A برای شناسایی OA	Campàs et al., 2007
بر پایه پلیمرهای قالب مولکولی (MIP)	این نوع حسگر هیچ مولکول بیولوژیکی استفاده نمی‌کنند و سم هدف را با یک مونومر و یک اتصال دهنده متقابل مخلوط می‌کنند و در شرایط مناسب اجازه می‌دهند تا پلیمریزه شود. سپس، الگو برداشته می‌شود تغییرات پردازش و تبدیل به سیگنال می‌شود. توسعه سنسور بر پایه پلیمرهای قالب مولکولی برای تشخیص سم DA	Lotierzo et al., 2004

3. نتیجه‌گیری

نگرانی‌های روزافزون و جدی در مورد ایمنی غذاهای دریایی و حفاظت از سلامت انسان، ضرورت روش‌های تحلیلی سریع‌تر، قوی‌تر، خاص‌تر و حساس‌تر را برای تشخیص سموم دریایی آشکار کرده است. بیوسنسورها باید بتواند با ساختارهای پیچیده و گاهی اوقات مخلوط سموم را شناسایی کنند. بیوسنسورها ممکن است تمام محدودیت‌های روش‌های کنونی را برطرف نکنند، اما با دارا بودن مزایای بیشتری مثل حساسیت‌های بالا، تشخیص مقادیر کم، قابلیت حمل، سادگی استفاده و ... ابراز مفیدی برای شناسایی سموم دریایی باشند.

منابع

۵. حسینی ع، جرجندی م، شهیدی بنجار غ، عقیقی س.۱۳۸۴. بیوسنسورها، ابزاری قدرتمند در ردیابی مولکول‌های زیستی؛ چهارمین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران. کرمان، ص.۳-۱

۶. شاکری زاده ع. ۱۳۸۴. بیوسنسورها و کاربردهای آن در پزشکی. نوید نو،۲۹، ص. ۵۱-۴۵

7. Bano, K., Khan, W. S., Cao, C., Khan, R. F., & Webster, T. J. 2020. Biosensors for detection of marine toxins. Nanobiosensors: From Design to Applications, 329-356.

8. Dillon, M., Zaczek-Moczydlowska, M. A., Edwards, C., Turner, A. D., Miller, P. I., Moore, H., ... & Campbell, K. 2021. Current Trends and Challenges for Rapid SMART Diagnostics at Point-of-Site Testing for Marine Toxins. Sensors, 21(7), 2499.

9. Leonardo S., Reverté L., Diogène J., Campàs, M. 2016. Biosensors for the Detection of Emerging Marine Toxins. In Biosensors for Security and Bioterrorism Applications (pp. 231-248). Springer International Publishing.

10. Wang Q., Yang Q., Wu W. 2020. Ensuring seafood safe to spoon: a brief review of biosensors for marine biotoxin monitoring. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1-13.

11. Gharatappeh A.R. Memariyani M. Lellahi M. Tajvidi M.B. Doragi E .2008. Early detection of bioterrorism agents by Nanosensors. Journal of IRIAF Health Administration.11 (1): 34-40.

12. Darsanaki RK., Azizzadeh A., Nourbakhsh M., Raeisi G., Azizollahi Aliabadi M., 2013. Biosensors: Functions and Applications. Journal of Biology and today's world., 2; 1: 53-61.

13. Müller WE., Müller I.M. 2003. Marine molecular biotechnology.

14. McPartlin DA., Lochhead MJ., Connell L.B., Doucette, GJ., O'Kennedy RJ. 2016. Use of biosensors for the detection of marine toxins. Essays in biochemistry, 60(1), 49-58.

15. Campàs M., Prieto-Simón B., & Marty J.L. 2007 .Biosensors to detect marine toxins: Assessing seafood safety. Talanta, 72(3), 884-895.

16. Campàs M., Marty J L. 2007. Enzyme sensor for the electrochemical detection of the marine toxin okadaic acid. Analytica chimica acta, 605(1), 87-93.

17. Cheun BS., Loughran M., Hayashi T., Nagashima Y., Watanabe E. 1998. Use of a channel biosensor for the assay of paralytic shellfish toxins. Toxicon, 36(10), 1371-1381.

18. Yoo JS., Cheun B.S., Park I.S., Song Y C., Seo Y., Kim NG., Lee, J.H. 2004. Use of sodium transfer tissue biosensor (STTB) for monitoring of marine toxic organism. Journal of environmental biology, 25(4), 431-436.

19. Tang, A. X., Pravda, M., Guilbault, G. G., Piletsky, S., & Turner, A. P.2002. Immunosensor for okadaic acid using quartz crystal microbalance. Analytica Chimica Acta, 471(1), 33-40.

20. Yu Q., Chen S., Taylor A.D., Homola J., Hock B., Jiang, S. 2005. Detection of low-molecular-weight domoic acid using surface plasmon resonance sensor. Sensors and Actuators B: Chemical, 107(1), 193-201.

21. Carter RM., Poli MA., Pesavento M., Sibley DE., Lubrano GJ., Guilbault GG.1993. Immunoelectrochemical biosensors for detection of saxitoxin and brevetoxin. Immunomethods, 3(2), 128-133.

22. Lotierzo M., Henry O.Y.F., Piletsky S., Tothill I., Cullen D., Kania M., Turner A.P. 2004. Surface plasmon resonance sensor for domoic acid based on grafted imprinted polymer. Biosensors and Bioelectronics, 20(2), 145-152.
23. Moosavy M., Jalilvand A. 2009. Microbial biosensors and their applications for environment. The 6th National Biotechnology Congress of Iran13-15 Aug, 2009, Milad Tower Conference Hall, Tehran-Iran
24. Fusetani, N., & Kem, W. (Eds.). 2009. *Marine toxins as research tools* (Vol. 46). Springer Science & Business Media.

A review of the concentration of heavy metals in the fish tissue of the northern coasts of Iran

Reza Kazemi Darsanaki[1]; Seyedeh Ainaz Shirangi[*2]

1- M.Sc. Student in Marine Biology, Department of Biology, Faculty of Basic Science and Engineering, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran
2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Science and Engineering, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran

* *a.shirangi@gonbad.ac.ir*

Abstract
Population growth, development of various industries and increasing expansion of agricultural fields have caused the entry of a large volume of various pollutants into the aquatic environment. Heavy metals are one of the major environmental pollutants. Considering their toxicity, long-term stability, bioaccumulatability and biodegradability, these metals are the main group of aquatic pollutants in the food chain. Given the accumulatability of heavy metals in the body of fish and their key role in human nutrition, many studies have been conducted on the determination of the concentration of heavy metals in fish in Iranian waters; the aim of this study is to review the studies on the concentration of heavy metals in the fish tissue of the northern coasts of Iran.

Keywords: Heavy metals, Muscle, Fish, Caspian Sea

مروری بر غلظت فلزات سنگین در بافت ماهیان سواحل شمال کشور

رضا کاظمی درسنکی[۱]؛ سیده آیناز شیرنگی[۲*]

۱-دانشجوی کارشناسی‌ارشد زیست دریا، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی‌مهندسی، دانشگاه گنبدکاووس

۲-استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی‌مهندسی، دانشگاه گنبدکاووس

* a.shirangi@gonbad.ac.ir

چکیده

افزایش جمعیت، توسعه صنایع مختلف و گسترش روزافزون مزارع کشاورزی سبب ورود حجم بالایی از آلاینده‌های مختلف به محیط‌های آبی شده است. یکی از عمده‌ترین آلاینده‌های محیط‌زیست فلزات سنگین هستند. این فلزات با توجه به سمیت، پایداری طولانی، قابلیت انباشت زیستی و تجزیه‌ناپذیری، گروه اصلی آلاینده‌های آبزیان در زنجیره مواد غذایی را تشکیل می‌دهند. با توجه به قابلیت تجمع فلزات سنگین در بدن ماهی‌ها و نقش مهمی که آن‌ها در تغذیه انسان دارند، مطالعات زیادی جهت تعیین غلظت انواع فلزات سنگین در ماهی‌های آب‌های ایران انجام شده است؛ هدف این مقاله، مروری بر مطالعات انجام شده در خصوص غلظت فلزات سنگین در بافت ماهیان سواحل شمال کشور است.

واژگان کلیدی: فلزات سنگین، عضله، ماهی، دریای خزر

۱. مقدمه

دریای خزر بزرگ‌ترین دریاچه دنیا و یکی از مهم‌ترین اکوسیستم‌های آبی محسوب می‌شود که متأسفانه آلودگی‌های صنعتی، کشاورزی و فاضلاب‌های مختلف، استخراج نفت و گاز در سواحل و در اعماق و همچنین حمل‌ونقل دریایی و بندرها سبب تغییر شرایط اکولوژیک این دریا شده است (Norouzi et al., 2019). با توجه به نزدیکی شهرهای ساحلی، جریانات رودخانه‌ای که حاوی پساب، مواد معلق و رسوبات بوده، بسیاری از مواد آلاینده از جمله سموم، کودهای شیمیایی باقیمانده در خاک و مواد حاصل از شستشوی زه آب‌های صنایع کوچک و بزرگ شهرها به دریا تخلیه می‌شوند (Sattari et al., 2014). فلزات سنگین معمولاً در مقابل تصفیه شیمیایی مقاوم هستند. این‌گونه فلزات به‌راحتی می‌توانند سبب آلودگی زیست‌محیطی آبزیان به‌خصوص ماهی‌ها شوند که یکی از مهم‌ترین غذاهای انسان محسوب می‌شوند (Najm et al., 2014). ماهی به عنوان منبع غنی پروتئین، سطوح بالای امگا ۳، اسیدهای چرب، مواد معدنی ضروری و ویتامین‌ها برای انسان شناخته شده است. علاوه بر این، مصرف ماهی باعث کاهش بیماری‌های مختلف از جمله اختلالات روانی، بیماری‌های قلبی عروقی، آرتریت روماتوئید و همچنین برخی از انواع سرطان شده و به رشد طبیعی نورون‌ها در کودکان کمک می‌کند. تجمع زیستی فلزات سنگین در ماهی به عوامل محیطی مختلف مانند pH، دما، شوری، سختی آب، محل نمونه‌برداری، فصل، غلظت و نوع آلاینده و ویژگی‌های اکولوژیکی و فیزیولوژیکی مثل جنس، سن، اندازه، ترجیح زیستگاه، عادت تغذیه، سطح تغذیه‌ای، دوره قرار گرفتن در معرض فلز و ... بستگی دارد (Sheikhzadeh et al.,2021). فلزات سنگین می‌توانند در بافت‌های ماهی مثل آبشش، عضله و ... به میزان متفاوت تجمع یابند که به‌اندازه و سن ماهی وابسته است؛ بنابراین ماهی شاخص زیستی مناسبی برای تعیین غلظت فلزات سنگین در اکوسیستم‌های آبی است (Velayatzadeh et al., 2014). مطالعات زیادی در خصوص سنجش میزان غلظت انواع فلزات سنگین در ماهی‌های آب‌های ایران انجام شده است. هدف این مطالعه، مروری بر تحقیقات انجام شده در راستای تعیین غلظت فلزات سنگین در بافت ماهیان سواحل شمال کشور در دو دهه اخیر است.

۲. مواد و روش‌ها

طی این مطالعه مروری با کلیدواژه‌های «فلزات سنگین» و «دریای خزر» به جستجو مطالعات در خصوص غلظت فلزات سنگین در بافت ماهیان دریای خزر در پایگاه‌های معتبر علمی نظیر Science Direct، Springer، Google Scholar و SID پرداخته شد.

2-1- فلزات سنگین و ماهی

فلز سنگین در واژه‌نامه‌های تخصصی به فلزاتی با جرم مخصوص بیش‌تر از ۵ گرم بر سانتی‌متر مکعب اطلاق می‌شود (اعظمی و همکاران، ۱۳۹۶). این فلزات (آلومینیوم، آرسنیک، بریلیوم، بیسموت، کادمیوم، کروم، کبالت، مس، آهن، سرب، منگنز، جیوه، نیکل، سلنیوم، تالیم، قلع، تیتانیوم و روی) با توجه به سمیت، قابلیت انباشت زیستی و تجزیه‌ناپذیری، گروه اصلی آلاینده‌های آبزیان در زنجیره غذایی را تشکیل می‌دهند. فلزات سنگین به‌روش‌های مختلف نظیر استخراج، فرآیند ذوب، احتراق مواد سوختی و صنعتی شدن و از مسیرهای گوناگون مانند نزولات جوی، تخلیه مواد زائد، نشت اتفاقی، تخلیه آب توازن کشتی، تخلیه فاضلاب‌های صنعتی، کشاورزی، خانگی و فرسایش خاک به محیط‌های آبی منتقل می‌شوند (لک‌زایی و همکاران، ۱۳۹۴). آلودگی آب با ترکیبات یا عناصر فلزی سنگین، منجر به مسمومیت خونی ماهیان و به دنبال آن، تلفات مستقیم و یا مسمومیت مزمن و حتی تغییراتی در فیزیولوژی ماهیان می‌شود که نتیجه آن عدم توانایی برای ادامه حیات خواهد بود. بیشتر ترکیبات فلزی یا یون‌های آن‌ها در بافت‌های بدن، به‌ویژه کبد، آبشش، قلب، طحال و استخوان انباشت می‌گردند (پورغلام و همکاران، ۱۳۹۱). ازآنجاکه ماهی‌ها بخش عمده‌ای از رژیم غذایی انسان را تشکیل می‌دهند، این فلزات سنگین می‌توانند از طریق تغذیه از ماهیان آلوده وارد بدن انسان شوند. (Norouzi et al., 2016). فلزات از طریق آب و رسوبات و همچنین از طریق غذای ماهی جذب بدن ماهی می‌شوند (Han et al., 2021). فلزات سنگین انباشته شده در ماهی و سایر موجودات آبزی به دو صورت تجمع مستقیم و غیرمستقیم است. مصرف آب و غذای آلوده از طریق دستگاه گوارش به‌عنوان قرار گرفتن در معرض مستقیم و از طریق غشاهای نفوذپذیر مانند پوست و آبشش از نوع غیرمستقیم در نظر گرفته می‌شود. سطح غلظت فلزات سنگین در ماهی و سایر موجودات آبی نشان دهنده غلظت فلزات در محیط اطراف نیز می‌باشد. تجمع فلزات سنگین در اندام‌های موجودات آبزی گاهی می تواند از سطوح محیطی فراتر رود. اثر سمی معمولاً زمانی رخ می‌دهد که میزان جذب از مکانیسم متابولیسم، ذخیره‌سازی و سم‌زدایی فراتر رود. منابع برخی از فلزات سنگین در محیط‌های آبی در جدول شماره ۱ آمده است (Yousif et al., 2021).

جدول 1: منابع برخی از فلزات سنگین در محیط‌های آبی

فلز سنگین	منبع
روی	صنعت آبکاری، ذوب و پالایش، معادن، ماده آلی جامد
آهن	آلیاژهای آهن در ظروف، خودروها، ماشین‌های لباس‌شویی، پل‌ها، ساختمان‌ها و همچنین سایر منابع آهن مانند داروها، مواد شیمیایی، کودهای آهن و آفت‌کش‌ها
مس	صنعت آبکاری، ذوب و پالایشگاه، معادن، ماده آلی جامد
سرب	استخراج و ذوب سنگ معدن فلزی، بنزین سرب‌دار، فاضلاب شهری، ضایعات صنعتی غنی‌شده با سرب، رنگ‌ها
کادمیوم	منابع زمین زاد، فعالیت‌های انسانی، ذوب و پالایش فلزات، سوزاندن سوخت‌های فسیلی، کاربرد کودهای فسفاته، لجن فاضلاب
جیوه	فوران‌های آتشفشان، آتش‌سوزی جنگل، انتشار گازهای گلخانه‌ای، زغال‌سنگ و سوزاندن چوب
آرسنیک	نیمه‌هادی‌ها، معدن و ذوب، نیروگاه‌های زغال‌سنگ، علف‌کش‌ها، آتشفشان ها، پالایش نفت، افزودنی‌های خوراک دام
کروم	صنعت آبکاری، لجن، ضایعات جامد
منگنز	تخلیه فاضلاب شهری، لجن فاضلاب، استخراج معادن و فرآوری مواد معدنی، احتراق سوخت‌های فسیلی
نیکل	فوران‌های آتشفشانی، دفن زباله، آتش‌سوزی جنگل، هوازدگی خاک ، پساب‌های صنعتی، لوازم آشپزخانه، ابزار جراحی، آلیاژهای فولادی، باتری‌های خودرو

به‌طورکلی، فلزات را می‌توان به دو دسته ضروری و غیرضروری نیز دسته‌بندی کرد. فلزات غیرضروری (به‌عنوان‌مثال سرب، جیوه، کادمیوم، آلومینیوم و قلع) عملکرد بیولوژیکی ندارند و به‌عنوان عناصر xenobiotics یا عناصر خارجی نیز نامیده می‌شود و اثرات و سمیت آن‌ها با افزایش سطح و غلظت این فلزات افزایش می‌یابد، از سوی دیگر فلزات ضروری (مانند روی ، آهن، مس، کبالت، نیکل، کروم و مولیبدن) نقش بیولوژیکی خود را دارند و اثرات و سمیت آن‌ها یا در کمبودهای متابولیکی یا در سطوح و غلظت‌های بالای این فلزات رخ می‌دهد (Yousif et al., 2021).

2-2- میزان آلودگی فلزات سنگین در بافت ماهیان دریای خزر

دریای خزر دارای مناطق مصبی، تالابی و سواحل مختلف است که در نزدیکی هر یک از این مناطق منابع آلوده‌کننده متفاوتی وجود دارد (Norouzi et al., 2016). آلودگی اکوسیستم‌های دریایی درحال تشدید شدن است و ماهی‌ها به‌طور مداوم در معرض فلزات سنگین موجود در آب‌های آلوده قرار دارند. مطالعات روی فلزات سنگین ازنقطه‌نظر سلامتی و بهداشت و تعیین محدوده مجاز غلظت این عناصر برای انسان بسیار حائز اهمیت است (میلانی و همکاران ۱۴۰۰). به‌طور معمول بعضی از عناصر، گرچه به میزان بسیار کم، برای انجام فعالیت‌های طبیعی فیزیولوژیک بدن انسان و پستانداران و نیز آبزیان ضروری هستند، اما زمانی که غلظت فلزات سنگین در محیط از حد مجاز فراتر رود و یا به‌طور مستمر وارد محیط‌زیست آبزیان شوند، ماهی‌ها با ذخیره‌سازی این فلزات در اندام‌هایی مانند ماهیچه، کبد، کلیه و... دچار نوعی مسمومیت مزمن و شدید می‌شوند. انسان نیز به دلیل مصرف یک‌باره و زیاد فلزات سنگین تجمع یافته در ماهیچه‌های ماهی، ممکن است به‌صورت حاد دچار مسمومیت شود (ستوده اصل و همکاران ۱۳۹۳). این فلزات با ترکیبات ضروری بدن مانند اکسیژن، گوگرد و نیتروژن تشکیل گروه‌هایی مانند OH، SH، S-S، COOH، COO را می‌دهند. با توجه به این واقعیت که بسیاری از ترکیبات ضروری بدن مانند آنزیم‌ها و پروتئین‌ها شامل چنین گروه‌هایی هستند، فلزات سنگین می‌توانند باعث تأخیر فعالیت‌های آنزیم‌ها و اختلالات در ترکیب ترکیبات ضروری بدن شوند. هنگامی‌که فلزات سنگین وارد بدن می‌شوند، دفع نشده و در بدن تجمع پیدا می‌کنند و باعث مشکلات سلامتی می‌شوند (میلانی و همکاران ۱۴۰۰)

جدول شماره ۲ بررسی‌های انجام‌شده درخصوص وضعیت آلودگی فلزات سنگین در بافت ماهیان سواحل شمال کشور را در دو دهه اخیر را نشان می‌دهد. در بیشتر این مطالعات آلودگی مشاهده شده نگران‌کننده گزارش شد. این آلودگی‌ها می‌تواند به علت وضعیت زمین‌شناسی و ژئومورفولوژیک و در پی آن فرسایش و انحلال بیش‌تر این عناصر، ترکیبات نفتی، تردد، نشت و تخلیه آب توازن نفتکش ها، فاضلاب‌های صنعتی و شهری، کودهای شیمیایی، سموم کشاورزی، قارچ‌کش‌ها، علف‌کش‌ها، صنایع آبکاری و تجهیزات الکترونیکی، روغن‌های مستعمل، سوخت شناورها و ...باشد (الصاق ا، ۱۳۸۹). فلزات سنگین اندام هدف خود را بر اساس میزان فعالیت متابولیک آن انتخاب می‌کنند. این نکته علت تجمع بیش‌تر فلزات در بافته‌ای نظیر کبد و آبشش ها را در مقایسه با بافت ماهیچه (با فعالیت متابولیک پایین) تفسیر می‌نماید (لک‌زایی و همکاران ۱۳۹۴).

جدول -۲: میزان آلودگی فلزات سنگین در بافت ماهیان سواحل شمال کشور

سال مطالعه	محل نمونه‌برداری	تعداد و نوع ماهی	روش بررسی	بافت	فلزات سنگین	بیشترین فلز سنگین	نتیجه نهایی	منبع
۸۱	فریدون‌کنار	۳۲ ماهی کفال طلایی	جذب اتمی شعله‌ای	عضله	روی مس نیکل سرب کادمیوم	روی	غلظت سرب و کادمیوم بالاتر از استاندارد جهانی مشاهده شد.	امینی رنجبر و ستوده نیا، ۱۳۸۹
۸۵	۴ ایستگاه در کل دریای خزر	۴۰ ماهی خاویاری	جذب اتمی شعله‌ای	عضله و کبد	مس روی جیوه	روی	کبد تجمع بیشتری از فلزات نسبت به عضله را نشان داد	حیدری و همکاران، ۱۳۹۰

۸۶	جنوب شرقی دریای خزر	۳۰ ماهی کپور	جذب اتمی شعله‌ای	عضله و پوست	سرب روی مس	روی	تجمع فلز سنگین روی در پوست بیشتر از تجمع در عضله بود. مقادیر به دست آمده پایین‌تر از حد استاندارد جهانی بود.	پازوکی و همکاران، ۱۳۹۰
۸۷	ساری	۴۰ ماهی سفید/۲۲ ماهی کفال پوزه‌باریک	جذب اتمی	عضله	روی مس نیکل سرب کادمیوم جیوه	روی	غلظت این فلزات در عضله دو گونه ماهی سفید و کفال کمتر از حد استانداردهای جهانی برآورد شد. .	پورغلام و همکاران، ۱۳۹۱
۸۸	بابلسر تا نوشهر	۲۴ ماهی سفید/۲۴ ماهی کپور	جذب اتمی	عضله	کادمیوم سرب ارسنیک جیوه	سرب	غلظت سرب و کادمیوم بالاتر از استاندارد جهانی مشاهده شد.	الصاق ا، ۱۳۸۹
۸۹	کیاشهر و تالش	۲۸ ماهی کفال طلایی	جذب اتمی شعله‌ای	کبد و عضله	سرب کادمیم روی مس	روی	غلظت سرب و کادمیم در ماهیان منطقه کیاشهر بیشتر از منطقه تالش بوده و غلظت روی و مس در ماهیان منطقه تالش بیشتر بود. تجمع فلزات سنگین در هر دو منطقه در بافت کبد نسبت به بافت عضله دارای مقادیر بیشتری بود	لک‌زایی و همکاران، ۱۳۹۴
۸۹	ساری	۲۸ ماهی کپور	جذب اتمی شعله‌ای	عضله	روی مس نیکل سرب کادمیم جیوه	روی	غلظت جیوه بیش‌تر از حد مجاز جهانی بود.	ساروی و همکاران، ۱۳۹۲
۹۰	آبگیر گمیشان	۶ ماهی کفال پوزه‌باریک	جذب اتمی کوره گرافیکی	عضله	آرسنیک سرب کادمیوم نیکل	سرب	غلظت سرب و بالاتر از استاندارد جهانی مشاهده شد.	کلانی ن، ۱۳۹۳

۹۱	آستارا تا تنکابن	۳۰ ماهی سفید	طیف‌سنجی نشری پلاسمای جفت شده القایی	عضله	کادمیوم سرب کروم نیکل	کروم	مقادیر به دست آمده پایین‌تر از حد مجاز تعیین‌شده جهانی بود	نقیبی پور و همکاران، ۱۳۹۴
۹۲	دهانه تالاب انزلی	۱۰ ماهی سیاه کولی	جذب اتمی به روش بخارات سرد اتمی	عضله	آلومینیوم نیکل سرب جیوه کروم	آلومینیوم	میزان آلومینیوم و نیکل بیشتر از استاندارد سازمان بهداشت جهانی بود.	ستوده اصل و همکاران، ۱۳۹۳
۹۲	۱۰ ایستگاه کل دریای خزر	۱۰۰ ماهی کفال	جذب اتمی شعله‌ای	عضله، کبد و آبشش	کادمیوم جیوه آرسنیک سرب کروم	سرب	کبد، آبشش و عضله به ترتیب بیشترین تجمع فلزات سنگین را به خود اختصاص دادند و غلظت هر ۵ فلز بیشتر از استاندارد جهانی برای بافت عضله بود.	نوروزی و همکاران، ۱۳۹۴
۹۳	بابلسر	۲۰ ماهی سفید و کفال طایی	جذب اتمی	آبشش و کبد	کادمیوم روی سرب	روی	بافت کبد کفال پتانسیل بالایی برای تجمع فلزات سنگین نسبت به کبد ماهی سفید داشت و به‌طورکلی کبد نسبت به آبشش دارای تجمع بیشتر فلزات سنگین بود.	کاردل و همکاران، ۱۳۹۴
۹۳	۶ ایستگاه از بندر ترکمن تا بندر انزلی	۴۲ ماهی سفید	طیف‌سنجی اتمی پلاسما	عضله و آبشش	سرب کادمیوم جیوه آرسنیک کروم آهن روی مس	آهن	تجمع فلزات در آبشش بیشتر از عضله بود و به طور کلی تجمع فلزات سنگین در ماهی سفید در حد پایین تر استاندارد جهانی بود.	موسوی مقدم و همکاران، ۱۳۹۷
۹۳	بابلسر	۲۲ ماهی زالون	جذب اتمی شعله‌ای	عضله،پوست، آبشش وگناد	آهن روی مس کادمیوم	روی	میزان کادمیوم در همه بافت‌ها و روی در پوست و گناد بالاتر از استاندارد جهانی بود.	فلاحی نژاد و همکاران، ۱۳۹۷
۹۳	محمودآباد	۳ ماهی سفید، ۳ ماهی کفال پوزه	جذب اتمی	عضله	آرسنیک سرب	آهن در ماهی	میزان فلزات سنگین در نمونه‌های مورد بررسی	صالحی بوریان و

		باریک و ۳ ماهی کیلکا			کادمیوم جیوه آهن ومس	سفید/ سرب در ماهی کفال	پایین‌تر و یا نزدیک به استانداردهای جهانی بود.	همکاران، ۱۳۹۳
۹۴	۱۰ ایستگاه کل دریای خزر	۶۰ ماهی کفال طلایی	جذب اتمی شعله‌ای	آبشش	سرب کادمیوم	سرب	آلودگی مناطق شرقی دریای خزر (بندر ترکمن و خواجه نفس) بسیار بالاتر از استانداردهای بین‌المللی بود.	باقری و نوروزی ۱۳۹۵
۹۴	۱۰ مصب رودخانه‌های استان مازندران و گیلان (آستارا تا ساری)	۶۰ نمونه اردک‌ماهی	جذب اتمی و سیستم کوره گرافیتی	کبد و عضله	کادمیوم نیکل روی	روی	میزان نیکل، کادمیوم و روی در کبد اردک‌ماهی در تمامی ایستگاه‌های موردمطالعه بالاتر از عضله بود. میزان نیکل در عضله اردک‌ماهیان مصب رودخانه سفیدرود و پلرود بالاتر از حد مجاز استاندارد جهانی بود.	محمد صالحی و ولایت زاده،۱۳۹۷
۹۴	نوشهر	۳۹ ماهی کپور و ۴۲ ماهی کفال طلایی	جذب اتمی	کبد، آبشش، کلیه و عضله	کادمیوم جیوه آرسنیک سرب کروم روی مس کبالت منگنز	روی	کبد، آبشش، کلیه و عضله به ترتیب دارای بیشترین تجمع فلزات سنگین بودند و میزان تجمع فلزات در عضله که مصرف غذایی انسان است بالاتر از استاندارد نبود.	سلگی و همکاران، ۱۳۹۷
۹۶	محمودآباد	۱۰ نمونه از هر ماهی سوف کفال خاکستری/کپور/سفید	جذب اتمی شعله‌ای	عضله	جیوه روی	جیوه	بیشترین مقدار جیوه و روی در ماهی سوف مشاهده شد و استفاده از این ماهی برای انسان دارای محدودیت گزارش شد.	موافق و همکاران، ۱۳۹۹
۹۷	بندر انزلی	۱۱عدد ماهی کفال طلایی	جذب اتمی	عضله	مس روی نیکل	روی	میزان نیکل بیشتر از استاندارد جهانی بود.	فرح‌بخش و همکاران، ۱۳۹۸

3.نتیجه‌گیری

ماهی به‌عنوان یک منبع مهم از پروتئین و چربی با ارزش اقتصادی بالا شناخته شده و با داشتن ویتامین‌های محلول در چربی و مواد موردنیاز، در یک رژیم غذایی متعادل جایگاه ویژه‌ای دارد. تحقیقات نشان داده‌اند که مصرف ماهی، خطر بروز بیماری‌های قلبی، عروقی، فشارخون و سرطان را کاهش می‌دهد بنابراین مصرف آن در تمام دنیا رو به افزایش است؛ توسعه سریع صنعت و کشاورزی منجر به افزایش آلودگی نواحی ساحلی به فلزات سنگین شده است که به عنوان یک خطر زیست محیطی قابل توجه برای بی مهرگان، ماهی ها و انسان ها شناخته شده است. از طرف دیگر ماهی، در صورت آلوده شدن می‌تواند حاوی مقادیر زیادی آلاینده‌های مختلف از جمله فلزات سنگین باشد. بررسی مطالعات انجام شده درخصوص آلودگی‌های فلزات سنگین در بافت ماهیان سواحل شمال کشور نشان می‌دهد بیشتر مطالعات رو بافت عضله متمرکز شده‌اند که دلیل آن مصرف بافت عضله ماهی به‌عنوان مهم‌ترین بخش خوراکی برای انسان است که می‌تواند به‌طور مستقیم روی سلامتی انسان اثرگذار باشد. بررسی‌های انجام شده میزان آلودگی را قابل‌توجه و در برخی موارد بالاتر از استانداردهای جهانی نشان می‌دهند. با توجه به مصرف ماهی به‌عنوان یکی از غذاهای مصرفی مردم این منطقه پایش‌های مداوم تمامی آلاینده‌های محیطی در آب، رسوب و آبزیان دریای خزر و شناخت دقیق منابع آلاینده تا لزوم اطمینان از سلامت جهت مصرف ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

۶. اعظمی ج. مرادپور م. کیانی مهر ن. ۱۳۹۶. مروری بر شاخص‌های زیستیِ محیط‌های آلوده به فلزات سنگین. انسان و محیط‌زیست. دوره ۱۵، شماره ۴۰ ص. ۱۳-۲۴.

۷. الصاق، ا. ۱۳۸۹. تعیین برخی فلزات سنگین در عضلات ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) جنوب مرکزی دریای خزر. تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک (پژوهش و سازندگی), ۲۴(۴ (پیاپی ۸۹)),ص. ۳۳-۴۴.

۸. امینی رنجبر غ. ستوده نیا ف. ۱۳۸۴. تجمع فلزات سنگین در بافت عضله ماهی کفال طلایی (*Mugil auratus*) دریای خزر در ارتباط با برخی مشخصات بیومتریک (طول استاندارد, وزن, سن و جنسیت). مجله علمی شیلات ایران (فارسی), ۱۴(۳), ص ۱-۱۸.

۹. لکزایی ف. و بابایی ه. خداپرست س. ۱۳۹۴. سنجش فلزات سنگین (سرب،کادمیم، روی و مس) در بافت کبد و عضله ماهی کفال طلایی در دو منطقه حوضه جنوب غربی دریای خزر (کیاشهر و تالش). توسعه آبزی پروری (علوم زیستی), ۹(۳)، ص. ۵۱-۵۸.

۱۰. صالحی بوربان س. قراچورلو م. زمانی ف. ۱۳۹۵. بررسی میزان فلزات سنگین در عضله و روغن ماهی سفید، کیلکای معمولی و کفال پوزه‌باریک. بهداشت مواد غذایی، ۶(۴ (پیاپی ۲۴)), ص. ۷۵-۸۷.

۱۱. کلانی ن. ریاضی ب. کرباسی ع. معطر ف. ۱۳۹۳. بررسی فلزات سنگین (آرسنیک، سرب، کادمیوم، کروم و نیکل) در عضله کفال پوزه‌باریک (*Liza saliens*) و ارزیابی خطر بهداشتی ناشی از مصرف آن برای انسان. آبزیان و شیلات، ۵(۱۷)، ص. ۶۵-۷۹.

۱۲. میلانی ج. کلکار خ. فلاحت پ. ۱۴۰۰. تاثیر فرآیند پخت بر باقی ماندهی فلزات سنگین در گوشت تعدادی از گونه های ماهی دریای خزر. نشریه پژوهشهای صنایع غذایی. ۳۱ شماره ۴ ص. ۱۸۷ – ۲۰۰.

۱۳. موسوی مقدم س. نوروزی م. اسماعیلی م. ۱۳۹۷. بررسی فلزات سنگین و ارتباط آن با برخی شاخص‌های زیست‌سنجی در عضله و آبشش ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) دریای خزر. زیست شناسی دریا (بیولوژی دریا)،۱۰(۳۷)، ص. ۱۳-۲۴.

14. Bagheri Tavani M. Norouzi M. 2016. Lead and Cadmium Pollution in the Southern Caspian Sea Basin through Liza aurata using the GIS System. J. Aqu. Eco. 6 (2):101-115.
15. Norouzi M. Bagheri Tavani M. 2019. Assessment of the Consumption Risk of Fifteen Heavy Metals in Liza aurata in the Caspian Sea. J. Aqu. Eco. 8 (3):96-107
16. Najm M. Shokrzadeh M. Fakhar M. Sharif M. Hosseini S M. RahimiEsboei B et al. 2014. Concentration of Heavy Metals (Cd, Cr and Pb) in the Tissues of *Clupeonella Cultriventris* and *Gasterosteus Aculeatus* from Babolsar Coastal Waters of Mazandaran Province, Caspian Sea. J Mazandaran Univ Med Sci. 24 (113):185-192.
17. Sattari M. Imanpour J. Bibak M. Forouhar Vajargah M. Khosravi A. 2019. Investigation of metal element concentrations in tissue of *Rutilus frisii* in the Southwest Caspian Sea. isfj. 28 (3):149-161.
18. Velayatzadeh M. Sary A. Askary M. Beheshti S. Mahjob M. Hoseini. 2014. Measurement of Heavy metals (Hg, Cd, Sn, Zn, Ni, Fe) in canned tuna fish product in central cities, Iran. 498-506.
19. Norouzi M. Bagheri Tavani, M. Amirjanati A. Ghodrati S. 2016. Concentration of heavy metals in tissues of golden gray mullet (*Liza aurata*) in different areas of the southern coast of the Caspian Sea. Environmental Sciences, 14(3), 201-214.
20. Movafagh Behnam M. Esmaili Sari A. Majedi S.M. 2020. Accumulation of mercury and zinc in muscle tissue of four species of fishes in Caspian Sea (Case study: coastal of Mahmoud Abad-Noshahr). Journal of Animal Environment, 12(3), 183-188.
21. Nasrollahzadeh Saravi H. Pourgholam R. Pourang N. Rezaei M. Makhlough A. Unesipour H. 2013. Heavy metal concentrations in edible tissue of *Cyprinus carpio* and its target hazard quotients in the Southern Iranian Caspian Sea Coast,(2010). Journal of Mazandaran University of Medical Sciences, 23(103), 33-44.
22. Pazooki J. Ghaffar HF. Abtahi B. 2012. A comparison of heavy metal concentrations in skin and muscle tissues of wild and cultured carp (*Cyprinus carpio*) in the southeastern Caspian Sea area of Iran. Environmental sciences.9,.1.
23. Farahbakhsh Z. Akbarzadeh A. Amiri P. Naji A. 2019. Potential health risk assessment of heavy metals (Cu, Zn, Ni) via the consumption of the prevailing bony fish *Liza auratas* (Risso, 1810) of Caspian Sea. Iranian Journal of Health and Environment. 12(2):193-202.
24. Kardel, F. Mirzapour F. Omidzahir S., Akhoundian M. 2016. Heavy metal concentrations in gill and liver tissues of *Rutilus kutum* and *Chelon aurata* in the coast of Babolsar, southern Caspian Sea. International Journal of Aquatic Biology, 4(2), 80-86.
25. Falahnejad Astani Z. Taghavi Jelodar H. Fazli H. 2018. Studying the accumulation of heavy metals (Fe, Zn, Cu and Cd) in the tissue (muscle, skin, gill and gonad) and its relation with fish (Alosa braschinkowi) length and weight in Caspian Sea coasts. J Aquac Mar Biol. 7(6):308–312.

26. Solgi E. Alipour H. Majnooni F. 2019. Investigation of the concentration of metals in two economically important fish species from the Caspian Sea and assessment of potential risk to human health. Ocean. Sci. j.1-12.
27. Sheikhzadeh, H., & Hamidian, A. H. 2021. Bioaccumulation of heavy metals in fish species of Iran: a review. Environmental Geochemistry and Health, 1-121.
28. Han, J. L., Pan, X. D., Chen, Q., & Huang, B. F. 2021. Health risk assessment of heavy metals in marine fish to the population in Zhejiang, China. Scientific Reports, 11(1), 1-9.
29. Yousif, R., Choudhary, M. I., Ahmed, S., & Ahmed, Q. 2021. Bioaccumulation of heavy metals in fish and other aquatic organisms from Karachi Coast, Pakistan. Nusantara Bioscience, 13(1).

Toxicity effect of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on cellulase and superoxide dismutase activity in earthworms

Mehran Arabi [1*], Nahid Rezaie [2]

1- Associate Prof. in Animal physiology, Animal sciences group, Faculty of basic sciences, Shahrekord university
2- MSc student in Animal physiology, Animal sciences group, Faculty of basic sciences, Shahrekord university

* *mehranarabi@hotmail.com*

Abstract

Esters of phthalic acid (PAEs)(Phthalates) contamination has been detected in almost all environmental media, including lake water, marine water, sediment, soil, food and human beings. In industry, PAEs are primarily manufactured and used as plasticizers to improve the flexibility and durability of plastic products. They gradually released into the environment from extrication of the weak non-bonding interactions with a plastic matrix. Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) as a plasticizer is used in wall coverings, floor tiles, shower curtains, rainwear, baby pants, toys, shoes, blood storage bags, etc. Earthworms are typical saprozoic soil invertebrates and are key organisms for soil functioning. They can be exposed to pollutants entering the soil through both dermal contact and ingestion. In this study we aimed to evaluate the toxicity of DEHP in earthworms *Eisenia fetida* at various concentrations 0, 0.1, 1, and 2 mg/kg dry soil for 6 and 12 days. Earthworms were homogenized. We measured the activities of digestive enzyme cellulase and antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) in earthworm's homogenates by spectrophotometric procedures. Our resulting data confirmed that DEHP treatments decreased the activities of both cellulase and SOD. These lowered activities were more in the higher DEHP concentrations and 12 day exposure time than other groups. Collectively, it was found that DEHP induced oxidative damages in the earthworm's body which results in decreased digestion and metabolic activities.

Keywords: Ester of phthalic acid, Natural soil, Terrestrial invertebrates, Cellulose, Antioxidant

اثر سمیت دی-۲- اتیل هگزیل فتالات (DEHP) بر فعالیت سلولاز و سوپراکسید دیسموتاز در کرم‌های خاکی

مهران عربی [۱*] ؛ ناهید رضایی[۲]؛ محمد شادخواست[۳]

۱- دانشیار فیزیولوژی جانوری، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد

۲- دانشجو کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد

۳- دانشیار بافت شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد

* *mehranarabi@hotmail.com*

چکیده

آلودگی ناشی از استرهای فتالیک اسید (PAEs)(فتالات ها) در محیط‌های مختلف اعم از آب دریاچه‌ها، دریاها، رسوبات، خاک، غذا و بدن انسان قابل ردیابی هستند. در صنعت PAEs تحت عنوان پلاستی سایزر در بهبودبخشی انعطاف و مقاومت محصولات پلاستیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این مواد به علت پیوندهای ضعیفی که با اجزای پلاستیک دارند، به تدریج آزاد و به محیط وارد می شوند. دی-۲- اتیل هگزیل فتالات (DEHP) در ترکیب کاغذ دیواری، کف پوش، اسباب بازی، کفش، کیسه‌های نگهداری خون و غیره استفاده می شود. کرم‌های خاکی از جمله بی مهرگان ساپروزوییک شاخص و کلیدی در خاک بوده که در به عملکرد مناسب خاک کمک می‌کنند. در این مطالعه هدف ما ارزیابی سمیت DEHP در کرم‌های خاکی Eisenia fetida تحت غلظت‌های مختلف ۰/۱ ، ۱ و ۲ میلی گرم در کیلوگرم خاک خشک به مدت ۶ و ۱۲روز بوده است. کرم‌های خاکی هوموژن شده و فعالیت سلولاز به عنوان یک آنزیم گوارشی و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) به عنوان یک آنزیم آنتی اکسیدانی در هوموژنیت کرم‌ها با روش های اسپکتروفوتومتریک سنجیده شدند. نتایج این آزمایش نشان داد که تیمارهای DEHP موجب مهار فعالیت هر دو سیستم آنزیمی سلولاز و SOD شده‌اند. کاهش در فعالیت‌های آنزیمی به میزان بیشتری در تیمارهای با غلظت های بالاتر DEHP و در دوره زمانی ۱۲روزه نسبت به سایر گروه‌ها مشاهده گردید. خلاصه این که تیمارهای DEHP موجب القای آسیب های اکسیداتیو در بدن کرم‌های خاکی شده که نتیجه آن کاهش توان گوارشی و واکنش های متابولیکی بوده است.

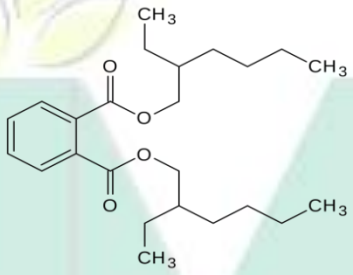
واژگان کلیدی: استر اسید فتالیک، خاک طبیعی، بی مهرگان خاکزی، سلولز، آنتی اکسیدان

۱. مقدمه

وجود هر گونه آلودگی در خاک علاوه بر تحمیل آسیب‌های ساختاری و عملکردی به بدن موجودات زنده در نهایت اکوسیستم ها را نیز دچار آسیب خواهد نمود. امروزه با افزایش تولید و مصرف پلاستیک‌ها در سراسر جهان، نگرانی در مورد سمیت ناشی از این مواد افزایش یافته است. وجود انواع مختلفی از ترکیبات شیمیایی در ساختار پلاستیک‌ها از جمله عوامل مهم در لزوم بررسی تاثیر سمیت آلاینده‌های پلاستیکی در محیط‌های زیست جانوری است. از جمله مواد پرکاربرد در تولید انواع پلاستیک‌ها، فتالات‌ها یا استرهای فتالیک اسید (PAEs) بوده که به عنوان پلاستی سایزر در افزایش نرمی و شفافیت انواع پلاستیک‌ها مورد استفاده فراوان دارند. PAEs

به ویژه در تولید محصولات PVC و پلی اتیلنی استفاده می‌شوند. در برخی از محصولات فتالات‌ها حدود ۴۰ درصد وزن محصولات پلاستیکی را به خود اختصاص می‌دهند. به علت پیوندهای سست بین PAEs و سایر مواد سازنده‌ی پلاستیک‌ها' مونومرهای PAEs به راحتی از ساختار مواد پلاستیکی جدا و به محیط زیست وارد شده که خود زمینه ساز بروز سمیت در موجودات زنده ساکن آن نواحی است (US EPA, 1980; Derraik, 2002).

ترکیب شیمیایی دی-۲- اتیل هگزیل فتالات (DEHP) با فرمول شیمیایی $C_{24}H_{38}O_4$ در حدود ۴۰ درصد تولید انواع PAEs را به خود اختصاص داده و به میزان زیادی در محصولاتی همچون مواد روکش دهنده ی وسایل منزل' کف پوش‌ها' اسباب بازی ها و برخی مواد آرایشی و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرد (شکل ۱). در پزشکی کیسه های ذخیره فرآورده‌های خونی، وسایل همودیـــالیز و لوله‌های تراشه حـــاوی مقادیر زیـــادی از DEHP هستند. ذرات DEHP با پیوندهای غیرکوئوالان به سایر ذرات درون پلاستیک متصل بوده و به راحتی در اثر استفاده مکرر، تاثیر حرارت و تمیز کردن سطح وسایل پلاستیکی جدا و ضمن رهایش به محیط اطراف وارد می گردند (Roslev et al., 1998; Rowdhwal and Chen, 2018) .



شکل ۱: ساختار شیمیایی دی-۲-اتیل هگزیل فتالات (DEHP).

گزارش‌های علمی حاکی از آن است که فتالات‌ها به ویژه DEHP موجب کاهش احتمالی حاملگی و افزایش سقط‌های خودبخودی می شود (Lovecamp-Swan and Davis, 2003).

از جمله موجودات زنده در اکوسیستم های خاکی که به سرعت نسبت به تاثیرات منفی مواد شیمیایی مختلف در محیط اطراف از خود واکنش نشان می دهند انواع کرم‌های خاکی هستند. این جانوران به دلیل نقش مهمی که در تقویت خاک از طریق فرآیندهای زیستی و فیزیکوشیمیایی دارند و نیز به علت توزیع گسترده‌شان در انواع خاک‌ها، به عنوان مدلی مناسب برای استفاده در بسیاری از آزمایشات سم شناسی و دیگر ارزیابی‌های زیست‌محیطی مورد استفاده محققین قرار می‌گیرند. این جانوران به دلیل رشد و تکثیر سریع و نیز جمع آوری آسان و دوره تولیدمثلی کوتاهی که دارند در مطالعات مختلف علمی مورد توجه قرار گرفته اند. از نظر ارسطو کرم‌های خاکی به عنوان روده‌های زمین هستند زیرا بر اساس شیوه زندگی شان، موجب حاصلخیزی هر چه بیشتر خاک شده و در صورت تاثیر آلاینده‌های محیطی بر آنان، ساختار خاک تضعیف خواهد شد (Sheppard et al., 1998).

بررسی ها نشان داده که سالیانه در حدود ۶ میلیون تن انواع PAEs وارد بازار مصرف می شود. بر اساس طبقه بندی به عمل آمده توسط USEPA مشخص شده که در بین انواع PAEs بیشترین میزان سمیت متعلق به DEHP است. در جانوران آسیب‌های وارده توسط PAEs' به دوز و مدت زمان برخورد با این ترکیب بستگی داشته و لذا نتیجه تاثیر مزمن آن مشهودتر است. به طورکلی PAEs سبک با زنجیره الکیلی کوتاه و وزن مولکولی کم از حلالیت بیشتری در آب برخوردار بوده و به همین دلیل موجب بروز سمیت حاد

می‌شوند. نیمه عمر DEHP بین ۱۵۰ تا ۳۰۰ روز و محدوده‌ی غلظتی آن بین ۰/۲تا ۲۵/۲ میلی گرم در کیلوگرم خاک و لجن فاضلاب ها است (US EPA, 1980; Lundburg and Nilsson, 1994).

نتایج مطالعات علمی نشـان داده که DEHP پس از ورود به بدن در چندین مرحله انتقال زیسـتی به متابولیت های مختلفی تبدیل می شـود که مهم ترین این متابولیت ها، MEHP بوده که تاثیر سـمیت این متابولیت بر تولیدمثل موجودات مختلف به عنوان یک ترکیب آنتی آندروژن مورد تایید قرار گرفته است (Treinen et al., 1990). DEHP پس از جدایی از محل استقرار خود ضمن ورود به خاک و ایجاد اتصـالات پایدار با ذرات آن' به آب‌های زیرسـطحی نیز نفوذ نموده و در نهایت در گوشـت حیوانات و روغن های خوراکی گیاهی قابل ردیابی و شناسایی خواهد بود (Rowdhwal and Chen, 2018) .

بررسـی ها نشـان داده که در کرم‌های خاکی تیمار شـده با DEHP میزان اکسـیداسـیون سـلولی و آسـیب های وارده به ژنوم افزایش معنی‌داری یافته است (Ma et al., 2017) . از سوی دیگر DEHP با ایجاد سمیت در کرم های خاکی موجب بروز آپوپتوز و افزایش غیرطبیعی سنتز رادیکال های آزاد اکسیژنی (ROS) در بافت های بدن این جانوران شده که نتیجه آن کاهش قدرت سازگاری این جانوران با محیط و کوتاهی عمر در آنان بوده اسـت (Rowdhwal and Chen, 2018) . تیمار DEHP در رت ها موجب گسـترش پراکسـیداسـیون لیپیدها (LPO) و افزایش مالون‌دی‌آلدئید (MDA) شـده که نشـانگر القای اکسـیداسـیون سـلولی در بافت های بدن آنان بوده است (Abdel-Kawi et al., 2016). در بافت کلیه موش‌ها نیز DEHP با کاهش محتوی مولکول های آنتی اکسیدانی نظیر گلوتاتیون (GSH) موجب القای استرس اکسیداتیو (OS) و غیرفعال شدن سلول‌های کلیوی شده است (Amara et al., 2020). در انسان نیز وجود رابطه مستقیم بین میزان حضور ذرات PAEs در محیط با میزان ابتلای افراد به دیابت قندی نوع II به اثبات رسیده به طوری که متابولیت های آنان در ادرار دیابتی‌ها قابل ردیابی هسـتند (James-Todd et al., 2012). تاثیر DEHP در نماتود *C. eleganse* موجب کاهش رشد سلولی و القای استرس اکسیداتیو در بدن این جانور شده است (Roh et al., 2007).

در پژوهش حاضر با در نظرگیری احتمال جدایی ذرات DEHP از محل اصلی خود در محصولات پلاستیکی و سپس ورودشان به آب و خاک اطراف' از کرم های خاکی *Eisenia fetida* به عنوان مدل جانوری خاکزی در بررسی اثر سمیت DEHP بر فعالیت آنزیم های سلولاز (در سیستم گوارش) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (در سیستم دفاع آنتی اکسیدانی) استفاده شده است.

۲. مواد و روش‌ها

۱-۲- تهیه و نگهداری مدل جانوری

در مطالعه حاضر مدل جانوری مورد استفاده کرم‌های خاکی قرمز کالیفرنیایی یا *Eisenia foetida* بالغ بودند. بلوغ آنان با توجه به دارا بودن کمربند تناسلی برجسته در نظر گرفته شد. عمر تقریبی کرم‌ها حدود ۳ ماه با وزن ۳۵۰ تا ۴۰۰ میلی گرم بود و از شرکت مواد آلی کیانپارس در شیراز تهیه و خریداری شدند. به منظورسازگاری با محیط جدید' کرم‌های خاکی به مدت یک هفته در شرایط استاندارد در تشت‌های پلاستیکی محتوی خاک طبیعی جمع آوری شده از سطح زمین های دانشگاه شهرکرد نگهداری شدند. برای شروع آزمایشات کرم‌های خاکی به چهار گروه (با سه تکرار مستقل با۲۰ نخ کرم در هر تکرار) تقسیم بندی شدند: یک گروه شاهد

(بدون تیمار) و سه گروه تجربی (تیمار شده با سه غلظت از DEHP). در طول کار شرایط کنترل شده با رطوبت ۶۰ درصد، دمای °C ۲±۲۲ و دوره روشنایی ۱۲-۱۲ ساعت (نور- تاریکی) حفظ گردید.

۲-۲- مشخصات فتالات: ترکیب دی-۲- اتیل هگزیل فتالات (DEHP)($C_{24}H_{38}O_4$, CAS No. 117-81-7, > 99.5% purity) از شرکت سیگما- الدریچ تهیه و سایر مواد شیمیایی مصرفی مورد نیاز از طریق شرکت های داخلی خریداری و تهیه گردیدند.

۲-۳- طرح مطالعه: سه غلظت مشخص از DEHP یعنی ۰/۱، ۱ و ۲ میلی گرم در کیلوگرم (mg/kg) خاک خشک بر اساس الگوی مشابه در کارهای قبلی با فتالات ها مورد استفاده قرار گرفتند (Wang et al., 2018; Song et al., 2019). این سه غلظت بر اساس متوسط غلظت DEHP موجود در نمونه های خاک و رسوبات که بین ۰/۲۰ تا ۲۵/۲۰ میلی گرم در کیلوگرم است، انتخاب گردیدند (He et al., 2015; Rowdhwal and Chen, 2018). دو دوره زمانی ۶ و ۱۲روزه برای تعیین اثر تیمارهای DEHP بر کرم‌های خاکی درون ظروف محتوی خاک طبیعی در نظر گرفته شد. در پایان هر یک از این دو دوره زمانی کرم‌ها را از نمونه های خاک خارج و پس از شستشو با آب شهری قطعه قطعه و خرد نمودیم. سپس با روش فرا صوت در بافر فسفات پتاسیم از خرده های کرم ها هوموژنیت (عصاره کل بدن) تهیه و در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. برای سنجش های آنزیمی هوموژنیت ها به مدت ۱۰ دقیقه و با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه (۴ درجه سانتی گراد) سانتریفیوژ شده و سوپرناتانت (مایع رویی) در لوله ها جدا و در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد تا شروع آزمایشات بعدی نگهداری شدند (Torabi Farsani et al., 2021).

۲-۴- سنجش فعالیت آنزیمی سلولاز (EC 3.2.1.4): سلولاز موجود در لوله گوارش غذای کرم‌خاکی مسئول تجزیه سلولز غذا است. بر اساس روش Mishra and Dash (۱۹۸۰) محلول سلولز در بافر فسفاته (pH=6.4) به سوپرناتانت حاوی آنزیم افزوده شده و برای ۲۴ ساعت انکوباسیون به انجام رسید. به مخلوط قبل، ۱ میلی لیتر از محلول DNS (۳و ۵- دی نیترو اسید سالی سیلیک) را اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در نزدیک به نقطه جوش قرار دادیم. پس از سرد شدن در آب سرد به تدریج رنگ قرمز آجری تولید شد. جذب نوری محلول آخر قرمز رنگ در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده و ثبت شد.

۲-۵- سنجش فعالیت آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)(EC 1.15.1.1): بر طبق روش Misra and Fridovich (۱۹۷۲) فعالیت SOD به عنوان یک آنزیم آنتی اکسیدانی مسئول تجزیه رادیکال آزاد آنیون سوپراکسید ($^{\bullet}O_2^-$) در محیط های سلولی است. برای شروع ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت به مقدار مشخصی از بافر کربنات سدیم ۰/۰۵ مولار (pH برابر ۱۰/۲) اضافه گردید. پس از آن به مخلوط مرحله قبل، ۲۰ میکرولیتر از اپی نفرین ۳۰ میلی مولار در اسید استیک (۰/۰۵ درصد) اضافه شد. در آخر جذب نوری برای ۴ دقیقه در طول موج ۴۸۰ نانومتر خوانده شد. یک واحد از SOD مقداری از آنزیم است که توانایی مهار ۵۰ درصد از واکنش اوتواکسیداسیون اپی نفرین را داشته باشد.

۲-۶- آنالیز آماری نتایج: آنالیزهای آماری نتایج توسط نرم افزار SPSS با سطح معنی داری $p<0/05$ به انجام رسید. داده‌ها به صورت Means±Standard Deviation (SD) نمایش داده شدند. جهت مقایسات آماری بین گروه های مختلف از روش One way-ANOVA با پس آزمون Tukey's HSD استفاده شد.

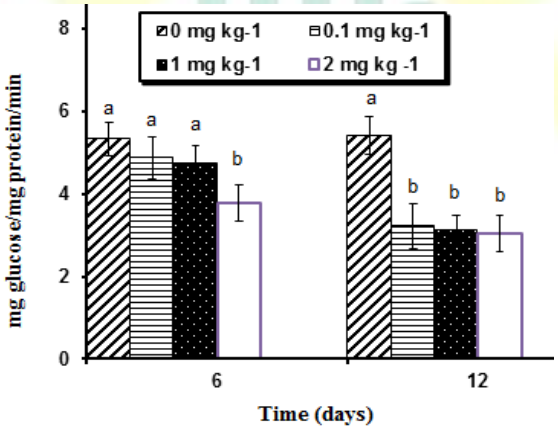
۳. نتایج و بحث

۳-۱- تغییرات فعالیت سلولاز: نتایج موجود در شکل ۱ نشان دهنده روند کاهش در فعالیت سلولاز هوموژنیت کرم‌های تیمار شده با غلظت های مختلف از DEHP در دو دوره زمانی ۶ و ۱۲ روزه بوده که در تیمارهای ۱۲روزه به طور کامل معنی دار ($p<0/05$) بوده و در تیمار ۶ روزه تنها تیمار ۲ mg/kg از DEHP معنی دار ($p<0/05$) بوده است. این مهار آنزیمی وابسته به افزایش در غلظت

(Dose-dependent) DEHP بوده است. مشخص گردید که بیشترین میزان مهار سلولاز مربوط به غلظت ۲ mg/kg (۴۳/۸۱- درصد) در پایان ۱۲روز تیمار با DEHP بوده است.

قند پلیمری سلولز از جمله منابع مهم تامین انرژی در بدن بسیاری از جانوران علف خوار و نیز کرم‌های خاکی بسیار حائز اهمیت است. سلولاز به عنوان آنزیم تجزیه کننده سلولز در صنایع مختلفی همچون تولید انواع آب میوه، پودرهای لباسشویی، کاغذسازی، بهبود ترکیب غذای دام ها جهت هضم بهتر و غیره مورد کاربرد دارد (Ejaz et al., 2021). مطالعات نشان داده که فعالیت سلولازی در بدن کرم‌های خاکی مربوط به ترشحات روده ای این جانوران و نیز ترشحات باکتری های گرم منفی مقیم در روده آنان است. به کمک فعالیت سلولازی، کرم های خاکی قادر به استفاده از منابع مختلف سلولزی جهت تامین انرژی برای فعالیت های روزمره شان هستند (Sukumaran et al., 2005; Kamalzaeia et al., 2018). در سال ۲۰۱۸ ، نتایج کار تحقیقاتی به عمل آمده توسط تیم تحقیقاتی ما نشان داد که در عصاره کل بدن و مایع سلومی کرم های خاکی فعالیت سلولازی مقاوم به دما ثبت شده که با قلیایی شدن محیط بر فعالیت آن افزوده می شود (Kamalzaeia et al., 2018). بررسی منابع نشان داده که مطالعات اندکی در رابطه با اثر DEHP بر فعالیت سلولاز در بدن کرم های خاکی به انجام رسیده است. از آن جایی که ذرات PAEs در اثر عواملی مثل تغییرات دما از محل اصلی شان جدا و به محیط زیست وارد می گردند لذا بسیاری از واکنش های حیاتی از جمله فعالیت های آنزیمی نیز دستخوش تغییر خواهند شد (Derraik, 2002; Fan et al., 2021). در سال ۲۰۰۷ نتایج مطالعه Shi و همکاران نشان داد که با تاثیر برخی آلاینده‌ها فعالیت سلولاز دچار تنظیم کاهشی شده و مهار شده است. آلاینده هایی نظیر آفت‌کش ها (Chen et al., 2018) و یون‌های فلزی (Wu et al., 2012) پس از آلوده سازی خاک موجب القای آسیب های اکسیداتیو و مهار فعالیت سلولازی در بدن کرم‌های خاکی می شوند.

در بررسی دیگری احتمال جالب توجه ای برای کاهش فعالیت سلولاز در کرم های خاکی تیمار شده با آفت کش ها عنوان گردیده که بر اساس آن امکان تغییر در رفتار تغذیه ای کرم‌های خاکی آلوده به آفت کش‌ها وجود داشته که با کاهش ورود سلولز به روده جانور سوبسترای کم تری نیز برای فعالیت سلولاز وجود خواهد داشت و نتیجه آن کاهش سنتز و ترشح این آنزیم در کرم‌ها بوده است (Farrukh, 2017). از سوی دیگر نیز مشخص شده که آلودگی ناشی از تاثیر PAEs موجب مهار سلولاز در میکروب‌های خاکزی شده که یقینا بر میزان باروری خاک اثر منفی خواهد داشت (Xie et al., 2010).



شکل ۱: بررسی فعالیت سلولاز در تیمار با DEHP (حروف غیرهمنام از نظر آماری اختلاف معنی دار در سطح p<۰/۰۵ دارند).

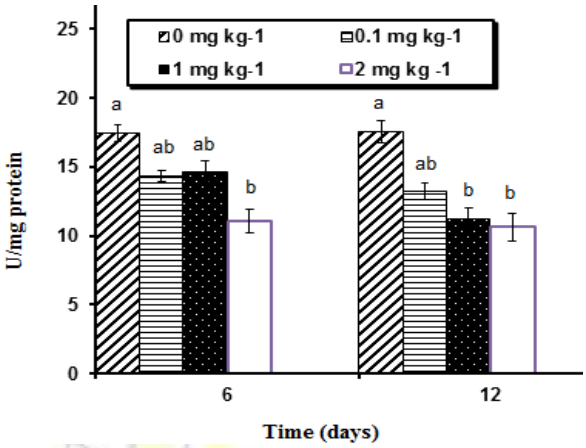
۳-۲- تغییرات فعالیت SOD: با آنالیز آماری نتایج موجود در شکل ۲ مشخص گردید که تیمارهای DEHP موجب ایجاد مهار در فعالیت SOD در هر دو دوره زمانی ۶ و ۱۲روزه شده اند. بیشترین میزان مهار فعالیت SOD مربوط به تیمار mg/kg ۲ از DEHP در پایان ۱۲روز بوده که مقدار آن برابر با ۴۰/۵۱- درصد بوده است ($p<۰/۰۵$). در این مطالعه مهار فعالیت آنزیمیSOD وابسته به افزایش در غلظت DEHP بوده است.

مطالعات نشان داده که تیمارهای DEHP موجب بروز در بافت‌های جانوری شده به طوری در سال ۲۰۲۰ مشخص گردید که DEHP با افزایش سنتز ROS و بر هم زدن تعادل آنتی اکسیدانی در ساختار بیضه موجب بروز تغییرات منفی در روند اسپرماتوژنز شده است (Zhao et al., 2020). مطالعات دیگر نیز افزایش تولید ROS را در تیمارهای DEHP نشان داده اند (Yirong et al., 2020). در همین راستا و در سال ۲۰۲۱ نشان داده شد که DEHP با فعال سازی مسیر سیگنال رسانی ROS/mTOR/NLRP3 در سلول های بیضه رت های نابالغ موجب افزایش غیرطبیعی تولید ROS و فعال سازی روند اتوفاژی و حذف این سلول ها شده است (Hong et al., 2021). در شرایط استرس اکسیداتیو (افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و کاهش فعالیت دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی)، آسیب‌های اکسیداتیو موجب بروز اختلالات غشایی و ژنومیک شده و لذا تغییر در فعالیت آنزیم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی نظیر SOD از جمله پیامدهای این روند غیرطبیعی خواهد بود (Pastore et al., 2003). در محیط‌های سلولی، SOD در تجزیه آنیون سوپراکسید وارد عمل شده و بدین ترتیب از تولید نهایی رادیکال هیدروکسیل که واجد نقش تخریبی شدیدی در غشاهای زیستی است، ممانعت به عمل خواهد آمد (Gill and Tuteja, 2010; Halliwell & Gutteridge, 2015). در پژوهش حاضر تیمارهای DEHP به صورت وابسته غلظت و زمان موجب کاهش فعالیت SOD در بدن کرم‌های خاکی *Eisenia fetida* شده اند.

در همسویی با نتایج ما، در سال ۲۰۱۵ تاثیر دراز مدت فتالات DMP بر کرم‌های خاکی موجب مهار فعالیت SOD شده است (Du et al., 2015). در همین راستا در سال ۲۰۲۱ نیز نشان داده شد که فتالات‌ها و برخی از متابولیت های آنان موجب کاهش معنی دار در فعالیت SOD در کرم خاکی *Eisenia fetida* شده اند (Fan et al., 2021).

بررسی ها نشان داده که علت مهار SOD در مطالعات فوق تحت تاثیر دو روند بوده است: ۱) افزایش میزان رادیکال های آزاد محیط موجب اشباع آنزیم های سیستم دفاع آنتی اکسیدانی شده که در نتیجه آن امکان بروز تغییرات ساختاری و مهار فعالیت آنزیمی امری اجتناب ناپذیر خواهد بود (Wu et al., 2011) و ۲) امکان برقراری پیوندهای واندروالسی و یا هیدروژنی بین فتالات‌ها و متابولیت‌های آنان با SOD (تغییر در ساختار آلفا- هلیکس) وجود داشته که در نهایت با ایجاد تغییر در محل های اتصال سوبسترا به آنزیم موجب این مهار آنزیمی خواهند شد (Fan et al., 2021).

با توجه به موارد بالا می توان عنوان نمود که در پژوهش حاضر تیمارهای DEHP با گسترش آسیب‌های اکسیداتیو موجب مهار فعالیت سلولاز و SOD شده که هر دو این تغییرات در کاهش سازگاری کرم‌های خاکی با محیط پیرامون موثر هستند.



شکل ۲: بررسی فعالیت SOD در تیمار با DEHP (حروف غیرهمنام از نظر آماری اختلاف معنی دار در سطح p<۰/۰۵ دارند).

۴. نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تیمارهای مختلف از DEHP به ویژه در غلظت‌های بیشتر و در دوره زمانی طولانی تر موجب بروز واکنش‌های اکسیداتیو در بدن کرم های خاکی شده به طوری که از پیامدهای آن می توان به کاهش فعالیت آنزیم گوارشی سلولاز و نیز کاهش فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی SOD اشاره نمود. با کاهش دسترسی کرم ها به سلولاز منابع سلولزی مورد نیاز جهت تامین انرژی در بدن آنان بدون تجزیه و استفاده باقی مانده و هم زمان تغییر کاهشی در فعالیت SOD موجب گسترش آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از سمیت DEHP در بدن کرم‌های خاکی شده است.

سپاسگزاری

ما نویسندگان این مقاله از مسئولین محترم دانشگاه شهرکرد بابت حمایت مالی، و از آقای دکتر محمدشادخواست به جهت پیشنهادهای ارزنده شان کمال قدردانی و تشکر را داریم.

منابع

1. Abdel-Kawi S.H., Hashem K.S. and Abd-Allah S. 2016. Mechanism of diethylhexylphthalate (DEHP) induced testicular damage and of grape seed extract-induced protection in the rat. Food and Chemical Toxicology, 90: 64-75.
2. Amara I., Salah A., Timoumi R., Annabi E., Scuto M., Trovato A., Neffati F., Calabrese V. and Abid-Essefi S. 2020. Effect of di (2-ethylhexyl) phthalate on Nrf_2-regulated glutathione homeostasis in mouse kidney. Cell Stress Chaperones, 25: 919-928.
3. Chen J., Saleem M., Wang C., Liang W.and Zhan Q. 2018. Individual and combined effects of herbicide tribenuron-methyl and fungicide tebuconazole on soil earthworm *Eisenia fetida.* Scientific Reports, 8: 2967.

4. Derraik J.G. 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. Marine Pollution Bulletin, 44(9): 842-852.
5. Du L., Li G., Liu M., Li Y., Yin S., Zhao J. and Zhang X. 2015. Evaluation of DNA damage and antioxidant system induced by di-n-butyl phthalates exposure in earthworms (*Eisenia fetida*). Ecotoxicology and Environment Safety, 115: 75-82.
6. Ejaz U., Sohail M. and Ghanemi A. 2021. Cellulases: From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications. Biomimetics, 6: 44.

7. Fan X., Gu C., Cai J., Bian Y., Yang X., Sun C. and Jiang X. 2021. Study on active response of superoxide dismutase and relevant binding interaction with bioaccumulated phthalates and key metabolites in *Eisenia fetida*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 223: 112559.
8. Farrukh S. 2017. Chronic effects of endosulfan on acetylcholinesterase and cellulase enzyme activity of earthworm *Eisenia foetida*. MOJ Toxicology, 3(3): 68-72.
9. Gill S.S. and Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, 48 (12): 909-930.
10. Halliwell B. and Gutteridge J.M. 2015. Free Radicals in Biology and Medicine. 5th Edition. Oxford University Press.
11. He L., Gielen G., Bolan N., Zhang X., Qin H., Huang H. and Wang H. 2015. Contamination and remediation of phthalic acid esters in agricultural soils in China: a review. Agronomy for Sustainable Development, 35: 519-534.
12. Hong Y., Yu Zhou Y., Shen L., Wei Y., Long C., Fu Y., Wu H., Wang J., Wu Y., Wu S. and Wei G. 2021. Exposure to DEHP induces testis toxicity and injury through the ROS/mTOR/NLRP3 signaling pathway in immature rats. Ecotoxicology and Environmental Safety, 227: 112889.
13. James-Todd T., Stahlhut R., Meeker J.D., Powell S.G., Hauser R., Huang T. and Rich-Edwards J. 2012. Urinary phthalate metabolite concentrations and diabetes among women in the Health and National Nutrition Examination Survey (NHANES) 2001-2008. Environmental Health Perspectives, 120(9): 1307-1313.
14. Kamalzaeia N., Arabi M. and Hemmati R. 2018. A Novel Cellulase from the Earthworm *Allolobophora Chlorotica*. Biomacromolecular Journal, 4(1): 7-15.

15. Lovecamp-Swan T. and Davis B.J. 2003. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. Environmental Health Perspectives, 111(2): 139-145.
16. Lundburg G. and Nilsson, C. 1994. Phthalic acid esters used as plastic additives. Swedish National Chemical Inspectorate, Report No. 12/94.
17. Ma T.T., Zhou W., Chen L., Wu L., Christie P., Zhang H. and Luo Y. 2017. Toxicity effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate to *Eisenia fetida* at enzyme, cellular and genetic levels. PLOS ONE, 12(3): e0173957.
18. Mishra P.C. and Dash M.C. 1980. Digestive enzymes of some earthworm. Experimentia, 36(10): 1156-1157.
Misra H.P. and Fridovich I. 1972. The role of superoxide anion in the auto oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. Journal of Biological Chemistry, 247: 3170-3175.
19. Pastore A., Piemonte F., Locatelli M., Russo A.L., Gaeta L.M., Tozzi G. and Federici G., 2003. Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects. Clinical Chemistry, 47(8): 1467-1469.
20. Roh J.Y., Jung I.H., Lee J.Y. and Choi J. 2007. Toxic effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on mortality, growth, reproduction and stress-related gene expression inthe soil nematode *Caenorhabditis elegans*. Toxicology, 237: 126-133
21. Roslev P., Madsen P.L., Thyme J.B. and Henriksen K. 1998. Degradation of phthalate and Di-(2-Ethylhexyl) phthalate by indigenous and inoculated microorganisms in sludge-amended soil. Applied and environmental microbiology, 64(12): 4711-4719.
22. Rowdhwal, S.S.S. and Chen, J. 2018. Toxic Effects of Di-2-ethylhexyl Phthalate: An Overview. BioMed Research. International, 2018: 10 pages.

23. Sheppard S., Bembridge J., Holmstrup M. and Posthuma L. 1998. Advances in Earthworm Ecotoxicology. SEATAC Press, Amsterdam.
24. Song P., Gao J., Li X., Zhang C., Zhu L., Wang J. and Wang J. 2019. Phthalate induced oxidative stress and DNA damage in earthworms (*Eisenia fetida*). Environment International, 129: 10-17.
25. Sukumaran R.K., Singhania R.R. and Pandey A. 2005. Microbial cellulases Production, applications and challenges .Journal of Scientific & Industrial Research, 64: 832-844.
26. Torabi Farsani A., Arabi M. and Shadkhast M. 2021. Ecotoxicity of chlorpyrifos on earthworm *Eisenia etida* (Savigny, 1826): Modifications in oxidative biomarkers. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 249: 109145.
27. Treinen K.A., Dodson W.C. and Heindel J.J. 1990. Inhibition of FSH-stimulated cAMP accumulation and progesterone production by mono (2-ethylhexyl) phthalate in rat granulosa cell cultures. Toxicology and Applied Pharmacology, 106(2): 334-340.

28. US EPA (United State Environmental Protection Agency) Office of Water Regulations and Standards, Criteria and Standard Division, EPA-440/5-80-067, Washington (DC); 1980.
29. Wang G., Wang J., Zhu L., Wang J., Li H., Zhang Y., Liu W. and Gao J. 2018. Oxidative damage and genetic toxicity induced by DBP in earthworms (*Eisenia fetida*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 74 (4): 527-538.
30. Wu S., Wu E., Qiu L., Zhong W. and Chen J. 2011. Effects of phenanthrene on the mortality, growth, and anti-oxidant system of earthworms (*Eisenia fetida*) under laboratory conditions. Chemosphere, 83(4): 429-434.
31. Wu B., Liu Z., Xu Y., Li D. and Li M. 2012. Combined toxicity of cadmium and lead on the earthworm *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). Ecotoxicology and Environmental Safety, 81: 122-126.
32. Xie H.G., Shi Y.J, Zhang J., Cui Y., Teng S.X., Wang S.G. and Zhao R. 2010. Degradation of phthalate esters (PAEs) in soil and the effects of PAEs on soil microcosm activity. Chemical Technolohy and Biotechnology, 85(8): 1108-1116.
33. Yirong C., Shengchen W., Jiaxin S., Shuting W. and Ziwei Z. 2020. DEHP induces neutrophil extracellular traps formation and apoptosis in carp isolated from carp blood via promotion of ROS burst and autophagy. Environmental Pollution, 262: 114295.
34. Zhao Y., Li M.Z., Shen Y., Lin J., Wang H.R., Talukder M. and Li J.L. 2020. Lycopene prevents DEHP-induced Leydig cell damage with the Nrf2 antioxidant signaling pathway in mice. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 68: 2031-2040.

Evaluation of the toxicity of di-ethyl phthalate (DEP) in earthworms *Eisenia fetida* Savigny

Hanye-Sadat Sayedbokaei [1], Mehran Arabi [2*]

1- MSc student in Animal physiology, Animal sciences group, Faculty of basic sciences, Shahrekord university
2- Associate Prof. in Animal physiology, Animal sciences group, Faculty of basic sciences, Shahrekord university

* *mehranarabi@hotmail.com*

Abstract

Phthalates (PAEs), the esters of phthalic acid, are detectable in various environments including soil, sediment, and water. Six million tons of PAEs are consumed globally each year. Di-ethyl phthalate (DEP) is used in cosmetics, plastic toys, nail polish solvents, shampoo, shower curtains, medical devices, etc. The routes of exposure are through inhalation, dermal and oral. The aim of the present study was to assess the toxicity of DEP in earthworms *Eisenia fetida* Savigny. Earthworms were exposed to various concentrations of DEP (0, 0.1, 1, and 2 mg/kg dry soil) for 6 and 12 days. At the end, earthworms washed and the homogenates were made. In the present study, the activities of digestive enzyme cellulase and antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) were evaluated in the earthworm's homogenates spectrophotometrically. Our findings revealed that DEP treatments could decrease the cellulase activity and increase the SOD activity as well. These enzymatic alterations were prominent particularly in the higher DEP concentrations and in 12 day exposure time. In brief, DEP could induce oxidative damages (elevated SOD) and reduce cellulose utilization (dampened cellulase) in earthworms resulting in diminished sources of energy.

Keywords: Phthalate, Earthworm, Superoxide dismutase, Cellulase, Oxidative damages

بررسی سمیت دی- اتیل فتالات (DEP) در کرم های خاکی *Eisenia fetida* Savigny

حانیه السادات سیدبکایی[۱]؛ مهران عربی[۲*]

۱- دانشجو کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد

۲- دانشیار فیزیولوژی جانوری، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد

* *mehranarabi@hotmail.com*

چکیده

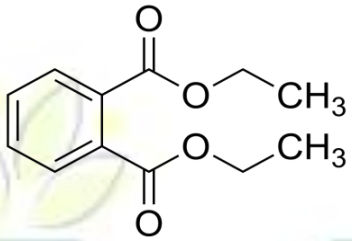
فتالات ها (PAEs)، به عنوان استرهای اسید فتالیک، در محیط های گوناگون شامل خاک، رسوبات و آب قابل ردیابی بوده و سالانه در حدود ۶ میلیون تن از آنان به مصرف جهانی می رسد. دی اتیل- فتالات (DEP) در مواد آرایشی، اسباب بازی پلاستیکی، حلال لاک ناخن، شامپو، پرده های حمام، تجهیزات پزشکی و غیره مورد استفاده دارد. DEP از مسیرهای تنفس، پوستی و خوراکی وارد بدن موجودات زنده می شود. هدف از انجام این پژوهش ارزیابی سمیت DEP در کرم های خاکی Eisenia fetida Savigny بوده است. کرم های خاکی به مدت ۶ و ۱۲ روز در معرض غلظت‌های مختلف (۰/۱ ، ۱ و ۲ میلی گرم در کیلوگرم خاک خشک) از DEP قرار گرفتند. در انتها کرم‌ها شسته شده و از آنان هوموژنیت تهیه گردید. در این مطالعه فعالیت سلولاز به عنوان یک آنزیم گوارشی و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) به عنوان یک آنزیم آنتی اکسیدانی به روش اسپکتروفوتومتری در هوموژنیت کرم ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که تیمارهای DEP موجب بروز کاهش در فعالیت سلولاز و افزایش در فعالیت آنزیمی SOD شده اند. این تغییرات آنزیمی به ویژه در غلظت های بیشتر از DEP و در دوره زمانی ۱۲ روزه نمود بیش تری داشته اند. به طور کلی می توان نتیجه گیری کرد که تیمارهای DEP موجب القای آسیب های اکسیداتیو (SOD افزایش یافته) و کاهش استفاده از سلولز (سلولاز کاهش یافته) در کرم های خاکی شده که در نتیجه آن منابع انرژی کم تری در دسترس این جانوران قرار خواهد گرفت.

واژگان کلیدی: فتالات، کرم خاکی، سوپراکسید دیسموتاز، سلولاز، آسیب های اکسیداتیو

۱. مقدمه

در دنیای امروز مصرف فزاینده ی انواع محصولات پلاستیکی نگرانی های روزافزونی را پیرامون سمیت احتمالی این مواد در پس از ورود به طبیعت و اکوسیستم های مربوطه مطرح نموده است (Derraik, 2002). فتالات ها (Phthalates) یا استرهای اسید فتالیک (PAEs) به عنوان پلاستی سایزر (Plasticizer) یا نرم کننده و به منظور افزایش نرمی و شفافیت در تولید پلاستیک ها مورد استفاده قرار می گیرند. PAEs به ویژه در تولید محصولات PVC و پلی اتیلنی استفاده می شوند. به علت پیوندهای ضعیف موجود در بین PAEs و سایر مواد سازنده پلاستیک ها، ذرات PAEs به آسانی و به سرعت از ساختار پلاستیک ها جدا شده و ضمن ورود به محیط در نهایت موجب بروز تغییرات فیزیولوژیکی منفی در موجودات زنده خواهند شد (US EPA, 1980; Derraik, 2002). از جمله انواع PAEs می توان به دی- اتیل فتالات (Di-ethyl phthalate = DEP) با فرمول شیمیایی $C_{12}H_{14}O_4$ اشاره نمود (شکل ۱). این فتالات به صورت مایعی بی رنگ با بوی مواد آروماتیک بوده و به میزان کمی فرار است. DEP در محصولاتی نظیر مواد روکش دهنده ی وسایل منزل، اسباب بازی ها، مسواک، چسب نواری، اسپری مو، حلال لاک ناخن، روکش برخی قرص ها، حشره کش ها، مواد

مرطوب کننده سطوح' بسته بندی مواد غذایی' لوله های دیالیز و تخلیه دستگاه گوارش در پزشکی و غیره به عنوان عامل پلاستی سایزر مورد استفاده قرار می گیرد. در سالیان اخیر تولید سالیانه DEP به مرز ۹۵۰۰ تن نیز بالغ گردیده است. مشخص شده که به طور روزانه مقادیر زیادی از DEP در حین استفاده و نیز در زمان دور ریزی وسایل حاوی این فتالات به محیط زیست وارد می شود. مقادیری از DEP نیز به همراه تبخیر از محصولات گوناگون وارد اتمسفر (مسیر تنفس) می شود. گزارشات نشان داده که سالیانه در امریکا در حدود ۷۲ تن از DEP به درون هوا و آب های جاری وارد می شود. در طبیعت DEP به واسطه روندهایی مثل فوتولیز و اکسیداسیون مورد تجزیه قرار می گیرد. در حدود ۱ درصد از DEP با شستشوی انواع پلاستیک ها به آب های جاری وارد می شود (US EPA, 1993; WHO, 2003).



شکل ۱: ساختار شیمیایی دی- اتیل فتالات (DEP).

گزارش های اکوتوکسیسیتی متعددی نشان داده که فتالات ها با ورود به بدن جانوران مختلف از جمله پستانداران موجب کاهش میزان بارداری و نیز افزایش بروز سقط های خودبخودی در آنان می شوند (Lovecamp-Swan and Davis, 2003) . انواع آلاینده ها و مواد سمی گوناگون پس از ورود به طبیعت، موجودات زنده مختلفی را تحت تاثیر خود قرار می دهند. در اکوسیستم های خاکی انواع کرم های خاکی (Earthworms) به دلیل نقش مهم و بی بدیلی که در تقویت و باروری خاک دارند، بسیار مورد توجه محققین قرار دارند. به علت گستره ی وسیعی که این جانوران در انواع خاک ها دارند, به عنوان مدلی مناسب در بسیاری از آزمایشات توکسیکولوژی (Toxicology) یا سم شناسی و ارزیابی های زیست محیطی مورد استفاده قرار می گیرند. کرم های خاکی از قدرت رشد و تکثیر سریعی برخوردار بوده لذا در مطالعات مختلف علمی مورد کاربرد دارند. با در نظرگیری نقش کرم های خاکی در تجزیه مواد آلی و حاصلخیزی خاک، هر گونه بروز آسیب در ساختار بدنی آنان موجب کم توانی ساختار فیزیکوشیمیایی خاک و قطع برخی زنجیره های غذایی در این محیط خواهد شد (Sheppard et al., 1998). در مطالعه ی حاضر از کرم های خاکی Eisenia fetida Savigny به عنوان مدل جانوری در بررسی اثرات DEP سمی احتمالی استفاده شده است.

در دسته بندی های جدید که بر اساس میزان سمیت فتالات ها صورت گرفته' مشخص شده که DEP از سمیت متوسطی نسبت به سایر PAEs برخوردار است. در جانوران مختلف آسیب های وارد شده توسط PAEs به غلظت و مدت زمان برخورد با آنان بستگی تام داشته و لذا تاثیر مزمن آنان شدیدتر نیز خواهد بود. مطالعات مشخص نموده که PAEs با زنجیره الکیلی کوتاه تر و وزن مولکولی کم تر از حلالیت بیش تری در آب برخوردار هستند. نتایج دیگر بررسی ها نشان داده که در خاک و در طی ۲۴ ساعت در حدود ۴ درصد از ۱ میلی گرم در کیلوگرم خاک از DEP مورد تجزیه قرار می گیرد. در ۵ سانتی متر از سطح خاک های ماسه دار مقدار DEP بیشتراز نواحی عمیق تر این گونه ها خاک هاست. گاه تا ۱۵۰ سانتی متری عمق برخی خاک ها ذرات DEP یافت شده اند. نیمه عمر DEP در خاک در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد در حدود ۰/۷۵روز است. در امریکا میزان حضور DEP در نمونه های آب های

آشامیدنی از ۰/۰۱۰ تا ۱ میکروگرم در لیتر متغیر بوده که در نهایت اختلالات مختلفی را در بدن موجود زنده ایجاد می کند (US EPA, 1980 &1993; WHO, 2003) . در کرم های خاکی PAEs موجب القای استرس اکسیداتیو (OS) و بروز آسیب های گسترده و شدید در ژنوم (DNA) شده که در نتیجه آن از میزان قدرت سازگاری این جانوران با محیط به طور معنی داری کاسته می شود (Song et al., 2019). از سوی دیگر نتایج مطالعه ای دیگر در کرم های خاکی مشخص نموده که فتالات ها از جمله DEP با افزایش دهی اکسیداسیون سلولی موجب تحریک فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در بافت های بدن این جانوران شده اند (Wang et al., 2014). علاوه بر این بررسی ها نشان داده که در رده ی سلولی PC12 پس از تیمار با DEP بر میزان محتوی پروتیین های خانواده Bax افزوده شده که نتیجه آن القای مرگ سلولی به روش اپوپتازیس (Apoptosis) بوده است. در همین مطالعه DEP با افزایش میزان رادیکال های آزاد اکسیژنی (ROS) موجب مرگ سلولی شده است (Sun et al., 2012). موجودات زنده هوازی از یک سو نیازمند اکسیژن مولکولی (O_2) بوده و از سوی دیگر، متابولیت های آن نظیر رادیکال هیدروکسیل ($^{\bullet}OH$) ، آنیون سوپراکسید ($^{\bullet}O_2^-$) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می توانند بقای این موجودات را در معرض خطر قرار دهند. به متابولیت های مضر اکسیژن گونه های اکسیژن فعال (ROS) گفته شده که از جمله عوامل ایجاد آسیب های اکسیداتیو در سلول ها و بافت ها هستد. در مقابله با ROS سلول های بدن واجد سیستم دفاع آنتی اکسیدانی (آنزیمی و غیرآنزیمی) هستند. از آنتی اکسیدان های غیرآنزیمی می توان به گلوتاتیون احیا شده (GSH) و ویتامین E اشاره نمود. آنتی اکسیدان های آنزیمی نیز شامل کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و غیره هستند. OS وضعیت خطرناکی است که در زمان غلبه ROS بر قدرت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در بدن ایجاد می شود. از جمله نتایج آسیب رسان OS در سلول ها پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی (LPO) بوده که شامل مجموعه ای از واکنش های تخریب و تشکیل مجدد پیوندهای دوگانه در ساختار PUFA غشاهای زیستی است. LPO و محصول نهایی آن مالون دی آلدیید (MDA) موجب تخریب ساختار غشاء، مهار فعالیت های آنزیمی و تجزیه DNA سلولی می شوند (Halliwell and Gutteridge, 2015).

در رت های نر، تزریق دراز مدت DEP موجب افزایش وزن کبد و افزایش معنی دار آنزیم های نکروز کبدی در خون این جانوران شده است (Pereira et al., 2006). در سال ۲۰۱۵ نیز نشان داده شد که تزریق DEP به بدن رت ها موجب بروز اختلالات شدید کبدی و تجمع تری گلیسیریدها در این بافت شده است. همچنین در این مطالعه القای استرس اکسیداتیو به دنبال اثر DEP در جانوران تیمار شده به اثبات رسیده است (Akhtar, 2015). به هر حال با توجه به امکان رهایش DEP از محل اصلی خود و ورود آن به آب و خاک های اطراف، امکان آلوده سازی بی مهرگان خاکزی نظیر کرم های خاکی وجود داشته و در همین راستا مطالعه حاضر سعی در روشن سازی نحوه اثر DEP در کرم های خاکی *Eisenia fetida* Savigny را داشته است.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱- کرم های خاکی و شرایط نگهداری:

در آزمایشات این مطالعه کرم های خاکی *Eisenia fetida* Savigny با ناحیه کمربند تناسلی مشخص به عنوان نمونه های بالغ انتخاب گردیدند. محدوده وزنی کرم ها شامل ۴۰۰-۳۵۰ میلی گرم و با عمر تقریبی ۳ ماه بود که از شرکت مواد آلی کیانپارس در شیراز خریداری شده بودند. در ابتدا کرم ها در شرایط استاندارد به مدت یک هفته جهت سازگاری با محیط جدید در ظروف حاوی خاک طبیعی (جمع آوری شده از زمین های دانشگاه شهرکرد) نگهداری گردیدند. در ادامه کرم های خاکی به یک گروه شاهد منفی (بدون تیمار) و سه گروه تجربی (تیمار شده با سه غلظت از DEP) با سه تکرار مستقل تقسیم شده و در هر گروه حداقل ۲۰ نخ کرم قرار داده شد. رطوبت ۶۰ درصد، دمای ۲۲±۲ °C و دوره روشنایی ۱۲-۱۲ ساعت (نور- تاریکی) در طول مدت تیمارها حفظ گردید.

۲-۲- فتالات مورد استفاده: در این مطالعه ترکیب دی- اتیل فتالات (DEP) ($C_{12}H_{14}O_4$, CAS No. 84-66-2, 99.5% purity) خریداری شده از شرکت سیگما- الدریچ مورد استفاده قرار گرفت. سایر مواد شیمیایی مصرفی مورد استفاده در کار از طریق شرکت های داخلی خریداری گردیدند.

۲-۳- طرح آزمایش: بر اساس الگوی کار مشابه در مطالعات پیشین (Wang et al., 2018; Song et al., 2019) سه غلظت خیلی کم' کم و متوسط از DEP به ترتیب ۰/۱ ' ۱ و ۲ میلی گرم در کیلوگرم (mg/kg) خاک خشک در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند. در واقع این سه غلظت بر اساس متوسط غلظت DEP که در نمونه های خاک خشک کشاورزی بین ۰/۵۱ تا ۷/۱۶ میلی گرم در کیلوگرم است' انتخاب و تعیین گردیدند (Ma et al., 2015). کرم های خاکی در ظروف محتوی خاک طبیعی و DEP در دو دوره زمانی ۶ و ۱۲روزه نگهداری شدند. در انتها کرم ها را خارج نموده و پس از خرد کردن در بافر فسفات پتاسیم با روش فرا صوت (اولتراسونیک) از کرم ها عصاره کل بدن یا هوموژنیت (Homogenate) تهیه شد. جهت مهار فعالیت پروتئازی به هوموژنیت ها PMSF افزوده شد و در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند. برای سنجش های آنزیمی هوموژنیت ها به مدت ۱۰ دقیقه و با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه (در ۴ درجه سانتی گراد) سانتریفیوژ شده' سوپرناتانت آنان جدا و ضمن نگهداری در فریزر در آزمایشات بعدی استفاده گردیدند (Torabi Farsani et al., 2021).

۲-۴- بررسی فعالیت سلولاز (EC 3.2.1.4): این آنزیم مسئول تجزیه سلولز در غذای کرم های خاکی است. در این سنجش محلول سلولز همراه با بافر فسفاته (pH=6.4) به سوپرناتانت حاوی سلولاز اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. سپس به این مخلوط ۱ میلی لیتر از محلول ۳و ۵- دی نیترو اسید سالیسیلیک (DNS) را اضافه نمودیم و پس از آن مخلوط را به مدت ۱۵ دقیقه در آب جوشان قرار داده و بعد سرد نمودیم (تولید رنگ قرمز آجری). در انتها جذب نوری محلول قرمز رنگ را در طول موج ۵۵۰ نانومتر ثبت نمودیم. رنگ قرمز به علت عملکرد احیا کنندگی قند بر DNS بوده که ترکیبات آمینو (Amino) قرمز رنگ را در محیط آزاد نموده است (Mishra and Dash, 1980).

۲-۵- بررسی فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD, EC 1.15.1.1): در این روش عملکرد آنزیم آنتی اکسیدانی SOD که مسئول تجزیه و حذف رادیکال آنیون سوپراکسید ($^{\bullet}O_2^-$) است' سنجیده شده است. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از هوموژنیت به ۸۸۰ میکرولیتر از بافر کربنات سدیم ۰/۰۵ مولار (pH برابر ۱۰/۲) اضافه شد. سپس به مخلوط ۲۰ میکرولیتر از اپی نفرین ۳۰ میلی مولار در اسید استیک (۰/۰۵ درصد) اضافه گردید. در انتها میزان جذب نوری در طی ۴ دقیقه در طول موج ۴۸۰ نانومتر ثبت گردیدند. یک واحد از آنزیم عبارت است از مقدار آنزیمی که بتواند ۵۰ درصد از روند اوتواکسیداسیون اپی نفرین را مهار نماید (Misra and Fridovich, 1972).

۲-۶- تجزیه و تحلیل آماری داده ها: تمامی داده ها به صورت Means ± Standard Deviation (SD) نمایش داده شده اند. جهت مقایسه آماری بین گروه ها از روش آماری One way-ANOVA و پس آزمون Tukey's HSD استفاده شد. در آنالیزها نرم افزار SPSS و سطح معنی داری $p<۰/۰۵$ مورد استفاده قرار گرفت.

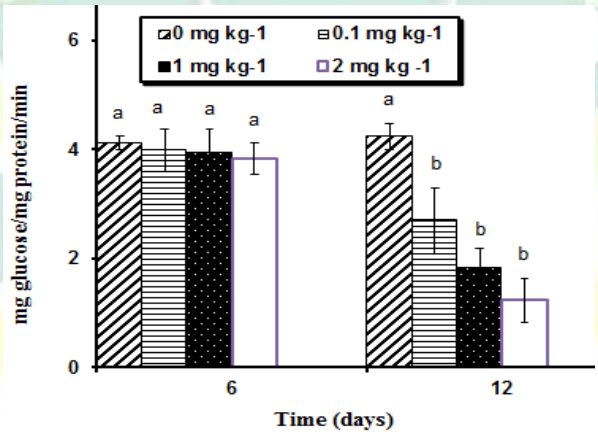
۳. نتایج و بحث

۳-۱- بررسی تغییر در فعالیت سلولاز: در شکل ۱ داده ها نشان می دهند که فعالیت سلولاز تحت تاثیر در تیمارهای مختلف سیر کاهشی داشته و این کاهش فقط در تیمارهای ۱۲ روزه معنی دار ($p<۰/۰۵$) بوده است. حداکثر مهار آنزیمی در تیمار mg/kg ۲ از DEP به میزان ۷۰/۹۲ درصد در پایان ۱۲روز تیمار بوده است.

سلولز ، پلیمر طبیعی تجدیدپذیر، جهت تامین انرژی جانورانی نظیر علف خواران و کرم های خاکی به مصرف می رسد. سلولاز مسئول تجزیه سلولز بوده که در واقع کمپلکس سه تایی از آنزیم ها بوده که در صنعت (آب میوه' مواد شوینده' بیواتانول و کاغذسازی)

و در غذای دام (بهبود هضم) مورد استفاده دارد (Ejaz et al., 2021). فعالیت سلولازی در بخش عقبی بدن کرم های خاکی در محدوده روده بیشتراز دیگر نواحی سیستم گوارش بوده که مرتبط با فعالیت باکتری های گرم منفی مقیم در بخش میانی روده است (وجود همبستگی مثبت بین فعالیت سلولزی و فعالیت های میکروبی). فعالیت سلولازی در بدن کرم های خاکی به ویژه در تولید کود بیولوژیکی ورمی کمپوست (Vermicompost) از ضایعات گیاهی و کود گاوی بیشترخود را نشان داده و بدون آن تجزیه مواد در طبیعت با مشکل روبرو خواهد شد (Mishra and Dash, 1980; Sukumaran et al., 2005). در سال ۲۰۱۸ تیم تحقیقاتی ما نشان داد که در عصاره کل بدن و نیز مایع سلومی کرم های خاکی Allolobophora Chlorotica فعالیت سلولازی وجود دارد. این آنزیم مقاوم به تغییرات دما بوده و محیط قلیایی بر فعالیت آن می افزاید (Kamalzaeia et al., 2018). سلولاز از جمله سیستم های آنزیمی حساس به حضور آلاینده ها در محیط بوده که تحت تاثیر سمیت آنان دچار تنظیم کاهشی شده و عملکرد آن در بیشترموارد دچار مهار می شود (Shi et al., 2007).

تاکنون بررسی های اندکی بر روی اثر PAEs به ویژه DEP بر فعالیت سلولازی خاک و نیز کرم های خاکی به انجام رسیده است. ذرات PAEs تحت تاثیر تغییرات محیطی نظیر دما و اسیدیته به راحتی از محل اولیه خود در محصولات پلاستیکی جدا و پس از ورود به محیط در نهایت می توانند موجب بروز سمیت در بدن موجودات زنده شوند (Derraik, 2002; Fan et al., 2021). آلودگی ناشی از ورود PAEs به خاک موجب کاهش فعالیت سلولازی میکروب ها شده و بر باروری خاک نیز اثر منفی خواهد دارد (Xie et al., 2010). برخی دیگر از آلاینده ها مثل آفت کش ها بر عملکرد سلولاز تاثیر داشته به طوری که اندوسولفان (Farrukh, 2017) و تبوکونازول (Chen et al., 2018) پس از ورود به خاک به صورت وابسته به غلظت با القای آسیب های اکسیداتیو موجب مهار سلولاز در بدن کرم های خاکی شده اند. از سوی دیگر یون های فلزی نیز پس از آلوده سازی خاک موجب مهار فعالیت سلولازی در بدن کرم های خاکی شده اند (Wu et al., 2012).



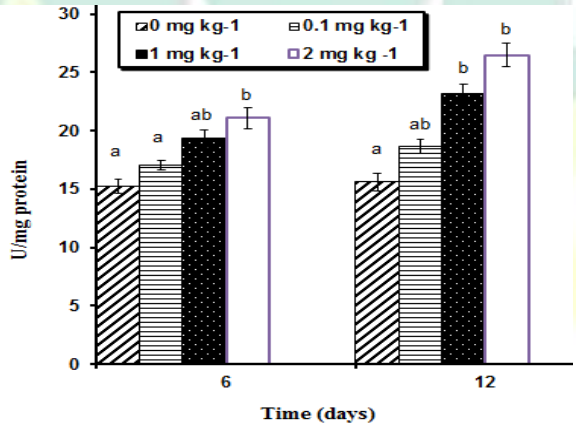
شکل ۱: تغییر در فعالیت سلولاز در تیمار با DEP (حروف غیرهمنام از نظر آماری اختلاف معنی دار (p<۰/۰۵) دارند).

۳-۲- بررسی تغییر در فعالیت SOD: داده های موجود در شکل ۲ بیانگر تاثیر تیمارهای DEP بر فعالیت SOD بوده به طوری که یک روند افزایشی را نشان می دهد. این افزایش در فعالیت آنزیمی SOD وابسته به افزایش در غلظت DEP بوده است. بیش ترین میزان افزایش معنی دار (p<۰/۰۵) در فعالیت آنزیم مربوط به تیمار ۲ mg/kg در پایان ۱۲ روز به مقدار ۶۹/۷۷ درصد است.

هر گاه در شرایط غیرطبیعی سرعت تولید مواد اکسیدان نظیر رادیکال های آزاد بیشتراز سرعت خنثی سازی یا حذف شان توسط سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی (آنزیمی و غیر آنزیمی) باشد' شرایط OS در سلول ها و بافت ها پدیدار شده که نتیجه آن بروز آسیب

های اکسیداتیو در غشاهای زیستی و ژنوم است. بر همین اساس فعال شدن آنزیم های دفاع آنتی‌اکسیدانی نظیر SOD در زمان بروز OSاجتناب ناپذیر است (Pastore et al., 2003). هر موجود زنده‌ای که بهره کم تری از سیستم دفاع آنتی اکسیدانی داشته باشد، حساسیت بیش‌تری به OS و روندهای مربوط به آن نظیر اکسیداسیون های لیپیدی و پروتیینی خواهد داشت. پس از عمل آنتی اکسیدان ها' ماکرومولکول ها محفوظ خواهند ماند (Halliwell & Gutteridge, 2015). SOD به عنوان یک آنزیم آنتی اکسیدانی مسئول حذف آنیون سوپراکسید در محیط های سلولی بوده که در نتیجه آن امکان شکل گیری آب اکسیژنه و سپس رادیکال تهاجمی هیدروکسیل از بین رفته و بدین ترتیب از گسترش آسیب های اکسیداتیو بیشتردر ساختارهای سلولی جلوگیری به عمل خواهد آمد (Gill and Tuteja, 2010; Halliwell & Gutteridge, 2015).

در تاثیر دو نوع فتالات DBP و DEHP فعالیت SOD بین ۳۷ تا ۴۲ درصد افزایش معنی دار پیدا نمود (Gao et al., 2019). در پژوهشی دیگر مشخص گردید که SOD در ۷ روز اول تیمار کرم های خاکی با DMP' افزایش فعالیت داشته اما در دراز مدت فعالیت آن مهار گردیده است (Du et al., 2015). علت این مهار آن است که در شرایط OS گاه به علت حضور مقادیر زیادی از رادیکال های آزاد سیستم های آنتی اکسیدانی اشباع شده و ضمن تغییر ساختار دچار کاهش یا مهار شده و در همین راستا نیز مهار فعالیت SOD قابل توجیه خواهد بود (Wu et al., 2011). در هر حال این نتایج در همسویی با نتایج مطالعه حاضر بوده که در آن فعالیت SOD در تیمارهای مختلف از DEP افزایش داشته و در پایان هر دو دوره زمانی ۶ و ۱۲ روزه بیش ترین غلظت فتالات موجب بیش ترین افزایش در فعالیت SOD شده است. در مقابل در سال ۲۰۲۱ نشان داده شد که فتالات ها و برخی از متابولیت های آنان موجب کاهش معنی دار در فعالیت SOD شده اند (Fan et al., 2021). در همین راستا مطالعات نشان داده که میزان فعالیت SOD در کرم های خاکی مقیم مناطق آلوده به مواد شیمیایی مختلف به طور معنی داری بالاتر از مناطق بدون آلودگی است (Aasagba et al., 2020). با توجه به موارد بالا می توان اظهار نمود که در پژوهش حاضر تیمارهای DEP با القای OS موجب گسترش آسیب های اکسیداتیو و در نهایت افزایش فعالیت SOD در جهت حفظ ساختارهای سلولی شده اند.



شکل ۲: تغییر در فعالیت SOD در تیمار با DEP (حروف غیرهمنام از نظر آماری اختلاف معنی دار (p<۰/۰۵) دارند).

۴. نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این پژوهش می توان عنوان نمود که DEP با القای استرس اکسیداتیو موجب گسترش آسیب های اکسیداتیو و در نهایت افزایش فعالیت سیستم آنتی اکسیدانی SOD و هم زمان کاهش فعالیت سیستم آنزیمی سلولاز در بدن کرم های خاکی مورد

آزمایش شده است. مجموع این تغییرات احتمالا موجب کاهش دسترسی به منابع سلولزی جهت تامین انرژی توسط کرم های خاکی خواهد شد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از مسئولین محترم دانشگاه شهرکرد بابت حمایت مالی، و از آقای دکتر محمدشادخواست به جهت همکاری بی شائبه شان، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع:

1. Aasagba S.O., Ichipi-ifukor P.C. and Okwudibie C. 2020. Oxidative Stress and Antioxidant Parameters in Earthworm (*Esiena fetida andrei*); a Probable index of Environmental Pollution Status. Journal of Applied Science and Environmental Management, 24(8): 1375-1382.

2. Akhtar S. 2015. Histopathological evaluation of di-ethyl phthalate induced hepatotoxicity on rat. MOJ Toxicology, 1(4): 133-136.
3. Chen J., Saleem M., Wang C., Liang W.and Zhan Q. 2018. Individual and combined effects of herbicide tribenuron-methyl and fungicide tebuconazole on soil earthworm *Eisenia fetida.* Scientific Reports, 8: 2967. 4. Derraik J.G. 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. Marine Pollution Bulletin, 44(9): 842-852.
5. Du L., Li G., Liu M., Li Y., Yin S., Zhao J. and Zhang X., 2015. Evaluation of DNA damage and antioxidant system induced by di-n-butyl phthalates exposure in earthworms (*Eisenia fetida*). Ecotoxicology and Environment Safety, 115: 75-82.
6. Ejaz U., Sohail M. and Ghanemi A. 2021. Cellulases: From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications. Biomimetics, 6: 44.
7. Fan X., Gu C., Cai J., Bian Y., Yang X., Sun C. and Jiang X. 2021. Study on active response of superoxide dismutase and relevant binding interaction with bioaccumulated phthalates and key metabolites in *Eisenia fetida*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 223: 112559.
8. Farrukh S. 2017. Chronic effects of endosulfan on acetylcholinesterase and cellulase enzyme activity of earthworm *Eisenia foetida*. MOJ Toxicology, 3(3): 68-72.
9. Gao M., Xu Y., Dong Y., Song Z. and Liu Y. 2019. Accumulation and metabolism of di(n-butyl) phthalate (DBP) and di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in mature wheat tissues and their effects on detoxification and the antioxidant system in grain. Science of the Total Environment, 697: 133981.
10. Gill S.S. and Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, 48 (12): 909-930.
11. Halliwell B. and Gutteridge J.M. 2015. Free Radicals in Biology and Medicine. 5th Edition. Oxford University Press.
12. Hund-Rinke K. and Wiechering H. 2001. Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. Journal of Soils and Sediments, 1: 15-20.
13. Kamalzaeia N., Arabi M. and Hemmati R. 2018. A Novel Cellulase from the Earthworm *Allolobophora Chlorotica*. Biomacromolecular Journal, 4(1): 7-15.
14. Lovecamp-Swan T. and Davis B.J. 2003. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. Environmental Health Perspectives, 111(2): 139-145.
15. Ma T.T., Wu L.H., Chen L., Zhang H., Teng Y. and Luo Y.M. 2015. Phthalate esters contamination in soils and vegetables of plastic film greenhouses of suburb Nanjing, China and the potential human health risk. Environmental Science and Pollution Research, 22(16): 12018-12028.
16. Mishra P.C. and Dash M.C. 1980. Digestive enzymes of some earthworm. Experimentia, 36(10): 1156-1157.
17. Misra H.P. and Fridovich I. 1972. The role of superoxide anion in the auto oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. Journal of Biological Chemistry, 247: 3170-3175.

18. Pastore A., Piemonte F., Locatelli M., Russo A.L., Gaeta L.M., Tozzi G. and Federici G., 2003. Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects. Clinical Chemistry, 47(8): 1467-1469.
19. Pereira C., Mapuskar K. and Rao C.V. 2006. Chronic toxicity of diethyl phthalate in male Wistar rats-A dose-response study. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 45(2): 169-177.
20. Sheppard S., Bembridge J., Holmstrup M. and Posthuma L. 1998. Advances in Earthworm Ecotoxicology. SEATAC Press, Amsterdam.
21. Shi Y., Shi Y., Wang X., Lu Y. and Yan S. 2007 .Comparative Effects of Lindane and Deltamethrin on Mortality, Growth, and Cellulase Activity in Earthworms (*Eisenia fetida*). Pesticide Biochemistry and Physiology, 89 :31-38.
22. Song P., Gao J., Li X., Zhang C., Zhu L., Wang J. and Wang J. 2019. Phthalate induced oxidative stress and DNA damage in earthworms (*Eisenia fetida*). Environment International, 129: 10-17.
23. Sukumaran R.K., Singhania R.R. and Pandey A. 2005. Microbial cellulases Production, applications and challenges .Journal of Scientific & Industrial Research, 64: 832-844.
24. Sun Y., Takahashi K., Hosokawa T., Saito T. and Kurasaki, M., 2012. Diethyl Phthalate Enhances Apoptosis Induced by Serum Deprivation in PC12 Cells. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 111: 113-119.
25. Torabi Farsani A., Arabi M. and Shadkhast M. 2021. Ecotoxicity of chlorpyrifos on earthworm *Eisenia etida* (Savigny, 1826): Modifications in oxidative biomarkers. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 249: 109145.
26. US EPA (United State Environmental Protection Agency) 1980. Office of Water Regulations and Standards, Criteria and Standard Division, EPA-440/5-80-067, Washington DC.
27. US EPA (1993) .Integrated Risk Information System: Diethyl phthalate (CASRN 84-66-2). Environmental Protection Agency, Washington DC, USA. http://www.epa.gov/iris/subst/0226.htm.
28. Wang Y., Ma Z.M. and Wu S.J. 2014. Study on the effect of enzymatic activity and acutetoxicity of three PAEs on *Eisenia fetida*. Environmental Science, 35 (2): 770-779.
29. Wang G., Wang J., Zhu L., Wang J., Li H., Zhang Y., Liu W. and Gao J. 2018. Oxidative damage and genetic toxicity induced by DBP in earthworms (*Eisenia fetida*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 74 (4): 527-538.
30. WHO (World Health Organization), 2003. DIETHYL PHTHALATE. Concise International Chemical Assessment Document 52, Geneva, ISSN 1020-6167.
31. Wu S., Wu E., Qiu L., Zhong W. and Chen J. 2011. Effects of phenanthrene on the mortality, growth, and anti-oxidant system of earthworms (*Eisenia fetida*) under laboratory conditions. Chemosphere, 83(4): 429-434.
32. Wu B., Liu Z., Xu Y., Li D. and Li M. 2012. Combined toxicity of cadmium and lead on the earthworm *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). Ecotoxicology and Environmental Safety, 81: 122-126.
33. Xie H.G., Shi Y.J, Zhang J., Cui Y., Teng S.X., Wang S.G. and Zhao R. 2010. Degradation of phthalate esters (PAEs) in soil and the effects of PAEs on soil microcosm activity. Chemical Technolohy and Biotechnology, 85(8): 1108-1116.

Evaluation of the impact of expired tebuconazole on earthworm *Eisenia fetida*

Somaye Naderi [1], Mehran Arabi [2*]

1- MSc student in Animal physiology, Animal sciences group, Faculty of basic sciences, Shahrekord university
2- Associate Prof. in Animal physiology, Animal sciences group, Faculty of basic sciences, Shahrekord university
* *mehranarabi@hotmail.com*

Abstract

Pesticides become expired when they can no longer be used for their intended purpose and efficiency. In toxicology, earthworms are used as sensitive bio-indicators in detecting many of environmental contaminants. Many invertebrates can absorb pesticides from the soil into their bodies and accumulate the pesticide residues in their tissues several times greater than those in the surrounding soil. In this study, we aimed to assess the impact of expired tebuconazole as a fungicide on earthworm *Eisenia fetida*. The LC_{50} for expired tebuconazole was calculated by probit method as ≥1213 mg/kg dry soil. Earthworms were exposed to 1/5, 1/10 and 1/20 of LC_{50} of fungicide for 4 and 8 days. After exposure times, the homogenates were made from earthworms. The oxidative biomarkers namely lipid peroxidation (LPO) content and content of carbonylated proteins (CP) in homogenates were measured spectrophotometrically. In addition, avoidance test (ANR %) was performed as a behavioral examination. The histopathological analyses were also performed .Our data revealed that expired tebuconazole could increase the LPO and CP contents, and also increase the earthworm migrations (ANR%) from polluted to control soil. Histopathological damages were observed in the surface (Epidermis and circular muscle layer) of earthworm's body .Briefly, expired tebuconazole have potency to induce oxidative stress and damage the earthworm's surface body resulting in the physiological disorders.

Keywords: Expired fungicide, Earthworm, Behavioral test, Histopathology, Oxidative stress.

بررسی تاثیر تبوکونازول منقضی شده بر کرم خاکی Eisenia fetida

سمیه نادری [۱]؛ مهران عربی [۲*]

۱- دانشجو کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد

۲- دانشیار فیزیولوژی جانوری، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد

* mehranarabi@hotmail.com

چکیده

آفت کش ها در زمان منقضی شدن تاریخ مصرف شان، فاقد اثربخشی لازم برای مقابله با آفات هستند. در مطالعات سم شناسی، کرم های خاکی به عنوان اندیکاتورهای زیستی حساس در ردیابی بسیاری از آلاینده های زیست محیطی استفاده می شوند. بسیاری از بی مهرگان قادر به جذب آفت کش ها از خاک به درون بدن خود بوده که گاه بقایای این مواد بسیار بیش تر از آن چیزیست که در محیط وجود دارد. در این مطالعه هدف ما ارزیابی تاثیر تبوکونازول منقضی شده (Expired) به عنوان یک قارچ کش بر کرم های خاکی Eisenia fetida بوده است. LC_{50} برای تبوکونازول منقضی شده به میزان ۱۲۱۳ $\geq$ mg/kg dry soil به وسیله روش Probit محاسبه گردید. کرم های خاکی در معرض غلظت‌های $\frac{1}{5}$ ، $\frac{1}{10}$ و $\frac{1}{20}$ از LC_{50} قارچ کش به مدت ۴ و ۸ روز قرار داده شدند. پس این دوره های زمانی از کرم‌ها هوموژنیت (عصاره کل بدن) تهیه شد. بیومارکرهای تنش اکسیداتیو یعنی محتوی پراکسیداسیون لیپیدها (LPO) و پروتیین های کاربولینه شده به روش اسپکتروفوتومتری در هوموژنیت ها اندازه‌گیری شدند. هم چنین تست گریز از محل (ANR%) به عنوان یک بررسی رفتاری به انجام رسید. آنالیزهای هیستوپاتولوژیکی نیز به انجام رسید. داده های ما آشکار نمود که تبوکونازول منقضی شده توانسته موجب القای تنش اکسیداتیو، افزایش محتوی LPO و CP شده و نیز افزایش مهاجرت (ANR%) از خاک های آلوده به قارچ کش به سوی خاک شاهد گردد. آسیب های هیستوپاتولوژیکی در سطح بدن (اپیدرم و لایه عضانی حلقوی) کرم های خاکی مشاهد شدند. خلاصه این که، تبوکونازول منقضی شده واجد توانایی لازم برای القای تنش اکسیداتیو و ایجاد آسیب در سطح بدن کرم های خاکی بوده که نتیجه آن بروز اختلالات فیزیولوژیکی است.

واژگان کلیدی: قارچ کش منقضی شده، کرم خاکی، تست رفتاری، هیستوپاتولوژی، تنش اکسیداتیو.

۱. مقدمه

امروزه نیاز غذایی روزافزون در دنیا باعث شده که آفت کش ها (Pesticides) به منظور پیشگیری و یا نابودی آفات در مزارع و باغات مورد استفاده فراوان داشته باشند. مطالعات مختلف نشان داده که اکثر آفت‌کش‌ها به محض ورود به محیط و تاثیر بر آفات مورد هدف واجد توانایی آلوده سازی و ورود به بافت‌های بدن موجودات زنده اطراف بوده و بدین ترتیب به موجودات زنده غیرهدف (Non-target) (از میکروب ها تا انسان) اطراف خود آسیب های مختلفی را وارد می سازند. از آن جایی که خاک غنی از مواد آلی برای تغذیه گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم است لذا ورود آلاینده هایی مثل آفت کش ها به درون آن، موجب ناپایداری خاک شده که نتیجه آن اختلال در شکل گیری زنجیره های غذایی خواهد بود (Wang et al., 2012; Tudi et al., 2021). از جمله موجودات زنده غیرهدف در اکوسیستم های خاکی که به شدت نسبت به تاثیرات منفی آفت کش ها حساس هستند می توان به انواع کرم های خاکی (Earthworms) اشاره نمود. امروزه این جانوران در بسیاری از آزمایشات سم شناسی (Toxicology) و دیگر ارزیابی های زیست محیطی به دلیل نقش مهمی که در تقویت خاک از طریق فرآیندهای زیستی و فیزیکوشیمیایی دارند و نیز به علت پراکنش گسترده

ای که در انواع خاک ها دارند , به عنوان مدلی مناسب مورد استفاده قرار می گیرند. کرم های خاکی به دلیل رشد و تکثیر سریع و نیز جمع آوری آسان و هم چنین دوره تولیدمثلی کوتاهی که دارند در مطالعات مختلف علمی مورد کاربرد فراوان دارند. کرم های خاکی به عنوان مهندسین خاک معرفی شده زیرا با عملکرد خود موجب حاصلخیزی هر چه بیش تر خاک شده و لذا هر گونه آسیب به آنان موجبات ضعیف شدن ساختار خاک را فراهم خواهد آورد (Bustos-Obregon and Goicochea, 2002).

آفت کش ها بر اساس میزان کاربرد در سه گروه اصلی حشره کش ها, علف کش ها و قارچ کش ها طبقه بندی می شوند. انواع قارچ‌کش‌ها (Fungicides) در کشاورزی از جمله آفت‌کش‌های پر کاربرد بوده که برای مقابله و نابودسازی قارچ های پاتوژن و یا مهار رشد و نمو هاگ های (Spores) آنان مورد استفاده دارند. قارچ‌کش‌ها در مبارزه با آلودگی‌های قارچی در بدن حیوانات نیز کاربردهای زیادی دارند. بر اساس منشا, قارچ‌کش‌ها شامل دو دسته ی بیولوژیکی و شیمیایی هستند. علاوه بر این قارچ کش ها از نظر عملکردی به چهار گروه تماسی, لوکال, اکروپتال, و سیستمیک تقسیم بندی می شوند. انواع شیمیایی قارچ کش ها پس از ورود به محیط زیست, سایر موجودات زنده غیرهدف به ویژه انسان را تحت تاثیر اثرات منفی و آسیب رسان خود قرار داده از جمله این که با ایجاد مشکل در عملکردهای آنزیمی سبب بروز اختلالات فیزیولوژیکی در بدن آنان خواهند شد (Wang et al., 2012; Feliziani and Romanazzi, 2013).

تبوکونازول (Tebuconazole) [(RS)-1-p-chlorophenyl-4, 4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl) pentan-3-ol] متعلق به خانواده ی ترکیبات تریازولی و از انواع قارچ کش‌های سیستمیک با فرمول ساختمانی $C_{16}H_{22}ClN_3O$ بوده که در کنترل و مقابله با بسیاری از انواع قارچ‌های پاتوژن گیاهی(مهار سنتز ارگوسترول قارچی) از جمله انواع زنگ‌ها کاربرد موثر و فراوانی دارد. این آفت کش واجد پایداری زیادی در محیط زیست بوده و سرعت تجزیه و تخریب آن بسیار کند است. روند امولسینه شدن آن در آب سرد به انجام رسیده و میزان انحلال آن حدود ۲۵۰gr/L می باشد. کم ترین میزان LC_{50} برای این قارچ کش در سخت پوستان و بیش ترین آن در پستانداران و پرندگان مشاهده شده است. این سم از مسیر تنفسی, گوارشی و تماسی به بدن پستاندارانی مثل انسان و موش ها راه یافته و موجب مهار بیوسنتز هورمون های استرویییدی در آنان می شود (WHO, 2013). با توجه به پرکاربرد بودن قارچ کش هایی نظیر تبوکونازول در کشاورزی و این که سمیت ناشی از تجمع آنان در بافت های بدن موجودات زنده غیرهدف به ویژه انواع خاکزی مهم بوده و حاصلخیزی خاک را دستخوش تغییر می کند, لذا مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات سمی احتمالی قارچ کش تبوکونازول منقضی شده (تاریخ مصرف گذشته) (Aged=Expired) در بدن کرم خاکی *Eisenia fetida* طراحی شده است. هدف از انجام این مطالعه اثبات اثرات سمی و آسیب رسان آفت کش های منقضی شده در موجودات زنده خاکزی بوده است. در تصور عمومی اعتقاد بر این است که آفت کش های منقضی شده عموما غیرسمی و غیرفعال بوده و خطری را متوجه محیط زیست نمی کنند و لذا بدون رعایت ملاحظات بهداشتی آنان را بیرون ریخته و دفع می کنند. با این وصف در این مطالعه ما بر آن شدیم تا نشان دهیم که این قبیل سموم کماکان قدرت سمیت خود را حفظ نموده و قادر به ایجاد تغییرات ناخواسته فیزیولوژیکی در بدن کرم های خاکی به عنوان جانوران سهیم در حاصلخیزی خاک, هستند.

بسیاری از پژوهش های زیست محیطی نشان داده که غالب آفت کش ها پس از استفاده و نابودسازی آفات به طور ناخواسته و گاه به میزان زیاد به درون ساختار زیستی محیط اطراف راه یافته و ضمن تجمع در آن مناطق موجب بروز آسیب های متنوع بافتی در بدن موجودات زنده مقیم در آن نقاط خواهند شد. در برخی دیگر از مطالعات و ارزیابی های محیطی نیز مشخص شده که ذرات و یا

بقایای آفت کش ها از مسیر استنشاق و آب های سطحی و حتی زیرسطحی در نهایت به بدن انسان وارد شده و بدین ترتیب عامل بروز برخی بیماری ها خواهند شد (Schwingl et al., 2021).

از جمله آسیب های مهم وتاثیر گذار در ارتباط با سمیت آفت کش ها در بدن موجودات زنده غیرهدف می توان به آسیب های اکسیداتیو (Oxidative damages) اشاره نمود. هر چند که موجودات زنده برای ادامه بقای خود نیازمند اکسیژن مولکولی (O_2) هستند اما چنانچه در معرض مقادیر زیادی از این گاز قرار بگیرند این روند معکوس شده و اکسیژن به عنوان یک عامل آسیب رسان در بدن وارد عمل می شود. متابولیت های O_2 با نام گونه های اکسیژن فعال (ROS) معرفی شده و از انواع این متابولیت ها که دارای اثرات مخرب زیستی (آسیب های اکسیداتیو سلولی) هستند می توان به رادیکال هیدروکسیل ($^{\bullet}OH$) و آنیون سوپراکسید ($^{\bullet}O_2^-$) اشاره نمود. سلول ها و بافت های بدن به منظور مقابله با آسیب های اکسیداتیو و مهار تخریب سلولی ناشی از عملکرد ROS ها مجهز به سیستم دفاع آنتی اکسیدانی شامل دو نوع آنزیمی و غیرآنزیمی هستند. مطالعات نشان داده که آلاینده های زیست محیطی از جمله افت کش ها دارای قدرت القای تنش اکسیداتیو (OS) در بدن موجودات زنده هستند. OS هنگامی پدیدار می گردد که تولید ROS به طور غیرطبیعی افزایش یافته و در مقابل دفاع آنتی اکسیدانی از قدرت کافی برای مهار و حذف آنان برخوردار نباشد (Halliwell and Gutteridge, 2015). در همین راستا شواهد علمی زیادی نشان داده اند که از جمله نتایج مخرب و منفی گسترش OS در بافت ها انتشار پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی (Lipid peroxidation) یا LPO بوده که اساس شکل گیری آن بر پایه مراحل مختلف اکسیداسیون و تغییر ماهیت در ساختار اسیدهای چرب غیراشباع (PUFA) در غشاهای سلولی و نیز اندامکی است. با گسترش هر چه بیش تر LPO اختلالات سلولی و بافتی نیز بیش تر شده تا جایی که امروزه یکی از موارد حتمی از اختلالات در علت شناسی برخی بیماری ها القای روند LPO است. در نهایت LPO علاوه بر ایجاد آسیب های غشایی و آنزیمی، موجب بروز شکستگی و تجزیه در ژنوم (DNA) نیز شده که در بسیاری از موارد تغییرات عملکردی در ژن ها را به دنبال خواهند شد (Birben et al., 2012; Mas-Bargues et al., 2021).

نتایج مطالعات نشان داده که قارچ کش تبوکونازول پس از استفاده در نهایت به راحتی در محیط های آبی وارد و حل شده و از آن جایی که زمین‌های کشاورزی در نزدیکی منابع آب نیز قرار دارند، لذا استفاده از تبوکونازول موجب آلوده سازی آب ها شده که ضمن ورود به بدن آبزیان موجب بروز آسیب های اکسیداتیو از جمله LPO و مرگ سلولی در آنان خواهد شد (Ferreira et al., 2012). در سال ۲۰۲۰ نیز نشان داده شده که تبوکونازول موجب اختلال در کار کبد (هپاتوتوکسیسیتی) در لارو ماهیان گورخری مورد مطالعه شده است. در همین بررسی مشخص شد که به دنبال اثر تبوکونازول در ماهیان، تولید ROS افزایش یافته که نتیجه آن بروز اپوپتازیس در هپاتوسیت ها بوده است (Li et al., 2020). در سال ۲۰۲۱ ، Freitas و همکارانش نشان دادند که سمیت تبوکونازول در خفاش های میوه خوار استوایی موجب القای OS و تغییر در فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در سلول های کبد این جانوران شده و هم‌چنین آسیب های بافتی در کبد به صورت التهاب و انسداد مجاری بوده است. در مطالعات دیگر مشخص شده که سمیت ایجاد شده با تبوکونازول در بروز بیماری کبد چرب غیرالکلی موثر بوده زیرا موجب تجمع چربی ها در سلول های مورد آزمایش شده است (Kwon et al., 2021). در کرم های خاکی اثرات تبوکونازول تازه به میزان کمی مطالعه شده است برای مثال در سال های اخیر (Chen et al., 2018) مشخص گردید که تبوکونازول موجب القای OS در کرم های خاکی شده اما با این حال تاکنون هیچ گزارشی در ارتباط با تاثیر سمیت تبوکونازول منقضی شده در کرم های خاکی در دسترس نمی باشد. با توجه به موارد بالا پژوهش حاضر به بررسی تاثیر قارچ کش تبوکونازول منقضی شده بر میزان تغییرات فعالیت بیومارکرهای OS و رفتار مهاجرتی کرم های خاکی *Eisenia fetida* پرداخته است.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱- کرم های خاکی و شرایط نگهداری

کرم های خاکی *Eisenia fetida* مورد استفاده از نوع بالغ با کمربند تناسلی کامل و با محدوده وزنی ۴۰۰-۳۵۰ میلی گرم بودند. کرم ها از شرکت مواد آلی کیانپارس در شیراز تهیه شدند. کرم ها پس از سازش با شرایط جدید در آزمایشگاه (یک هفته در خاک طبیعی زمین های دانشگاه شهرکرد) به یک گروه شاهد (بدون تیمار) و سه گروه تجربی (تیمار شده با سه غلظت از آفت کش) هر یک با سه تکرار مستقل تقسیم شدند. هر گروه شامل حداقل ۲۰ نخ کرم بود. کرم های خاکی در ظروف پلاستیکی یک بار مصرف با رطوبت ۶۰ درصد' دمای حدود ۲±۲۲ °C و دوره روشنایی ۱۲-۱۲ ساعت (نور- تاریکی) نگهداری شدند.

۲-۲- آفت کش تبوکونازول (Tebuconazole)

قارچ کش تبوکونازول تازه (Fresh) با ماده موثره ۲ درصد و خلوص بالای ۹۹ درصد از شرکت آریا شیمی خریداری و کیسه محتوی قارچ کش در زمان خرید باز گردید. پس از گذشت ۳ سال از نگهداری در انبار آزمایشگاه محتوی این کیسه به عنوان تبوکونازول منقضی شده (Expired) در پژوهش حاضر استفاده گردید. دیگر مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت های داخلی تهیه گردیدند.

۲-۳- تعیین متوسط غلظت کشندگی (LC_{50}) تبوکونازول منقضی شده

به منظور تعیین میزان LC_{50} برای کرم های خاکی *Eisenia fetida* از روش پروبیت (Probit) (نسبت غلظت آفت کش به میزان مرگ و میر) توسط نرم افزار SPSS استفاده گردید. در این روش ۷ روزه غلظت های افزایشی از آفت کش (با ۲۰ نخ کرم در هر غلظت) مورد استفاده قرار گرفته و در انتهای آزمایش غلظتی که توانسته بود ۵۰ درصد از کرم های خاکی را از بین ببرد به عنوان LC_{50} محاسبه و در نظر گرفته شد.

۲-۴- طراحی اجرای آزمایشات

در این طراحی قارچ کش تبوکونازول منقضی شده با سه غلظت زیر حدکشندگی ($\frac{1}{5}$ ، $\frac{1}{10}$ و $\frac{1}{20}$ از LC_{50}) در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفت. کرم های خاکی در ظروف محتوی خاک طبیعی و آفت کش در دو دوره زمانی ۴ و ۸ روز نگهداری شدند. پس از اتمام این دو دوره زمانی کرم ها جدا و در بافر فسفات پتاسیم حاوی EDTA با استفاده از روش اولتراسونیک خرد شده و از آنان عصاره کل بدن یا هوموژنیت (Homogenate) تهیه شد. هوموژنیت ها تا زمان استفاده در فریزر ۷۰- درجه قرار داده شدند. به منظور شروع سنجش ها هوموژنیت ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و سوپرناتانت (Supernatant) آنان جدا و استفاده گردید.

۲-۵- ارزیابی تغییر در فعالیت/محتوی بیومارکرهای تنش اکسیداتیو

۲-۵-۱- ارزیابی تغییر در محتوی پراکسیداسیون لیپیدها (LPO)

در این روش برای بررسی میزان تولید MDA به عنوان یکی از محصولات فرعی LPO که از انواع TBARS (محصولات پراکسیداسیون لیپیدی واکنش دهنده با اسید باربی تیوریک) است از سوپرناتانت هوموژنیت کرم ها استفاده شده است. در این روش ۵۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت به یک میلی لیتر از TCA ۱۰ درصد اضافه شده و مخلوط گردید. مخلوط حاصله به مدت ۱۰ دقیقه با دور g× ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. به مایع بالایی حاصله TBA اضافه نمودیم و میزان جذب نوری MDA تولید شده در طول موج ۵۳۲ نانومتر ثبت شد (Buege and Aust, 1978).

۲-۵-۲- ارزیابی تغییر در محتوی پروتیین های اکسید شده (کاربولینه)(Carbolynated proteins = CP)

برای این منظور از روش Levine و همکاران (۱۹۹۴) استفاده شد. خلاصه آن که مقداری از سوپرناتانت نمونه ها همراه با ترکیب DNPH (۲و۴- دی نیتروفنیل هیدرازین) ۱۰ میلی مولار (حل شده در اسید کلریدریک) به مدت یک ساعت در دمای قرار داده شدند. سپس محلول ۱۰ درصد TCA به مخلوط قبلی افزوده گردید و با دور g× ۳۰۰۰ برای حداقل ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید.

رسوب (Pellet) حاصله پس از شستشو در ترکیب گوانیدین با فسفات پتاسیم (pH =۲/۳) حل شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. در انتها میزان جذب نوری (OD) نمونه ها در طول موج ۳۷۰ نانومتر ثبت گردیدند.

۳-۵-۲- تست رفتاری درصد خالص گریز از محل یا ANR% (Hund-Rinke and Wiechering, 2001)

دو توده خاک در یک ظرف یک بار مصرف (دو نیمه ی چپ و راست) ریخته شدند. به یک توده خاک غلظت های مختلف از آفت کش اضافه شد و توده خاک دیگر به عنوان شاهد (بدون آفت کش) در نظر گرفته شد. یک خط مرزی را بین دو توده ی خاک در ظرف مشخص نموده و بر روی آن ۲۰ نخ کرم قرار داده شد. به توده های خاک مقداری آب اضافه کرده، درب ظرف ها را بسته و در محلی تاریک در دمای اتاق به مدت ۴۸ ساعت قرار دادیم. در انتهای کار ظروف را خارج نموده و تعداد کرم های خاکی را در دو توده خاک (شاهد و آلوده به آفت کش) شمارش نمودیم. تعداد را در فرمول زیر وارد نمودیم که در آن N تعداد کل کرم ها در شروع آزمایش و C و T به ترتیب تعداد کرم ها در خاک های شاهد و آلوده هستند:

$$\text{Avoidance net rate \%} = \left(\frac{C-T}{N}\right)100$$

۶-۲- آنالیزهای هیستوپاتولوژیکی

از هر گروه حداقل ۵ نخ کرم خاکی در فرمالین ۱۰ درصد فیکس گردیده و پس از برش گیری با ضخامت ۵ میکرون با استفاده از دستگاه تمام اتوماتیک مقاطع عرضی (تهیه شده از منطقه پس از کمربند تناسلی کرم ها) به کمک روش H&E رنگ آمیزی گردیدند. در انتها آنالیزهای هیستوپاتولوژیکی مقاطع عرضی به کمک میکروسکوپ نوری معمولی به انجام رسید.

۷-۲- تجزیه و تحلیل آماری داده ها

نتایج این پژوهش به صورت Means ± Standard Deviation (SD) به نمایش درآمده اند. مقایسه های آماری بین گروه های مختلف با روش One way-ANOVA و استفاده از پس آزمون Tukey's HSD در نرم افزار SPSS با سطح معنی داری $p<۰/۰۵$ به انجام رسیدند.

۳. نتایج و بحث

۱-۳- تعیین متوسط غلظت کشندگی (LC_{50}) تبوکونازول منقضی شده

نتیجه بررسی ها با روش پروبیت مشخص نمود که میزان LC_{50} برای کرم های خاکی *Eisenia fetida* پس از یک دوره تیمار ۷ روزه در حد ۱۲۱۳ mg/kg dry soil≤ بوده است. در مطالعه حاضر سه غلظت زیر حدکشندگی یعنی $\frac{1}{5}$ ، $\frac{1}{10}$ و $\frac{1}{20}$ از LC_{50} از این آفت کش مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-۳- بررسی تغییر در فعالیت بیومارکرهای تنش اکسیداتیو

بررسی های آماری موجود در شکل ۱ مشخص نمود که تبوکونازول منقضی شده با بالا بردن محتوی MDA در واقع موجب گسترش LPO در هوموژنیت کرم های خاکی شده است. محتوی واکنش های زنجیره ای LPO با افزایش در غلظت آفت کش بیش تر شده که در پایان ۸ روز (تیمار $\frac{1}{5}$ از LC_{50}) به ۱۱۶/۱۱ درصد رسیده است ($p<۰/۰۵$).

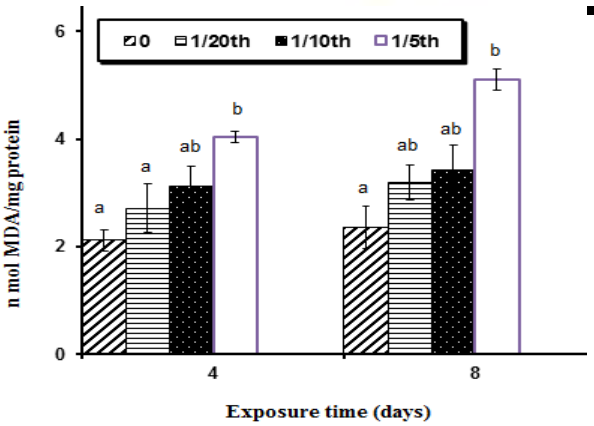
نتایج موجود در شکل ۲ نیز نشان دهنده میزان تغییر در محتوی CP یا میزان پروتیین های اکسید شده در بافت های بدن کرم های خاکی پس از تیمار با تبوکونازول منقضی شده است. نتایج می دهند که افزایش در محتوی CP از الگوی افزایش در غلظت آفت کش پیروی کرده به طوری که بیش ترین میزان افزایش در محتوی CP در غلظت $\frac{1}{5}$ از LC_{50} در انتهای دوره ی ۸ روزه تیمار با آفت کش به میزان ۱۰۲/۹۱ درصد ($p<۰/۰۵$) بوده است.

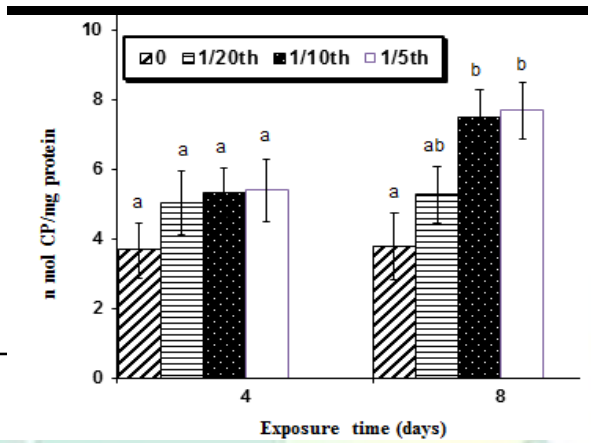
آفت‌کش‌ها به عنوان ترکیبات شیمیایی موثر در حذف انواع آفات از جمله آلاینده های زیست محیطی بوده که کاربرد آنان علاوه بر افزایش دهی میزان محصولات کشاورزی موجب بروز آسیب های بافتی گسترده در بدن موجودات زنده غیرهدف نظیر کرم های خاکی در محیط نیز خواهد شد (Gobi et al., 2005; Torabi Farsani et al., 2021). در مطالعات سم شناسی آفت کش ها بی مهرگانی مثل کرم های خاکی به عنوان بیواندیکاتور مورد استفاده فراوان دارند. از آن جایی که این جانوران موجب افزایش باروری خاک و بهبود ساختار فیزیکوشیمیایی آن می شوند لذا تاثیرات منفی و آسیب رسان آلاینده های محیطی بقای آنان را با خطر جدی روبرو خواهد نمود و لذا حفظ این جانوران در اولویت های اصلی دوستداران محیط زیست می باشد (Gobi et al., 2005). آفت کش های منقضی شده به ترکیباتی گفته می شوند که پس از یک دوره ی زمانی مشخص فاقد اثرات مطلوب اولیه خود باشند' اما با این وصف در برخی کشورها این آفت کش ها در بسته بندی های جدید و با تاریخ مصرف جدید وارد بازار مصرف شده و دوباره به کار برده می شوند (Torabi Farsani et al., 2021). از جمله پیامدهای مهم سمیت ایجاد شده توسط آفت کش ها در بدن موجودات زنده افزایش غیرطبیعی مقدار ROS ها و القای OS وLPO می باشند (Banerjee et al., 1999). MDA به عنوان یکی از محصولات نهایی روند LPO قادر به برقراری پیوندهای محکم کوئووالانسی با ماکرومولکول های زیستی نظیر پروتیین ها' فسفولیپیدها و ژنوم (DNA) بوده که در نتیجه این پیوندها مقدمات غیرفعال سازی این ماکرومولکول ها فراهم شده که در نهایت مشکلات عدیده ی سلولی (ساختاری و عملکردی) پدیدار خواهند شد. بنابراین حذف در مهار گسترش آسیب های اکسیداتیو مهم می باشد (Halliwell and Gutteridge, 2015; Owagboriayea et al., 2020). در مطالعه حاضر نیز تبوکونازول منقضی شده موجب افزایش میزان MDA و گسترش آسیب های اکسیداتیو در ساختار سلولی بدن کرم های خاکی مورد آزمایش شده که این نشان دهنده ی تاثیر این آفت کش در القای OS بوده است.

بررسی منابع علمی موجود نشان می دهد که در حال حاضر داده های معتبر اندکی در مورد تاثیر تبوکونازول منقضی شده بر فعالیت کرم های خاکی موجود بوده و لذا در پژوهش حاضر منابع علمی لازم و کافی جهت انجام مقایسه با سایر داده های علمی در اختیار ما نبوده است. در سال ۲۰۲۱ تیم تحقیقاتی ما اثرات آفت کش کلرپیریفوس (تازه و منقضی شده) را در کرم های خاکی بررسی نمود و نتایج آن مطالعه نشان داد که آفت کش منقضی شده کماکان خطرناک بوده و قادر با القای OS' گسترش LPO و تغییر در فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در بدن کرم های خاکی است (Torabi Farsani et al., 2021). در همسویی با نتایج پژوهش حاضر' داده های موجود در دیگر پژوهش ها نشان داده که اضافه سازی قارچ کش تبوکونازول به آب موجب القای OS و بروز آسیب های اکسیداتیو در بدن ماهیان مورد آزمایش شده که برای رفع آن ترکیبات جدا شده از عسل به نمونه های آب اضافه گردید (Ferreira et al., 2012). نتایج مطالعه Chen و همکاران نیز در سال ۲۰۱۸ نشان داد که تبوکونازول موجب القای OS و مهار فعالیت سلولاز در روده کرم های خاکی شده که با این مهار آنزیمی مشکلاتی در ارتباط با تغذیه و تجزیه سلولز برای این جانوران پدیدار خواهد گردید (Chen et al., 2018). در مطالعه ای دیگر' تبوکونازول در خفاش های میوه خوار موجب بروز آسیب های اکسیداتیو در کبد و عضلات شده است (Freitas et al., 2021).

در مطالعات سم شناسی یکی از شاخص های زیستی مورد استفاده برای اثبات القای OS به دنبال تاثیر آلاینده ها در بافت های جانوری' تعیین میزان پروتیین های اکسید شده (محتوی CP) در نمونه های مورد مطالعه است (Purdel et al., 2014). در پژوهش حاضر داده های منتج از آزمایشات مشخص نمودند که محتوی CP در تیمارهای با تبوکونازول منقضی شده افزایش قابل توجه ای داشته است. بررسی ها نشان داده که با القای OS، پیوندهای محکمی بین MDA و گروه های آمینی برخی اسیدهای امینه ایجاد و کاربولینه شده و بدین ترتیب با تغییر در ساختار پروتیین ها مقدمات غیرفعال شدن آنان فراهم می شود. یکی از نتایج افزایش محتوی ناپایداری غشاهای سلولی است (Cecarini et al., 2007; Purdel et al., 2014). در سال ۲۰۱۷ مشخص گردید که تیمار

رت ها با تبوکونازول موجب بروز سمیت در کبد و افزایش محتوی CP کبدی در گروه های تیمار شده با قارچ کش شده است (Ben-Saad et al., 2017). علاوه بر این در سال ۲۰۲۰ نیز Ben Othmène و همکاران نشان دادند که تبوکونازول موجب کاهش گلوتاتیون و در مقابل افزایش MDA و محتوی CP در سلول های قلب رت می شود (Ben Othmène et al., 2020). اثرات سمی برخی دیگر از قارچ کش ها مثل پروپیکونازول نیز موجب القای OS و افزایش محتوی CP در بافت های جانوری بوده که یکی از نتایج آن تغییر ساختارهای آنزیمی و مهار عمل در آنان است (Bruno et al., 2009). با توجه به موارد بالا در مطالعه حاضر نیز افزایش میزان MDA در بدن کرم های خاکی به دنبال تیمار با تبوکونازول منقضی شده به اثبات رسیده و لذا می توان عنوان نمود که MDA تولید شده موجب افزایش محتوی CP در کرم های خاکی مورد آزمایش در پژوهش حاضر شده است.





شکل ۱ (چپ): میزان تغییر در محتوی پراکسیداسیون لیپیدها (LPO) در تیمارهای مختلف از تبوکونازول منقضی شده.

شکل ۲ (راست): میزان تغییر در محتوی پروتیین های کاربولینه شده (CP) در تیمارهای مختلف از تبوکونازول منقضی شده.

- وجود حروف غیرهمنام به معنای وجود اختلاف معنی دار آماری ($p<۰/۰۵$) است.

۳-۳- تست رفتاری درصد خالص گریز از محل (ANR%)

درصدهای موجود در جدول ۱ نشان دهنده ی تاثیر سمیت تبوکونازول منقضی شده بر افزایش گریز (مهاجرت) کرم های خاکی از توده های خاک آلوده به تبوکونازول منقضی شده به سوی توده خاک شاهد (بدون قارچ کش) است. بیش ترین میزان درصد مهاجرت ها در گروه تیمار شده با غلظت $\frac{1}{5}$ از LC_{50} به میزان ۸۲ درصد بوده است.

بر اساس نتایج تست گریز از محل، مهاجرت (فرار) مشخصی برای کرم های خاکی به وقوع پیوسته که خود نشان دهنده وجود نوعی فشار اکولوژیکی بر کرم های خاکی مورد آزمایش بوده که آنان را وادار به گریز از مکان اولیه به طرف محیطی با آلودگی کم تر (خاک شاهد) نموده است. در واقع این تست جهت برآورد کیفیت نمونه های خاک مورد کاربرد دارد (ISO, 2006). در پژوهش حاضر بر اساس افزایش غلظت قارچ کش (Dose-dependent) در خاک بر میزان ANR% نیز افزوده شده است. مطالعات قبلی نشان داده که کرم های خاکی از خاک های آلوده به انواع قارچ کش ها گریزان هستند (Garcia et al., 2008). در سال۲۰۱۶ نشان داده شد که کرم های خاکی *Eisenia fetida* حساسیت زیادی به حضور تبوکونازول در خاک داشته و در طی آزمایشات ANR% افزایش یافته بود (Rico et al., 2016). در خاک های آلوده به داروهای ضدمیکروبی نظیر سولفادیازین ها (Sulfadiazine) نیز کرم های خاکی میزان زیادی از ANR% را از خود نشان می دهند (Candello et al., 2018). در سطح بدن کرم های خاکی کمورسپتورهای زیادی وجود داشته که نسبت به حضور مواد شیمیایی مفید و مضر (آلاینده ها) در خاک اطراف حساس بوده و با فعالیت خود به کرم های خاکی

هشدار لازم را برای مهاجرت (فرار) و جابجایی از نقاط آلوده به سوی نقاط امن تر (با آلودگی کم تر) ارسال نموده تا بدین ترتیب آسیب های بافتی و نیز ناتوانی در حرکت به سوی منابع غذایی به حداقل رسانیده شوند (Reinecke et al., 2002).

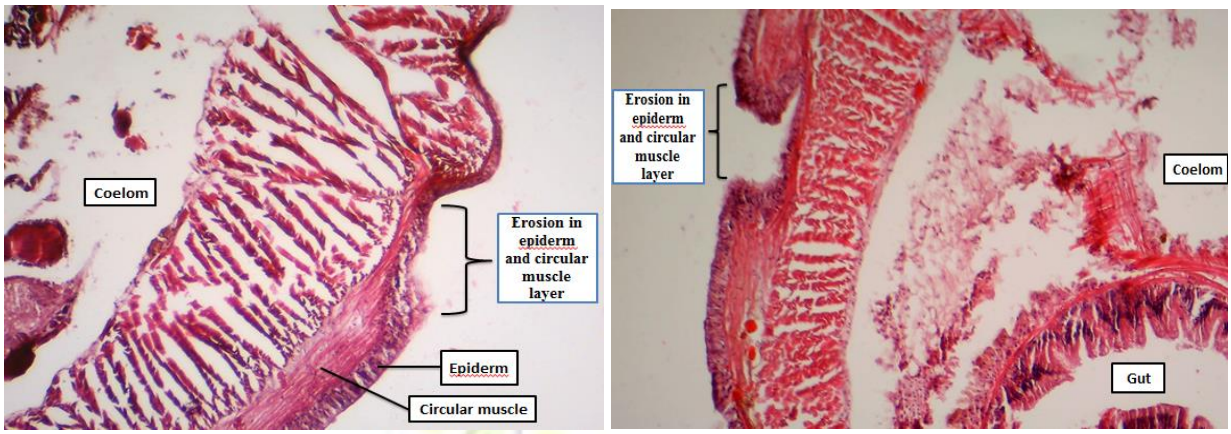
جدول ۱: نتایج تست رفتاری درصد خالص گریز از محل ۴۸ ساعته کرم‌های خاکی تیمار شده با تبوکونازول منقضی شده.

Expired tebuconazole (mg/kg)	ANR%
$\frac{1}{20}$ LC_{50}	+67
$\frac{1}{10}$ LC_{50}	+75
$\frac{1}{5}$ LC_{50}	+82

۳-۴- مشاهدات هیستوپاتولوژیکی

بروز آسیب های بافتی (هیستوپاتولوژیکی) در ارتباط مستقیم با تاثیر آلاینده های محیطی بر بافت های جانوری بوده که با کاهش توان آنتی اکسیدانی بروز OS در سلول های آنان همراه می باشد (Torabi Farsani et al., 2021). به دنبال تیمار با تبوکونازول منقضی شده (تمامی غلظت ها در هر دو دوره زمانی) تغییرات هیستوپاتولوژیکی در محدوده پوست به صورت خردگی ها و پارگی هایی (Rupturing) در اپیدرم و کوتیکول آن مشاهده گردید' که برخی نقاط لایه عضلانی حلقوی بلافاصله زیر اپیدرم نیز دستخوش تغییر و خردگی شده بود (شکل ۳ و ۴).

در مطالعه حاضر القا و گسترش OS همراه با افزایش محتوی CP را می توان از جمله عوامل اصلی در بروز تغییرات هیستوپاتولوژیکی در سطح بدن کرم های خاکی دانست که به ناپایداری' بهم ریختگی و تخریب های سلولی (بدشکلی بافتی) منتهی خواهند شد. نتایج مطالعه استفاده از قارچ‌کش‌های تریازولی در سال ۲۰۱۳ نشان داد که این گونه آفت کش ها با مهار فعالیت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی و القای موجب تخریب سلول‌های اپیدرم و جداسازی اپیدرم از لایه های زیر خود شده اند (Gao et al., 2013). در همسویی با نتایج مطالعه ما' نشان داده شده که تیمار با تبوکونازول در کرم های خاکی موجب تخریب لایه های عضلانی حلقوی و طولی همراه با آسیب نکروزی در جدار رگ های خونی این جانوران شده است. نواحی متورم (ادم دار) نیز به میزان زیادی در بدن کرم ها مشاهده گردید (Rico et al., 2016). در سال ۲۰۲۰ نتایج تیمار رت ها با تبوکونازول نشان داد که تیمار مذکور موجب خونریزی و تجمع لوکوسیت ها در بافت عضله قلب و کم توانی قلب و بروز مشکلات خونرسانی به دیگر بافت ها شده است (Ben Othmène et al., 2020). در بافت کبد موش های رت پس از تیمار با تبوکونازول اختلالاتی مثل واکوئوله شدن سیتوپلاسم هپاتوسیت ها و تجمع لوکوسیت ها و التهاب مشاهده شده است (Ben-Saad et al., 2017). رویهم رفته با توجه به موارد بالا می توان عنوان نمود که تغییرات هیستوپاتولوژیکی مشاهده شده در پژوهش حاضر می تواند موجبات کاهش تحرک' سوء تغذیه و حتی مهار فعالیت های تولیدمثلی را در کرم‌های خاکی آلوده شده به قارچ کش را فراهم آورد.



شکل ۳ و ۴ (راست و چپ): مقطع عرضی کرم خاکی در گروه های تجربی دارای آسیب بافتی شامل خردگی و پارگی در اپیدرم و لایه عضلانی حلقوی (Circular) پوست (بزرگنمایی ۱۰۰)(H&E).

۴. نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان دهنده آن است که تبوکونازول منقضی شده کماکان واجد قدرت کافی برای القای OS و ایجاد تغییرات هیستوپاتولوژیکی در بدن کرم های خاکی بوده و بر همین اساس می بایست در نحوه ی دفع و استفاده مجدد از آن بازنگری نمود.

سپاسگزاری

از مسئولین محترم دانشگاه شهرکرد بابت حمایت مالی از این پژوهش در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری و نیز از دکتر محمد شادخواست به جهت کمک ها و پیشنهادهای با ارزش شان، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع:

1. Banerjee B.D., Seth V., Bhattacharya A., Pasha S.T. and Chakraborty A.K. 1999. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. Toxicology Letter, 107: 33-47.

2. Ben Othmène Y., Hamdi H., Amara I. and Abid-Essefi S. 2020 .Tebuconazole induced oxidative stress and histopathological alterations in adult rat heart .Pesticide Biochemistry and Physiology, 170: 104671.
3. Ben-Saad H., Kammoun I., Boudawara T., Zeghal K.M., Hakim A. and Amara I.B.2017. Effects of Selenium on Tebuconazole-Induced Hepatotoxicity in Adult Rats. Research and Reviews in BioScieces,12(2):118.
4. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S. and Kalayci O.2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. World Allergy Organization Journal, 5: 9-19.
5. Bruno M., Moore T., Nesnow S. and Ge Y. 2009. Protein carbonyl formation in response to propiconazole-induced oxidative stress. Journal of Proteome Research, 8(4): 2070-2078.
6. Buege J.A. and Aust S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. Methods in Enzymology, 52: 302-310.
7. Bustos-Obregon E. and Goicochea R.I. 2002. Pesticide soil contamination mainly affects earthworm male reproductive parameters. Asian Journal of Andrology, 4: 195-199.
8. Candello F.P., Guimarães J.R. and Nour E.A.A. 2018. Earthworm avoidance behavior to antimicrobial sulfadiazine on tropical artificial soil. Ecotoxicol. Environ. Contam., 13(2): 69-75.
9. Cecarini V., Gee J., Fioretti E., Amici M., Angeletti M., Eleuteri A.M. and Keller J.N. 2007. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. Biochimica et Biophysica Acta 1773(2): 93-104.
10. Chen J., Saleem M., Wang C., Liang W. and Zhang Q. 2018. Individual and combined effects of herbicide tribenuron-methyl and fungicide tebuconazole on soil earthworm *Eisenia fetida*. Scientific Reports, 8: 2967.

11. Feliziani E. and Romanazzi G. 2013. Preharvest application of synthetic fungicides and alternative treatments to control postharvest decay of fruit. Stewart Postharvest Review, 9(3): 1-6.
12. Freitas R.M.P., Linhares B.S., Oliveira J.M., Leite J.P.V., da Matta S.L.P., Gonçalves R.V. and Freitas M.B. 2021. Tebuconazole-induced toxicity and the protective effect of *Ficus carica* extract in Neotropical fruit-eating bats. Chemosphere, 275: 129985.
13. Ferreira D., Unfer T.C., Rocha H.C., Kreutz L.C., Koakoski G. and Gil Barcellos L.J. 2012. Antioxidant activity of bee products added to water in tebuconazole-exposed fish .Neotropical Ichthyology, 10(1): 215-220.
14. Gao M., Song W., Zhang J. and Guo J. 2013. Effect on enzymes and histopathology in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by triazole fungicides. Environmental Toxicology and Pharmacology, 35(3): 427-33.
15. Garcia M., Römbke J., de Brito M.T .and Scheffczyk A. 2008. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. Environmental Pollution, 153(2): 450-456.
16. Gobi M., Janardhanan S., Vijayalakshmi G.S. 2005. Sublethal toxicity of the herbicide butachlor on the earthworm *Perionyx sansibaricus* and its histological changes. Journal of Soils and Sediments, 5(2): 82-86.
17. Halliwell B. and Gutteridge J.M. 2015. Free Radicals in Biology and Medicine. 5th Edition. Oxford University Press.
18. Hund-Rinke K. and Wiechering H. 2001. Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. Journal of Soils and Sediments, 1: 15-20.
19. ISO (International Organization for Standardization) 2006. International Organization for Standardization. Draft ISO-17512: Soil Quality eAvoidance test for evaluating the quality of soils and the toxicity of chemicals. Test with earthworms (*Eisenia fetida/andrei*). Geneva, Switzerland.
20. Kwon H.C., Kim D.H., Jeong C.H., Kim Y.J., Han J.H., Lim S.J., Shin D.M., Kim D.W. and Han S.G. 2021 . Tebuconazole Fungicide Induces Lipid Accumulation and Oxidative Stress in HepG2 Cells .Foods 10(10): 2242.
21. Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.P. and Shacter E. 1994. Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins. Methods in Enzymology, 233: 346-357.
22. Li S., Jiang Y., Sun Q., Coffin S., Chen L., Qiao K., Gui W., Zhu G. 2020. Tebuconazole induced oxidative stress related hepatotoxicity in adult and larval zebrafish (*Danio rerio*). Chemosphere, 241: 125129.
23. Mas-Bargues C., Escrivá C., Dromant M., Borrás C. and Viña J. 2021. Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease. Archives of Biochemistry and Biophysics, 709(30): 108941.
24. Owagboriayea F., Dedekeb G.A., Bamideleb J.A., Aladesida A.A., Omoregie I.P., Feyisola R.T. and Temitope A.M. 2020. Biochemical response and vermiremediation assessment of three earthworm species (*Alma millsoni*, *Eudrilus eugeniae* and *Libyodrilus violaceus*) in soil contaminated with a glyphosate-based herbicide. Ecological Indicators, 108: 105678.
25. Purdel N.C., Margina D. and Ilie M. 2014. Current Methods Used in the Protein Carbonyl Assay. Annual Research & Review in Biology, 4(12), 2015-2026.
26. Reinecke A.J., Maboeta M.S., Vermeulen L.A. and Reinecke S.A. 2002. Assessment of lead nitrate and mancozeb toxicity in earthworms using the avoidance response. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 68:779-786.
27. Rico A., Sabater C. and Castillo M.A. 2016. Lethal and sub-lethal effects of five pesticides used in rice farming on the earthworm *Eisenia fetida.* Ecotoxicology and Environmental Safety, 127: 222-229.
28. Schwingl P.J., Lunn R.M. and Mehta S.S. 2021. A tiered approach to prioritizing registered pesticides for potential cancer hazard evaluations: implications for decision making. Environmental Health, 20: 13.
29. Torabi Farsani A., Arabi M. and Shadkhast M. 2021. Ecotoxicity of chlorpyrifos on earthworm *Eisenia etida* (Savigny, 1826): Modifications in oxidative biomarkers. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 249, 109145.
30. Tudi M., Daniel Ruan H., Wang L., Lyu J., Sadler R., Connell D., Chu C. and Phung D.T. 2021. Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. International Journal of Environmental Research and Public Health, 18: 1112.

31. Wang Y., Wu S., Chen L., Wu C., Yu R., Wang Q. and Zhao X. 2012. Toxicity assessment of 45 pesticides to the epigeic earthworm *Eisenia fetida.* Chemosphere, 88: 48-491.
32. WHO (World Health Organization) 2013. Food and Agriculture Organization (FAO). Joint meeting on pesticide residues on tebuconazole (107534-96-3). 1994, [cited 11 September 2013]. Available from: http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v94pr10.htm.

Effect of water hardness on toxicity of copper sulfate to *Gammarus cf. syriacus*

Pardis Khodabande Shahraki [1 *], Fardin Shaluei [2], Valiullah Khalaji Pir Balouti [3]

1 .Master of Science in Fisheries Science, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

2 .Assistant Professor, Department of Fisheries and Environment, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

3. Associate Professor, Department of Animal Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

Email:pardis.khodabande@gmail.com*

Abstract

Heavy metals such as copper are naturally present in the environment with low concentrations from natural sources such as volcanic activity or weathering of rocks. Moreover, industrial activities and some agricultural uses contribute to increase their concentration in ground or aquatic ecosystems. Copper sulfate ($CuSO_4$) has been widely used to control fin rot, skin lesions and external parasites of fish in aquaculture. Amphipods are a common representative spring fauna and one of the most sensitive groups of organisms to toxic substances. This investigation was conducted to determine LC_{50}, NOEC, MAC and LOEC of $CuSO_4$ to *Gammarus cf. syriacus* in soft and hard water (45 and 175 mg/L as $CaCO_3$). For hard water and soft water, groups of ten and seven *G.cf. syriacus* in three replicates were exposed to different concentrations of $CuSO_4$ for 96 h and cumulative mortality was calculated in 24-h intervals. The 96h LC_{50}, NOEC, MAC and LOEC values of $CuSO_4$ for *G.cf. syriacus* in soft water were estimated at 0.306, 0.1, 0.07 and 0.05 ppm, respectively, and also 96h LC_{50}, NOEC, MAC and LOEC values in hard water were calculated to be 0.546, 0.02, 0.031 and 0.05 ppm, respectively. The present results indicate that water hardness is capable of reducing the toxicity of $CuSO_4$ to Gammarus. Copper is more toxic in the soft water than in the hard water because they are more soluble in the soft waters.

Keywords: Acute toxicity, Water hardness, Copper, Amphipods

تاثیر سختی آب بر سمیت سولفات مس در گونه *Gammarus cf. syriacus*

پردیس خدابنده شهرکی[۱*] ، فردین شالوئی [۲] ، ولی الله خلجی پیربلوطی [۳]

۱. دانشجو، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد.

۲. استادیار، گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد.

۳. دانشیار، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد.

*Email:pardis.khodabande@gmail.com**

چکیده

فلزات سنگین مانند مس به طور طبیعی در محیط با غلظت کم از منابع طبیعی مانند فعالیت های آتشفشانی یا هوازدگی سنگ ها وجود دارند. علاوه بر این، فعالیت‌های صنعتی و برخی کاربردهای کشاورزی به افزایش غلظت آنها در اکوسیستم‌های زمینی یا آبی کمک می‌کند. سولفات مس ($CuSO_4$) به طور گسترده ای برای کنترل پوسیدگی باله، ضایعات پوستی و انگل های خارجی ماهی در آبزی پروری استفاده شده است. آمفی پود ها نماینده رایج جانوران چشمه ها و یکی از حساس ترین گروه های موجودات زنده به مواد سمی هستند. این بررسی برای تعیین LC_{50}، NOEC، MAC وLOEC سولفات مس برای Gammarus cf. syriacus در آب نرم و سخت (۴۵ و ۱۷۵ میلی گرم در لیتر $CaCO_3$) انجام شد. برای آب سخت و آب نرم به ترتیب، گروه های ده و هفت نفری *G.cf.* syriacus در سه تکرار به مدت ۹۶ ساعت در معرض غلظت های مختلف سولفات مس قرار گرفت و مرگ و میر تجمعی در فواصل زمانی ۲۴ ساعت محاسبه شد. مقادیر LC_{50} ۹۶ ساعته، MAC، NOEC و LOEC سولفات مس برای *G.cf.* syriacus در آب نرم به ترتیب ۰/۳۰۶، ۰/۰۷، ۰/۱ و ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر و همچنین مقادیر LC_{50} ۹۶ ساعته، MAC، NOEC و LOEC در آب سخت به ترتیب ۰/۵۴۶، ۰/۰۳، ۰/۰۵ و ۰/۰۲ میلی گرم در لیتر محاسبه شد. نتایج حاضر نشان می دهد که سختی آب قادر به کاهش سمیت سولفات مس در گاماروس است. مس در آب نرم سمی تر از آب سخت است زیرا در آب های نرم حلالیت بیشتری دارد.

واژه‌های کلیدی: سمیت حاد، سختی آب، مس، آمفی پود

1. مقدمه

آلودگی اکوسیستم‌های آبی ناشی از عوامل مختلفی از جمله ورود عوامل بیماری‌زا، مواد آلی، مواد معدنی، ورود نفت و مشتقات آن می‌باشد. در این میان، آلودگی به فلزات سنگین به دلیل غیرقابل تجزیه بودن این مواد و پایداری آن‌ها در محیط زیست، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Rana, 2006). فلزات سنگین از منابع طبیعی مثل فعالیت‌های آتشفشانی یا هوازدگی سنگ‌ها به داخل محیط‌های آبی آزاد می‌شوند. علاوه بر این، فعالیت‌های صنعتی و برخی مصارف کشاورزی، هم‌چنین دفع فاضلاب‌ها و رواناب‌های سطحی شهرهای بزرگ و کوچک تجمع فلزات فلزات سنگین در آب‌های شیرین را به شدت افزایش داده‌اند (Guven *et al.*, 1999).

فلزات سنگین از مهم‌ترین آلاینده‌های پیکره های آبی محسوب می‌شوند که پایداری بالایی داشته و از توانایی ایجاد سمیت در آبزیان، قابلیت تجمع در زنجیره غذایی، اثرات مخرب بر تعادل بوم‌شناختی محیط پذیرنده و تنوع موجودات آبزی برخوردارند.

سولفات مس، $CuSO_4$، یک ترکیب غیر آلی و یک اکسیدان قوی است (Gamakaranage, 2018) و به عنوان یک انگل کش خارجی موثر و محافظ ماهیان در برابر عفونت های باکتریایی عمل می کند (Reardon and Harrell, 1990). در واقع سولفات مس، موثر ترین ماده شیمیایی در برابر چندین عفونت انگلی و بیماری ها محسوب می شود و در درمان گسترده عفونت تک یاخته ها بسیار کاربرد دارد (Tavares-Dias *et al.*, 2011). سولفات مس در درمان بیماری هایی با منشا قارچی در ماهیان هم موثر است (Mutlu *et al.*, 2015). در استخر های میگو هم برای از بین بردن جلبک های رشته ای و کاهش فراوانی جلبک های سبز_آبی (Chu Chen *et al.*, 2004) و در آبزی پروری با آب شیرین برای کنترل انگل های خارجی، بیماری های باکتریایی و به عنوان یک قارچ کش یا علف کش از سولفات مس استفاده می شود (Pillai *et al.*, 2006). سولفات مس به حالت های پودری، مایع و کریستال در دسترس است (Gamakaranage, 2018). PH و سختی، متغیر های مهمی هستند که بر سمیت مس تاثیر می گذارند و باید قبل از درمان در نظر گرفته شوند (Mutlu *et al.*, 2015). مس مانند سایر فلزات سنگین موجود در محیط‌های آبی ابتدا توسط پلانکتون‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و ارگانیسم‌های کوچک نظیر گاماروس‌ها به‌عنوان اولین سطح تولیدکننده اکوسیستم‌های آبی جذب شده سپس به ترتیب، توسط موجودات بزرگ‌تر خورده شده و در نهایت وارد بدن انسان می‌شوند (Abou *et al.*, 2005).

گاماروس یک تیره مهم از خانواده gammaridae است که در سراسر جهان در انواع اکوسیستم های آبی از جمله آب های شیرین، محیط های لب شور و دریایی وجود دارد. گاماروس ها نقش مهمی در ساختار و عملکرد جوامع آبزی دارند (Karimzadeh and Zahmatkesh, 2015). در واقع گاماروس؛ بزرگ ترین تیره از خانواده آمفی پود gammaridae است (Zamanpoore *et al.*, 2011). گاماروس یک گروه بیولوژیکی است که به دلیل عواملی مثل فراوانی زیاد، اندازه کوچک، چرخه عمر کوتاه و حساسیت بیشتر به بسیاری از سموم برای آزمایشات سم شناسی در محیط های آبی شور و شیرین مورد توجه قرار گرفته است (Karimzadeh and Zahmatkesh, 2015). تاکنون وجود ۲۴ گاماروس در آب های شیرین ایران ذکر شده است و طبق متون چاپی، چندین گونه از جانوران آمفی پود ایرانی به عنوان بومی این منطقه شناخته می شوند (Zamanpoore *et al.*, 2011). در مورد گونه مورد مطالعه، *Gammarus cf. syriacus*، باید خاطرنشان کرد این گونه، گونه ای جدید است و اطلاعات زیادی از آن در دسترس نیست. از اطلاعات در دسترس می توان به این نکته اشاره کرد که این گونه دارای درجه تیزی متفاوت در گوشه نوک تیز خلفی-دیستال صفحه اپیمرال ۳ و سطح مختلف ارتفاع در قسمت پشتی urosomite ۱ تا ۳ است و این موارد از ویژگی های ظاهری این گونه برای شناسایی آن و وجه تمایز این گونه با سایر گونه های *G. pseudosyriacus*، *G. shirazinus* و *G. zagrosensis* می باشد (Zamanpoore *et al.*, 2011).

با بررسی اثر دما بر سمیت روی، مس و سرب در آمفی پود آب شیرین *Gammarus pulex*، نتایج نشان داد که با افزایش غلظت مس، روی و سرب و رژیم های دمایی، مرگ و میر این گاماروس افزایش یافت. با این حال، سمیت مس، روی و سرب برای *Gammarus pulex* با کاهش دما، کاهش یافت. LC_{50} به ترتیب ۰/۰۲۸، ۵/۲۱ و ۱۱/۲میلی گرم بر لیتر برای مس، روی و سرب در ۲۵ درجه

سانتی گراد است. در حالی که مقادیر LC_{50} به ترتیب ۰/۰۸۰، ۱۲/۱ و ۲۳/۲ میلی گرم بر لیتر برای مس، روی و سرب در ۱۵ درجه سانتی گراد بود. نتایج تجزیه و تحلیل LC_{50} نشان می دهد که مس برای *Gammarus pulex* بیشتر از روی یا سرب سمی است. نتیجه گیری اصلی که از این مطالعه و سایر مطالعات حاصل می شود این است که ضروری است که هنگام ارزیابی اثرات سمی فلزات سنگین بر بقای موجودات آبزی، اثرات دما در نظر گرفته شود (Bat *et al.*, 2000).

با توجه به تمامی این اثرات منفی سولفات مس هنوز اطلاعات کافی در مورد اثرات سمیت آن بر گاماروس مورد مطالعه و همچنین اطلاعاتی درباره عملکرد سولفات مس در برابر سختی در دسترس نمی باشد. این مطالعه با هدف بررسی تاثیر سختی بر سمیت سولفات مس بر روی گونه *Gammarus cf. syriacus* انجام شده است.

۲.مواد و روش

برای انجام این آزمایش، از چشمه بیژگرد واقع در استان چهارمحال و بختیاری در اوایل پاییز نمونه برداری انجام شد و نمونه ها به آزمایشگاه شیلات دانشگاه شهرکرد منتقل شدند. گاماروس ها به مدت یک هفته با هوادهی مداوم در شرایط آزمایشگاهی قرار گرفتند. منبع آب مورد استفاده در این تحقیق، آب شهری دکلرینه شده و آب جمع آوری شده از چشمه بود.

برای بدست آوردن محدوده کشندگی سولفات مس در آب دکلرینه شده شهری، گاماروس ها در معرض غلظت های صفر، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر سولفات مس قرار گرفتند. این غلظت ها برای تعیین سمیت حاد در محدوده بیشترین غلظت بدون کشندگی و کمترین غلظت با ۵۰ درصد کشندگی، انتخاب شدند. برای این منظور، تعداد ۱۰ گاماروس در سه تکرار در ظرف های یک لیتری به مدت ۹۶ ساعت در معرض غلظت های یاد شده قرار گرفتند و در دوره های زمانی ۲۴ ساعته تلفات در هر غلظت، جمع آوری و ثبت شد. گاماروس ها در زمان نگهداری و انجام آزمایش‌ها در شرایط ثابت نگهداری شدند و فراسنجه‌های فیزیکی و شیمیایی آب شامل دما (۱۳ درجه سانتی‌گراد)، اکسیژن محلول (۸/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و pH (۸) با استفاده از دستگاه پرتابل مدل HQ30d اندازه‌گیری شد. همچنین میزان سختی آب دکلرینه شده شهری (۴۵ میلی گرم در لیتر کربنات کلسیم) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر هک مدل DR 6000 قرائت شد. همچنین برای بدست آوردن محدوده کشندگی سولفات مس در آب چشمهِ جمع آوری شده از محل، گاماروس ها در معرض غلظت های صفر، ۰/۰۲، ۰/۰۵، ۰/۰۷۵، ۰/۱، ۰/۱۵ و ۰/۲ میلی گرم در لیتر سولفات مس قرار گرفتند. برای این منظور تعداد ۷ گاماروس در سه تکرار در ظرف های یک لیتری به مدت ۹۶ ساعت در معرض غلظت های یاد شده قرار گرفتند و در دوره های زمانی ۲۴ ساعته تلفات در هر غلظت، جمع آوری و ثبت شد. پارامتر های فیزیکوشیمیایی موثر آب چشمه شامل درجه حرارت، اکسیژن محلول و pH با آب شهر تفاوتی نداشت ولی سختی کل آب چشمه (۱۷۵میلی گرم در لیتر کربنات کلسیم) از آب شهری بیشتر بود. میزان غلظت کشنده (LC_{10-90}) سولفات مس در دوره های زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت با استفاده از نرم افزار SPSS و با استفاده از آزمون Probit محاسبه شدند. همچنین میزان حداکثر غلظت مجاز (MAC) سولفات مس با محاسبه میانگین هندسی مقادیر غلظت بی اثر (NOEC) و حداقل غلظت موثر (LOEC) برای سولفات مس محاسبه شد.

۳.نتایج

میزان مرگ و میر تجمعی Gammarus cf. syriacus در آب چشمه و آب دکلرینه شده شهری در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است. در طی آزمایش در گروه های شاهد هیچ گونه تلفاتی مشاهده نشد و تلفات مشاهده شده در گروه های تیمار تنها به دلیل وجود سولفات مس بوده است. نتایج نشان می دهد که با افزایش غلظت و مدت زمان قرار گیری در معرض سولفات مس، تلفات افزایش پیدا می کند. با توجه به جداول ۱ و ۲، مقادیر غلظت بی اثر (LOEC) و حداقل غلظت مؤثر (NOEC) برای آب دکلرینه شده شهری ۰/۰۵ ، ۰/۱ و برای آب چشمه به ترتیب ۰/۰۲ و ۰/۰۵ میلی گرم بر لیتر بوده است.

جدول ۱: میزان مرگ و میر تجمعی *Gammarus cf. syriacus* در معرض غلظت های مختلف سولفات مس در آب دکلرینه شده شهری در مدت ۴ روز (n=۳۰)

غلظت	تعداد تلفات			
میلی گرم بر لیتر (ppm)	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
شاهد	۰	۰	۰	۰
۰/۰۵	۰	۰	۰	۰
۰/۱	۰	۳	۳	۴
۰/۱۵	۲	۲	۲	۲
۰/۲	۰	۵	۶	۹
۰/۳	۵	۱۲	۱۲	۱۳
۰/۵	۲۰	۲۲	۲۳	۲۴

جدول ۲: میزان مرگ و میر تجمعی *Gammarus cf. syriacus* در معرض غلظت های مختلف سولفات مس در آب چشمه در مدت ۴ روز (n=۲۱)

غلظت	تعداد تلفات			
میلی گرم بر لیتر (ppm)	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
شاهد	۰	۰	۰	۰
۰/۰۲	۰	۰	۰	۰
۰/۰۵	۰	۱	۱	۲
/۰۷۵	۰	۰	۱	۱
۰/۱	۰	۱	۲	۳
۰/۱۵	۱	۲	۳	۴
۰/۲	۱	۲	۴	۵

نتایج به دست آمده از مقادیر غلظت های کشنده ($LC_{۱۰-۹۰}$) برای سولفات مس در آب دکلرینه شده شهری و آب چشمه به ترتیب در جداول ۳ و ۴ آمده است. میزان غلظت نیمه کشنده ($LC_{۵۰}$) سولفات مس در آب دکلرینه شده شهری در زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب ۰/۴۳۴، ۰/۳۵۱، ۰/۳۳۶ و ۰/۳۰۶ میلی گرم بر لیتر برآورد شد (جدول ۳) و برای آب چشمه در زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ۰/۵۴۵، ۱/۷۵۷، ۰/۶۵۱ و ۰/۵۴۶ میلی گرم بر لیتر محاسبه شد (جدول ۴). با توجه به نتایج آزمایش سمیت حاد میزان حداکثر غلظت مجاز (MAC) سولفات مس برای آب دکلرینه شده شهری و آب چشمه به ترتیب ۰/۰۷ و ۰/۰۳ محاسبه شد (شکل ۱).

جدول ۳: مقادیر غلظت های کشنده ($LC_{۱۰-۹۰}$) سولفات مس برای *Gammarus cf. syriacus* در آب دکلرینه شده شهری در دوره زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت

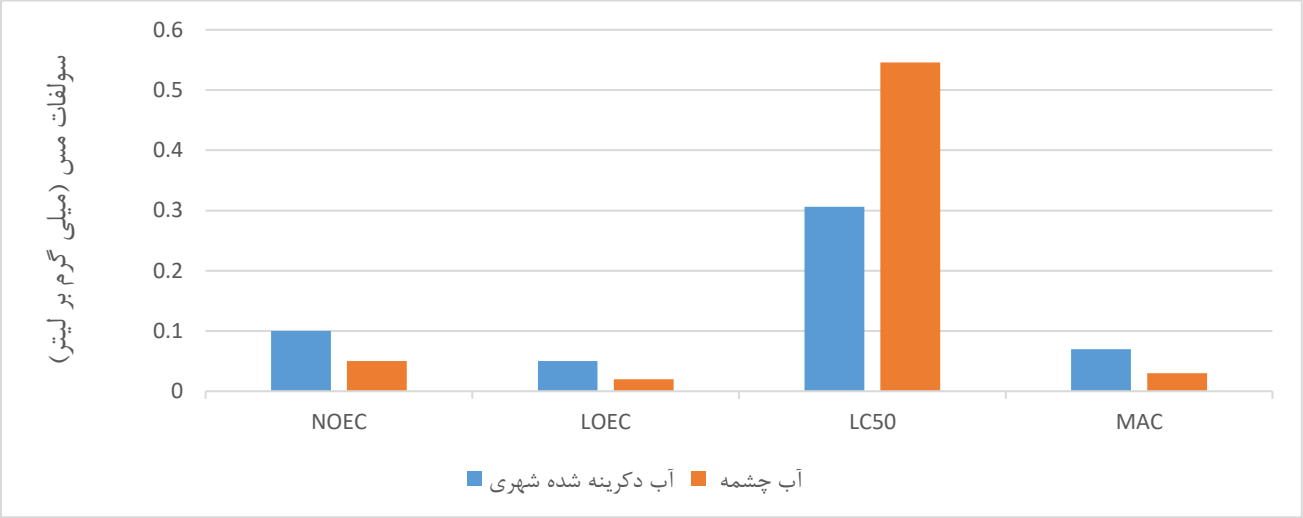
غلظت های کشنده (ppm)	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت

LC_{10}	۰/۲۳۳	۰/۱۴۱	۰/۱۳۸	۰/۱۲۲
LC_{20}	۰/۲۸۹	۰/۱۹۳	۰/۱۸۸	۰/۱۶۷
LC_{30}	۰/۳۳۷	۰/۲۴۲	۰/۲۳۴	۰/۲۱۰
LC_{40}	۰/۳۸۴	۰/۲۹۳	۰/۲۸۲	۰/۲۵۵
LC_{50}	۰/۴۳۴	۰/۳۵۱	۰/۳۳۶	۰/۳۰۶
LC_{60}	۰/۴۹۰	۰/۴۲۰	۰/۴۰۰	۰/۳۶۷
LC_{70}	۰/۵۵۹	۰/۵۰۹	۰/۴۸۲	۰/۴۴۶
LC_{80}	۰/۶۵۲	۰/۶۳۸	۰/۶۰۰	/۵۶۰
LC_{90}	۰/۸۰۶	۰/۸۷۲	۰/۸۱۳	۰/۷۶۷

جدول ۴: مقادیر غلظت های کشنده (LC_{10-90}) سولفات مس برای *Gammarus cf. syriacus* در آب چشمه در دوره زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت

غلظت های کشنده (ppm)	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
LC_{10}	۰/۲۳۴	۰/۱۹۳	۰/۱۱۱	۰/۰۸۳
LC_{20}	۰/۳۱۲	۰/۴۱۲	۰/۲۰۴	۰/۱۵۸
LC_{30}	۰/۳۸۵	۰/۷۱۲	۰/۳۱۶	۰/۲۵۲
LC_{40}	۰/۴۶۱	۱/۱۳۶	۰/۴۵۹	۰/۳۷۶
LC_{50}	۰/۵۴۵	۱/۷۵۷	۰/۶۵۱	۰/۵۴۶
LC_{60}	۰/۶۴۴	۲/۷۱۹	۰/۹۲۵	۰/۷۹۲

$LC_{۷۰}$	۰/۷۷۱	۴/۳۳۷	۱/۳۴۵	۱/۱۷۹
$LC_{۸۰}$	۰/۹۵۰	۷/۴۹۱	۲/۰۸۴	۱/۸۸۰
$LC_{۹۰}$	۱/۲۷۱	۱۵/۹۸۳	۳/۸۲۷	۳/۵۸۹



شکل ۱: مقادیر غلظت بی اثر (NOEC)، حداقل غلظت موثر(LOEC)، غلظت نیمه کشنده ($LC_{۵۰}$) ۹۶ ساعته و حداکثر غلظت مجاز (MAC) سولفات مس در آب دکلرینه شده شهری و آب چشمه برای *Gammarus cf. syriacus*

۴.بحث و نتیجه گیری

استفاده از مواد شیمیایی راهی موثر در کنترل عوامل بیماری زا است (Gamakaranage, 2018). سولفات مس از جمله داروهایی ست که در مزارع پرورش ماهیان گرمابی، به خصوص استخر های خاکی استفاده می شود. در کنترل شکوفایی جلبکی فیتوپلانکتون ها و گیاهان آبزی، کنترل حلزون ها و سایر نرم تنان استخر های پرورشی که میزبان واسط انگل ها هستند، کاربرد دارد (مازندرانی و همکاران، ۱۳۹۶). در آزمون سمیت مواد شیمیایی یا آفت کش های جدید برای آبزیان، تعیین سمیت حاد، اولین مرحله از مطالعات سم شناسی است که به بررسی غلظت نیمه کشنده یا $LC_{۵۰}$ مواد سمی محلول در آب می پردازد. $LC_{۵۰}$ بیانگر مرگ و میر ۵۰٪ موجودات در معرض آلاینده در مدت زمان مشخص است که بیشتر بر اساس ۹۶ ساعت بعد از در معرض قرار گیری بیان می شود (Elia *et al.*, 2003). همه ی گونه های گاماریده یون مس ورودی به بدن را تنظیم می کنند و مکانیسم‌های سم‌زدایی برای مقابله با سمیت توسط یون‌های فلزی دارند. با این حال، اگر این مکانیسم‌های سم‌زدایی نتوانند مقدار اضافی فلز وارد شده را تنظیم کنند،

مازاد آن منجر به اختلالات فیزیولوژیکی می‌شود (Schmidlin *et al.*, 2015). با توجه به نتایج بدست آمده، میزان غلظت نیمه کشنده سولفات مس هم در آب دکلرینه شده شهری هم در آب چشمه در تمام دوره های آزمایش (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) از ۱ میلی گرم بر لیتر کمتر است و با استناد به این که سولفات مس در غلظت های کمتر از ۱ میلی گرم بر لیتر سمی هستند (Schmidlin *et al.*, 2015)، می توان گفت سولفات مس جز سمی ترین سموم و مس جز کشنده ترین فلزات سنگین به حساب می آیند.

در مطالعه ای با موضوع اثرات کشنده مس بر برخی از صفات بیولوژیکی آمفی پود *Gammarus aequicauda* پرورش یافته در شرایط آزمایشگاهی، (Prato *et al.*, 2013) به این مهم دست یافتند که مس باعث کاهش بقا، کاهش رشد به دلیل کاهش مقدار انرژی متابولیکی و کاهش باروری به دلیل ارجحیت صرف انرژی برای حفظ بقا و رشد، طولانی شدن زمان رسیدن به بلوغ جنسی و کوتاه شدن زمان صرف شده در precopula می شود. (Schmidlin *et al.*, 2015) در بررسی اثر افزایش دما بر روی *Gammarus fossarum* تحت تأثیر سولفات مس، افزایش سمیت مس را با افزایش دما، به دلیل افزایش تنفس و به دنبال آن افزایش فعالیت متابولیک و افزایش جذب یون ها، تایید کردند. (Lebrun *et al.*, 2017) به کاهش فعالیت های حرکتی و تنفسی در *G. fossarum* در معرض مس و مهار فعالیت آنزیم گوارشی β-گلوکوزیداز در جنس نر و ماده و مهار فعالیت آنزیم β-گالاکتوزیداز در جنس نر دست یافتند. همچنین دلیل حساسیت جنس ماده نسبت به جنس نر را به رفتار تولیدمثلی و میزان پوست اندازی بالای جنس ماده ارتباط دادند. (Schmidlin *et al.*, 2015) دریافتند مس بر فعالیت تغذیه *G. fossarum* تاثیری نداشت اما به طور قابل توجهی فعالیت EST (Electron Transport System) را کاهش داد. (Arthur and Leonard, 1997) LC_{50} ۹۶ ساعته برای مس برای Gammarus pseudolimnaeus را ۰/۰۲۰ میلی گرم بر لیتر برآورد کردند و (Girling *et al.*, 2000) میزان LC_{50} ۹۶ ساعته برای Gammarus pulex را ۰/۰۳۷ میلی گرم بر لیتر محاسبه کردند.

با توجه به مقایسه نتایج به دست آمده بر اساس LC_{50} و نتایج مطالعه (Kiyani *et al.*, 2013) مبنی بر سمیت بیشتر فلزات سنگین در آب نرم به دلیل انحلال پذیری بالا نسبت به آب سخت و کاهش سمیت فلزات سنگین در آب شیرین با افزایش سختی آب، به دلیل رقابت بین یون های فلزات سنگین و یون های کلسیم و منیزیم برای مکان های جذب در موجودات و کاهش سمیت مس تا ۳۸ برابر با افزایش ۱۲ برابری سختی آب از ۲۵ به ۳۵۰ میلی گرم در لیتر $CaCO_3$ و با توجه به اینکه سمیت مس با افزایش سختی آب، به دلیل رقابت بین کلسیم و مس برای اتصال با مکان های جذب در سطوح بیولوژیکی، کاهش پیدا می کند (Leal *et al.*, 2018)، می توان به این نتیجه دست یافت که سولفات مس سمیت بیشتری در آب دکلرینه شده شهری برای *Gammarus cf. syriacus* نسبت به آب چشمه بروز می دهد.

در مجموع می توان به این نتیجه رسید که حضور سولفات مس در محیط های آبی، حتی در غلظت های پایین باعث بروز تلفات جدی در سخت پوستانی مانند گاماروس، که خوراک ماهیان ارزشمند هستند، خواهد شد. لذا برای حفاظت از سلامت سخت پوستان و ماهیان باید از ورود این سموم به منابع آبی جلوگیری به عمل آورد.

منابع

۶. **مازندرانی م.، قاسمی ا.، سوداگر م. و حسینی س. م. ۱۳۹۶.** اثرات تغذیه ای زردچوبه (*Curcuma longa*) برکاهش آسیب های کبدی و کلیوی ناشی از مواجه با سولفات مس در ماهی کپور معمولی(*Cyprinus carpio*). مجله منابع طبیعی ایران، دوره ۷۰، شماره ۲، صفحات ۱۴۷-۱۳۸.

7. **Abou El-Naga E., El-Moselhy K.M. and Hamed M.A. 2005.** Toxicity of cadmium and copper and their effect on some biochemical parameters of marine fish *mugil sheheli*. Egyptian Journal of Aquatic Research, 31(2).
8. **Arthur J.w. and Leonard E.N. 1997.** Effects of Copper on *Gammarus pseudolimnaeus*, *Physa integra* and *Carnpelontct deiisum*, in Soft Water. Journah Fisheries Research Board of Canada, 27(7): 1277-1283.
9. **Bat L., Akbulut M., Culha M., Gundogdu A. and Satilmis, H.H. 2000.** Effect of Temperature on the Toxicity of Zinc, Copper and Lead to the Freshwater Amphipod *Gammarus pulex pulex* (L., 1758). Turk J Zool, 24(4): 409-415.
10. **Chu Chen J., Tuen Yeh S. and Hung Liu C. 2004.** Effect of copper sulfate on the immune response and susceptibility to Vibrio alginolyticus in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology, 17(5): 437-446.
11. **Elia AC., Galarini R., Taticchi, M.I., Dorr ,AJ. and Mantilacci, L. 2003.** Antioxidant responses and bioaccumulation in Ictalurus melas under mercury exposure .Ecotoxicology and Environmental Safety, 55(2): 162-167.
12. **Gamakaranage C. 2018.** Clinical Features of Acute Copper Sulphate Poisoning. Journal of Heavy Metal Toxicity and Diseases, 3(1): 2.
13. **Girling A.E., Pascoe D., C. R. Janssen C.R., Peither, A.,Wenzel A., Schafer H., Neumeier B., Mitchell G.C., Taylor E.J., Maund S.J., Lay J.P., Juttner I., Crossland N.O., Stephenson R.R. and Persoone G. 2000.** Development of Methods for Evaluating Toxicity to Freshwater Ecosystems. Ecotoxicology and Environmental Safety, 45: 148-176.
14. **Guven K., Özbay C., Ünlu E. and Satar, A., 1999.** Acute Lethal Toxicity and Accumulation of Copper in *Gammarus pulex* (L.) (Amphipoda). Tr. J. of Biology, 23(4): 513-521.
15. **Karimzadeh K. and Zahmatkesh A.,2015.** Investigation of Acute Toxicity of Two Organophosphates on Caspian Sea Gammarus (*Pontogammarus maeoticus*). Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences, 4(3): 64-68.
16. **Kiyani V., Hosynzadeh M. and Ebrahimpour M. 2013.** Investigation acute toxicity some of heavy metals at different water hardness. International journal of Advanced Biological and Biomedical Research, 1(2): 134-142.
17. **Leal P.R., Moschini-Carlos V., López-Doval J.C., Cintra J.P., Yamamoto J.K., Bitencourt M.D., Santos R.F., Abreu G.C. and Pompêo M.L.M., 2018.** Impact of copper sulfate application at an urban Brazilian reservoir: A geostatistical and ecotoxicological approach. Science of the Total Environment, 618: 621-634.
18. **Lebrun J.D., Uher E. and Fechner L.C. 2017.** Behavioural and biochemical responses to metals tested alone or in mixture (Cd-Cu-Ni-Pb-Zn) in Gammarus fossarum: From a multi-biomarker approach to modelling metal mixture toxicity. Aquatic Toxicology, 193:160–167.
19. **Mutlu E., Aydin S. and Kutlu B. 2015.** Alterations of Growth Performance and Blood Chemistry in Nile Tilapia (*Oreochromis Nuoticus*) Affected by Copper Sulfate in Long-Term Exposure. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 15: 487-493.
20. **Pillai B.R., Reddy R. and Adhikari S. 2006.** Bioaccumulation of copper in post-larvae and juveniles of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) exposed to sub-lethal levels of copper sulfate. Aquaculture, 252(2-4): 356-360.
21. **Prato E., Parlapiano I. and Biandolino F. 2013.** Sublethal effects of copper on some biological traits of the amphipod *Gammarus aequicauda* reared under laboratory conditions. Chemosphere, 93(6): 1015-1022.
22. **Rana S. 2006.** Environmental pollution: Health and toxicology. Alpha Science Int'l Ltd.
23. **Reardon I.S. and Harrell R.M. 1990.** Acute Toxicity of Formalin and Copper Sulfate to Striped Bass Fingerlings Held in Varying Salinities. Aquaculture, 87(3-4): 255-270.
24. **Schmidlin L., Fumetti S.V. and Nagel P. 2015.** Copper sulphate reduces the metabolic activity of *Gammarus fossarumin* laboratory and field experiments. Aquatic Toxicology, 161: 138–145.

25. **Schmidlin L., Fumetti S.V. and Nagel P. 2015**. Effects of increased temperatures on *Gammarus fossarum* under the influence of copper sulphate. Ecotoxicology, 24(2): 433–444.
26. **Sukumaran M., Ramesh A. and Rengarajan R. 2017.** Toxicity Effect of Copper Sulphate on Protein Alterations in Estuarine fish, *Mugil Cephalus*. International Journal of Current Research in Life Sciences, 12(6): 794-797.
27. **Tavares-Dias M., Ferreira J.S., Affonso E.G., Ono E.A. and Martins M.L. 2011.** Toxicity and effects of Copper sulfate on Parasitic control and Hematological Response of Tambaqui *Colossoma macropomum*. Bol. Inst. Pesca, São Paulo, 37(4): 355-365.
28. **Zamanpoore M., Grabowski M., Poeckl M. and Schiemer F. 2011.** Taxonomic review of freshwater Gammarus (Crustacea: Amphipoda) from Iran. Zootaxa, 3140: 1-14.

Sedative effects of intranasal acepromazine administration in domestic pigeon

Nasser vajdi[1*], shohreh alian samakkhah

14- Department of clinical sciences, school of veterinary medicine, Amol university of special modern technologies, Amol, Iran.

15- Department of food hygiene, school of veterinary medicine, Amol university of special modern technologies, Amol, Iran.

*Corresponding Author Email address: dr.nasser.vajdi@gmail.com

Abstract

Safe and effective sedation methods are as much important for small pet birds as for the other animal not only for surgical procedures but also for safe handling and diagnostic and clinical procedures such as radiography, wound dressing, blood collection and fracture splinting; especially in case of delicate birds such as pigeons. The aim of this study is evaluation of sedation efficacy in intranasal administration of acepromazine in pigeons. Ten healthy adult domesticated pigeons of both sexes, weighting 311/33±24/46 (g) were used in this study. Acepromazine (5 mg/kg) was administered by intranasal. The onset time and duration of sedation time were measured and recorded. This study showed that IN drug administration could provide fast and reliable in pigeons and IN acepromazine can provide adequate sedation for diagnostic and minor therapeutic procedures.

Key words: acepromazine, sedative effects,intranasal, pigeon

بررسی اثر آرام‌بخشی تجویز داخل بینی داروی آسپرومازین در کبوتر اهلی

ناصر وجدی[۱*]، شهره عالیان سماک خواه[۲]

۶- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.

۷- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.

ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: dr.nasser.vajdi@gmail.com

چکیده:

پرندگان دست آموز کوچک مانند کبوتر نسبت به دست کاری طولانی مدت طی معاینه بالینی مانند رادیوگرافی، خون‌گیری، پانسمان زخم و آتل بندی شکستگی از خود واکنش شدید نشان می‌دهند و ممکن است باعث آسیب در این پرندگان گردد. برای جلوگیری از تهییج و تشویش این پرندگان طی معاینات بالینی مقید سازی با داروهای آرام بخش ضروری می باشد. هدف از انجام این مطالعه ، بررسی بالینی ایجاد آرام بخشی با تجویز داخل بینی آسپرومازین در کبوتر می‌باشد. علائمی مانند افتادن پلک‌ها، افتادن سر و گردن، عدم تعادل در راه رفتن و خواب‌آلودگی به عنوان علائم آرام بخشی در نظر گرفته شد. ۱۰ قطعه پرنده بالغ سالم دست آموز با محدوده وزنی ۲۴/۴۶ ± ۳۱۱/۳۳ گرم انتخاب شدند. داروی آسپرومازین به میزان ۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به شکل داخل بینی تجویز شد؛ با مشاهده علائم بالینی ذکر شده، زمان شروع اثر و طول مدت آرام بخشی درکبوترها به وسیله زمان‌سنج ثبت و مورد ارزیابی آماری قرار گرفت. تجویز داخل بینی دارو باعث شروع آرام بخشی در مدت ۱/۶۷ ± ۶/۴۰ دقیقه و طول آرام بخشی ۲/۷۰ ± ۱۷/۴۰ دقیقه گردید. تجویز داخل بینی آسپرومازین آرام بخشی نسبتا سریع و موثری در کبوتر ایجاد می‌کند و این روش تجویز داخل بینی جایگزین مطلوبی برای سایر روش‌های تجویز دارویی در این پرنده می‌باشد.

واژه های کلیدی: آسپرومازین، آرام بخشی، داخل بینی، کبوتر

۱. مقدمه

پرندگان دست آموز کوچک مانند کبوتر نسبت به دست کاری طولانی مدت طی معاینه بالینی مانند رادیوگرافی، خون‌گیری، پانسمان زخم و آتل بندی شکستگی از خود واکنش شدید نشان می‌دهند و ممکن است باعث آسیب در این پرندگان گردد. برای جلوگیری از تهییج و تشویش این پرندگان طی معاینات بالینی مقید سازی با داروهای آرام بخش ضروری می‌باشد (Vesal and Zare, 2006) . آسپرومازین گیرنده‌های تحریکی دوپامین را در بخش عقده‌های قاعده‌ای مهار می‌کند. این دارو گیرنده‌های محیطی آلفا را مهار کرده و از عمل کاتکول‌امین‌ها جلوگیری می‌کند((Vesal et al., 2011). آسپرومازین به دلیل تاثیر بر ناحیه‌ی حساس گیرنده‌های شیمیایی در مغز، اثر ضداستفراغی دارد. این دارو می‌تواند قلب را در برابر آریتمی‌های ناشی از اپی‌نفرین حفاظت کند. این دارو در کبد متابولیزه می‌شود و امکان عبور از جفت را دارد. آسپرومازین در بیماران مبتلا به افت فشار خون و شوک منع استعمال دارد((Sarchahi et al., 2009).

هدف از انجام این مطالعه ، بررسی بالینی ایجاد آرام بخشی با تجویز داخل بینی آسپرومازین در کبوتر می‌باشد.

۲. مواد و روش کار

۱۰ قطعه پرنده بالغ سالم دست آموز با محدوده وزنی ۲۴/۴۶ ± ۳۱۱/۳۳ گرم انتخاب شدند. داروی آسپرومازین به میزان ۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به شکل داخل بینی تجویز شد. علائمی مانند افتادن پلک‌ها، افتادن سر و گردن، عدم تعادل در راه رفتن و خواب‌آلودگی به عنوان علائم آرام بخشی در نظر گرفته شد. با مشاهده علائم بالینی ذکر شده، زمان شروع اثر و طول مدت آرام بخشی درکبوترها به وسیله زمان‌سنج ثبت و مورد ارزیابی آماری قرار گرفت. (شکل ۱) .



شکل ۱ : اثر آرام‌بخشی آسپرومازین بر کبوتر و بسته شدن پلک.

۳. نتایج و بحث

تجویز داخل بینی دارو منجر به شروع آرام بخشی در مدت ۱/۶۷ ± ۶/۴۰ دقیقه و طول مدت آرام بخشی ۲/۷۰ ± ۱۷/۴۰ دقیقه گردید. ثابت شد آسپرومازین در مقایسه با داروی دیازپام که توسط دکتر زمانی مقدم و همکاران انجام گرفته بود (Zamani Moghadam et al., 2009) شروع اثر طولانی تر و مدت آرام بخشی کوتاه تری دارد. با این حال تجویز داخل بینی آسپرومازین آرام بخشی راحت و ایمنی در کبوتر ایجاد کرد. در مطالعه حاضر تجویز داخل بینی دارو به خوبی و بدون مشکل تحمل شد. البته اطلاعات فیزیولوژیکی در طول مطالعه ثبت نشد. تمامی کبوترها برگشت از آرام بخشی ملایمی داشتند و نشانه های سختی تنفس در طول آرام بخشی و بازگشت از آن مشاهده نشد.

۴. نتیجه‌گیری

تجویز داخل بینی آسپرومازین آرام بخشی نسبتا سریع و موثری در کبوتر ایجاد می‌کند و این روش تجویز داخل بینی جایگزین مطلوبی برای سایر روش‌های تجویز دارویی در این پرنده می باشد.

۵. سپاسگزاری

این طرح تحقیقاتی با استفاده از اعتبارات ویژه پژوهشی(گرنت)دانشگاه تخصصی فناوریهای نوین آمل انجام شده است.

منابع

15. Sarchahi, A.A., Vesal, N., Gholipour, M.A., 2009. Effects of acepromazine-xylazine combinations on intraocular pressure, pupil size and heart rate in clinically normal dogs. Online Journal of Veterinary Research 13, 130-137.
16. Vesal, N., Sarchahi, A.A., Nikahval, B., Karampour, A., 2011. Clinical evaluation of the sedative properties of acepromazine xylazine combinations with or without atropine and their effects on physiologic values in dogs. Veterinarski arhiv 81, 485-498.
17. Vesal, N., Zare, P., 2006. Clinical evaluation of intranasal benzodiazepines, α2-agonists and their antagonists in canaries. Veterinary anaesthesia and analgesia 33, 143-148.
18. Zamani Moghadam, A., Bigham Sadegh, A., Sharifi, S., Habibian, S., 2009. Comparison of intranasal administration of diazepam. Iranian Journal of Veterinary Science and Technology 1, 19-26.

Investigation of the effect of additive buffers (Sodium bicarbonate, Romino buffer and Behdam growth buffer) on the performance and parameters of gas production and rumen fermentation in vitro and in vitro in fattening lambs

Fariba Karimi; Mohammad Mehdi Moeini; Mohammad Ibrahim Noorian Soror

1- Student of Livestock Nutrition Department, Faculty of Agriculture, Razi University

2- Associate Professor, Department of Animal Nutrition, Faculty of Agriculture. Razi University

*unikarimi74@gmail.com

Abstract: In this study, the effect of additive buffers (sodium bicarbonate, ruminobuffer and commercial behdam growth buffer) on the performance, gas production and rumen fermentation in vitro and in vitro were investigated. The aim of this study was to improve ruminal acidity, the buffer effect on rumen fermentation parameters and protozoan population, also improve feed efficiency and reduction of fermentation waste and energy waste. A total of 18 fattening lambs at the age of 3-4 months,(29±1 kg), were used in a completely randomized design with three treatments and 6 replications over a period of 75 days. The diets were control: Sodium bicarbonate, the second diet: (ruminobuffer buffer), the third diet: (behdam growth). The lambs were weighed every two weeks and the blood sampling collected at the end of experiment. Rumen fluid was also collected in two stages on day 30 and 60 of the experiment. The mean weight gain in the control and second treatments was higher than the third treatment, but there was no significant difference between the treatments in terms of dry matter consumption. Feed conversion rate improved in the second treatment. Glucose concentration in the third treatment was significantly reduced compared to the second and first treatment (control), the amount of triglyceride in the second and third treatment was significantly reduced compared to the control. Alanine aminotransferase increased significantly in the second and third treatments compared to the control. There was no significant difference between the treatments in terms of protozoan population, but gas production in the second and third treatments decreased compared to the control treatment. Ammonia nitrogen increased under the influence of the second treatment compared to the control treatment. Also, ruminal pH showed a relative increase compared to the control group under two experimental treatments. In general, the use of these buffers in the diet by increasing the concentrate to 75% of the diet, controlled and prevented changes in ruminal pH.

Keywords: Protozoa population, Buffer, Volatile fatty acids, Ammonia nitrogen

بررسی اثر بافر های افزودنی(بی کربنات سدیم، رومینو بافر و بهدام رشد) برعملکرد و فراسنجه های تولید گاز و تخمیر شکمبه در شرایط درون تنی و برون تنی در بره های پرواری

فریباکریمی ؛ محمد مهدی معینی؛ محمد ابراهیم نوریان سرور

۱-دانشجوی گروه علوم دامی .پردیس کشاورزی .دانشگاه رازی

۲-دانشیار گروه علوم دامی پردیس کشاورزی .دانشگاه رازی

*unikarimi74@gmail.com**

چکیده

در این مطالعه اثر بافر های افزودنی (بی کربنات سدیم، رومینوبافر و بافر تجاری بهدام رشد) بر عملکرد و فراسنجه های تولید گاز و تخمیر شکمبه در شرایط درون تنی و برون تنی، بررسی شد. هدف از این مطالعه بررسی:بهبود اسیدیته شکمبه و اثر بافر بر فراسنجه های تخمیر شکمبه و جمعیت پروتوزا، کاهش ضایعات تخمیر و هدرروی انرژی، بهبود کارایی مصرف خوراک، ضریب تبدیل بود. تعداد ۱۸راس بره پرواری نژاد مهربان در سن ۴-۳ ماهگی، با میانگین وزن اولیه ۲۹ کیلوگرم در قالب یک طرح کاملا تصادفی با سه تیمار و ۶تکرار در یک دوره ۷۵روزه استفاده شد، جیره های مورد استفاده به ترتیب شامل جیره اول(شاهد) :(بافر سدیم بی کربنات)،جیره دوم :(بافر رومینوبافر)،جیره سوم :(بافر تجاری بهدام رشد) بودند. در طی دوره آزمایش هر دو هفته یکبار بره ها توزین و در آخر دوره خون گیری انجام شد. مایع شکمبه نیز در دو مرحله روز ۳۰ و ۶۰ آزمایش جمع اوری شد. میانگین افزایش وزن در تیمار شاهد و دوم از تیمار سوم بیشتر بود اما از نظر مصرف ماده خشک بین تیمار ها اختلاف معنی داری وجود نداشت. و بهترین ضریب تبدیل مربوط به تیمار دوم بود. در بین فراسنجه های خونی غلظت گلوکز در تیمار سوم نسبت به تیمار دوم و اول(شاهد) به طور معنی داری کاهش یافت ، مقدار تری گلیسرید هم در تیمار دوم و سوم نسبت به تیمار اول (شاهد) به طور معنی داری کاهش یافت، آلانین آمینو ترانسفراز به طور معنی داری در تیمار های دوم وسوم نسبت به شاهد افزایش یافت، از لحاظ جمعیت پروتوزایی اختلاف معنی داری بین تیمارها دیده نشد اما تولید گاز در تیمارهای دوم و سوم نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت. نیتروژن آمونیاکی در تیمار دوم نسبت به تیمار شاهد بیشتر بود. همچنین pH شکمبه تحت دو تیمار آزمایشی نسبت به گروه شاهد افزایش نسبی را نشان داد. در نتیجه گیری کلی استفاده از این بافرها در جیره پرواری با افزایش کنسانتره تا ۷۵ درصد جیره، سبب کنترل و جلوگیری از تغییر pH شکمبه شد.

کلید واژه :جمعیت پروتوزا، اسید های چرب فرار، نیتروژن آمونیاکی

۱.مقدمه

به منظور افزایش توان تولیدی و تامین انرژی در دام های پرواری و پر تولید از جیره پرکنسانتره استفاده می شود (استوکداله، ۱۹۹۰). در زمان افزایش مصرف کربوهیدرات های سریع تخمیر شونده با افزایش تولید اسید در شکمبه، دام با سازگاری رفتاری، فیزیولوژیکی و متابولیکی اسیدیته شکمبه خود را در دامنه نسبتا کوچکی حفظ می کند تا منجر به ناهنجاری های بالینی و متابولیکی نشود (کیتیالرس و تالکامپ، ۱۹۹۲). بی کربنات سدیم(جوش شیرین) یکی از بافر هایی است که در ازمایشات متعددی مورد بررسی قرار گرفته و اثر مطلوبی هم در کاهش اسیدیته شکمبه و بدن حیوان گزارش شده است و در بسیاری از دامداری ها مورد استفاده قرار می گیرد. اخیرا با توجه به شرایط محیطی و اقتصادی و اثرات جانبی مواد شیمیایی و سرعت و ماندگاری، از بافرهای مختلف گیاهی، معدنی و ویتامینی استفاده می شود. بافرها موجب افزایش مصرف ماده خشک و حفظ بهره وری بالا در شیر دهی می شود و هموستاز شکمبه را در برابر هرگونه تغییر در pH محافظت می کند،تمایل به افزایش نسبت استات به پروپیونات دارد و قابلیت هضم فیبر را ازاین طریق به ترتیب افزایش درصد چربی و تولید شیر افزایش می دهد(شارما و همکاران، ۲۰۱۸).بافر های مورد استفاده در شکمبه باید محلول در آب بوده وبا pKaنزدیک بهpH شکمبه قادر به مصرف و خنثی سازی اسید های شکمبه باشند (اردمن، ۱۹۹۸).

۲.مواد و روش ها

در این آزمایش از دام ها در سه نوبت مایع شکمبه اخذ شد. pH مایع شکمبه بلافاصله بعداز گرفتن مایع شکمبه توسط pH متر اندازه گیری وثبت شد. تولید گاز با روش منک و همکاران (۱۹۷۹)(اندازه گیری شد. فرمول زیر قابلیت هضم ماده آلی کل جیره را با استفاده از تولید گاز به روش گاز تست نشان می دهد .

$$OMD=14/88+0/8893GP+0/0448XP+0/0651XA$$

GP=مقدار گاز تولیدی برحسب میلی لیتر ، XA= مقدار خاکستر نمونه (گرم برکیلو گرم ماده خشک)، XP= مقدار پروتئین خام (گرم برکیلو گرم ماده خشک)، OMD= مقدار ماده آلی تجزیه شده (میلی گرم)

نیتروژن آمونیاکی براساس روش برودریک و کانگ (۱۹۸۰) اندازه‌گیری گردید. اندازه گیری اسید های چرب فرار کل با استفاده از دستگاه مارخام و طبق روش بارنت و رید)) ۱۹۵۷صورت گرفت، برای شمارش پرتوزوآ از نرم افزار دینو کاپچر و لام هموسیتومتراستفاده شدو بر اساس روش دهوریتی ۲۰۰۳انجام می شد.

مدل آماری تجزیه و تحلیل داده ها :آزمایش مورد نظر در قالب یک طرح کاملا تصادفی انجام گرفت. با استفاده از نرم افزار آماری SAS داده ها مورد تجزیه وتحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین ها توسط آزمون چند دامنه ای دانکن انجام شد.

۳.بحث و نتایج

۳-۱-عملکرد رشد

وزن اولیه در هر سه تیمار آزمایش عملکرد تقریبا باهم مساوی بود.وزن نهایی در تیمار شاهد و دوم در مقایسه با تیمار سوم بیشتر بود. افزایش وزن روزانه به ترتیب در تیمار دوم از شاهد بیشتر و تیمار سوم از همگی کمتر.افزایش وزن نهایی تیمار دوم و شاهد از تیمار سوم بیشتر بود و در این دوره بین ۱۴/۸۰تا ۱۶/۶۶کیلوگرم افزایش وزن داشته اند. از لحاظ مصرف ماده خشک بین تیمار های آزمایشی اختلاف معنی داری وجود ندارد. بیشترین مصرف ماده خشک مربوط به تیمار دوم است. از لحاظ ضریب تبدیل خوراک بین تیمار های آزمایشی اختلاف معنی داری وجود ندارد و تیمار دوم ضریب تبدیل بهتری دارد.

جدول ۱: مقایسه ی اثر بافر های مختلف بر فراسنجه های رشد و عملکرد بره های پرواری (میانگین ± خطای استاندارد)

فراسنجه	تیمار			
	تیمار شاهد	تیمار دوم	تیمار سوم	
وزن اولیه (کیلوگرم)	۲۹/۶۵±۰/۸۳	۲۹/۲۱±۰/۸۳	۲۸/۹۵±۰/۸۳	۰/۴۹
وزن نهایی (کیلوگرم)	۴۵/۸۷±۱/۳۳	۴۵/۸۸±۱/۳۳	۴۳/۷۵±۱/۳۳	۰/۷۷
افزایش وزن روزانه (گرم در روز)	۲/۳۳±۱۰/۵۳ ۱۶	۲/۲۲±۱۰/۵۳ ۲۲	۱/۴۴±۱۰/۵۳ ۹۷	۰/۶۳
افزایش وزن نهایی (کیلوگرم)	۱۶/۲۲±۰/۷۸	۱۶/۶۶±۰/۷۸	۱۴/۸۰±۰/۷۸	۰/۶۳
ماده خشک مصرفی روزانه (کیلوگرم)	۱/۶۳±۰/۰۰۵	۱/۵۵±۰/۰۰۵	۱/۵۰±۰/۰۰۵	۰/۸۲
ماده خشک مصرفی کل (کیلوگرم)	۱۲/۳۳±۳/۷۴ ۲	۱۱/۲۸±۳/۷۴ ۶	۱۱/۱۳±۳/۷۴ ۳	۰/۸۲
ضریب تبدیل خوراک	۷/۵۴±۰/۴۰	۶/۹۸ ± ۰/۴۰	۷/۶± ۰/۴۰	۰/۶۱

حروف غیر مشترک نشان دهنده معنی‌داری در سطح P≤ ۰/۰۵.

تیمار اول: شاهد (سدیم بی‌کربنات)، تیمار دوم: رومینوبافر و تیمار سوم: مکمل بافری بهدام رشد.

در آزمایشاتی که بر روی گوسفند انجام شد نتیجه گرفتند مصرف کنسانتره با سدیم بی کربنات افزایش یافت(مارتن،). ۱۹۵۹ اضافه کردن بیکربنات سدیم برای افزایش pH شکمبه مهم است(مارتن و بون،۱۹۶۸ (.مطالعات نشان داده اضافه کردن بنتونیت سدیم سبب بهبود معنی دار در افزایش وزن روزانه و خوراک مصرفی شده است(والز و همکاران، .(۱۹۶۸ کاظمی و وطن پرست(۱۳۹۷)نشان دادند :اکسید منیزیم می تواند الگوی تخمیر در شکمبه را از طریق کاهش نرخ متان، افزایش قابلیت هضم ماده آلی و راندمان سنتز توده میکروبی بهبود بخشد.وجود اکسیدمنیزیم در رومینو بافر و خاصیت بافری آن می تواند از دالیل افزایش وزن روزانه و ضریب تبدیل باشد(هاشمی و همکاران، ۲۰۱۲).با اضافه کردن ۰/۰۵درصد اکسید منیزیم و ۰/۲ درصد بی کربنات سدیم به جیره های پرواری لری _بختیاری بهبود ضریب تبدیل غذایی، افزایش وزن روزانه وافزایش خوراک مصرفی مشاهده شد(هاشمی و همکاران، ۲۰۱۲)مطالعات نشان داده اند اضافه کردن بی کربنات سدیم به جیره گاوشیری در زمان استرس گرمایی موجب افزایش خوراک مصرفی و تولید شیر شده است(ریچارد و همکاران،۱۹۸۸) .

۳-۲-فراسنجه های خونی فراسنجه های خونی کلسترول، اوره، آلبومین، پروتئین در بین تیمار های آزمایشی اختلاف معنی داری نداشتند . گلوکز در تیمار دوم نسبت به تیمار اول و شاهد به طور معنی داری کاهش یافت. تری گلیسرید دربین تیمار های آزمایشی اختلاف معنی داری داشت به طوریکه در تیمار اول و دوم نسبت به شاهد به طور معنی دار کاهش یافت و تیمار اول کاهش معنی داری بیشتری داشت. تری گلیسرید شکل اصلی لیپید دربدن حیوانات است و نقش مهمی در حمل و نقل چربی و ذخیره چربی بدن حیوان دارد. سطح کلسترول نقش مهمی در پیدایش آترواسکلروز و بیماری عروق و کرونر قلب دارد. آلبومین ناقل بسیاری از مواد قطبی در خون است هم چنین اسید چرب جذب شده از روده را به بافت چربی و عضله منتقل می‌کند و هم چنین سبب انتقال اسید های چرب آزاد شده از ذخایر چربی به عضله و کبد می شود.

جدول ۲: مقایسه اثر بافرهای مختلف بر برخی فراسنجه‌های خونی بره‌های پرواری (میانگین ± خطای استاندارد)

فراسنجه	تیمار			
	شاهد	تیمار دوم	تیمار سوم	
گلوکز(mg/dL)	۸۹/۳۳±۲/۱۹ a	۹۲/۵۰±۲/۱۹ a	۷۸/۰۰±۲/۱۹ b	۰/۰۸

کلسترول(mg/dL)	۳۹/۳۳±۱/۵۶	۴۴/۸۳±۱/۵۶	۴۰/۵۰±۱/۵۶	۰/۳۳
تری‌گلیسیرید(mg/dL)	۲۰/۳۳±۰/۸۳ a	۱۵/۵۰±۰/۸۳ ab	۱۸/۳۳±۰/۸۳ b	۰/۰۴
اوره (mg/dL)	۵۶/۰۰±۱/۸۷	۵۹/۳۳±۱/۸۷	۵۶/۰۰±۱/۸۷	۰/۰۷
آلبومین (g/dL)	۳/۷۳±۰/۰۶	۳/۸۰±۰/۰۶	۳/۹۸±۰/۰۶	۰/۳۷
پروتئین کل(g/dL)	۷/۰۳±۰/۱۲	۶/۷۳±۰/۱۲	۷/۰۱±۰/۱۲	۰/۵۹

حروف غیر مشترک نشان دهنده معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ ≥P.

تیمار اول: شاهد (سدیم بی‌کربنات)، تیمار دوم: رومینوبافر و تیمار سوم: مکمل بافری بهدام رشد.

۳-۳-آنزیم های کبدی

آلانین آمینو ترانسفراز به طور معنی داری در بین تیمارهای آزمایشی افزایشداشت و در تیمار دوم افزایشبیشتری داشت.آسپارتات آمینوترانسفراز در بین تیمار هایآزمایشی اختلاف معنی دار داشت و تیمار دوم نسبت به تیمار اول (شاهد (وتیمار سوم کاهشمعنی دار داشت.

جدول ۳: مقایسه اثر بافرهای مختلف بر فعالیت آنزیم‌های کبدی بره‌های پرواری (میانگین ± خطای استاندارد(

فراسنجه	تیمار			معنی‌داری
	تیمار اول	تیمار دوم	تیمار سوم	
آلانین آمینوترانسفراز **(U/L)**	۲۷/۵۰±۱/۲۹b	۳۳/۳۳±۱/۲۹a	۳۶/۵۰±۱/۲۹a	۰/۰۴
آسپارتات آمینوترانسفراز **(U/L)**	۱۳۱/۰۰±۲/۳۷ a	۱۱۸/۵۰±۲/۳۷ b	۱۳۰/۱۶±۲/۳۷ a	۰/۰۱

حروف غیر مشترک نشان دهنده معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ ≥P.

تیمار اول: شاهد (سدیم بی‌کربنات)، تیمار دوم: رومینوبافر و تیمار سوم: مکمل بافری بهدام رشد.

جمعیت پروتوزایی : نتایج نشان داد اِنتودینوم و داسی تریشیدا تحت تاثیر رومینوبافر کاهش و با بافر تجاری بهدام رشد افزایش یافتند، ایزوتریشیدا تحت تاثیر رومینوبافر و بافر تجاری بهدام رشد کاهش یافت. پروتوزوآی کل تحت تاثیر بافر تجاری بهدام رشد کاهش یافت، با گذشت زمان جمعیت اِنتودینیوم و ایزوتریشیدا افزایش و داسی تریشیدا کاهش یافت و جمعیت کل پروتوزوآ با گذشت زمان کاهش یافت. ترکیبات موجود در بافر مثل برخی از مواد موجود در گیاهان برای پروتوزوآ سمی هستند. ترکیبات فعال گیاهان از طریق ایجاد پیوند با استرول غشای تک یاختگان سبب تغییر نفوذ پذیری تک یاخته و در نهایت تجریه تک یاخته مشود.

جدول ٤: مقایسه اثر بافرهای مختلف بر جمعیت پروتوزوآی شکمبه برههای پرواری در طول دوره آزمایشی ($N\times10^{4}$) (میانگین ± خطای استاندارد)

فراسنجه	اِنتودینینه	ایزوتریشیدا	داسی تریشیدا	کل پروتوزوا شمارش شده
تیمار اول	۶/۵۰±۰/۳۱	۱۱/۵۰±۰/۷۷	۳۹۴/۳۳±۳/۶۰	۴۱۲/۳۳±۰/۱۳
تیمار دوم	۵/۰۰±۰/۳۱	۱۵/۰۰±۰/۷۷	۳۵۰/۰۰±۳/۶۰	۴۱۲/۵۰±۰/۱۳
تیمار سوم	۸/۰۰±۰/۳۱	۱۴/۰۰±۰/۷۷	۳۹۰/۵۰±۳/۶۰	۳۷۰/۰۰±۰/۱۳
زمان‌ها				
روز ۳۰	۶/۰۰±۰/۳۱	۱۲/۰۰±۰/۷۷	۳۸۲/۸۸±۳/۶۰	۴۰۰/۸۸±۰/۰۸
روز ۶۰	۷/۰۰±۰/۳۱	۱۵/۰۰±۰/۷۷	۳۷۷/۶۶±۳/۶۰	۳۹۵/۶۶±۰/۰۸
زمان	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
تیمار	۰/۰۲	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
زمان * تیمار	۰/۰۰۸	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱

حروف غیر مشترک نشان دهنده معنی‌داری در سطح $P\leq$ ۰/۰۵.

تیمار اول: شاهد (سدیم بی‌کربنات)، تیمار دوم: رومینوبافر و تیمار سوم: مکمل بافری بهدام رشد.

در مطالعه ای اضافه کردن بنتونیت به میزان ۲درصد به کنجاله خرمای روغنی سبب کاهش جمعیت پروتوزوآیی و کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی در شکمبه شده) عبدالله و همکاران، ۱۹۹۵(.طالب زاده و همکاران (۲۰۱۲):نشان دادند که اسانس آویشن شیرازی یک اثر ضد پروتوزایی قوی دارد، به طوریکه جمعیت انتودینیوم ها، اپیدینیوم، کانو داتوم و اپیدنیم ایکاو داتوم را کاهش داد.

۳-۴-فراسنجه های تخمیر شکمبه ای

نتایج آزمایش نشان داد تولید گاز تحت تاثیر تیمار های آزمایشی کاهش یافت. غلظت نرمال اسید های چرب فرار کل در مایع شکمبه بین ۷۰تا ۱۵۰میلی مول در لیتر است (مک دونالد و همکاران، ۲۰۱۰).بافر های آزمایشی اثر معنی داری روی کل اسید های چرب فرار نداشت. با گذشت زمان اسید های چرب فرار کل افزایش یافت. نتایج نشان می دهد نیتروژن آمونیاکی تحت تاثیر رومینوبافر افزایش یافت نسبت به تیمار شاهد و تحت تاثیر بافر تجاری بهدام رشد کاهش یافت، درطی دوره آزمایش نیتروژن آمونیاکی با گذشت زمان افزایش یافت. محیط شکمبه تحت تاثیر تیمار های آزمایشی افزایش یافت نسبت به گروه شاهد، و باگذشت زمان pH محیط شکمبه به تدریج کاهش یافت. از طریق تولید اسید چرب در شکمبه گاز تولید می شود که می تواند نشان دهنده تخمیر کربوهیدرات های خوراک باشد. کاهش در تولید گاز را ناشی از کاهش قابلیت هضم ماده خشک دانستند و نیز خاصیت ضد میکروبی گیاهان دارویی و کاهش فرایند تخمیر که در نهایت موجب کاهش تولید اسید های چرب فرار می شود، می تواند سبب کاهش تولید گاز شود. اسید های چرب منبع اصلی انرژی نشخوار کننده است بنابراین سطح آن ها مهم است و تغییرات زیاد در میزان آن مطلوب نیست. اسید های چرب اسید های ضعیفی هستند که در شکمبه تجزیه شده و پروتون آن ها آزاد می شود و باعث کاهش pH شکمبه می شود. رابطه عکس بین غلظت اسید های چرب و pH شکمبه وجود دارد. و pH شکمبه شاخص مهمی از عملکرد اکوسیستم شکمبه است.

جدول۵ : مقایسه اثر بافرهای مختلف بر بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه در طول دوره آزمایشی (میانگین ± خطای استاندارد)

فراسنجه	گاز (میلی‌لیتر)	کل اسیدهای چرب فرار (میلی-مول در لیتر)	نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در لیتر)	pH
تیمار اول	۴۷/۸۳±۰/۹۸[a]	۱۳۰/۰۰±۵/۴۹	۲۳۴/۳۵±۸/۰۱	۶/۳۰±۰/۵۰
تیمار دوم	۴۳/۱۶±۰/۹۸[b]	۱۳۰/۰۰±۵/۴۹	۲۴۰/۵۱±۸/۰۱	۶/۳۶± ۰/۵۰
تیمار سوم	۴۲/۱۶±۰/۹۸[b]	۱۳۰/۰۰±۵/۴۹	۲۲۵/۲۵±۸/۰۱	۶/۳۸±۰/۵۰
زمان‌ها				
روز ۳۰	-	۱۴۶/۶۶±۵/۴۹	۲۲۶/۷۱±۸/۰۱	۶/۵۵±۰/۳۰
روز ۶۰	-	۱۶۰/۰۰±۵/۴۹	۲۴۰/۰۳±۸/۰۱	۶/۱۵±۰/۳۰
زمان	-	۰/۰۶	۰/۷۵	<۰/۱
تیمار	۰/۰۳	۰/۱۴	۰/۴۲	۰/۴۴
زمان * تیمار	-	۰/۸۳	۰/۳۹	۰/۰۱

حروف غیر مشترک نشان دهنده معنی‌داری در سطح P≤ ۰/۰۵.

تیمار اول: شاهد (سدیم بی‌کربنات)، تیمار دوم: رومینوبافر و تیمار سوم: مکمل بافری بهدام رشد.

مکمل رومینو بافر شاخص اسید زایی و نسبت شاخص اسید زایی به مقدار ماده خشک ناپدید شده کمتری دارد و میتواند pH محیط را در سطح بالاتری حفظ کند بوسیله حفظ آن در ساعات اولیه انکوباسیون(محمدی چپدره و همکاران، ۱۳۹۶(.نتایج مطالعات نشان داد که گاو های شیرده ای که بی کربنات سدیم وکلینوپتولیت مصرف می کنند دارای pH شکمبه بیشتری هستند (نیکخواه و همکاران، ۱۳۸۲(.محمدی چپدره و همکاران(۱۳۹۶(نشان دادند ؛که گیاهان دارویی تاثیرقابل توجهی در حفظ pH شکمبه و مقدار ماده خشک ناپدید شده در شرایط برون تنی داشتند. هم چنین بواسطه استفاده از بی کربنات سدیم افزایش مصرف نیتروژن آمونیاکی توسط میکروارگانیسم ها و نهایتا افزایش مصرف پروتئین میکروبی توسط دام اثبات شده است(نیوبولد و همکاران، ۱۹۸۸).مکمل کردن کربنات منیزیم و بنتونیت سدیم در شرایط برون تنی سبب افزایش حجم گاز تولیدی و استفاده از اکسید منیزیم کاهش تولید گاز را به همراه دارد (واگار و همکاران، ۲۰۱۸؛ وارادیوا و همکاران، ۲۰۱۳(.

قابلیت هضم: قابلیت هضم تحت تاثیر تیمار های آزمایشی کاهش یافت، قابلیت هضم تیمار اول از تیمار دوم و سوم بیشتر است. تیمار دوم از تیمار سوم قابلیت هضم بیشتری دارد ولی اختالف آن ها معنی دار نیست.

جدول٦:مقایسه اثر بافرهای مختلف برقابلیت هضم جیره(میانگین ± خطای استاندارد)

فراسنجه	تیمار			معنی‌داری
	تیمار اول	تیمار دوم	تیمار سوم	
قابلیت هضم ماده مغذی	۶۶/۶۲±۰/۸۷	۶۶/۲۶±۰/۸۷	۶۶/۶۲±۰/۸۷	۰/۰۹

حروف غیر مشترک نشان دهنده معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ ≥P.

تیمار اول: شاهد (سدیم بی‌کربنات)، تیمار دوم: رومینوبافر و تیمار سوم: مکمل بافری بهدام رشد.

٤.نتیجه گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از همه این بافرها در جیره سبب جلوگیری از افت pH شکمبه شد و با افزایش کنسانتره تا ۷۵ درصد جیره مصرف خوراک کاهش معنی داری نشان نداد، و بره ها افزایش وزن و ضریب تبدیل مناسبی داشتند. بنابراین لازم است استفاده از این بافرها با توجه قیمت و در دسترس بودن انها مورد توجه قرار گیرد.

منابع

١٦. کاظمی م . ، و وطن پرست م . ۱۳۹۷ . اثر استفاده از سطوح مختلف اکسید منیزیوم با خلوص بالا بر ویژگی های هضمی –تخمیری و تولید متان یک جیره ی پر کنسانتره در محیط کشت ثابت . فصلنامه ی علمی پژوهشی محیط زیست جانوری . جلد چهارم ،شماره سوم ، ص ۵۰-۵۶.

۱۷. محمدی م . ، معینی م . و سوری م .۱۳۹۶. اثر مکمل رومینوبافر ، بی کربنات سدیم و مخلوط گیاهان دارویی بر اسیدوز ، اسیدهای چرب فرار ، فراسنجه های خونی و عملکرد بره های پرواری کردی ، نشریه ی پژوهش در نشخوار کنندگان ، جلد پنجم ، شماره دوم ، ص ۸۷-۱۰۳ .

۱۸. نیکخواه ع. ، صفا مهر ع. و مرادی شهر بابک م. ۱۳۸۲. اثرات کلینوپتیولیت طبیعی و بی کربنات سدیم روی متابولیت های خون، شیر و ترکیبات شیر گاو های هلشتاین ، پژوهش و سازندگی ، جلد سوم ، شماره صد وسوم ، ص ۳۲-۳۸ .

19. Abdullah N. 1995. Effects of bentonite on rumen protozoa population and rumenfluid characteristics of sheep fed palm kernel cake. Asian, Australian J. Animal Science. 8(2): 249- 254.

20. Bunn C. R., and Matrone G. 1968. Dietary factors affecting utilization of urea nitrogen by sheep in puri fied diets. 95(2):122-140.

21. Erdman R. A. 1988. Dietary bufferingrequirements of thelactating dairy cow: A review. J. Dairy Sci. 71(3):3246_3266

22. Garcýa-Gonzalez R., Lopez S. Fernandez M. and Gonzalez J. S. 2008. Dose response effects of Rheum officinaleroot and Frangulaalnusbark on ruminal methane production in vitro. Journal of Animal Science and Technology, 145(1): 319-334.

23. Hashemi M., Zamani F. Vatankhah M. and HosseinZadeh S. 2012. Effect of Sodium Bicarbonate and Magnesium Oxide on Performance and Characteristics of Lori- Bakhtiari Fattening Ram Lambs. Global Veterinarian. 8(4): 89-92.

24. Ketelaars J. J. M. H., and Tolkamp B. J. 1992.Towards a new theory of feed intake regulation in ruminants. 3. Optimum feed intake: in search of a physiological background. Livestock Production Science, 31(5): 235- 258.

25. Matrone G. H. A., Ramsey S. and Wise G. H. 1959. Effect of volatile fatty acids. sodium and potassium bicarlx>nate in purified diets for ruminants. 100(8) 240-248.

26. Newbold C.J., Thomas P.C. and Chamberlain D.G. 1988. Effect of dietary supplements of sodium bicarbonate on the utilization of nitrogen in the rumen of sheep receiving a silage-based diet. J. Agriculture Science. 110(2): 383-386.

27. Richard A., and Erdman A. 1988. Dietary Buffering Requirements of thelactating Lactating Dairy Cow: A Review. J. Dairy Science. 71(5): 3246-3266.

28. Stockdale C. R. 1990. Effect of length of the period of supplementation with concentrates on pasture intake and performance of grazing dairy cows. Australian Journal of experimental Agriculture, 39(4): 803-809.

29. Shrma H.,prakash R.hassanmir SH.mani V.and ojaha L.2018.effect of feeding buffer on feed intake milk production and rumen fermantation paatrn in lactating animal.6(3):916-922.

30. Talebzadeh R., Alipour D. Saharkhiz M. J. Azarfar A. and Malecky M. 2012. Effect of essential oils of Zatariamultifloraonin vitro rumen fermentation, protozoa population, growth and enzyme activity of anaerobic fungus isolated from Mehraban sheep. Journal of Animal Science, 172(6): 115-124.

31. Vaghar Seyedin S.M., Mojtahedi M. Ghiasi S.A .and Fathi Nasri M.H .2018. Buffering capacity of some native alkalizer and buffer compounds and their effect on in vitro gas production and digestibility. Iranian Journal of Animal Science Research, 11 (4):54-70.

32. Váradyová Z ., Kisidayov S.K . Mihalikov K . and Baran M . 2006. Influence of natural magnesium sources on the in vitro fermentation and protozoan population in the rumen fluidcollectedfromsheep.SmallRuminantResearch,61:63-71

33. Walz L.S., White T.W. Fernandez J.M. Gentry L.R. Blouin D.C. Froetsche M.A. Brown T.F. Lupton C.J. and Chapa A.M. 1998. Effects of fish-meal and sodium bentoniteon daily gain, wool growth, carcass characteristics and ruminal and blood characteristics of lambs fed concentrate diets. J. Animal Science. 76(4): 2025-2030.

Increasing the shelf life of seafood using polymers containing nanoparticles

Sousan Rasouli

Department of Nanomaterials and Nanocoatings, Institute for Color Science and technology

rasouli@icrc.ac.ir

Abstract

Due to its sensitive structure, seafood is a very suitable environment for the growth of microorganisms, which shortens their shelf life. In this regard, food protection using antibacterial packaging has a special place. In this research, zinc oxide nanoparticles were used to make a polyethylene-based polymer packaging with desirable antibacterial properties. To select the best amount of the used nanoparticles, first a composite of nanoparticles and polyethylene with concentrations of 0.5, 1 and 2% was prepared and Oncorhychus mykiss was selected for antibacterial test. MIC test was performed on four pathogenic microorganisms, *Pseudomonas aeruginosa (ATCC27853), Escherichia coli (PTCC1399) (Staphylococcus aureus (PTCC 1431), Listeria monocytogenes (PTCC 1163).* At a concentration of 1%, all pathogens showed negative results in the MIC test.

Keywords: Zinc Oxide, polyethylene, antibacterial, Oncorhychus mykiss

بالا بردن زمان نگهداری محصولات دریایی با استفاده از پلیمرهای حاوی نانوذرات

سوسن رسولی

گروه نانوفناوری رنگ – پژوهشگاه رنگ

rasouli@icrc.ac.ir

چکیده

محصولات دریایی به جهت ساختار حساس خود محیط بسیار مناسبی برای رشد میکروارگانیسمها بوده و این امر عمر نگهداری آنها را کوتاه می کند. دراین راستا حفاظت از مواد غذایی با استفاده از بسته بندی های ضد باکتری جایگاه ویژه ای دارد. در این تحقیق، برای ساخت یک بسته بندی پلیمری بر پایه پلی اتیلن با خواص آنتی باکتریال مطلوب از نانوذرات اکسید روی استفاده شد. برای انتخاب مقدار نانوذرات مصرفی، ابتدا کامپوزیت نانوذرات و پلی اتیلن با غلظتهای ۰.۵، ۱ و ۲ درصد تهیه شد و گوشت ماهی قزل آلا نیز برای تست ضدباکتری انتخاب شد. تست MIC بر روی چهار میکروارگانیسم پاتوژن زا , Pseudomonas aeruginosa (ATCC27853), Esherichia coli (PTCC1399) (Staphylococcus aureus(PTCC *1431*) , Listeria monocytogenes (PTCC *1163*), انجام شد. نتایج نشان داد که نانو اکسید روی بسیار قوی عمل کرده و در غلظت یک درصد تمامی پاتوژن زا ها نتایج منفی را در آزمایش MIC نشان دادند.

کلمات کلیدی: اکسید روی، پلی اتیلن، آنتی باکتریال، ماهی قزل آلا

۱. مقدمه

مقاومت در برابر پاتوژن های انسانی یک چالش بزرگ در زمینه های دارویی و پزشکی است که این مقاومت های آنتی بیوتیکی و مصرف مداوم و بی رویه ترکیبات دارویی شیمیایی باعث ایجاد پدیده مهم مقاومت درمیکروارگانیسم ها شده است . با ایجاد این پدیده اثرداروها ضعیف و یا خنثی شده و در نهایت باعث افزایش مقدار مصرف دارو و تمایل به استفاده از ترکیبات با فرمولاسیون جدید تر و قوی تر میشود [۲-۱]. این امر در عصر حاضر یک نگرانی در حال رشد است لذا پیشگیری از ورود پاتوژن ها امری حائز اهمیت است. یکی از راههای اصلی ورود پاتوژن ها به بدن انسان وجود این مواد و میکروارگانیسم های مولد آنها در مواد غذایی است. لذا محافظت ماده ی غذایی از ورود و فعالیت میکروارگانیسم ها امری ضروری است و در این زمینه بسته بندی های آنتی باکتریال جایگاه ویژه ایی دارند. از طرف دیگر استفاده از نانو مواد برای ایجاد بسته بندی فعال بسیار موفق بوده است. یکی از نانو ذراتی که در زمینه ایجاد خواص آنتی باکتریال مطرح است اکسید روی می باشد [۳].

بسته بندی نانویی مواد غذایی با خواص ضد میکروبی بر پایه نانوکاپوزیت های نسل نوین می باشد که به وسیله افزودن یا ترکیب نانوذرات به داخل فیلم های پلیمری ساخته می شد. بیشترین عملکرد این نانوذرات ضد میکروبی بر روی سطح وسیعی با یک حجم مشخص می باشد که این خود دلیل بر افزایش خاصیت ضد میکروبی این نانو ذرات فلزی یا اکسید فلزی است.

به طور کلی مکانیسم عملکرد ضد میکروبی این نانو ذرات می تواند به روش های مختلفی باشد مانند [۴]:

الف- باعث یکسری فعل و انفعالات داخلی در سلول میکروبی می شود.

ب- انتقال الکترون های غشایی را به تعلیق در می آورد.

ج- از طریق سوراخ کردن پوشش به داخل سلول نفوذ می کند.

د- اکسیداسیون اجزای سلولی را باعث می شود.

ه- محصولات ثانویه ای را تولید کند که باعث تخریب سلول می شود.

در بین نانوذرات اکسید فلزی، اکسید روی با داشتن ویژگی های منحصر به فرد در اندازه، خواص نوری، مغناطیسی و ضدباکتریایی، کاربرد بسیار وسیعی در طراحی بیوسنسورها، محصولات آرایشی و بهداشتی و پزشکی پیدا کرده است [۶-۵].

از طرف دیگر بسیاری از مواد غذایی از جمله فرآورده های دریایی فسادپذیر هستند و لازم است که از فساد آنها در طی فرآوری، آماده سازی، نگه داری و توزیع، پیشگیری نمود [۷]. لذا ایجاد خواص آنتی باکتریال مناسب برای بسته بندی این مواد غذایی و حفاظت از آنها امری ضروری است. در این تحقیق و پژوهش، اثر بسته بندی پلیمری آنتی باکتریال تیمار شده با نانو ذرات اکسید روی بر روی ماهی قزل آلا بررسی شده است. در این راستا، فیلمهای پلیمری پلی اتیلنی با استفاده از درصدهای وزنی ۰.۵ ،۱ و ۲ درصد از نانواکسید روی تهیه شده و عملکرد آنتی باکتریال فیلمهای تهیه شده بر مهار رشد میکروارگانیسم های Pseudomonas aeruginosa، Escherichia coli، Staphylococcus aureus، Listeria monocytogenes در گوشت ماهی قزل آلا بررسی می شود.

۲. مواد و روش ها

۲-۱- مواد

پلی اتیلن سبک گرید ۰۲ بندرامام با اندیس جریان مذاب ۲ گرم بر ۱۰دقیقه، چگالی ۰/۹۲ گرم بر میلی لیتر و نقطه بستن ۹۴°C . سوسپانسیون سوش های باکتریای *Pseudomonas aeruginosa (ATCC27853)*، *Esherichia coli (PTCC1399)*, *Staphylococcus aureus(ATCC27853)*، *Listeria monocytogenes* *تهیه شده از انیستیتوپاستور تهران*، محیط مولر هینتون آگار خریداری شده از شرکت مرک ، نانو ذرات اکسید روی تهیه شده از شرکت نانو پارس، انکوباتور ، استریلازاتور اشعه UV ، فیلدوپلاتین لوپ، لوله Scilabware ،هود لامینار ،اتوکلاو ، استریلازاتور فیلدوپلاتین، دستگاه کانتور باکتری ،محیط کشت NA ،محیط کشت NB.

۲-۲- آماده سازی مواد اولیه برای تهیه فیلم

درصدهای وزنی ۰.۵٪، ۱٪ و ۲٪ از نانو ذرات اکسید روی سنتز شده با وزن مشخصی از گرانولهای پلی اتیلنی اضافه گردید. این مواد در دستگاه اکسترودر مخلوط شدند. با استفاده از روش دمشی فیلم ها با ابعاد و ضخامت مشخص تولید شد. در این راستا، گرانول های تولید شده به داخل دستگاه با قطر مارپیچ ۴۵ میلی متر و طول بر قطر مارپیچ ۳۰ میلی متر اضافه و فیلم با ضخامت کمتر از

۵۰ میکرومتر تولید گردید. اندازه ضخامت از ۱۰ نقطه متفاوت فیلم های تولید شده به صورت تصادفی انتخاب و میانگین آنها به عنوان ضخامت اصلی انتخاب شد.

۲-۳- تهیه سوسپانسیون نانو اکسید روی و انجام آزمون ضد باکتری به روش MIC[356]

برای تهیه سوسپانسیون نانو مواد رقت ها یی با درصد های مختلف تهیه شد (۰.۵ و ۱ و ۲ درصد) و بر پاتوژن های مذکور مورد بررسی قرار گرفته و تست های تاثیر غلظت های مختلف نانوذرات بر باکتری ها در محیط ابتدا محیط کشت (NB) آماده سازی شد. سپس در داخل هر لوله Scilabware که قبلا استریل شده است . ۱میلی لیتر محیط کشت NB ریخته شد و سپس از سوسپانسیون های سوش های باکتری به مقدار ۵۰ µl نیم مکفارلند اضافه شد.

۲-۵- بررسی میکروبی فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان با بسته بندی پلیمری حاوی نانواکسید روی

نمونه ی قزل آلای رنگین کمان بسته بندی شده از موسسه تحقیقات شیلات ایران تهیه و از لحاظ بارمیکروبی توسط آزمون شمارش کلی میکروبی مورد بررسی اولیه قرار گرفت. برای آزمایشات میکروبیولوژی هنگام نمونه برداری برای از بین بردن آلودگی، ابتدا بسته ها با الکل ۷۰ درجه استریل شده و در شرایط اسپتیک و استریل بسته ها باز شدند . ابتدا فیلمهای دارای تیمار نانو ماده در اندازه های ۵×۵ بریده شده و میزان یک گرم از نمونه قزل آلای رنگین کمان در داخل بسته های پلیمری قرار گرفت سپس تلقیح سوسپانسیون نیم مکفارلند از سوش های مختلف باکتری, Pseudomonas aeruginosa (ATCC27853), Esherichia coli (PTCC1399), Staphylococcus aureus(PTCC 1431), Listeria monocytogenes(PTCC 1163)،انجام و گرمخانه گذاری صورت گرفت .پس از خروج نمونه های تلقیح شده ، رقت سازی تا ۱۰ مرحله صورت گرفت و از هر رقت سه کشت انجام شده است در نهایت بعد از ۴۸ ساعت، گرمخانه گذاری پلیت ها خارج شده و تعداد کلنی ها برای هر رقت به صورت میانگین و به صورت CFU/m2 استخراج شد و سپس به صورت عدد فعالیت ضد باکتری گزارش شد.

در این تحقیق و پژوهش برای بیان بهتر عملکرد کاغذ تیمار شده با نانوذرات از عدد فعالیت ضد باکتری استفاده شد که فرمول زیر بیان کننده آن است:

$R=\log B/A$

B: تعداد کلنی در نمونه شاهدCFU/m2

A: تعداد کلنی در نمونه تیمار شدهCFU/m2

R : عدد فعالیت ضد باکتری

۳. نتایج و بحث

در ابتدا برای تعیین مقدار بهینه نانو ذرات مصرفی در تهیه سوسپانسیون محلول پوشش دو تست MIC برای هر چهارباکتری , *Pseudomonas aeruginosa (ATCC27853), Esherichia coli (PTCC1399) (Staphylococcus aureus(PTCC 1431) , Listeria monocytogenes (PTCC 1163),* اندازه گیری شده و نتایج در جدول شماره ۱ گزارش شده است. طبق نتایج آزمایشات نانوذرات اکسید روی بسیار قوی عمل کرده و در مورد هر چهار پاتوژن غلظت یک درصد آن در مهار رشد باکتری

[356] Minimum Inhibitory Concenteration

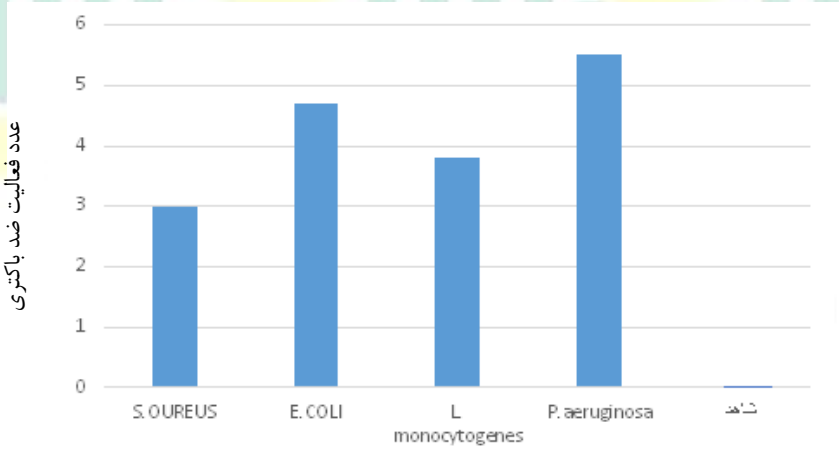
اتفاق افتاده است. لذا برای ساخت بسته بندی آنتی باکتریال غلظت یک درصد در فیلم پلیمری بکار رفته و تست های ضد باکتری بر روی گوشت ماهی انجام شد.

جدول ۱: نتایج ازمون MIC بر روی چهار میکرو ارگانیسم پاتوژن زا

سوش باکتری	درصد غلظت نانوذرات اکسید روی		
	۰/۵	۱	۱/۵
S.OUREUS	+	–	–
E.COLI	+	–	–
L. monocytogenes	+	–	–
P.aeruginosa	+	–	–

۳-۱-نتایج بر روی فیله ماهی قزل آلا

تست های باکتری بر روی چهار میکرو ارگانیسم پاتوزن زا و شاخص انجام شد و برای بیان بهتر نتایج عدد فعالیت ضد باکتری گزارش شد. همانطور که در نمودار شماره ۱ مشاهده می شود. نانو اکسید روی برروی پاتوژن زا های گرم منفی اثر بیشتری داشته است و توانسته است عدد فعالیت ضد باکتری بیشتری را از خود نشان دهد. در مجموع اثر نانو ذرات اکسید روی بر روی دو پاتوزن زا *Pseudomonas aeruginosa (ATCC27853)* و *Esherichia coli (PTCC1399)* بیشتر از دو پاتوژن زا *(Staphylococcus aureus(PTCC 1431)* و *Listeria monocytogenes (PTCC 1163)* , می باشد. نتایج این تحقیق نشان می دهدکه بسته بندی حاوی نانو ذرات اکسید روی در برابر هر چهار پاتوژن زا موفق عمل کرده است ولی عملکرد این بسته بندی در برابر دو پاتوژن زا گرم منفی عملکرد موثرتری داشته است.



نمودار شماره ۱:عدد فعالیت ضد باکتری بسته بندی حاوی نانوذرات اکسید روی بروی چهار میکروارگانیسم پاتوژن زا در نمونه فیله ماهی قزل آلا

خاصیت ضد میکروبی اکسید روی مستلزم ورود به داخل سلول نمی باشد و در تماس با سلول نیز می تواند کارایی خود را داشته باشد که باعث تغییر ماهیت سلول شده و در نهایت با تولید محصولاتی نابودی آن را باعث می شود. فعالیت اکسید روی برای تولید محصولات فتوکاتالیکی نیازمند نور نمی باشد و حتی شاید بتواند بدون حضور نور نیز فعالیت خود را داشته باشد. گونه های اکسیژن غیرفعال تولید شده شامل هیدراکسید، هیدروژن پراکسید، اکسیژن می باشند. اکسید روی در صورت معیوب شدن با نور ماورای بنفش و نور مرئی می تواند خود را بازسازی کند. رادیکال های هیدروکسیل و سوپراکسید به دلیل منفی بودن نمی توانند وارد سلول شوند ولی در تماس مستقیم با سلول باکتری می توانند عمل کنند اما هیدروژن پراکسید می تواند به داخل سلول نفوذ کند. اما فرض بر این است که با کاهش اندازه نانو ذرات غلظت هیدروژن پراکسید تولید شده افزایش پیدا می کند.

تحقیقات قبلی نشان دادند که سلولهای باکتریها به سطح فیلم پلیمری می چسبند و این امر بدون تردید موجب ازاد شده یونهای Zn^{+2} و H_2O_2 از سطح ذرات اکسید روی می شود. می توان گفت که آزاد شدن یونهای Zn^{+2} و H_2O_2 از سطح ذرات اکسید روی می تواند یکی از عوامل مهم درایجاد خواص آنتی باکتریالی باشد [۸]. به علاوه، در تحقیقی دیگر این نظریه که پروتئین لیپو پلی ساکارید موجود در دیواره سلول باکتری دلیل متفاوت بودن خواص ضد میکروبی نانو ذرات در مقابل باکتریهای گرم مثبت و منفی است را تقویت میکند[۹]. در واقع اتصال نانو ذرات اکسید روی به این پروتئینها در باکتریهای گرم منفی دلیل خاصیت ضد میکروبی آن می باشد. نانو ذرات اکسید روی به دلیل نسبت سطح به حجم بسیار بالا و بالا بودن تعداد زیادی از اتم های فلز در واحد سطح، تماس بهتری با میکروارگانیسم ها داشته و ویژگی های ضد میکروبی منحصر به فردی را نسبت به فلز نقره در ابعاد بزرگتر نشان می دهند.

۴.نتیجه گیری

مواد غذایی دریایی، از جمله مواد غذایی با حساسیت بالا و فساد پذیری زیاد هستند. لذا انتخاب ، طراحی و ساخت بسته بندی برای این نوع مواد دارای پیچیدگی و مشکلات خاصی است. این تحقیق نشان داد که نانوکامپوزیت بر پایه اکسید روی می تواند در مهار میکروارگانیسم ها عملکرد مناسبی را داشته باشد. تنها با استفاده از یک درصد وزنی نانوذرات اکسید روی می تواند در محافظت از فیله ماهی قزال آلا و جلوگیری از رشد و فعالیت میکروارگانیسم ها به خوبی عمل کند که این مسله باعث افزایش ماندگاری این محصول می شود.

منابع

6. Soto-quintero, A., Romo-uribe, Á., & Berm, H.,2017. 3D-Hydrogel Based Polymeric Nanoreactors for Silver Nano-Antimicrobial Composites Generation, Nanomaterials journal, MDPI, 7(8), 209: 1–18.

7. Li, W., Xie, X., & Shi, Q., 2010. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli, Springer, Applied Microbial and Cell Physiology Antibacterial,85: 1115–1122.

8. Linlin Wang, Chen Hu, Longquan Shao, 2017. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future, International Journal of Nanomedicine, 12:1228-1249

9. Rajeev Kumar Sharma, Meenakshi Agarwal, Kantesh Balani, Effect of ZnO morphology on affecting bactericidal property of ultra high molecular weight polyethylene biocomposite Materials Science and Engineering C 62 (2016) 843–851

10. VarshaSrivastavaDeepakGusainYogesh ChandraSharma, 2013. Synthesis, characterization and pplication of zinc oxide nanoparticles (n-ZnO), Ceramic International, Volume 39, Issue 8, Pages 9803-9808

11. Chen, J., & A, L. Brody. Use of active packaging structures to control the quality of a ready-to-eat meat product, 2013. Food Control. 30:306-310

12. Ekhtiarzade, H., Akhondzadeh Basti, A., Misaghi, A., Ebrahimzadeh mousavi, 2010 , Effect of Zataria multiflora Boiss essential oil on the growth of Staphylococcus aureus in the light salted fillets of silver carp (Hypophthalmichthys molitrix), Iranian Journal of Fisheries Sciences, 9(3) 352- 359

13. R.K. Sharma, K. Balani, 2014. Mechanics of ZnOmicro-rod and ZnO nanoparticle reinforcement in ultra-high molecular weight polyethylene biocomposite, J. Phys. D. Appl. Phys. 47: 345301

14. Cozzolino, C.A, Nilsson, F. 2013. Exploiting the nano-sized features controlled-Release packaging. Colloids Surf B Biointerfaces. 110:208-16

Effect of different dietary selenium varieties on mercury status during the late pregnancy in Khalkhali goats and their kids

Rasool Kachuee[1*]; Hossein Abdi-Benemar[2]; Yaghoub Mansoori[3]; Jamal Seifdavati[2]; Mohamad Mehdi Moeini[4]

1- PhD, Department of Animal Science, College of agricultural sciences, University of Mohaghegh .Ardabili, Iran
2- Associate Professor, Department of Animal Science, College of agricultural sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Iran.
3- Associate Professor, Department of Animal Science, College of agricultural sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Iran.
4- Associate Professor, Department of Animal Science, College of agricultural sciences, University of Razi Kermanshah, Iran.

**rasool.kachuee@gmail.com*

Abstract

The present study aims to determine the effect of dietary Se supplement on Khalkhali goats at the last stage of gestation on mercury concentrations of goats and placental, colostrum, and milk transfer of this heavy mineral from goats to their kids and colostrum .To this end, forty pregnant Khalkhali goats (30 ± 5 kg) were randomly allocated four treatments to receive supplements of 0 (control), 0.6 mg Se $head^{-1}$ d^{-1} of selenomethionin (SM), 0.6 mg Se $head^{-1}$ d^{-1} of selenium nanoparticles (SN) and 0.6 mg Se $head^{-1}$ d^{-1} of sodium selenite (SS), from four weeks before the expected day of delivery. Blood samples were taken from the goats four weeks before the expected day of delivery and on the kidding day, and colostrums were collected from the goats immediately after kidding. Instantly after delivery, newborn kids were taken apart from their dams and their blood samples were collected from the jugular vein, before they drank their first colostrums and at 7, 14, 21, and 28 after birth day. The results demonstrated that the serum mercury (Hg) concentration was greater in control group compared with Se supplemented goats ($P < 0.05$). Likewise, the total Hg content of the colostrums was lower in SM than SN ($P < 0.05$) and SS ($P < 0.05$). Moreover, the serum concentration of Hg significantly decreased in kids of Se treated goats contrasted with the control ones ($P > 0.05$). Similar differences among treatments were observed from examination of the kids' concentration of Hg. dissimilar observations were recorded for kids on a week to the four weeks of their life, where a similar pattern of results appeared for changes in Hg content of milk from 7 days after parturition day to the fourth week of lactation ($P > 0.05$). These results seem to indicate a higher neutralization efficiency against Hg into kids of selenium treated goats when contrasted with the control ones. It could be concluded that Se supplementation can affect and correlate with Hg levels, and this effect depends on the chemical or physical variety of Se supplementation.

Keywords: nano-Selenium, Selenomethionine, mercury transplacental and Colostrum transfer

اثر مکمل خوراکی نانو ذرات سلنیوم ، سلنیوم آلی و معدنی در بزهای آبستن سنگین بر مقادیر جیوه سرم، آغوز و شیر بزها و سرم بزغاله های آن ها

رسول کچویی*[۱]؛حسین عبدی بنمار[۲]؛ یعقوب منصوری[۳]؛ جمال سیف دواتی[۲]؛ محمد مهدی معینی[۴]

۱- دانش آموخته گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

۳- **استاد** گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه محقق اردبیلی

۴-**دانشیار** گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی

**rasool.kachuee@gmail.com*

چکیده

این مطالعه به منظور تعیین اثر منابع مختلف سلنیوم بر غلظت جیوه سرم و آغوز بز های خلخالی در اواخر آبستنی و همچنین اثر این منابع بر غلظت جیوه سرم بزغاله های آن ها تا چهار هفتگی و غلظت جیوه شیر مادران تا هفته چهارم در بزها انجام شد. آزمایش با استفاده از ۴۰ رأس بز خلخالی که در یک طرح بلوک کاملا تصادفی و بلوک بندی بر اساس وزن بزها انجام شد. در ۴ گروه ۱۰ رأسی تقسیم شدند، اجرا شد. یکی از تیمارهای آزمایشی ۰/۶ میلی گرم سلنیوم به ازای هر راس در روز به شکل سلنو متیونین و دیگر تیمارهای آزمایشی نیز به همین مقدار سلنیوم به شکل نانو ذرات سلنیوم و سدیم سلنیت دریافت کردند. گروه شاهد هیچ گونه مکملی دریافت نکردند و تنها جیره پایه را که حاوی ۰/۱ میلی گرم در کیلوگرم ماده خشک بود را دریافت کردند. سه هفته قبل از زایش و روز زایش از بزها خون گیری به عمل آمد. از بزغاله ها نیز در روز زایش و تا چهار هفته بعد از زایش بصورت هفتگی از سیاهرگ وداج خون گیری به عمل آمد. با استفاده از دستگاه ICP-OES غلظت جیوه سرم، آغوز و شیر بزها اندازه گیری شد. غلظت جیوه سرم بز ها قبل از زایش تقریباً مشابه بود، اما روز زایش غلظت جیوه در سرم بز هایی که مکمل دریافت کرده بودند پایین تر بود و از نظر آماری اختلاف بین گروه شاهد و تیمارهای آزمایشی معنی دار بود (P <۰/۰۵). تفاوت معنی داری بین منابع معدنی، نانو ذرات سلنیوم دیده نشد. اما غلظت جیوه در گروه سلنومتیونین از لحاظ آماری میزان کمتری از نانو ذرات سلنیوم داشت. نتایج بدست آمده از این آزمایش نشان داد که غلظت جیوه آغوز در بزهای دریافت کننده مکمل سلنومتیونین در مقایسه با سایر گروه ها کاهش معنی داری داشت (P <۰/۰۵). اما تفاوت معنی داری در غلظت جیوه آغوز بین منابع معدنی و نانو ذرات سلنیوم دیده نشد. غلظت جیوه سرم بزغاله های گروه آزمایشی در هنگام تولد در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی داری داشت (P >۰/۰۵). به طور مشابه، جیوه سرم بزغاله ها از سن یک تا چهار هفتگی در گروه های دریافت کننده مکمل سلنیوم کاهش معنی داری در مقایسه با گروه شاهد نشان نداد (P >۰/۰۵) و غلظت جیوه شیر گروه های دریافت کننده سلنیوم تفاوت معنی داری را نسبت به گروه شاهد نشان نداد (P >۰/۰۵). به نظر می رسد که افزایش مقدار سلنیوم خوراک بزها سبب کاهش غلظت جیوه در سرم بزها و آغوز شد. بنابراین هنگامی که از سطوح بالای سلنیوم در جیره دام های آبستن استفاده می شود می تواند سبب کاهش عنصر همه جا حاضر و بسیار سمی جیوه در این حیوانات و فراورده های دامی شود.

واژگان کلیدی: نانوذرات سلنیوم، سلنومتیونین، انتقال جفتی و آغوز جیوه

۱.مقدمه

یکی از مهم‌ترین پیامدهای انقلاب سوم صنعتی ورود فلزات سنگین به خانه‌ها است. جیوه یکی از بارزترین این مواد است که تقریباً در تمام اجزاء زندگی به‌صورت پنهان وجود دارد. جیوه فلز سفید رنگ نقره ای است که در دمای اتاق به حالت مایع است و یکی از قدیمی ترین و سنگین ترین فلزاتی است که بشر تاکنون می شناسد. هیچکس نمی داند حد نرمال جیوه در بدن انسان چقدر است اما آنچه شناخته شده اینست که جیوه می تواند باعث طیف وسیعی از مشکلات فیزیکی و حیاتی گردد. این عنصر یکی از فلزات سنگین موجود در محیط زیست و مواد غذایی است .باتوجه به این واقعیت که ما در زندگی امروزه به طور ناخواسته با این فلزسنگین در تماس هستیم و آن از طرق مختلف و حتی از طریق مواد غذایی مصرفی وارد بدن ما می شود. منشاهای اصلی این فلز سنگین پسماندهای صنعتی حتی رنگ ها می توانند باشند و وارد محیط زیست و چرخه غذای انسان شوند و دلیل افزایش شمار بیماری هایی با منشأ غذایی است. رژیم غذایی به عنوان عامل تعیین کننده برای انتقال این فلز از محیط اطراف به حیوانات خشکی‌زی شناخته شده اند (Rahman et al., 2019). متخصصان توصیه می کنند که برای پیشگیری از آسیب این فلزات به بدن می توان از برخی راهکارهای طبیعی کمک گرفت. سلنیوم از جمله موادی هستند که خنثی کننده اثرات جیوه بر بدن محسوب می شوند. سلنیوم یک عنصر ضروری و کمیاب است که به گروه ششم جدول تناوبی عناصر تعلق دارد. از نظر شیمیایی سلنیوم بین تلوریم که یک فلز و گوگرد که یک غیر فلز است قرار دارد. سلنیوم به عنوان یک عنصر سمی خطرناک در خاک شناخته شده بود، اهمیت این عنصر زمانی مشخص گردید که به عنوان یک عنصر کم مصرف دارای نقش های بسیار مهم معرفی شده و نیز احتمال کمبود آن مطرح گردید (Surai, 2006). اهمیت بیولوژیکی سلنیوم به عنوان بخشی از ساختار سلنو آنزیم ها و گلوتاتیون پراکسیداز که در تنظیم فرایند های اکسیداتیو و محافظت غشا سلول نقش دارد و در ترکیب ساختاری ردوکتازهای باکتریایی مشخص گردیده است. کمبود سلنیوم سبب کاهش سنتز گلوتاتیون پر اکسیداز و در نتیجه آسیب به غشا سلول و میتوکندری می شود (Rahman et al 2019). بیماری ماهیچه سفید در کشور های بزرگ پرورش دهنده گوسفند در جهان از جمله آفریقای جنوبی ، ترکیه، نیوزلند، انگلستان و آمریکا گزارش شده است. ترکیه بیشترین میزان شیوع این بیماری را در بین کشورها دارد. بین عناصر در غذا و خون اثرات رقابتی و تقویت‌کنندگی دیده شده است (Kachuee et al., 2013). همچنین، سلنیوم در خون با جیوه پیوند برقرار می کند و سبب کاهش سمیت جیوه می شود. میان سلنیوم و جیوه روابط متابولیکی وجود دارد و سلنیوم می تواند با پیوند های مستقیم با عناصر سنگین یا ایفای نقش خود در سیستم آنتی اکسیدانی و حتی با رقابت با آن ها در جذب سبب کاهش تاثیرات منفی این عناصر می شود.). علاوه بر این گزارش شد که سلنیوم توانست از سلول های کلیوی و کبدی در مقابل جیوه، با تشکیل باندهای جیوه-سلنیوم محافظت کند که سبب کاهش مرگ و میر ناشی از جیوه شد (Wang et al., 2017).

تحقیقات اخیر نشان دادند که مکمل سلنیوم به طور تاثیرگذاری مقدار جیوه در مغز را تغییر داد و سبب بهبود مسمومیت عصبی و استرس اکسیداتیو حاصل از این عنصر سنگین شد، همچنین این محققان، یک اثر متقابل مولکولی معنی داری بین جیوه-سلنیوم در سیستم عصبی انسان مشاهده کردند که ممکن است اثر مکمل سلنیوم بر خنثی سازی، کاهش مسمومیت عصبی و استرس اکسیداتیو حاصل از جیوه را توجیه کند (García-Sevillano et al., 2015).

میزان جیوه در حیوانات مزرعه ای و محصولات آن ها ممکن است تحت تاثیر مقادیر و شکل سلنیوم مصرفی در جیره این حیوانات قرار گیرد. این تحقیق در راستای بررسی اثر مکمل نانو ذرات سلنیوم ، سلنیوم آلی و معدنی در بزهای آبستن بر غلظت جیوه سرم بزها، بزغاله ها، آغوز و شیر آن ها انجام گردید.

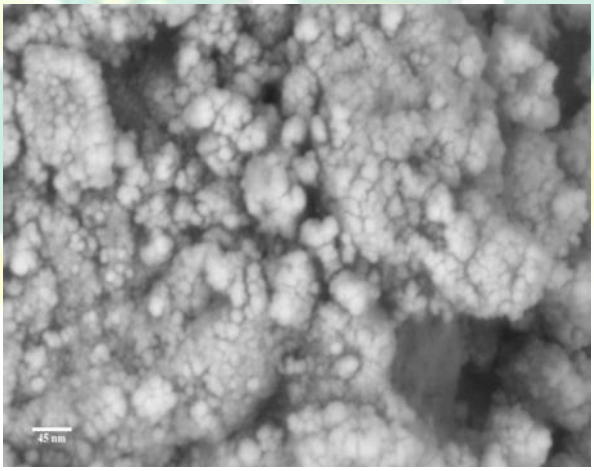
۲.مواد و روش‌ها

این آزمایش در واحد گوسفنداری دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی در اوایل بهمن ماه انجام شد. تعداد ۴۰ رأس بز نژاد خلخالی از سن حدود دو سال (۰/۵±۲) در یک دوره آزمایش ۹۰ روزه برای اجرای این آزمایش در نظر گرفته شد. میانگین وزن اولیه بزها ۳±۳۰ کیلوگرم بود. این دام ها بعد از توزین و بررسی سلامت عمومی دام به قفس های انفرادی(۰/۹۰×۱/۲) منتقل شدند که هر کدام بصورت مجزا به آب و خوراک دسترسی داشتند. تمام بزها به صورت یکسان تغذیه می شدند و دام‌های مورد آزمایش به صورت انفرادی و روزانه دو نوبت با یونجه و کنسانتره (دانه ذرت، گنجاله سویا، دانه جو و سبوس گندم) به نسبت ۵۵ به ۴۵ تغذیه می شدند. بز ها ۹۰ روز قبل از زایش ، در محوطه ای مسقف و در قفس به صورت انفرادی نگهداری می شدند. روزانه در دو نوبت صبح و عصر تغذیه آنها انجام می شد. دام ها مکمل های سلنیوم را به صورت روزانه و انفرادی دریافت می کردند.
گروه های آزمایشی شامل:

گروه های آزمایشی شامل: گروه شاهد بزهای آزمایشی بدون مکمل سلنیوم، گروه سلنومتیونین که جیره بزهای آزمایشی دارای ۰/۶ میلی گرم مکمل آلی سلنیوم به صورت سلنومتیونین ساخت شرکت سیگما ایالات متحد آمریکا، گروه سدیم سلنیت که جیره بز ها دارای۰/۶ میلی گرم مکمل معدنی سلنیوم به صورت سدیم سلنیت ساخت شرکت سیگما ایالات متحد آمریکا، و گروه نانوذرات سلنیوم که خوراک بز ها حاوی ۰/۶ میلی گرم سلنیوم به فرم نانو ذرات (۴۵ نانومتر) بود. دام ها این مکمل ها را به صورت روزانه و انفرادی در دو نوبت دریافت کردند.

قبل از مصرف مکمل سلنیوم و نیز روز زایش از سیاهرگ وداج کلیه بزها خونگیری شد. از بزغاله ها نیز در روز تولد (قبل از خوردن آغوز) و در ۷ ، ۱۴و ۲۱روزگی از سیاهرگ وداج خونگیری به عمل آمد. پس از زایش بزها به مدت ۴ هفته در قفس باقی مانده و روزانه در دو نوبت صبح و عصر شیردوشی می شدند.

نانو ذرات سلنیوم بر اساس روش کچویی و همکاران (۲۰۱۹) آماده سازی شد اندازه گیری سطح این ذرات با دستگاه میکروسکوپ الکترونی (فیلیپس XL30) با بزرگنمایی k50 در در شکل ۱ نشان داده شده است. این مکمل به صورت خوراکی قابل استفاده است.



شکل ۱: سطح نانودرات آماده سازی شده(۴۵ نانومتر)

این طرح در قالب طرح بلوک کامل تصادفی اجرا شد. دام ها بر اساس وزن بلوک بندی شدند.داده ها با رویه ی MIX ، نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۴ (۲۰۱۳) تجزیه و تحلیل شدند. .میانگین ها توسط آزمون Lsmeans با یکدیگر مقایسه شدند. مدل آماری طرح به صورت زیربود:

$$Yij = \mu + Ti + Bj + \varepsilon ij$$

در این فرمول Yij نشان دهنده مقدار عددی هر مشاهده در آزمایش، μ میانگین کل جامعه ای است که از طریق نمونه ها با فرض صفر مورد بررسی قرار گرفتند، Bj نشان دهنده بلوک Ti نشان دهنده اثر مکمل آزمایشی و εij نشان دهنده اثر خطا است .

مدل آماری استفاده شده برای وزن بزغاله ها و عناصر سرم بزغاله ها بر اساس طرح بلوک تکرار شده در زمان براساس زیر می باشد:

$$Yijk = \mu + Ti + Rj + Bj + TBij + \varepsilon bijk$$

در این فرمول Yijk نشان دهنده مقدار عددی هر مشاهده در آزمایش، μ میانگین کلی مشاهده ها است که از طریق نمونه ها با فرض صفر مورد بررسی قرار گرفتند، Rk نشان دهنده اثر بلوک k، Ti نشان دهنده اثر مکمل آزمایشی و Bj اثر زمان اندازه گیری j، TBij برهم کنش تیمار و زمان اندازه گیری و εbijk اشتباه آزمایش است و سطح معنی داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

۳. نتایج و بحث

با مقایسه میانگین داده ها، از نظر آماری تفاوت معنی داری بین غلظت جیوه سرم بزها قبل از مکمل سلنیوم مشاهده نشد،که ممکن است بدلیل مشابهت عوامل مدیریتی، محیطی و شرایط فیزیولوژیکی بز ها باشد.

در این مطالعه میزان جیوه سرم بزهای دریافت کننده سلنومتیونین در زمان زایش نسبت به گروه شاهد، گروهای دریافت کننده نانوذرات و شکل معدنی سلنیوم تفاوت معنی داری نشان داد ($P < ۰/۰۵$) (جدول ۱). در روز تولد، میزان جیوه سرم بزغاله ها نیز منعکس کننده میزان این عنصر در مادران خود بوده، به طوری که بین گروه های آزمایشی و شاهد تفاوت معنی داری دیده شد. گروه شاهد بیشترین مقدار جیوه را نشان داد در حالی که گروه دریافت کننده سلنیوم به صورت سلنومتیونین کمترین مقدار جیوه را داشت ($P < ۰/۰۵$) اما تفاوت معنی داری بین گروه دریافت کننده سلنیوم معدنی و نانوذرات سلنیوم دیده نشد. غلظت جیوه در آغوز نسبت به غلظت این عنصر در سرم مادران کمتر بود در صورتی که بازهم همانند سرم بزغاله ها، میزان جیوه آغوز انعکاسی از میزان این عنصر در سرم مادران بود ($P < ۰/۰۵$).

جدول ۱: میانگین غلظت جیوه آغوز و سرم بزها و بزغاله ها (میکروگرم در لیتر)

غلظت جیوه	گروه شاهد	سلنیوم آلی	سلنیوم معدنی	نانو ذرات سلنیوم
سرم بز قبل از مکمل	۳۲/۲±۱۲۴/۹۲۷	۳۳/۳±۰۷۱/۸۹۴	۳۲/۴±۸۴۲/۰۱۸	۳۲/۳±۲۵۶/۵۶۹
سرم بز روز زایش	۳۳/۳±۵۷۶/۵۳۳^{a}	۲۱/۵±۱۷۸/۱۳۹^{c}	۲۴/۲±۷۰۵/۶۱۲^{bc}	۲۶/۲±۷۳۸/۶۸۴^{b}
آغوز	۱۱/۱±۶۱۶/۲۲۲^{a}	۷/۱±۳۲۶/۷۷۸^{c}	۸/۰±۵۴۷/۹۰۳ ^{bc}	۹/۰±۲۵/۹۲۸ ^{b}
سرم بزغاله روز تولد	۱۵/۱±۹۵۱/۶۷۸^{a}	۱۰/۲±۰۶۱/۴۴۱ ^{c}	۱۱/۱±۷۳۷/۲۴۱ ^{bc}	۱۲/۱±۷۰۲/۲۷۵ ^{b}
در هر ردیف میانگین ها با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار بودند ($P < ۰/۰۵$). (± انحراف استاندارد)				

از طرفی میزان جیوه چهار هفته اول شیردهی در بین گروه های آزمایشی تفاوت معنی داری را نشان نداد(جدول ۲).

جدول ۲: میانگین محتوای جیوه شیر بزها تا هفته چهارم (میکروگرم در لیتر)

غلظت جیوه	گروه شاهد	سلنیوم آلی	سلنیوم معدنی	نانو ذرات سلنیوم

هفته اول	۲۹/۰۰۴ ±۲/۲۲۶	۲۶/۴۷۳ ±۳/۱۳۵	۲۷/۴۶۶ ±۲/۲۰۸	۲۸/۵۸۹ ±۲/۹۱۱
هفته دوم	۳۰/۶۱۷ ±۲/۳۵۰	۲۷/۹۴۵ ±۳/۳۰۹	۲۸/۹۹۳ ±۲/۳۳۱	۳۰/۱۷۸ ±۳/۰۷۳
هفته سوم	۳۲/۹۲۹ ±۲/۵۲۷	۳۰/۰۵۵ ±۳/۵۵۹	۳۱/۱۸۲ ±۲/۵۰۷	۳۲/۴۵۷ ±۳/۳۰۵
هفته چهارم	۳۴/۷۵۷ ±۲/۶۶۸	۳۱/۷۲۴ ±۳/۷۵۸	۳۲/۹۱۳ ±۲/۶۴۶	۳۴/۲۵۹ ±۳/۴۸۹
		P - values		
		تیمار	زمان	تیمار در زمان
		<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۴۶۱
در هر ردیف میانگین ها با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار بودند (P < ۰/۰۵). (± انحراف استاندارد)				

همچنین مقدار جیوه سرم بزغاله ها در چهار هفته اول زندگی روندی مشابه شیر نشان داد و در بین گروه های آزمایشی سلنومتیونین از لحاظ عددی کمترین میزان جیوه را داشت (جدول ۳).

جدول ۳: میانگین محتوای جیوه بزغاله ها تا هفته چهارم (میکروگرم در لیتر)

غلظت جیوه	گروه شاهد	سلنیوم آلی	سلنیوم معدنی	نانو ذرات سلنیوم
هفته اول	۱۵/۰±۹۱۶/۷۱۵	۱۵/۰±۰۵۴/۸۵۳	۱۵/۰±۱۷۳/۹۰۷	۱۵/۱±۴۶۸/۰۵۹
هفته دوم	۱۶/۰±۸۰۰/۷۵۵	۱۵/۸۹۱ ۰±/۹۰۱	۱۶/۰۱۶ ۰±/۹۵۷	۱۶/۳۲۴ ۱±/۱۱۸
هفته سوم	۱۸/۰۶۹ ۰±/۸۱۲	۱۷/۰۹۱ ۰±/۹۶۹	۱۷/۲۲۶ ۱±/۰۳۱	۱۷/۵۵۷ ۱±/۲۰۳
هفته چهارم	۱۹/۰۷۲ ۰±/۸۵۷	۱۸/۰۴۰ ۱±/۰۲۳	۱۸/۱۸۲ ۱±/۰۸۷	۱۸/۵۳۱ ۱±/۲۶۹
		P - values		
		تیمار	زمان	تیمار در زمان
		<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	۰/۴۸۱
در هر ردیف میانگین ها با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار بودند (P < ۰/۰۵). (± انحراف استاندارد)				

با این حال مطالعه ای که تاثیر مکمل های مختلف سلنیوم بر روی جیوه مادران آبستن، فرزندان، آغوز و شیر آن ها بررسی کند یافت نشد. سلنومتیونین در این مطالعه به مدت طولانی تری نسبت به سایر فرم های این عنصر، جیوه موجود در بزغاله ها و شیر را پایین نگه داشت که این تاثیر ممکن است مربوط به دخیره بهتر سلنیوم در فرم آلی و مورد استفاده قرار گرفتن زودتر و بهتر این عنصر در ساختار سلنوپروتئین ها است که نقش موثری در خنثی سازی عناصر غیرفلزی سمی از جمله جیوه دارند.

مطالعات آزمایشگاهی به خوبی ثابت کرده اند که جیوه میل ترکیبی بیشتری برای پیوند با سلنیوم نسبت به گوگرد دارد (Branco et al., 2014). براساس مطالعات بر روی اثر متقابل سلنیوم و جیوه، بیان شده است که اثر سلنیوم بر بروی جیوه می تواند از طریق مسیرهای زیر انجام شود (Rahman et al., 2019):

۱۴) حذف گروه متیل جیوه آلی

۱۵) بخش دوباره جیوه در اعضا مختلف بدن و کاهش اثرات جیوه

۱۶) تشکیل ترکیب نامحلول جیوه-سلنیوم

۱۷) جلوگیری از جذب جیوه

۱۸) منابع بیشتر سلنیوم(Selenium refuling)

۱۹) محافظت از سلنوپروتئین ها و فعالیت آن ها
۲۰) حفظ هموستازی در سطح ردوکس سلولی

سیستم های بیولوژیک برای سم زدایی جیوه آلی، تشکیل کریستال های غیرمتبلور جیوه-سلنیوم در بافت کبد می دهد(Spiller, 2017). گونه های مختلف جیوه و توزیع این عنصر در اندام های مختلف، مسئول تحریک استرس است و سلنیوم نقش های مختلف برای سم زدایی و کاهش استرس ناشی از مسمومیت این عنصر دارد (Rahman et al., 2019). در مطالعه ای که اخیرا بر روی ۵۴ مادر تازه زایمان کرده انجام شد، نشان داد که نسبت سلنیوم به جیوه کل در خون جفت نسبت به خون مادران کمتر بود (Sakamato et al., 2018). همچنین این محققان در مورد نقش حفاظتی سلنیوم در مقابله با جیوه، بیان کردند که با کاهش سلنیوم باید خطر افزایش سطح جیوه در خون جفت را در نظر گرفت. مکمل سلنیوم، توزیع مجدد جیوه در بافت های مختلف و مایعات فیزیولوژیک را مختل و منجر به تشکیل ترکیبات خنثی جیوه-سلنیوم-گوگرد شد (Rahman et al., 2019). بنابراین مکمل سلنیوم را می توان به عنوان کلید مکانیسم سم زدایی جیوه در نظر گرفت (García-Sevillano et al., 2015). علاوه بر این گزارش شد که سلنیوم توانست از سلول های کلیوی و کبدی در مقابل جیوه، با تشکیل باندهای جیوه-سلنیوم محافظت کند که سبب کاهش مرگ و میر ناشی از جیوه شد (Wang et al., 2017).

تحقیقات اخیر نشان دادند که مکمل سلنیوم به طور تاثیرگذاری مقدار جیوه در مغز را تغییر داد و سبب بهبود مسمومیت عصبی و استرس اکسیداتیو حاصل از این عنصر سنگین شد، همچنین این محققان، یک اثر متقابل مولکولی معنی داری بین جیوه-سلنیوم در سیستم عصبی انسان مشاهده کردند که ممکن است اثر مکمل سلنیوم بر خنثی سازی، کاهش مسمومیت عصبی و استرس اکسیداتیو حاصل از جیوه را توجیه کند (García-Sevillano et al., 2017).

هم اکنون مطالعات زیادی انجام شده که اثر متقابل میان جیوه و سلنیوم را مورد بررسی و آزمایش قرار داده اند، از این گزارشات می توان نتیجه گیری کرد که اثر متقابل بین این دو عنصر بستگی بسیار زیادی به نوع سلنیوم، جیوه و چندین مکانیسم سم زدایی دارد(García-Sevillano et al., 2017; Rahman et al., 2019). توزیع مجدد جیوه در اندام های مستعد و آسیب پذیر کاهش یافته و تشکیل ترکیبات جیوه-سلنیوم و دفع این ترکیب سبب کاهش جیوه در مدل های حیوانی و سلولی شد. احیای سیستم آنتی اکسیدانی بوسیله مکمل سلنیوم بالقوه ترین گزینه مناسب برای دفاع در مقابل جیوه است(García-Sevillano et al., 2017; Wang et al., 2017; Rahman et al., 2019). مکمل سلنیوم به تنهایی یا در چندین ترکیب می تواند از حیوانات و سطح سلولی در مقابل جیوه دفاع کند. به نظر می رسد برای تعیین تاثیرگذارترین مکانیسم سم زدایی جیوه توسط سلنیوم، هنوز نیازمند توجه بسیار سیستماتیک با تمرکز خاص بر روی تشکیل ترکیبات جیوه-سلنیوم و سلنوآنزیم ها-جیوه بوسیله فرم های مختلف سلنیوم در سیستم های موجود زنده در دوره های حساس زندگی (آبستنی و تولد) و داخل آزمایشگاهی است.

۴. نتیجه‌گیری

حیوانات در اواخر آبستنی به دلیل افزایش تنش اکسیژن ممکن است میزان گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن به طور فزاینده ای بالا رفته و منجر به مرگ جنین شود.، بنابراین استفاده از مکمل سلنیوم در این دوره توسط بسیاری از محققین پیشنهاد شده است. مکمل سلنیوم با افزایش غلظت این عنصر در خون و بهبود عملکرد ایمنی، نقش عمده ای در حفظ سلامت و مقاومت در برابر عناصر سنگین ایفا می کنند که احتمالا منجر به بهبود وضعیت تولید مثلی، افزایش تولید دام و کیفیت محصولات و فرآورده های دامی خواهد شد. مقدار جیوه در سرم بزهای گروه های آزمایشی کاهش پیدا کرد که این کاهش جیوه در سرم بزها با بزغاله ها در روز زایش و آغوز همزمان بود و اما مقدار جیوه در سرم بزغاله ها در هفته اول تا چهارم بعد از زایش به طور معنی داری کاهش نیافت و همچنین مقدار جیوه در شیر در چهار هفته اول شیردهی کاهش معنی داری نشان نداد. شاید افزایش مقدار سلنیوم

خوراک بزها سبب کاهش غلظت جیوه در سرم بزها، بزغاله ها در روز زایش و آغوز شد. بنابراین می توان نتیجه گیری کرد که استفاده از سطوح بالای مکمل سلنیوم در دام ها می تواند سبب کاهش معنی دار مقادیر جیوه در این حیوانات شود.

منابع

30. Branco, V., Godinho-Santos, A., Goncalves, J., Lu, J., Holmgren, A., Carvalho, C., 2014. Mitochondrial thioredoxin reductase inhibition, selenium status, and Nrf-2 activation are determinant factors modulating the toxicity of mercury compounds. Free Radic. Biol. Med. 73, 95–105.

31. **García-Sevillano, M.A., Rodríguez-Moro, G., García-Barrera, T., Navarro, F., Gómez-Ariza, J.L., 2015**. Biological interactions between mercury and selenium in distribution and detoxification processes in mice under controlled exposure. Effects on selenoprotein. Chem. Biol. Interact. 229: 82–90.

32. **Kachuee, R., Abdi-Benemar, H., Mansoori, Y., Sánchez-Aparicio, P., Seifdavati, J., Elghandour, M.M., Guillén, R.J. and Salem, A.Z., 2019**. Effects of sodium selenite, L-selenomethionine, and selenium nanoparticles during late pregnancy on selenium, zinc, copper, and iron concentrations in Khalkhali Goats and their kids. Biological trace element research, 191(2), 389-402.

33. **Kachuee, R., Moeini, M.M. and Souri, M. 2013**. The effect of dietary organic and inorganic selenium supplementation on serum Se, Cu, Fe and Zn status during the late pregnancy in Merghoz goats and their kids. Small Ruminant Research. 110:20-27.

34. **Rahman, M. M., Hossain, K. F. B., Banik, S., Sikder, M. T., Akter, M., Bondad, S. E. C., and Kurasaki, M. 2019**. Selenium and zinc protections against metal-(loids)-induced toxicity and disease manifestations: A review. Ecotoxicology and environmental safety.168: 146-163

35. **Sakamoto, M., Chan, H.M., Domingo, J.L., Koriyama, C., Murata, K. 2018**. Placental transfer and levels of mercury, selenium, vitamin E, and docosahexaenoic acid in maternal and umbilical cord blood. Environ. Int. 111: 309–315.

36. **Spiller, H.A. 2017**. Rethinking mercury: the role of selenium in the pathophysiology of mercury toxicity. Clin. Toxicol. (Phila.). 56:313–326.

37. **Surai, P. F. 2006**. Selenium in ruminant nutrition. In: Selenium in Nutrition and Health. Nottingham University Press: Nottingham, United Kingdom. 487-561

38. **Wang, H., Chen, B., He, M., Yu, X., Hu, B., 2017**. Selenocystine against methyl mercury cytotoxicity in HepG2 cells. Sci. Rep. 7:1-8Web .E. C, N. H. Casey ,L. Simela .2005, Goat meat quality. J. Small Ruminant Research. 60: 153- 166.

The effect of supplementation of Chlorella and Spirulina, Azolla in feeding diet on quail egg quality

Mojtaba Alisufi*[1]; Rashid Safari[2]; Zabih alah Nemati[3]; Kazem Alirezalou[2]

1- Student of Animal Sciences, Poultry Nutrition, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz
2 Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz
2- Associate Professor, Department of Animal Sciences, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources , University of Tabriz

Corresponding Author Email address (mojtaba.alisufi@yahoo.com)

Abstract

The aim of this experiment was to evaluate the effect of supplementation of Chlorella and Spirulina, Azolla on egg yolk and egg white quality of Japanese quail .In this experiment, 196 laying Japanese quails in 9 week of age were used for 21days. This experiment has been done in completely randomized design With 7 treatments and 4 replications and in each replication 7 birds were performed in 28 cages. Treatments include 1- basic diet (control); 2- Control treatment with 0.3 g / kg of chlorella; 3- Control treatment with 0.6 g / kg of chlorella; 4- Control treatment with 0.3 g / kg of spirulina; 5- Control treatment with 0.6 g / kg of spirulina; 6: control treatment with 0.3 g / kg azolla and 7- control treatment with 0.6 g / kg azolla. Treatment 5 caused the most change in the amount of yolk color among all and control treatment ($p < 0.05$). Also, 0.3 spirulina caused a significant increase in yolk pH ($p < 0.05$). White weight in all treatments had a significant increase with control treatment ($p < 0.05$). Azolla 0.6 and Azolla 0.3 increased the height of concentrated white with controlled treatment ($p < 0.05$). In general, Spirulina algae had the best performance compared to other experimental algae, but it can be added that Azolla algae at levels of 0.3 and 0.6 g / kg had no negative effect on birds.

Keywords: Quail, algae, yolk color, egg quality

تأثیر مکمل سازی جلبک‌های کلرلا و اسپیرولینا، آزولا در جیره غذایی بلدرچین ژاپنی بر کیفیت تخم بلدرچین

مجتبی علی‌صوفی[1*]؛ رشید صفری[2]؛ ذبیح اله نعمتی[3]؛ کاظم علیرضالو[2]

۱-دانش‌آموخته علوم دامی، گرایش تغذیه طیور دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر دانشگاه تبریز

۲- استادیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر دانشگاه تبریز

۳- دانشیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر دانشگاه تبریز

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: mojtaba.alisufi@yahoo.com

چکیده

هدف از این آزمایش تأثیر مکمل سازی جیره غذایی با جلبک‌های کلرلا و اسپیرولینا، آزولا بر کیفیت زرده و سفیده تخم بلدرچین ژاپنی می‌باشد. در این آزمایش تعداد ۱۹۶ قطعه بلدرچین ژاپنی تخم‌گذار از ۹ هفتگی به مدت ۲۱ روز مورد استفاده قرار گرفتند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۷ تیمار و ۴ تکرار و ۷ پرنده در هر تکرار در ۲۸ قفس انجام شد. تیمارها شامل ۱- جیره پایه (کنترل)؛ ۲- تیمار کنترل به همراه ۰/۳ گرم در کیلوگرم کلرلا؛ ۳-تیمار کنترل به همراه ۰/۶ گرم در کیلوگرم کلرلا؛ ۴- تیمار کنترل به همراه ۰/۳ گرم در کیلوگرم اسپیرولینا؛ ۵- تیمار کنترل به همراه ۰/۶ گرم در کیلوگرم اسپیرولینا؛ ۶: تیمار کنترل به همراه ۰/۳ گرم در کیلوگرم آزولا و ۷- تیمار کنترل به همراه ۰/۶ گرم در کیلوگرم آزولا بود. استفاده از اسپرولینا به میزان ۰/۶ گرم در کیلوگرم جیره باعث بیشترین تغییر در مقدار رنگ زرده در بین تمامی تیمارها شد ($p<۰/۰۵$). همچنین اسپیرولینا ۰/۳ سبب افزایش معنادار pH زرده شده است ($p<۰/۰۵$). وزن سفیده در تمامی تیمارها افزایش معنی دارنسبت به تیمار کنترل داشت($p<۰/۰۵$). آزولا ۰/۶ و آزولا ۰/۳ سبب افزایش ارتفاع سفیده غلیظ با تیمار کنترل شده است ($p<۰/۰۵$). به‌طور کلی جلبک اسپیرولینا در مقایسه با سایر جلبک‌های آزمایشی بهترین عملکرد را داشته البته می‌توان اضافه کرد که جلبک آزولا در سطوح ۰/۳ و ۰/۶ گرم در کیلوگرم هیچ تأثیر منفی در پرندگان نداشته است.

واژگان کلیدی: بلدرچین، جلبک، رنگ زرده، کیفیت تخم

۱.مقدمه

روند اخیر در تجارت خوراک در حال حاضر به سمت استفاده از مواد طبیعی به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها، رنگ‌های مصنوعی و سایر مواد شیمیایی است. اسپیرولینا (جلبک سبز آبی) و کلرلا از افزودنی‌های طبیعی خوراکی باکیفیت بالا هستند که می‌تواند در تغذیه دام و طیور استفاده شود. علاوه بر این، اسپیرولینا و کلرلا به دلیل اهمیت تغذیه‌ای به‌عنوان جایگزین‌های تجدید پذیر منابع پروتئینی معمولی (به‌عنوان‌مثال، کنجاله سویا، پودر ماهی، سبوس برنج) در پرورش آبزیان یا خوراک دام شناخته‌شده‌اند (Shields and Lupatsch 2012). اسپیرولینا platensis (Arthrospira) یک ریز جلبک سبز آبی رشته‌ای (سیانوباکتریوم) است که به‌عنوان منبع غنی از پروتئین باکیفیت بالا، ویتامین‌ها (به‌ویژه ویتامین B12 و پرو ویتامین β کاروتن)، مواد معدنی، اسیدهای چرب ضروری، شناخته می‌شود. اخیراً، علاقه مضاعف به کاربرد آن در حیوانات به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی، نقش محرک رشد و اثرات تعدیل کننده سیستم ایمنی وجود داشته است. این اثرات مثبت اسپیرولینا در بدن ممکن است در نهایت منجر به بهبود بهره‌وری حیوانی شود. برای مثال، در تغذیه آزمایش‌ها با حیوانات مختلف، اسپیرولینا باعث افزایش سرعت رشد، استفاده از مواد مغذی، مقاومت در برابر بیماری، کیفیت تخم‌مرغ و کیفیت لاشه در طیور، خوک و خرگوش می‌شود (Al-Batshan et al. 2001; Evans, Smith, and Moritz 2015; Meineri et al. 2009; Sujatha, Narahari, and technology 2011). لورنز گزارش کرد که اسپیرولینا منبع عالی تغذیه است و منبع طبیعی برتری از کاروتنوئیدها است که در رنگ آمیزی زرده تخم‌مرغ بسیار مؤثر هستند (Lorenz 2003). رنگ زرد پوست و ساقه جوجه‌های گوشتی و همچنین زرده تخم‌مرغ مهم‌ترین مشخصه‌ای است که می‌تواند تحت تأثیر تغذیه جلبک قرار گیرد. در بسیاری از بازارها، کاروتنوئیدهای ریزجلبک در رقابت با شکل مصنوعی رنگ‌دانه‌ها هستند (Spolaore et al. 2006). برخلاف جوجه‌های گوشتی، که در آن تحقیقات پروبیوتیکی و پروبیوتیکی بر جایگزین‌های آنتی‌بیوتیک‌ها متمرکز است، تغذیه مرغ‌های تخم‌گذار بر حفظ سلامت و تولید تخم‌مرغ با بهبود موازی کیفیت تخم‌مرغ متمرکز است. کلرلا ولگاریس، یک ریزجلبک سبز طبیعی، به طور مصنوعی کشت شده است و پیامدهای صنعتی و تغذیه‌ای دارد (Pulz, Gross, and biotechnology 2004). اعتقاد بر این است که اجزای آن بر عملکرد و سلامت حیوانات، از جمله تولید مثل و کیفیت تخم‌مرغ تأثیر می‌گذارند (Arakawa 1960). با این حال، نتایج مبهم هستند (Janczyk et al. 2006). گنجاندن گیاهان آبزی در سطح پایین در جیره‌های غذایی طیور، عملکرد بهتری را نشان داده‌اند، به‌ویژه هنگامی‌که بخشی از پروتئین کل را تأمین می‌کنند یا به‌عنوان منبع رنگ‌دانه برای زرده تخم‌مرغ و پوست گوشت استفاده می‌شود (Maurice et al. 1984). ارزش غذایی آزولا به‌خوبی مستند شده است که نشان می‌دهد منبع خوبی از پروتئین با تقریباً تمام اسیدآمینه ضروری موردنیاز برای تغذیه حیوانات (به‌ویژه لیزین) است. گزارش‌ها مربوط به ارزش تغذیه‌ای آزولا در رژیم غذایی مرغ‌های تخم‌گذار اندک است. تنوع در ترکیب و عدم اطلاع از ترکیبات آزولا، گنجاندن در جیره غذایی مرغ‌های تخم‌گذار را دشوارتر می‌کند. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر، تأثیر افزودن سطوح مختلف جلبک اسپیرولینا، کلرلا بر کیفیت داخلی و ظاهری تخم بلدرچین ژاپنی از جمله وزن تخم، وزن زرده، وزن سفیده، pH زرده و سفیده و... می‌باشد.

۲.مواد و روش‌ها

این آزمایش در فصل بهار و در سالن پرورش دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی شهرستان اهر صورت گرفت. در این آزمایش از بلدرچین‌های ماده با سن‌های یکسان از نژاد ژاپنی استفاده شده است. در مجموع از ۱۹۶ عدد بلدرچین ژاپنی در این آزمایش استفاده شد. جیره‌ی آزمایشی برای برآوردن نیازهای مواد مغذی (1994) NRC همانطور که در جدول شماره ۲-۱ نشان داده شده است، فرموله شد و جلبک‌های آزمایشی به‌صورت تازه و روزانه با جیره کاملاً مخلوط و در اختیار پرندگان قرار داده شد. در مجموع این ۱۹۶ پرنده در ۷ گروه و ۴ تکرار که در هر تکرار ۷ پرنده به‌صورت کاملاً تصادفی تقسیم شدند و به ترتیب یکی از ۷ گروه - جیره پایه (کنترل)؛ ۲- تیمار کنترل به همراه ۰/۳ گرم در کیلوگرم کلرلا؛ ۳-تیمار کنترل به همراه ۰/۶ گرم در کیلوگرم کلرلا؛ ۴- تیمار کنترل به همراه ۰/۳ گرم در کیلوگرم اسپیرولینا؛ ۵- تیمار کنترل به همراه ۰/۶ گرم در کیلوگرم اسپیرولینا؛ ۶: تیمار کنترل به همراه ۰/۳ گرم در کیلوگرم آزولا و ۷- تیمار کنترل به همراه ۰/۶ گرم در کیلوگرم آزولا نام‌گذاری شدند. آب در این آزمایش به‌صورت آزاد و با استفاده از نیپل در اختیار پرندگان قرار می‌گرفت. طول مدت روشنایی در این آزمایش به این صورت بود که ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت خاموشی در نظر گرفته شد. این آزمایش به مدت ۹ هفته انجام شد که آنالیزهای تخم در سه دوره‌ی سه هفته‌ای صورت گرفت. ارتفاع سفیده و زرده توسط یک کولیس دیجیتال با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر اندازه گیری شد، پس از اندازه‌گیری ارتفاع سفیده‌ی غلیظ و ارتفاع زرده ، ابتدا شدت رنگ زرده توسط کاغذ رش اندازه‌گیری و سپس به‌دقت زرده از سفیده جدا گردید و توسط یک ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم وزن زرده و سفیده به طور مجزا اندازه‌گیری شد. پس از وزن‌کشی سفیده و زرده‌هایی که از هم تفکیک شده بودند، زرده و سفیده‌های باقیمانده از هر واحد آزمایشی توسط همزن برقی باهم کاملاً مخلوط شد و pH هریک از نمونه‌ها توسط یک دستگاه pH متر رو میزی مدل (HANNA 211) کالیبره شده با محلول های بافری (۴ و ۷ =pH)، اندازه گیری شد. (نعمتی و همکاران. ۱۳۹۶). در این آزمایش، پس از اندازه‌گیری وزن زرده و سفیده تخم‌های بلدرچین از هر واحد آزمایشی جمع‌آوری خواهند شد، درصد سفیده و نسبت زرده به سفیده از رابطه‌ی زیر محاسبه شد (احمدی و همکاران. ۱۳۹۶) ×۱۰۰

(وزن کل تخم / وزن زرده‌ی تخم) = در صد زرده

×۱۰۰ (وزن کل تخم / وزن سفیده‌ی تخم) = درصد سفیده

داده‌های حاصل از این آزمایش با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS و روش مدل‌های خطی عمومی (GLM) آنالیز شدند و میانگین تیمارها در سطح احتمال ۰/۰۵ مورد مقایسه قرار گرفت.

جدول ۲-۱: اجزاء و ترکیب شیمیایی جیره های آزمایشی

اجزاء جیره	درصد جیره	اجزاء جیره	درصد جیره
ذرت	۵۸/۹	جوش شیرین	۰/۱
کنجاله سویا	۳۰	ترکیبات شیمیایی جیره	
روغن سویا	۲/۳	انرژی متابولیسمی (کیلوکالری)	۲۹۰۰
دی کلسیم فسفات	۲/۱	پروتئین خام (درصد)	۱۸
کربنات کلسیم	۷/۵	متیونین (درصد)	۰/۴۷
متیونین	۰/۲	لیزین (درصد)	۱/۰۸
مکمل ویتامینه	۰/۲۵	کلسیم (درصد)	۲/۵
مکمل معدنی	۰/۲۵	فسفر قابل دسترس (درصد)	۰/۶
نمک	۰/۲	تعادل آنیون_ کاتیون	۲۲۰

۳. نتایج و بحث

۳-۱- تأثیر مکمل سازی جلبک اسپیرولینا، کلرلا و آزولا وزن زرده، ارتفاع زرده، رنگ زرده، درصد زرده، pH زرده، نسبت زرده به سفیده، بریکس زرده تخم بلدرچین از هفته ۹ تا هفته ۱۲

در جدول ۳-۱ تأثیر مکمل سازی جلبک اسپیرولینا، کلرلا و آزولا وزن زرده، ارتفاع زرده، رنگ زرده، درصد زرده، pH زرده، نسبت زرده به سفیده، بریکس زرده تخم بلدرچین از شروع دوره تخم‌گذاری تا پایان روز ۲۱ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهند که جلبک‌های کلرلا، اسپیرولینا و آزولا تأثیر معنی‌داری بر وزن زرده، ارتفاع زرده، درصد زرده و نسبت زرده به سفیده نداشته است (P>۰/۰۵). اما تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری در رنگ زرده‌ی تخم بلدرچین داشته‌اند (P<۰/۰۵). نتایج حاکی از آن است که اسپیرولینا ۰/۶ بیشترین امتیاز رنگ زرده را نسبت به تیمار کنترل و سایر تیمارها داشته است همچنین نتایج نشان می‌دهد که کلرلا ۰/۶ و کلرلا ۰/۳ و آزولا ۰/۶ تفاوت معنی‌داری بین این تیمار وجود ندارد. کمترین امتیاز رنگ در بین تیمارها مربوط به تیمار آزولا ۰/۳ می‌باشد که با این وجود این تیمار نیز با تیمار کنترل اختلاف معنی‌داری دارد. در این آزمایش pH زرده فقط در تیمار اسپیرولینا ۰/۳ نسبت به تیمار کنترل افزایش یافته و اختلاف معنی‌داری با تیمار کنترل دارد (P<۰/۰۵) ولی سایر تیمارها با تیمار کنترل تفاوت معنی‌داری نداشته‌اند (P>۰/۰۵). این نتایج با نتایج به دست آمده توسط (Inborr 1998; Mariey, Samak, and Ibrahem 2012) مطابقت دارد. آن‌ها گزارش کردند که در نتیجه تغذیه با جیره‌های آزمایشی حاوی اسپیرولینا تفاوت معنی‌داری در درصد پوسته تخم‌مرغ، شاخص زرده، درصد آلبومین و واحد هاو وجود نداشت. همچنین نمرات رنگ زرده تخم‌مرغ‌هایی که با جیره حاوی اسپیرولینا تغذیه شده بودند بیشتر از آن‌هایی بود که با جیره شاهد و سایر تیمارها تغذیه شدند که این نتیجه با مطالعه قبلی مطابقت داشت (ANDERSON, TANG, and ROSS 1991). محققین دیگر پیشنهاد کردند که رنگ زرده در مرغ‌های تخم‌گذاری که با جیره‌های حاوی ریز جلبک‌های غنی از گزانتوفیل تغذیه می‌شوند، افزایش می‌یابد (Jeon et al. 2012). این نتایج همچنین با (Leeson and

(Caston 2004 همخوانی دارد، دریافتند که افزایش قابل توجهی در رنگ زرده تخم‌مرغ وجود دارد زیرا کلرلا حاوی رنگ‌دانه می‌باشد که به جیره غذایی مرغ‌های تخم‌گذار اضافه می‌شود. جیره‌های حاوی کلرلای ۰/۱ و ۰/۲ درصد اثرات بهبود کیفیت تخم‌مرغ را در مرغ‌های تخم‌گذار مسن اعمال کردند.

جدول ۳-۱: تأثیر مکمل سازی جلبک اسپیرولینا، کلرلا و آزولا وزن زرده، ارتفاع زرده، رنگ زرده، درصد زرده، pH زرده، نسبت زرده به سفیده، بریکس زرده تخم بلدرچین از هفته ۹ تا هفته ۱۲

مورد	تیمارهای آزمایشی							MSE	P value
	کنترل	کلرلا ۰/۳	کلرلا ۰/۶	اسپیرولینا ۰/۳	اسپیرولینا ۰/۶	آزولا ۰/۳	آزولا ۰/۶		
وزن زرده (گرم)	۳/۵۸	۳/۶۸	۳/۸۰	۳/۶۸	۳/۷۱	۳/۶۷	۳/۸۶	۰/۰۹۴	۰/۳۸
ارتفاع زرده (میلی‌متر)	۹/۴۸	۱۰/۰۰	۹/۸۰	۹/۸۷	۹/۹۲	۹/۹۰	۱۰/۰۱	۰/۱۴۴	۰/۲
رنگ زرده (مقیاس رش)	^{e}۳/۶۶	^{c}۵/۰۸	^{c}۵/۰۲	^{b}۶/۶۸	^{a}۷/۷۰	^{d}۴/۰۸	^{c}۴/۶۹	۰/۱۳۸	۰/۰۰۰۱
درصد زرده	۳۱/۶۹	۳۱/۳۰	۳۱/۴۶	۳۰/۵۳	۳۰/۷۵	۳۰/۶۹	۳۱/۶۴	۰/۳۵۵	۰/۱۳۷
pH زرده	^{b}۶/۰۹	^{b}۶/۱۱	^{b}۶/۲۰	^{a}۶/۳۱	^{b}۶/۱۴	^{b}۶/۱۴	^{b}۶/۱۱	۰/۰۳۶	۰/۰۰۴۶
نسبت زرده به سفیده	۰/۵۲۰	۰/۵۱۰	۰/۵۱۷	۰/۴۹۵	۰/۴۹۷	۰/۵۰۰	۰/۵۲۲	۰/۰۰۹	۰/۲۵۲۲

۱: تیمار کنترل بدون افزودنی، ۲: تیمار کنترل به همراه ۰/۳ گرم در کیلوگرم کلرلا، ۳: تیمار کنترل به همراه ۰/۶ گرم در کیلوگرم کلرلا، ۴: تیمار کنترل به همراه ۰/۳ گرم در کیلوگرم اسپیرولینا، ۵: تیمار کنترل به همراه ۰/۶ گرم در کیلوگرم اسپیرولینا، ۶: تیمار کنترل به همراه ۰/۳ گرم در کیلوگرم آزولا و ۷: تیمار کنترل به همراه ۰/۶ گرم در کیلوگرم آزولا

حروف متفاوت در جدول بیانگر اختلاف بین میانگین تیمارهای آزمایش در سطح ۵ درصد می‌باشد

به‌طور مشابه، (Sujatha et al. 2013) همچنین افزایش رنگ زرده را از ۶ به ۷/۴ در تغذیه آزولای تازه به اردک گزارش کرد. ترکیب آزولا در جیره غذایی مرغان تخم‌گذار منجر به رنگ زرده بهتری شد که ممکن است به کاروتن‌های موجود در آزولا نسبت داده شود (Bolka 2011).

۳-۲- تأثیر مکمل سازی جلبک اسپیرولینا، کلرلا و آزولا بر وزن سفیده، ارتفاع سفیده، واحد هاو، pH سفیده، درصد سفیده تخم بلدرچین از هفته ۹ تا هفته ۱۲

در جدول ۳-۲ تأثیر مکمل سازی جلبک اسپیرولینا، کلرلا و آزولا بر وزن سفیده، ارتفاع سفیده، واحد هاو، pH سفیده، درصد سفیده تخم بلدرچین از هفته ۹ تا هفته ۱۲ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهند که جلبک‌های کلرلا، اسپیرولینا و آزولا بر وزن سفیده تأثیر مثبت داشته و باعث افزایش وزن معناداری با تیمار کنترل شده است ($p<۰/۰۵$) ولی در بین تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری دیده نمی‌شود و همچنین در این آزمایش نتایج نشان می‌دهد که ارتفاع سفیده غلیظ در تیمار آزولا ۰/۶ و آزولا ۰/۳ تفاوت معناداری با تیمار کنترل دارد ($p<۰/۰۵$). تیمارهای آزولا ۰/۶ و آزولا ۰/۳ با تیمارهای اسپیرولینا ۰/۶ و اسپیرولینا ۰/۳ و کلرلا ۰/۶ تفاوت معناداری ندارند ولی با تیمار کلرلا ۰/۳ تفاوت معنادار است. واحد هاو، درصد سفیده و pH سفیده در این آزمایش با تیمار کنترل تفاوت معناداری ایجاد نکرده است ($p>۰/۰۵$).

جدول ۳-۲: تأثیر مکمل سازی جلبک اسپیرولینا، کلرلا و آزولا بر وزن سفیده، ارتفاع سفیده، واحد هاو، pH سفیده، درصد سفیده تخم بلدرچین از هفته ۹ تا هفته ۱۲

مورد	تیمارهای آزمایشی							MSE	P value
	کنترل	کلرلا ۰/۳	کلرلا ۰/۶	اسپیرولینا ۰/۳	اسپیرولینا ۰/۶	آزولا ۰/۳	آزولا ۰/۶		
وزن سفیده (گرم)	۶/۸۲^{b}	۷/۲۴^{a}	۷/۳۶^{a}	۷/۴۳^{a}	۷/۴۵^{a}	۷/۲۹^{a}	۷/۴۱^{a}	۰/۱۳۷	۰/۰۴
ارتفاع سفیده (میلی‌متر)	۳/۳۸^{b}	۳/۳۲^{b}	۳/۶۰^{ab}	۳/۵۴^{ab}	۳/۶۲^{ab}	۳/۷۳^{a}	۳/۷۱^{a}	۰/۰۹۹	۰/۰۵
واحد هاو	۸۳/۲۵	۸۲/۳۶	۸۳/۹۱	۸۳/۵۴	۸۴/۰۳	۸۴/۷۶	۸۴/۴۴	۰/۵۶۷	۰/۱۱۳
درصد سفیده	۶۰/۹۵	۶۱/۵۳	۶۱/۰۳	۶۱/۶۳	۶۱/۶۵	۶۱/۵۴	۶۰/۷۳	۰/۴۶۷	۰/۶۷۹۸
pH سفیده	۹/۳۸	۹/۴۰	۹/۳۷	۹/۴۵	۹/۴۳	۹/۴۰	۹/۳۳	۰/۰۵۱	۰/۷۳

۱: تیمار کنترل بدون افزودنی، ۲: تیمار کنترل به همراه ۰/۳ گرم در کیلوگرم کلرلا، ۳: تیمار کنترل به همراه ۰/۶ گرم در کیلوگرم کلرلا، ۴: تیمار کنترل به همراه ۰/۳ گرم در کیلوگرم اسپیرولینا، ۵: تیمار کنترل به همراه ۰/۶ گرم در کیلوگرم اسپیرولینا، ۶: تیمار کنترل به همراه ۰/۳ گرم در کیلوگرم آزولا و ۷: تیمار کنترل به همراه ۰/۶ گرم در کیلوگرم آزولا

حروف متفاوت در جدول بیانگر اختلاف بین میانگین تیمارهای آزمایش در سطح ۵ درصد می‌باشد

۴. نتیجه‌گیری:

به‌طور کلی از این آزمایش می‌توان نتیجه گرفت که جلبک‌های آزمایشی می‌توانند رنگ زرده و وزن سفیده را افزایش دهند و باعث بهبود رنگ زرده و افزایش وزن سفیده گردند و تأثیر منفی در دیگر پارامترها نداشته باشند.

منابع

۴۳. احمدی.، ف. و رحیمی، ف. ۱۳۹۰. عوامل مؤثر بر کیفیت و کمیت تولید تخم مرغ در مرغ های تخمگذار: مروری. مجله علوم کاربردی جهان، ۱۲، ۳۷۲-۳۸۴.

۴۴. نعمتی.، ذ. کریمی، ا. صفری، ر. و احمدیان، ح. ۱۳۹۶. تأثیر سلنیوم و ویتامین E برعملکرد تولیدی، کیفیت تخم و میزان سلنیوم در زرده بلدرچین ژاپنی تخم‌گذار. انتشارات دانشگاه گیلان

45. Al-Batshan, Hamad A, Saud I Al-Mufarrej, Ali A Al-Homaidan, MA %J Immunopharmacology Qureshi, and immunotoxicology. 2001. 'Enhancement of chicken macrophage phagocytic function and nitrite production by dietary Spirulina platensis', 23: 281-89.
46. Anderson, Donald W, Chung-shih Tang, and Ernest Ross. 1991. 'The xanthophylls of Spirulina and their effect on egg yolk pigmentation', Poultry Science, 70: 115-19.
47. Arakawa, S %J Japanese Journal of Experimental Medicine. 1960. 'Experimental breeding of White Leghorn with the Chlorella-added combined feed', 30???? :
48. Bolka, PC. 2011. 'Nutritional evaluation of azolla (Azolla pinnata) in broilers and layers', Karnataka Veterinary, Animal and Fisheries Sciences University, Bidar.
49. Evans, AM, DL Smith, and JS %J Journal of applied poultry research Moritz. 2015. 'Effects of algae incorporation into broiler starter diet formulations on nutrient digestibility and 3 to 21 d bird performance', 24: 206-14.
50. Inborr, J. 1998. 'Haematococcus, the poultry pigmentor', Feed Mix.
51. Janczyk, P, Martina Langhammer, Ulla Renne, V Guiard, and WB Souffrant. 2006. 'Effect of feed supplementation with Chlorella vulgaris powder on mice reproduction', Archiva Zootechnica, 9: 122-34.
52. Jeon, Jin-Young, Kwan-Eung Kim, Ho-Jung Im, Sung-Taek Oh, Soon-Up Lim, Hyuk-Sin Kwon, Byung-Hern Moon, Jin-Man Kim, Byoung-Ki An, and Chang-Won Kang .2012' .The production of lutein-enriched eggs with dietary Chlorella', Food Science of Animal Resources, 32: 13-17.
53. Leeson, S, and L Caston. 2004. 'Enrichment of eggs with lutein', Poultry Science, 83: 1709-12.
54. Lorenz, RT %J Bulletin. 2003. 'Naturose™ natural astaxanthin (Haematococcus algae meal) as a carotenoid and vitamin source for salmonids', 55.
55. Mariey, YA, HR Samak, and MA Ibrahem. 2012. 'Effect of using Spirulina platensis algae as afeed additive for poultry diets: 1-productive and reproductive performances of local laying hens', Egyptian Poultry Science Journal, 32: 201-15.
56. Maurice, DV, JE Jones, CR Dillon, and JM Weber. 1984. 'Chemical composition and nutritional value of Brazilian elodea (Egeria densa) for the chick', Poultry Science, 63: 317-23.
57. Meineri, Giorgia, F Ingravalle, Elisabetta Radice, and Manuela Aragno. 2009. 'Effects of high fat diets and Spirulina Platensis supplementation in New Zealand White rabbit.'
58. Pulz, Otto, Wolfgang %J Applied microbiology Gross, and biotechnology. 2004 .Valuable products from biotechnology of microalgae', 65: 635-48.
59. Shields, Robin, and Ingrid Lupatsch. 2012. '5 Algae for aquaculture and animal feeds.' in, Microalgal Biotechnology: Integration and Economy (De Gruyter).
60. Spolaore, Pauline, Claire Joannis-Cassan, Elie Duran, Arsène %J Journal of bioscience Isambert, and bioengineering. 2006. 'Commercial applications of microalgae', 101: 87-96.
61. Sujatha, T, D %J Journal of food science Narahari, and technology. 2011. 'Effect of designer diets on egg yolk composition of 'White Leghorn'hens', 48: 494-97.
62. Sujatha, T, D Udhayakumari, A Kundu, S Jeyakumar, Jai Sundar, and MS Kundu. 2013. 'Utilization of raw Azolla as a natural feed additive for sustainable production in Nicobari fowl', Animal Science Reporter, 7.

DNA barcoding reveals two new species of Rhinebothrium Linton, 1890 from the stingrays in the Persian Gulf and the Gulf of Oman

Kiavash Golzarianpour[1*]; Masoumeh Malek[2]; Mahdi Golestaninasab[3]

1- Assistant professor, Biology School, Faculty of Sciences, Gonbad Kavous University
2- Professor, School of Biology, University of Tehran
3- Assistant professor, Faculty of Sciences, Semnan University

*golzarianpour@gonbad.ac.ir

Abstract

The taxonomy of *Rhinebothrium* tapeworms was studied in the Persian Gulf and the Gulf of Oman. A total of 266 hosts were obtained from the study areas as bycatch from local fishing vessels, which included 11 species of seven genera and two orders. The barcode NADH2 was used to identify the hosts. 125 hosts were infected with at least one individual of a species of the genus *Rhinebothrium*. A total of 3246 rhinebothid tapeworms belonging to nine taxa were isolated from their spiral intestines, of which six species were previously described. Due to the morphological similarity in some parasitic taxa, the barcode 28s rDNA was used to identify and determine the species boundary of all obtained parasitic taxa. The results showed that the two taxa obtained from the two hosts *Maculabatis arabica* and *Maculabatis randalli* show genetic divergence in spite of highly morphological similarity and can be considered as cryptic species. Studies based on morphological characteristics and molecular evidence support their description as new species.

Keywords: description, cryptic species, NADH2, 28s rDNA

رمزمیله دنا و کشف دو گونه جدید کرم نواری Rhinebothrium Linton, 1890 از سفره ماهیان گزنده در خلیج فارس و دریای عمان

کیاوش گلزاریان پور[۱*]؛ معصومه ملک[۲]؛ مهدی گلستانی نسب[۳]

۱-استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس

۲- استاد گروه علوم جانوری، دانشکده زیست شناسی، دانشکدگان علوم، دانشگاه تهران

۳- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سمنان

ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: golzarianpour@gonbad.ac.ir)

چکیده

آرایه شناسی کرم های نواری جنس *Rhinebothrium* سفره ماهیان گزنده در خلیج فارس و دریای عمان مورد مطالعه قرار گرفت. درمجموع ۲۶۶ سفره‌ماهی از مناطق موردمطالعه به صورت صید ضمنی از شناورهای صیادی محلی بدست آمد که دربردارنده ۱۱ گونه از هفت جنس و دو راسته بود. برای تعیین هویت میزبان ها از رمزمیله *NADH2* استفاده شد. ۱۲۵ میزبان آلوده به حداقل یک فرد از یک گونه از جنس *Rhinebothrium* بود. مجموعاً ۳۲۴۶ کرم نواری راینی‌بوترید متعلق به نه آرایه از روده مارپیچ آن‌ها جدا شد که از این تعداد شش گونه پیش‌ازاین توصیف‌شده بودند. با توجه به شباهت ریختی در برخی آرایه های انگلی، رمزمیله *28s rDNA* برای تشخیص و تعیین مرز گونه ای تمام آرایه های انگلی بدست آمده مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد دو آرایه بدست آمده از دو میزبان *Maculabatis Arabica* و *Maculabatis randalli* با توجه به شباهت ریختی واگرایی ژنتیکی را نشان می دهند و می توان آنها را به عنوان گونه های مخفی قلمداد کرد. با توجه بررسی های انجام شده شواهد ریختی و مولکولی از توصیف آنها به عنوان گونه های جدید حمایت می کند.

واژگان کلیدی: توصیف، ژن ریبوزومی، گونه مخفی، NADH2، 28s rDNA

۱. مقدمه

کرم‌های نواری حقیقی (رده Cestoda) از اعضای انگلی شاخه کرم‌های پهن (Platyhelminthes) هستند. فرد بالغ آنها انگل اجباری دستگاه گوارش مهره‌داران از جمله غضروف ماهیان است (Roberts et al. 2009). کرم‌های نواری و ماهیان غضروفی ارتباط تکاملی تنگاتنگ و در عین حال طولانی‌مدتی را ایجاد کرده اند که زمان تخمینی این ارتباط به حدود ۴۰۰ میلیون سال می‌رسد (Palm 1999). این زمان منجر به ایجاد تنوع قابل‌توجه کرم‌های نواری ماهیان غضروفی شده است. در حال حاضر از ۱۹ راسته کرم‌های نواری، نه راسته با بیش از ۲۱۰ جنس و ۱۰۳۴ گونه معتبر انواع ماهیان غضروفی را آلوده می‌کنند که بزرگ‌ترین فون انگل

مهره‌داران را تشکیل می‌دهند (Caira and Jensen 2017). باوجود تنوع قابل ملاحظه کرم های نواری، گونه‌ها و جنس‌های فراوانی از آنها هنوز از ماهیان غضروفی توصیف نشده‌اند. از آنجا که کرم‌های نواری کوسه‌ها و سفره‌ماهیان اغلب میزبان ویژگی اختصاصی (oioxenous) نشان می‌دهند این فرضیه مطرح می‌شود که گونه‌زایی این کرم‌ها می تواند همبستگی زیادی به گونه زایی میزبان آن‌ها داشته باشد و هر قدر میزبان ها فاصله ژنتیکی کمتری داشته باشند احتمال وجود انگل هایی با فاصله ژنتیکی کم و ریخت مشابه نیز قابل انتظار است (Caira and Jensen 2001; Caira and Jensen 2014). با توجه به شکل‌گیری چنین رابطه‌ای، در بررسی‌های آرایه شناسی انگل ها شناسایی دقیق گونه میزبان اهمیت بالایی دارد (Healy 2006)، بویژه در مواردی که گونه های میزبان خصوصیات ریختی مشابه‌ای داشته باشند امکان شناسایی اشتباه آنها در زمان نمونه برداری وجود دارد (Golzarianpour et al. 2020). از این رو بهره‌گیری از رمزمیله ژنی یکی از روش‌های مطمئن تشخیص گونه میزبان خواهد بود. یافته‌های Naylor et al. (2012) بیانگر آن است که ژن میتوکندریایی *NADH2* کد کننده پروتئینی با تکاملی سریع، نه تنها برای تمایز گونه‌ها قابل اعتماد است بلکه در تشخیص گونه‌های مخفی سفره ماهیان و کوسه ها کارایی بالایی دارد. در اصل، می‌توان آن را رمزمیله ماهیان غضروفی در نظر گرفت.

کرم‌های نواری جنس *Rhinebothrium* Linton, 1890 به‌طور انحصاری سفره‌ماهیان را آلوده می کنند و فرم بالغ انگل در روده مارپیچ آن‌ها مستقر می‌شود. در حال حاضر ۵۳ گونه از جنس *Rhinebothrium* از ۴۳ گونه میزبان سفره‌ماهی در مقیاس جهانی گزارش شده است (Golzarianpour et al. 2021; Trevisan and Caira 2020; Santos et al. 2020). بر اساس اطلاعات کنونی، بیش از ۵۴ گونه سفره ماهی (از ۲۱ جنس، ۸ خانواده و ۴ راسته) با گزارش مستند در آب‌های خلیج‌فارس و دریای عمان لیست شده است (Jabado et al. 2017) با این وجود تا کنون فقط ۴ گونه کرم نواری راینی بوترید از ۱۱ گونه میزبان از این منطقه توصیف شده است. با توجه به داده های موجود نه تنها بسیاری از گونه های سفره‌ماهی که می توانند میزبان این انگل ها باشند هنوز مورد بررسی قرار نگرفته اند بلکه شناسایی و توصیف گونه های انگل راینی‌بوترید از این میزبان‌های بررسی شده بسیار محتمل است (Golzarianpour et al. 2021). در مطالعات متعدد نشان داده شده است که ناحیه D1-D3 ژن *28s rDNA* از یک‌سو به‌واسطه دارا بودن نواحی با تغییرپذیری بالا (D-loop) برای استفاده در شناسایی گونه مناسب بوده و به‌عنوان رمزمیله کرم‌های نواری پیشنهاد شده است و از سویی دیگر وجود نواحی حفاظت‌شده (stem) آن‌را به‌عنوان یک نشانگر مناسب برای بررسی روابط بین تبارها مطرح کرده است (Littlewood et al. 2001; Caira and Jensen 2017).

در مطالعه حاضر فون کرم های نواری گونه های مختلفی از سفره ماهیان گزنده در خلیج فارس و دریای عمان مورد بررسی قرار گرفت و از داده های مولکولی برای تشخیص گونه و شناسایی گونه های مخفی احتمالی استفاده شد.

۲.مواد و روش‌ها

سفره ماهی‌های گزنده از خانواده Urogymnidae که به صورت صید ضمنی توسط صیادان محلی از سواحل ایرانی خلیج‌فارس و دریای عمان (سواحل بوشهر (28°93'N, 50°62'E)، آبهای جزایر قشم و هرمز (27°03'N, 56°55'E)، تنگه هرمز (26°75'N, 56°67'E)، سواحل جد، بلوچستان (25°29'N, 59°41'E)، سواحل چابهار (25°23'N, 60°62'E)) صید شده بودند برای بررسی آلودگی آنها به گونه های کرم نواری راینی بوترید مورد بررسی قرار گرفتند. برای تعیین هویت دقیق گونه سفره ماهی از بافت عضله همه افراد صیدشده نمونه‌برداری شد و در الکل ۹۶ درصد و دمای ۲۰- نگهداری شدند. در محل صید، بلافاصله روده مارپیچ هر نمونه میزبان از حفره شکمی بیرون آورده شد و با برشی طولی میانی به دونیمه تقسیم شد. یک‌نیمه در کیسه حاوی الکل ۹۶درصد

قرارداده شد و نیمه دیگر در فرمالین ۴درصد (رقیق‌شده با آب دریا) تثبیت شد. پس از جداسازی نمونه های انگلی از بافت روده، نمونه‌های انگل تثبیت‌شده در فرمالین برای نگهداری دائمی به الکل ۷۰٪ منتقل شدند.

با به‌کارگیری پروتکل Glass Fiber Plate (Ivanova et al. 2006) یا کیت PeqGold Microspine Tissue و طبق دستورالعمل آن کل ژنوم میزبان استخراج شد. ژنوم استخراج‌شده تا زمانی که برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[1] استفاده شوند در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جفت آغازگرهای عمومی 'ILEM-Fwd 5'AAGGAGCAGTTTGATAGAGT3 و ASNM-Rev 5'AACGCTTAGCTGTTAATTAA-3' برای انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز مورد استفاده قرار گرفتند و برنامه: واسرشتن[2] اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه شامل واسرشتن به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه، اتصال[3] آغازگر به DNA الگو به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۱ درجه، تکثیر به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و پس از اتمام چرخه مرحله تکثیر نهایی به مدت هفت دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای تکثیر ژن *NADH2* اجرا شد (Naylor et al. 2012).

برای استخراج ژنوم هر فرد انگل بخش میانی استروبیلا مورداستفاده قرار گرفت و بند های انتهایی و اسکولکس هر فرد به عنوان نمونه وچر و با اختصاص یک کد رنگ‌آمیزی و اسلاید دائمی آن‌ها تهیه شد. استخراج DNA نمونه‌های انگلی با به‌کارگیری پروتکل Glass Fiber Plate انجام شد (Ivanova et al. 2006). تکثیر ناحیه D1-D3 ژن 28s rDNA با استفاده از زوج آغازگر پیشرو LSU5 (AGGTCGACCCGCTGAAYTTAAGC) و پیرو 1500R (GCTATCCTGAGGGAAACTTCG) انجام گرفت. شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر ناحیه D1-D3 ژن 28s rDNA عبارت بود از واسرشتن اولیه به مدت چهار دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ سیکل شامل واسرشتن به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به‌جایگاه به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و طویل شدگی به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد که پس از پایان سیکل ۳۵ ام طویل شدگی نهایی به مدت هفت دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد اجرا شد.

برای بررسی نتیجه PCR، الکتروفورز افقی با استفاده از ژل آگارز یک درصد در محلول بافر TAE انجام شد. برای تعیین محل محصولات PCR رنگ Evagreen به ژل مایع اضافه شد. سپس با استفاده از سیستم Genoplex VWR از ژل عکس‌برداری شد. در صورت مشاهده باند واضح و با طول مناسب که بیانگر تکثیر صحیح قطعات مدنظر است، محصولات PCR با استفاده از کیت MicroSpin خالص و برای تعیین توالی با استفاده از آغازگرهای بکار رفته در PCR به شرکت Microsynth Seqlab GmbH (گوتینگن، آلمان) فرستاده شدند. توالی های پیرو و پیشرو نمونه های میزبان و انگل با استفاده از نرم‌افزار UGENE v.1.31.0 (Okonechnikov et al. 2012) به هم چسبانده و یک قطعه واحد به دست آمد. با به‌کارگیری الگوریتم بلاست (BLAST) تعیین هویت توالی‌های به‌دست‌آمده صحت سنجی شد. توالی‌های ژن *28S rDNA* با استفاده از ابزار آنلاین LocARNA (Raden et al. 2018) که از ساختار ثانویه ریبوزومی برای هم‌ردیفی بهره می‌برد، هم‌ردیف شدند.

تهیه اسلاید کرم‌های نواری برای مطالعه با میکروسکوپ نوری مطابق با دستورالعمل Healy (2006) انجام شد: ابتدا نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در اتانول ۳۵ درصد و سپس ۱۵ دقیقه در آب مقطر غوطه‌ور و آبدهی شدند. برای رنگ‌آمیزی نمونه ها رنگ هماتوکسلین دلافیلد رقیق‌شده در آب مقطر (۱:۹) استفاده شد. مدت‌زمان رنگ دهی بسته به‌اندازه کرم متغیر بود ولی نمونه‌ها بین ۳۰ تا ۶۰ ثانیه در رنگ غوطه‌ور شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با آب شیر شستشو شدند و به‌منظور آبگیری از رقت‌های افزایشی اتانول ۳۵ و ۷۰ درصد استفاده شد. در ادامه با اتانول ۷۰ درصد اسیدی رنگ‌بری و ایجاد تباین ساختارهای داخلی بند

انجام گرفت و برای خنثی کردن اثر اســـید و تثبیت رنگ هر نمونه در محلول اتانول ۷۰ درصـــد بازی قرار گرفت؛ در ادامه آبگیری کامل نمونه‌ها با اتانول مطلق انجام شـد. به‌منظور شـفاف‌سـازی، نمونه‌ها در متیل سـالیسـیلات غوطه‌ور شـدند. در پایان برای تهیه اسلاید دائمی، نمونه‌ها با اسـتفاده از چسـب کانادابالزام روی اسـلایدهای شـیشـه‌ای چسـبانده شـدند. اسـلایدهای آماده‌شـده باکیفیت مناسب با دوربین Leica ICC50 HD که روی میکروسکوپ Leica DM500 نصب بود عکس‌برداری شد.

۳. نتایج و بحث

درمجموع ۲۶۶ سفره‌ماهی از مناطق موردمطالعه صید شد که بر اساس شناسایی اولیه شامل ۱۱ گونه از هفت جنس و دو راسته بود. از راسته Myliobatiformes، زیر خانواده Urogymninae با شش گونه و چهار جنس فراوان‌ترین آرایه و جنس Maculabatis با سه گونه متنوع‌ترین جنس بود. به ترتیب ۸۰ و ۲۱ قطعه M. randalli و M. arabica بدست آمد. ۴۲ قطعه M. gerrardi به دام افتادند. فقط یک قطعه P. fai بزرگ جثه از آب‌های جزیره هرمز، در نزدیکی تنگه هرمز به دست آمد. ۴۳ قطعه B. walga بودند از هر دو بدنه آبی صید گردید. پنج قطعه H. Leoparda صید شد که از این تعداد یک قطعه از سواحل جُد واقع در دریای عمان، پنج قطعه از آب‌های اطراف جزیره هرمز و دو قطعه از آب‌های سواحل بوشهر به دست آمد. تنها نماینده صیدشده از زیر خانواده Hypolophinae، P. sephen بود که ۵۰ قطعه از آن از هر دو بدنه آبی صید شد. از راسته Rhinepristiformes چهار گونه شامل ۲۶ فرد از گونه G. granulatus ، یک فرد از هر یک از گونه‌های G. halavi و G. obtusus همگی از دریای عمان و *R. laevis* از خلیج‌فارس صید گردید. هویت تمام میزبان های صید شده از طریق رمزمیله NADH2 مورد تایید قرار گرفت. از ۲۶۶ میزبان بررسی‌شده ۱۲۵ میزبان آلوده به حداقل یک فرد از یک گونه از جنس Rhinebothrium بود. مجموعاً ۳۲۴۶ کرم نواری راینی‌بوترید متعلق به نه گونه از روده مارپیچ آن‌ها جدا شد که از این تعداد شش گونه پیش‌ازاین توصیف‌شده بودند. توصیف دو آرایه در این نوشتار ارائه می شود.

از بین کرم های های نواری توصیف نشده، دو تاکسون از دو میزبان M. randalli و M. arabica بدست آمد که از نظر ریختی بسیار به هم شباهت داشتند ولی نتایج مبتنی بر رمزمیله ژن 28s rDNA هویت گونه ای مستقل آنها را نشان داد (فاصله ژنتیکی پاتریستیک ۰.۹ درصد). مطالعه Mantovani (۲۰۱۸) نیز نشان داده است که در جنس Echeneibothrium فاصله ژنتیکی بیش از ۰.۴ درصد می تواند به عنوان مرز گونه در نظر گرفته شود. با توجه به نتایج حاصله این دو تاکسون به عنوان گونه های جدید توصیف می شوند.

.Rhinebothrtium sp.1

میزبان

Maculabatis arabica, Maculabatis randalli (Myliobatiformes: Dasyatidae),

محل

دریای عمان و خلیج‌فارس

محل زیست در میزبان

روده مارپیچ

توصیف بر اساس ۱۵ اسلاید کرم بالغ، چهار اسکولکس آماده‌شده برای SEM و ۱۹ نمونه استفاده‌شده در آنالیز مولکولی انجام شد. همچنین نمونه‌های ووچر مربوط به نمونه‌های میکروسکپ الکترونی و مولکولی رنگ‌آمیزی و برای تطبیق هویت آن‌ها استفاده شدند.

توصیف

کرم نواری یوآپولایتیک (شکل ۱- الف)، بندها هم‌پوشان. ۱۶/۸- ۵/۷ (۰/۸ ± ۱۱/۳ ؛ N=۱۵) میلی‌متر طول، حداکثر عرض ۱/۸- ۰/۸ (۰/۲ ± ۱/۳ ؛ N= ۹) میلی‌متر در سطح اسکولکس، متشکل از ۱۷۳-۴۰ بند (۱/۱ ± ۹۷/۱ ؛N=۳۵). اسکولکس پراپر با چهار بوتریدیوم ساقه دار، فاقد ساقه سری، فاقد مزورینکوس، ابعاد بوتریدیوم ها به طول ۹۰۹/۲-۴۷۶/۹ (۶/۸ ± ۶۵۳/۴ ؛ N=۶ ؛ n=۸) و عرض ۲۱۳/۲-۱۶۷/۶ (۳۵/۲ ± ۱۸۵/۳ ؛ N=۵ ؛ n=۵)، که به‌واسطه یک انقباض افقی لولا مانند در مرکز، بوتریدیوم به دونیمه خلفی و قدامی نسبتاً مساوی تقسیم می‌شود، لوکولی های میانی هر نیمه عریض‌تر از لوکولی های خلفی و قدامی، در محل لولا لوکولی وجود ندارد، سطح چسبنده دارای تیغه‌های عرضی و یک تیغه طولی میانی واضح که از حاشیه خلفی قدامی ترین لوکولی تا حاشیه قدامی خلفی‌ترین لوکولی امتداد می‌یابد؛ فاقد تیغه طولی حاشیه‌ای؛ قدامی ترین و خلفی‌ترین لوکولی ها منفرد، به طول ۵۶/۵-۳۵/۶ (۹/۷ ±۴۹/۱ ؛N=۴ ؛ n=۶) و عرض ۳۰/۹-۱۹/۹ (۴/۶ ± ۲۵/۷ ؛N=۴ ؛ n=۶)؛ درمجموع هر بوتریدیوم دارای ۴۲-۳۴ (۰/۶ ± ۳۸ ؛ n=۳۵) لوکولی؛ ساقه به طول ۶۳۳/۴-۱۵۵/۶ (۴۰/۴ ± ۲۷۸/۳ ؛N=۷ ؛ n=۲۵) و عرض ۱۵۳/۲-۶۹/۸ (۱۱/۱ ± ۱۰۲/۵ ؛ N=۷ ؛ n=۲۲) که به مرکز بوتریدیوم متصل است.

استروبیلا

بندهای نابالغ متعدد و مستطیلی شکل، طول بند کمتر از عرض آن، به‌تدریج نسبت طول بند به عرض آن با افزایش سن بند بیشتر می‌شود، آهنگ تولید بند نابالغ بیشتر از بندهای بالغ؛ به طول ۳۴۶/۸-۱۴/۵ (۱۱۶/۵ ± ۱۲۱/۱ ؛N=۷ ؛ n=۲۶) و عرض ۲۰۶/۶-۶۸/۳ (۲۶/۴ ± ۱۳۹/۷ ؛N=۷ ؛ n=۲۶)؛ بندهای بالغ به تعداد کمتر، به طول ۸۳۵/۱-۳۰۳/۵ (۲۷۲/۴ ± ۵۲۴/۳ ؛N=۷ ؛ n=۱۷) و عرض ۴/۱-۸۴/۲۶۱ (۳۲/۶ ± ۱۸۷/۶ ؛N=۷ ؛ n=۱۷)؛ بند انتهایی دوکی‌شکل، به طول ۱۰۰۷/۸-۵۸۳/۹ (۲۱۲/۱ ± ۷۶۴/۵ ؛N=۶) و عرض ۵/۸-۱۱۷/۲۶۱ (۳۲/۲ ± ۲۰۴/۸ ؛N=۶).

میکروسکپ الکترونی نگاره

بخش‌های مرکزی با پوششی از لوکولی های سطح چسبنده فیلی‌تریش های آسیکولار کوتاه (شکل ۱-ب C)؛ تیغه‌های عرضی سطح چسبنده با آرایش اسپاینی‌تریش های اسکولوپیت (شکل ۱-ب D)؛ تیغه‌های طولی سطح چسبنده با آرایش اسپاینی‌تریش های اسکولوپیت و فیلی‌تریش های آسیکولار کوتاه (شکل ۱-ب **Error! Reference source not found.**E)؛ ساقه بوتریدیوم و سطح بندها پوشیده از فیلی‌تریش های کاپیلی‌فرم متراکم (capilliform filitriches) (شکل ۱-ب **Error! Reference source not found.**F و شکل ۱-ب **Error! Reference source not found.**I)؛ تمام سطح غیر چسبنده (proximal) با اسپاینی‌تریش های گلادی‌ایت رشته دار باریک (aristate gladiate spinitriches) متراکم که مابین آن‌ها فیلی‌تریش های آسیکولار (acicular filitriches) قرار دارند پوشانده شده است (شکل ۱-ب **Error! Reference source not found.**G)؛ لبه بوتریدیوم سطح غیر چسبنده دارای پوشش متراکمی از فیلی‌تریش های کاپیلی‌فرم و آرایش پراکنده‌ای از اسپاینی‌تریش های گلادی‌ایت رشته دار (شکل ۱-ب K-J)؛ لبه بوتریدیوم سطح چسبنده آرایش متراکمی از فیلی‌تریش های آسیکولار و اسپاینی‌تریش های اسکولوپیت (scolopate spinitriches) (شکل ۱-ب L).

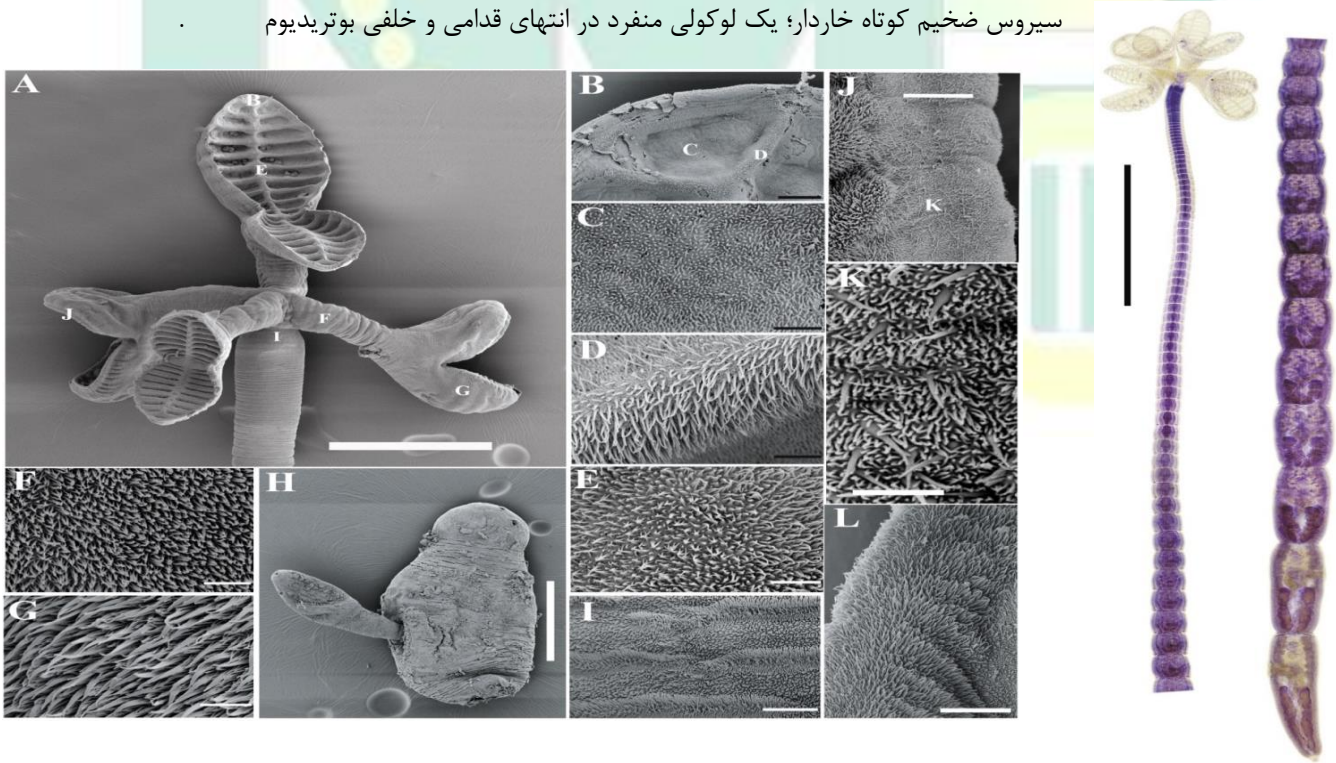
تشریح اندام‌های تولیدمثلی

دهلیز جنسی مشترک؛ منافذ جنسی کناری، به‌طور متناوب در سمت چپ و راست بند قرار دارند؛ موقعیت منفذ جنسی قدامی، ۲/۵-۶۳/۷۳ درصد (۰/۰۴ ± ۶۸/۱ ؛N=۵) طول بند انتهایی از انتهای خلفی؛ بیضه‌ها در بند بالغ از دید پشتی بیضی‌شکل و با آرایش نامنظم در بخش قدامی بند، به طول ۵۱/۹-۳۹/۲ (۷/۴ ± ۴۷/۶ ؛N=۷ ؛ n=۱۷) و عرض ۴۲/۲-۲۶/۵ (۶/۶ ± ۳۵/۷ ؛N=۷ ؛ n=۱۷)؛ به تعداد ۱۴-۸ (۱/۳ ± ۱۰/۳ ؛N=۲۴) عدد در هر بند، بیضه‌ها از منفذ جنسی عبور نمی‌کنند؛ دو تا سه بند انتهایی بیضه‌ها تحلیل می‌روند، مجرای وابران متسع، پیچ‌خورده و از ناحیه لبه قدامی وارد کیسه سیروس می‌شود؛ کیسه سیروس بیضوی شکل، نسبتاً

کوچک، وارد فضای بین تخمدانی نمی‌شود، حاوی سیروس کوتاه، ضخیم و خاردار؛ کیسه سیروس در بند آخر به طول ۲۰۹/۱-۱۷۹/۹ (۳۳/۷ ± ۱۹۳/۵؛N=۵) و عرض ۹۸/۷-۵۹/۹ (۱۴/۱ ± ۸۰/۶؛N=۵)؛ واژن در جلوی مجرای سیروس به دهلیز جنسی مشترک باز می‌شود، در بند آخر لومن واژنی بسیار متسع، دیواره آن در بندهای بالغ و بند آخر با دیواره ضخیم و عرض آن در طول مجرا تقریباً ثابت، به‌طور عرضی از دهلیز جنسی گسترده شده و در میانه بند به سمت ناحیه خلفی خمیده می‌شود. در ناحیه خلفی کیسه سیروس بدون پیچ‌خوردگی و تا رسیدن به اووتیپ امتداد می‌یابد، از رو کیسه سیروس عبور نمی‌کند؛ بخش پروکسیمال واژن دارای اسفنکتر واژنی است؛ تخمدان دولایه، از دید پشتی به شکل V معکوس، تقریباً متقارن، لوبی شکل، ۴۴/۷-۴۰/۶ درصد (۰/۰۴ ± ۴۳؛ N=۶) طول بند آخر از انتهای خلفی بند را فرامی‌گیرد، لوب نزدیک به منفذ جنسی به طول ۴۲۲/۳-۳۰۶/۱ (۶۶/۱ ± ۳۶۱/۹؛N=۶) و لوب دور از منفذ جنسی به طول ۴۴۰/۴-۳۳۲/۵ (۷۶ ± ۳۸۲/۳؛N=۶)؛ حداکثر عرض تخمدان ۷۱/۲-۴۲/۴ (۸/۱ ± ۵۶/۵؛N=۳؛ n=۵)، پل تخمدانی (ovarian isthmus) در موقعیت نزدیک به رأس خلفی تخمدان؛ غده مهلیز در سطح پل تخمدانی؛ غدد زرده‌ای فولیکولار، شکل فولیکول‌ها نامنظم، به طول ۳۰/۲-۱۶/۳ (۳/۹ ± ۲۲/۷؛N=۳؛ n=۷) و عرض ۲۰/۱-۸/۶ (۲/۶ ± ۱۴/۲؛N=۳؛ n=۷)، به‌صورت ستون‌های دولایه در طرفین بند، از انتهای خلفی بند تا انتهای قدامی بند کشیده می‌شود، ستون غدد زرده‌ای هم در سطح منفذ جنسی، هم در سطح تخمدان پیوسته است (فرد شماره MM۱۴۸۵F۲)؛ رحم میانی و کیسه‌مانند در بندهای بالغ انتهایی، از انتهای خلفی لوب تخمدانی تا قدامی ترین فولیکول‌های زرده‌ای امتداد می‌یابد، پروگلوتید رسیده آزاد و تخم مشاهده نشد.

خصوصیات تشخیصی

خصوصیت بارز و مشخص این آرایه عبارت است از فرم تولیدمثلی کرم نواری یوآپولایتیک و بلند؛ وجود ۱۴-۸ بیضه در جلوی منفذ جنسی؛ بوتریدیوم لولادار که در بخش میانی تنگ‌شدگی دارد؛ فاقد لوکولی در محل لولای بوتریدیوم؛ بوتریدیوم عضلانی، کوتاه با تعداد لوکولی کم (۴۲-۳۴)؛ موقعیت قدامی منافذ جنسی؛ غدد زرده‌ای پیوسته در سطح منفذ جنسی؛ کیسه سیروس کوچک حاوی سیروس ضخیم کوتاه خاردار؛ یک لوکولی منفرد در انتهای قدامی و خلفی بوتریدیوم .



شکل۱: الف) آرایه Rhinebothrium sp.۱. اسلاید MM۱۴۸۶F۱. محل قطع پایان بندهای نابالغ و شروع بندهای بالغ را نشان می‌دهد؛ مقیاس یک میلی‌متر. ب) تصویر میکروسکوپ الکترونی Rhinebothrium sp.A۱. - اسکولکس (وچر MM۱۵۳۱S۳)؛ B- لوکولی منفرد نیمه قدامی بوتریدیوم؛ C- سطح میانی لوکولی سطح چسبنده بوتریدیوم؛ D- تیغه عرضی در سطح چسبنده؛ E- تیغه طولی سطح چسبنده؛ F- ساقه بوتریدیوم؛ G- سطح غیر چسبنده؛ H- بند انتهایی با سیروس بیرون زده (وچر MM۱۴۴۲S۱)؛ I- ساقه سری بسیار کوتاه؛ J- لبه بوتریدیوم در سطح غیر چسبنده؛ K- لبه بوتریدیوم در سطح غیر چسبنده؛ I- لبه بوتریدیوم در سطح چسبنده؛ مقیاس: □ ۳۰۰ A=، □ ۱۰ B =، □ ۲ C ,- E= ۳ F=، □ ۲ G=، □ ۲۰۰ H =، □ ۹ I =، □ ۲ K= و □ ۵ =

Rhinebothrtium sp.2

میزبان

Maculabatis arabica, *Maculabatis randalli* (Myliobatiformes: Dasyatidae),

محل

دریای عمان و خلیج‌فارس

محل زیست در میزبان

روده مارپیچ

توصیف بر اساس هفت اسلاید کرم بالغ، شش اسکولکس آماده‌شده برای SEM و ۱۲ نمونه استفاده‌شده در آنالیز مولکولی انجام شد. همچنین نمونه‌های ووچر مربوط به نمونه‌های میکروسکپ الکترونی و مولکولی رنگ‌آمیزی و برای تطبیق هویت آن‌ها استفاده شدند.

توصیف

کرم نواری یوآپولایتیک (شکل ۲-الف)، بندها هم‌پوشان. ۱۱/۹- ۲/۴ (۳/۲ ± ۶ ؛ N=۱۱) میلی‌متر طول، حداکثر عرض ۱/۵- ۰/۷ (۰/۳ ± ۱ ؛ N=۲۵) میلی‌متر در سطح اسکولکس، متشکل از ۱۰۱-۲۵ بند (۱/۱ ± ۵۶ ؛ N=۷). اسکولکس پراپر با چهار بوتریدیوم ساقه دار و ساقه سری (۲۴۱/۸-۵۹/۵؛ N=۵)، فاقد مزورینکوس، ابعاد بوتریدیوم ها به طول ۳۳۱/۹-۸۰۲/۲ (۱۴۴/۱ ± ۶۲۰/۱ ؛N=۶ ؛ n=۱۲) و عرض ۲۹۳/۵ -۱۲۹/۲ (۵۶/۳ ± ۱۹۸/۵؛ N=۶ ؛ n=۱۲)، که به‌واسطه یک انقباض افقی لولا مانند در مرکز، بوتریدیوم به دونیمه خلفی و قدامی تقسیم می‌شود، لوکولی های میانی هر نیمه عرض تر از لوکولی های خلفی و قدامی، در محل لولا لوکولی وجود دارد ، سطح چسبنده دارای تیغه‌های عرضی و یک تیغه طولی میانی واضح که از حاشیه خلفی قدامی‌ترین لوکولی تا حاشیه قدامی خلفی‌ترین لوکولی امتداد می‌یابد؛ فاقد تیغه طولی حاشیه‌ای؛ قدامی ترین و خلفی‌ترین لوکولی ها منفرد به طول ۶۱/۷-۳۳/۸ (۸/۶ ± ۴۴/۱؛ N=۶ ؛ n=۱۲) و عرض ۳۲/۸-۱۴/۸ (۴/۷ ± ۲۴/۵؛ N=۶ ؛ n=۱۲)؛ درمجموع هر بوتریدیوم دارای ۵۰-۴۲ (۰/۶ ± ۴۶؛ N=۱۲) لوکولی؛ ساقه به طول ۴۳۵/۲-۸۲/۶ (۷۹/۲ ± ۱۷۵/۳؛ N=۱۱ ؛ n=۳۶) و عرض ۱۵۱/۱-۴۶/۲ (۲۵/۸ ± ۹۴/۵؛ N=۱۱ ؛ n=۳۶) که به مرکز بوتریدیوم متصل است.

استروبیلا

بندهای نابالغ متعدد و مستطیلی شکل، طول بند کمتر از عرض آن، به‌تدریج نسبت طول بند به عرض آن با افزایش سن بند بیشتر می‌شود، آهنگ تولید بند نابالغ بیشتر از بندهای بالغ؛ به طول ۴۸۳/۴-۲۲/۲ (۱۰۱/۳ ± ۱۲۴/۶؛ N=۱۲ ؛ n=۸۰) و عرض ۲۰۷/۲-۲۳/۵ (۳۴/۷ ± ۱۲۱/۴؛ N=۱۲ ؛ n=۸۰)؛ بندهای بالغ به تعداد کمتر، به طول ۸۳۶/۱-۱۷۴/۴ (۱۵۷/۵ ± ۳۴۱/۱؛ N=۷ ؛ n=۴۵) و عرض ۲۹۱/۱-۹۸/۱ (۵۳/۹ ± ۱۷۹/۸؛ N=۷ ؛ n=۴۵)، بند انتهایی دوکی‌شکل، به طول ۹۵۲/۱-۴۵۲/۶ (۱۶۱/۳ ± ۶۰۹/۷؛ N=۷) و عرض ۲۸۴/۴-۱۲۲/۱ (۵۹/۱ ± ۲۰۲/۵؛ N=۷).

میکروسکپ الکترونی نگاره

بخش‌های مرکزی لوکولی های سطح چسبنده پوشیده از فیلی‌تریش های آسیکولار متراکم (شکل ۲-ب C)؛ تمام سطح غیر چسبنده (proximal) با اسپاینی‌تریش های گلادی‌ایت رشته دار (aristate gladiate spinitriches) متراکم که مابین آن‌ها فیلی‌تریش های آسیکولار (acicular filitriches) قرار دارند پوشانده شده است (شکل ۲-ب D)؛ سطح بندها دارای آرایش بسیار متراکم فیلی‌تریش های کاپیلی‌فرم؛ تیغه‌های عرضی و طولی سطح چسبنده بوتریدیوم با اسپاینی‌تریش های اسکولوپیت (scolopate spinitriches) و

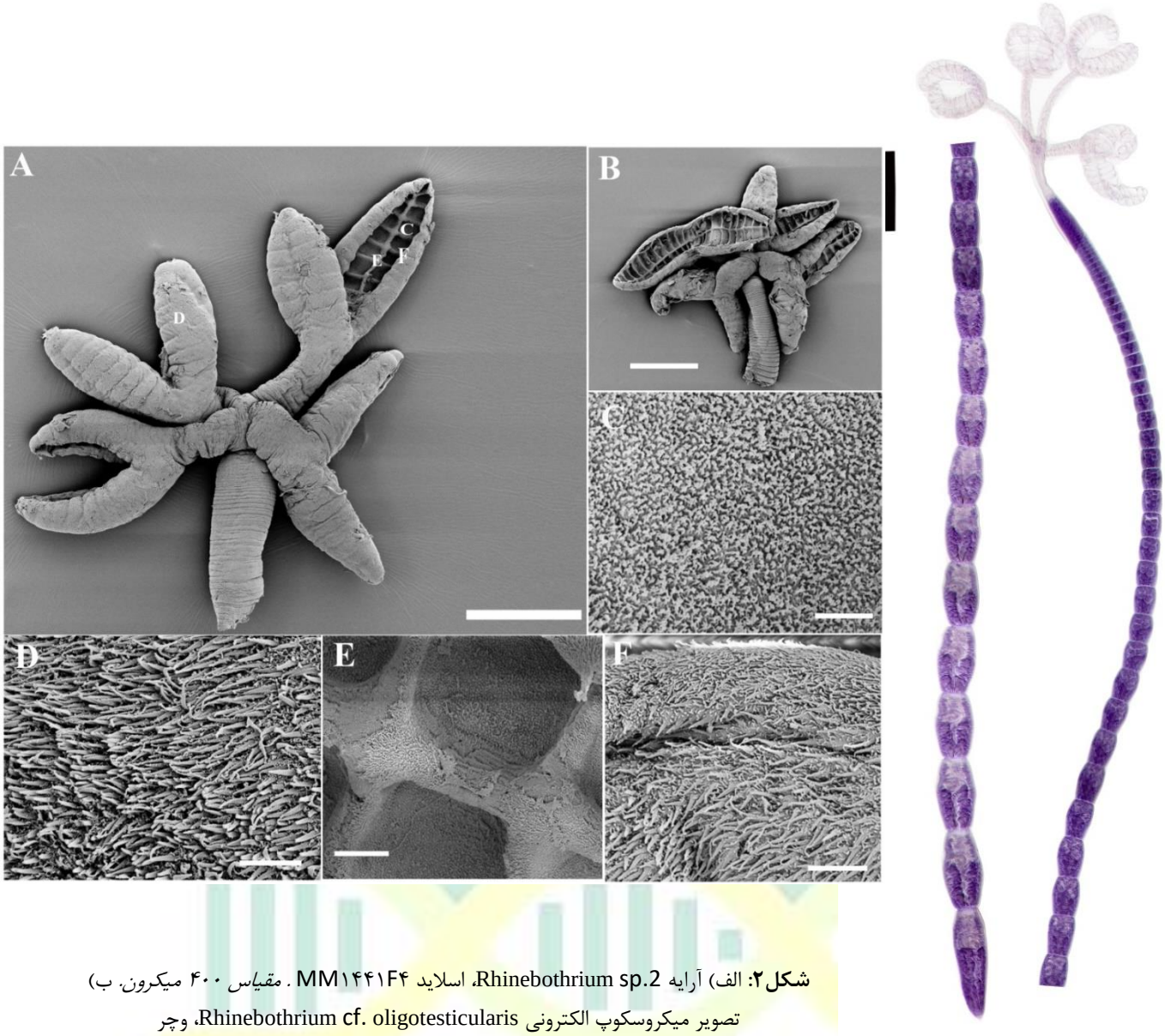
فیلی‌تریش های آسیکولار مفروش می‌شود (شکل ۲-ب E)؛ سطح غیر چسبنده لبه بوتریدیوم ها دارای پوشش متراکمی از فیلی‌تریش های کاپیلی‌فرم و آرایش پراکنده‌ای از اسپاینی‌تریش های گلادی‌ایت رشته دار؛ شکل ۲-ب F)

تشریح اندام‌های تولیدمثلی

یک پد عضلانی دهلیز جنسی را دربر می‌گیرد؛ منافذ جنسی کناری، به‌طور متناوب در سمت چپ و راست بند قرار دارند؛ موقعیت منفذ جنسی قدامی، ۷۶/۲-۶۳/۹ درصد (۰/۰۴ ± ۷۱/۳؛ N=۷) طول بند انتهایی از انتهای خلفی؛ بیضه‌ها در بند بالغ از دید پشتی بیضی‌شکل و با آرایش نامنظم در بخش قدامی بند، به طول ۱۰۵/۵-۵۷/۲ (۱۲/۱ ± ۷۸/۲؛ N=۵ ؛ n=۱۴) و عرض ۶۸/۸-۳۷/۱ (۷/۳ ± ۴۸/۸؛ N=۵ ؛ n=۱۴)؛ به تعداد ۸-۴ (۱/۳ ± ۶/۳؛ N=۱۲) عدد در هر بند، بیضه‌ها از منفذ جنسی عبور نمی‌کنند؛ در دو تا سه بند انتهایی بیضه‌ها تحلیل می‌روند، مجرای وابران متسع، بسیار پیچ‌خورده و از ناحیه لبه قدامی وارد کیسه سیروس می‌شود؛ کیسه سیروس بیضوی شکل، نسبتاً کوچک، وارد فضای بین تخمدانی نمی‌شود، حاوی سیروس کوتاه، ضخیم و خاردار؛ کیسه سیروس در بند آخر به طول ۱۵۵/۱-۹۲/۳ (۲۷/۲ ± ۱۲۵/۳؛ N=۵) و عرض ۶۷/۹-۵۱/۲ (۷/۲ ± ۵۸/۱؛ N=۵)؛ واژن در جلوی مجرای سیروس به دهلیز جنسی مشترک باز می‌شود، دیواره واژن در بندهای بالغ و بند آخر با دیواره ضخیم و عرض آن در طول مجرا تقریباً ثابت، به‌طور عرضی از دهلیز جنسی گسترده شده و در میانه بند به سمت ناحیه خلفی خمیده می‌شود، در ناحیه خلفی کیسه سیروس پیچ‌خوردگی پیدا می‌کند و تا رسیدن به اووتیپ امتداد می‌یابد، از روی کیسه سیروس عبور نمی‌کند؛ بخش پروکسیمال واژن دارای اسفنکتر واژنی است؛ تخمدان دولایه، از دید پشتی به شکل V معکوس، تقریباً متقارن، لوبی شکل، ۵۸/۴-۳۶/۵ درصد (۰/۰۸ ± ۴۷/۶؛ N=۶) طول بند آخر از انتهای خلفی بند را فرامی‌گیرد، لوب نزدیک به منفذ جنسی به طول ۴۰۷/۹-۱۷۵/۴ (۸۸/۱ ± ۲۸۸/۹؛ N=۶) و لوب دور از منفذ جنسی به طول ۴۰۸/۴-۱۸۱/۵ (۸۶/۷ ± ۲۹۵/۱؛ N=۷)؛ حداکثر عرض تخمدان ۵۸/۱-۳۱/۱ (۸/۳ ± ۴۳/۷؛ N=۶ ؛ n=۱۲)، پل تخمدانی (ovarian isthmus) در موقعیت نزدیک به رأس خلفی تخمدان؛ غده مهلیز در سطح پل تخمدانی؛ غدد زرده‌ای فولیکولار، شکل فولیکول‌ها نامنظم، به طول ۲۴/۲-۱۷/۶ (۲/۷ ± ۱۹/۶؛ N=۳ ؛ n=۵) و عرض ۷/۴-۵/۶ (۰/۷ ± ۶/۳؛ N=۳ ؛ n=۵)، به‌صورت ستون‌های دولایه در طرفین بند، از انتهای خلفی بند تا انتهای قدامی بند کشیده می‌شود، ستون غدد زرده‌ای در سطح منفذ جنسی و در سطح تخمدان پیوسته است؛ رحم میانی، کیسه‌مانند در بندهای بالغ انتهایی، از انتهای خلفی بند تا انتهای قدامی اولین ردیف بیضه‌ای امتداد می‌یابد، پروگلوتید آزاد مشاهده شد (نمونه MM۱۴۱۲P۲) ولی تخم مشاهده نشد.

خصوصیات تشخیصی

خصوصیت بارز و مشخص این آرایه عبارت است از فرم تولیدمثلی یوآپولایتیک؛ وجود بیضه‌های کم در جلوی منفذ جنسی؛ بوتریدیوم لولادار که در بخش میانی تنگ‌شدگی دارد؛ فقدان لوکولی در محل لولا؛ موقعیت قدامی منافذ جنسی؛ منقطع شدن غدد زرده‌ای در سطح منفذ جنسی؛ کیسه سیروس کوچک حاوی سیروس ضخیم کوتاه خاردار؛ یک لوکولی منفرد در انتهای قدامی و خلفی بوتریدیوم.



شکل۲: الف) آرایه Rhinebothrium sp.2، اسلاید MM۱۴۴۱F۴ . *مقیاس* ۴۰۰ میکرون. ب) تصویر میکروسکوپ الکترونی Rhinebothrium cf. oligotesticularis، وچر MM۱۵۳۱P۱S۲. Aو B- اسکولکس؛ C- بخش میانی لوکولی سطح چسبنده بوتریدیوم؛ D- سطح غیر چسبنده بوتریدیوم؛ E- سطح چسبنده در محل تیغه عرضی و طولی؛ F- لبه بوتریدی در سطح غیر چسبنده مقیاس: mμ A = ۲۰۰ ؛ B = ۳۰۰mμ ؛ C,D, F = ۳ mμ و E = ۹ mμ

۴. نتیجه‌گیری

با توجه به مطالعات محدود انجام شده در زمینه آرایه شناسی کرم های نواری راینی بوترید ماهیان غضروفی در خلیج فارس و دریای عمان توصیف گونه های جدید دور از انتظار نیست و مطالعه حاضر تایید کننده آن است. در مطالعه آرایه شناسی این گروه از کرم های نواری با توجه به رابطه تکاملی بین انگل های راینی بوترید و میزبان و زمان سپری شده وجود گونه های مخفی یعنی گونه هایی که واگرایی ژنتیکی نشان می دهند ولی از نظر خصوصیات ریختی تشخیص آنها براحتی امکان پذیر نیست می بایست مورد توجه قرار گیرد و این موضوع ضرورت استفاده از داده های مولکولی در کنار بررسی صفات ریختی در این گونه مطالعات را بوضوح نشان می دهد.

منابع

39. Caira J. N. and Jensen K. 2017 .Planetary Biodiversity Inventory (2008–2017): Tapeworms from Vertebrate Bowels of the Earth. Rhinebothriidea Healy, Caira, Jensen, Webster & Littlewood, 2009. With assistance of Ruhnke, T. R., F. B. Reyda, and F. P. L. Marques. Lawrence, KS, USA.

40. Caira J. N. and Jensen K. 2001 .An investigation of the co-evolutionary relationships between onchobothriid tapeworms and their elasmobranch hosts. International Journal for Parasitology, 31(9): 960–975.

41. Caira J. N. and Jensen, K. 2014. A digest of elasmobranch tapeworms. Journal of Parasitology, 100 (4): 373–391.

42. Golzarianpour K., Malek, M., Golestaninasab, M., Sarafrai, A., Kochmann J. and Klimple S. 2020. Insights into the Urogymnid whiprays (Chondrichthyes: Batoidea) in the Persian Gulf and the Gulf of Oman, with an amendment of their diagnostic characteristics and dispersal range. Zootaxa, 4819 (2): 316–334.

43. Golzarianpour, K., Malek M., Golestaninasab M., Sarafrazi A. and Kochmann J. 2021. Two new enigmatic species of Rhinebothrium (Cestoda Rhinebothriidae) from the Persian Gulf: notes on generic traits and host specificity. Systematics and Biodiversity, 19(3): 273–295.

44. Healy C. J. 2006. A revision of selected Tetraphyllidea (Cestoda): Caulobothrium, Rhabdotobothrium, Rhinebothrium, Scalithrium, and Spongiobothrium. PhD dissertation. University of Connecticut, Connecticut. 401.

45. Ivanova N. V., DeWaard J. R. and Hebert P. D. N. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. Molecular Ecology Notes, 6(4): 998–1002.

46. Jabado R., Kyne P., Pollom, R., Ebert D., Simpfendorfer C., Ralph G. and Dulvy N. 2017. The Conservation Status of Sharks, Rays, and Chimaeras in the Arabian Sea and Adjacent Waters. Environment Agency - Abu Dhabi and IUCN Species Survival Commission Shark Specialist Group, Vancouver, Canada. 978-9948-10-050-8

47. Littlewood D., Timothy J., Cribb T. H., Olson P. D. and Bray R. A. 2001. Platyhelminth phylogenetics—a key to understanding parasitism. Belgian Journal of Zoology. 131(1): 35–46.

48. Mantovani B. V. 2018. Skate Tapeworms Revisited: A Modern Approach. Doctoral Dissertations. University of Connecticut.

49. Naylor G. J. P., Caira, J. N., Jensen K., Rosana K. A. M., White W. T. and Last, P. R. 2012. A DNA sequence-based approach to the identification of shark and ray species and its implications for global elasmobranch diversity and parasitology. Bulletin of the American Museum of Natural History. 1–262.

50. Okonechnikov K., Golosova O., and Fursov M. 2012. Unipro UGENE. A unified bioinformatics toolkit. Bioinformatics. 28(8): 1166–1167.

51. Palm H. W. 1999. *Nybelinia* Poche, 1926, Heteronybelinia gen. nov. and Myxonibelinia gen. nov. (Cestoda, Trypanorhyncha) in the collections of the Natural History Museum, London. Bulletin of the Natural History Museum. 65: 133–153.

52. Raden M., Ali M., Alkhnbashi O. S., Busch A., Costa F., Davis J. A. et al. 2018. Freiburg RNA tools. A central online resource for RNA-focused research and teaching. Nucleic acids research. 46(1): 25-29.

53. Roberts L. S., Schmidt G. D. and Janovy J. 2009. Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' foundations of parasitology. 8th ed. Boston: McGraw-Hill Higher Education. 0073028274

54. Santos J. V., Marques F. P.L. and Trevisan B. 2020. The First Report and Description of a New Species of Rhinebothrium from a Dasyatid Stingray from the Brazilian Northeastern Coast with a Review of the Distribution of the Genus throughout Endemic Marine Ecoregions. The Journal of Parasitology. 106 (6): 809–817.

55. Trevisan B. and Caira J. N. 2020. Three New Species of Rhinebothrium (Cestoda. Rhinebothriidea) from the Leopard Whipray, Himantura Leoparda, in Australia. The Journal of Parasitology. 106(6): 789–801.

The effect of algae supplementation in the diet of Japanese quail on quail egg production performance

Mojtaba Alisufi*[1]; Rashid Safari[2]; Zabih alah Nemati[3]; Kazem Alirezalou[2]

1- Student of Animal Sciences, Poultry Nutrition, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz
2 Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz
2- Associate Professor, Department of Animal Sciences, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz

Corresponding Author Email address (mojtaba.alisufi@yahoo.com)

Abstract

The aim of this experiment was to evaluate the effect of dietary supplementation with the algae Chlorella and Spirulina, Azolla on the yolk and egg white quality of Japanese quail. In this experiment, 196 laying Japanese quails in 9 week of age were used for 18 weeks. This experiment has been done in completely randomized design With 7 treatments and 4 replications and in each replication 7 birds were performed in 28 cages. Treatments include 1- basic diet (control); 2- Control treatment with 0.3 g / kg of chlorella; 3- Control treatment with 0.6 g / kg of chlorella; 4- Control treatment with 0.3 g / kg of spirulina; 5- Control treatment with 0.6 g / kg of spirulina; 6: control treatment with 0.3 g / kg azolla and 7- control treatment with 0.6 g / kg azolla .Feed intake by spirulina had a significant increase of 0.6 compared to the control treatment ($p < 0.05$), which can be concluded that spirulina causes a good diet, which increases with the feed weight of quail eggs in this treatment. And was significantly different from the control treatment. Experimental treatments also increased egg production and egg mass and were significantly different from control treatment ($p < 0.05$). In general, experimental treatments had a positive effect on egg production, egg mass and egg weight and improved bird performance.

Keywords: Japanese quail, egg production, algae, egg mass

تأثیر مکمل سازی جلبک‌های دریایی در جیره غذایی بلدرچین ژاپنی بر عملکرد تولید تخم بلدرچین

مجتبی علی‌صوفی[1*]؛ رشید صفری[2]؛ ذبیح اله نعمتی[3]؛ کاظم علیرضالو[2]

۱-دانش‌آموخته علوم دامی، گرایش تغذیه طیور دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر دانشگاه تبریز

۲- استادیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر دانشگاه تبریز

۳- دانشیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر دانشگاه تبریز

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: mojtaba.alisufi@yahoo.com

چکیده

هدف از این آزمایش تأثیر مکمل سازی جیره غذایی با جلبک‌های کلرلا و اسپیرولینا، آزولا بر وزن تخم، توده تخم، مصرف خوراک و تولید تخم بلدرچین ژاپنی می‌باشد. در این آزمایش تعداد ۱۹۶ قطعه بلدرچین ژاپنی تخم‌گذار از ۹ هفتگی تا ۱۸ هفتگی مورد استفاده قرار گرفتند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۷ تیمار و ۴ تکرار و در هر تکرار ۷ پرنده در ۲۸ قفس انجام شد. تیمارها شامل ۱- جیره پایه (کنترل)؛ ۲- تیمار کنترل به همراه ۰/۳ گرم در کیلوگرم کلرلا؛ ۳-تیمار کنترل به همراه ۰/۶ گرم در کیلوگرم کلرلا؛ ۴- تیمار کنترل به همراه ۰/۳ گرم در کیلوگرم اسپیرولینا؛ ۵- تیمار کنترل به همراه ۰/۶ گرم در کیلوگرم اسپیرولینا؛ ۶: تیمار کنترل به همراه ۰/۳ گرم در کیلوگرم آزولا و ۷- تیمار کنترل به همراه ۰/۶ گرم در کیلوگرم آزولا بود. مصرف خوراک توسط اسپیرولینا ۰/۶ افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار کنترل داشت ($p<0/05$) که می‌توان نتیجه گرفت که اسپیرولینا سبب خوش خوراکی جیره می‌شود که با افزایش خوراک وزن تخم بلدرچین در این تیمار نیز افزایش کرده بود و تفاوت معناداری با تیمار کنترل داشت. تیمارهای آزمایشی سبب افزایش تولید تخم و توده تخم نیز شده بودند و با تیمار کنترل تفاوت معناداری داشتند ($p<0/05$). به‌طور کلی تیمارهای آزمایشی تأثیر مثبتی در تولید تخم، توده تخم و وزن تخم داشتند و باعث بهبود عملکرد پرنده شدند.

واژگان کلیدی: بلدرچین ژاپنی، تولید تخم، جلبک، توده تخم

۱.مقدمه

در میان جلبک‌های خوراکی، اسپیرولینا یا آرتروسپیرا (میکرو جلبک سبز آبی) اخیراً به‌عنوان منبع مهم ترکیبات فعال زیستی معرفی‌شده‌اند که می‌توانند گزینه‌ای برای جایگزینی بجای آنتی‌بیوتیک در تغذیه طیور باشند که بر حفظ سلامتی و تولید تخم‌مرغ با بهبود موازی کیفیت تخم‌مرغ رابطه‌ی مستقیم دارد. بااین‌حال نتایج به‌دست‌آمده کامل نیست و نیاز به تحقیقات

بیشتر در این زمینه می‌باشد. با توجه به بحث افزایش کیفیت تولید و عدم استفاده از آنتی‌بیوتیک در مزارع پرورشی در صنعت مرغداری می‌توان در صنعت دام و طیور از ریز جلبک‌ها به‌عنوان منابع مغذی طبیعی استفاده کرد. اسپیرولینا (جلبک سبز آبی) یکی از مواد افزودنی خوراک طبیعی باکیفیت بالا است که می‌تواند در تغذیه دام و طیور استفاده شود. دو گونه مختلف از اسپیرولینا وجود دارد: Spirulina maxima و Spirulina platensis، با پراکندگی متفاوت در سراسر جهان (De Oliveira, Monteiro et al. 1999). یک ریز جلبک سبز آبی رشته‌ای (سیانوباکتریوم) است که به‌عنوان منبع غنی از پروتئین باکیفیت بالا، ویتامین‌ها (به‌ویژه ویتامین B12 و پرو ویتامین β کاروتن)، مواد معدنی، اسیدهای چرب ضروری، شناخته می‌شود. در آزمایشات تغذیه با حیوانات دام، مشخص‌شده است که اسپیرولینا باعث افزایش سرعت رشد، استفاده از مواد مغذی، مقاومت در برابر بیماری، کیفیت تخم‌مرغ و کیفیت لاشه در طیور، خوک‌ها و خرگوش می‌شود (Al-Batshan, Al-Mufarrej et al. 2001, Meineri, Ingravalle et al. 2009, Sujatha and Narahari 2011, Evans, Smith et al. 2015). در یک مطالعه اولیه، راس و همکاران (۱۹۹۴) هیچ سوء اثری از مکمل جیره غذایی با اسپیرولینا بر تولید تخم‌مرغ، ضریب تبدیل، وزن تخم، وزن بدن و میزان مرگ‌ومیر پیدا نکرد. برخلاف جوجه‌های گوشتی که در آن‌ها تحقیقات پروبیوتیک و پری بیوتیک روی گزینه‌های جایگزین آنتی‌بیوتیک متمرکز است، تغذیه مرغ‌های لاین بر حفظ سلامتی و تولید تخم‌مرغ با بهبود موازی کیفیت تخم‌مرغ تمرکز دارند (Ross, Puapong et al. 1994). اعتقاد بر این است که اجزای آن بر عملکرد و سلامت حیوانات ازجمله تولیدمثل و کیفیت تخم‌مرغ تأثیر می‌گذارد (Arakawa 1960). بااین‌حال، نتایج مبهم است (Janczyk, Langhammer et al. 2006). بساک و همکاران گزارش کرده‌اند که آزولا برای تغذیه مرغ‌های گوشتی نیز مناسب است (Basak, Pramanik et al. 2002). گنجاندن آزولا در جیره طیور موجب صرفه‌جویی در تولید می‌شود (Dhumal, Siddiqui et al. 2009) اما مطالعات بسیار محدودی در مورد ارزیابی اثرات آن بر عملکرد تخم‌گذاری و صفات لاشه بلدرچین‌های ژاپنی انجام‌شده است. تنوع در ترکیب و عدم اطلاع از ترکیبات آزولا، گنجاندن در جیره غذایی طیور تخم‌گذار را دشوارتر می‌کند. بنابر این هدف از این مطالعه تأثیر مکمل سازی جلبک‌های دریایی اسپیرولینا، کلرلا و آزولا بر مصرف خوراک، تولید تخم، وزن تخم و توده تخم بلدرچین ژاپنی می‌باشد.

۲.مواد و روش‌ها

در این آزمایش از بلدرچین‌های ماده با سن‌های یکسان از نژاد ژاپنی استفاده شده است. در مجموع از ۱۹۶ عدد بلدرچین ژاپنی در این آزمایش استفاده شد. جیره‌ی آزمایشی برای برآوردن نیازهای مواد مغذی NRC (1994) همانطور که در جدول شماره ۲-۱ نشان داده شده است، فرموله شد و جلبک‌های آزمایشی به‌صورت تازه و روزانه با جیره کاملاً مخلوط و در اختیار پرندگان قرار داده شد. در مجموع این ۱۹۶ پرنده در ۷ گروه و ۴ تکرار که در هر تکرار ۷ پرنده به‌صورت کاملاً تصادفی تقسیم شدند و به ترتیب یکی از ۷ گروه - جیره پایه (کنترل)؛ ۲- تیمار کنترل به همراه ۰/۳ گرم در کیلوگرم کلرلا؛ ۳-تیمار کنترل به همراه ۰/۶ گرم در کیلوگرم کلرلا؛ ۴- تیمار کنترل به همراه ۰/۳ گرم در کیلوگرم اسپیرولینا؛ ۵- تیمار کنترل به همراه ۰/۶ گرم در کیلوگرم اسپیرولینا؛ ۶: تیمار کنترل به همراه ۰/۳ گرم در کیلوگرم آزولا و ۷- تیمار کنترل به همراه ۰/۶ گرم در کیلوگرم آزولا نام‌گذاری شدند. آب در این آزمایش به‌صورت آزاد و با استفاده از نیپل در اختیار پرندگان قرار می‌گرفت. طول مدت روشنایی در این آزمایش به این صورت بود که ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت خاموشی در نظر گرفته شد. این آزمایش به مدت ۹ هفته انجام شد که آنالیزهای تخم در سه دوره‌ی سه هفته‌ای صورت گرفت. این آزمایش در سالن پرورش دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر و در فصل بهار صورت گرفت. برای محاسبه خوراک مصرفی، باقی‌مانده خوراک در دانخوری‌های هر واحد آزمایشی در پایان

هر هفته از دوره جمع‌آوری و توزین شد و مصرف خوراک از تفاضل بین خوراک داده‌شده در ابتدای هر هفته و باقیمانده خوراک در پایان همان هفته و تقسیم مقدار خوراک مصرفی هر واحد آزمایش بر تعداد پرندگان همان واحد آزمایشی محاسبه شد. تخم‌های بلدرچین تولیدی در هر واحد آزمایشی به‌صورت روزانه و طی ساعت مشخصی در هرروز جمع‌آوری شد و با استفاده با یک ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم وزن‌کشی و با فرمول زیر میانگین وزن تخم بلدرچین روزانه محاسبه و در پایان هر هفته، به‌صورت میانگین هفته‌ای برای هر واحد آزمایشی محاسبه و ثبت گردید. محاسبه مجموع توده تخم بلدرچین به‌صورت روزانه برای هر واحد آزمایشی و در پایان هر هفته به‌صورت میانگین هفته‌ای ثبت گردید. تخم بلدرچین‌های هر واحد آزمایشی به‌صورت روزانه جمع‌آوری، شمارش و ثبت گردید. سپس تخم‌های تولیدی به‌وسیله‌ی یک ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم وزن‌کشی و آن‌ها نیز ثبت گردید و درصد تولید تخم بلدرچین از طریق فرمول زیر محاسبه می‌گردد. فرمول‌های استفاده به شرح زیر می‌باشد:

تعداد تخم تولیدی / وزن تخم‌های بلدرچین تولیدی=میانگین وزن تخم بلدرچین

۱۰۰× درصد تولید × میانگین وزن تخم (گرم) = مجموع توده تخم بلدرچین

۱۰۰× (تعداد بلدرچین روز /تعداد کل تخم تولیدی) = درصد تولید تخم بلدرچین روز

۲/ (تعداد در آخر دوره + تعداد در شروع دوره) × طول دوره= تعداد بلدرچین روز

جدول ۲-۱: اجزاء و ترکیب شیمیایی جیره های آزمایشی

اجزاء جیره	درصد جیره	اجزاء جیره	درصد جیره
ذرت	۵۸/۹	جوش شیرین	۰/۱
کنجاله سویا	۳۰	ترکیبات شیمیایی جیره	
روغن سویا	۲/۳	انرژی متابولیسمی (کیلوکالری)	۲۹۰۰
دی کلسیم فسفات	۲/۱	پروتئین خام (درصد)	۱۸
کربنات کلسیم	۷/۵	متیونین (درصد)	۰/۴۷
متیونین	۰/۲	لیزین (درصد)	۱/۰۸
مکمل ویتامینه	۰/۲۵	کلسیم (درصد)	۲/۵
مکمل معدنی	۰/۲۵	فسفر قابل دسترس (درصد)	۰/۶
نمک	۰/۲	تعادل آنیون_ کاتیون	۲۲۰

۳. نتایج و بحث

در جدول ۳-۱ تأثیر مکمل سازی جلبک‌های دریایی اسپیرولینا، کلرلا و آزولا بر عملکرد پرنده از هفته ۹ تا هفته ۱۸ دروه تخم‌گذاری گزارش داده شده است. نتایج نشان می‌دهند که جلبک‌های اسپیرولینا ۰/۶ و ۰/۳، آزولا ۰/۳ و ۰/۶ و کلرلا ۰/۶ موجب افزایش معنی‌داری در مصرف

خوراک می‌شوند (p<۰/۰۵)؛ اما کلرلا ۰/۳ تأثیر معنی‌داری با تیمار کنترل نداشت همچنین این تیمار فقط با اسپیرولینا ۰/۶ تفاوت معنی‌داری داشت. وزن تخم در این آزمایش در هر دو سطوح اسپیرولینا و آزولا با تیمار کنترل تفاوت معنی‌داری داشته‌اند و باعث افزایش وزن تخم در این آزمایش شده‌اند (p<۰/۰۵) این درحالی است که جلبک کلرلا با اینکه افزایش وزن داشته اما با تیمار کنترل و سایر تیمارها نداشته است. تمامی جلبک‌های آزمایشی باعث افزایش معنادار مقدار توده تخم نسبت به تیمار کنترل شده‌اند (p<۰/۰۵). در این آزمایش بیشترین مقدار توده تخم مربوط به تیمار اسپیرولینا ۰/۶ می‌باشد ولی با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری ندارد. نتایج نشان می‌دهند که سطوح بالاتر جلبک‌های اسپیرولینا و آزولا سبب افزایش معناداری با تیمار شاهد شده‌اند (p<۰/۰۵) اما در تیمار کلرلا سطوح بالاتر موجب کاهش تولید تخم نسبت به سطوح پایین‌تر می‌شود.

جدول ۳-۱: تأثیر مکمل سازی جلبک‌های دریایی اسپیرولینا، کلرلا و آزولا بر عملکرد پرنده از هفته ۹ تا هفته ۱۸ دروه تخم‌گذاری

مورد	تیمارهای آزمایشی							MSE	P value
	کنترل	کلرلا ۰/۳	کلرلا ۰/۶	اسپیرولینا ۰/۳	اسپیرولینا ۰/۶	آزولا ۰/۳	آزولا ۰/۶		
مصرف خوراک (گرم)	۳۳/۹۰^{c}	۳۴/۷۶^{bc}	۳۵/۲۱^{b}	۳۵/۰۳^{b}	۳۶/۲۹^{a}	۳۵/۴۳^{ab}	۳۵/۱۸^{b}	۰/۵۵۶	۰/۰۰۰۲
وزن تخم (گرم)	۱۱/۴۶^{b}	۱۱/۷۲^{ab}	۱۱/۷۷^{ab}	۱۱/۹۵^{a}	۱۱/۹۸^{a}	۱۱/۸۲^{a}	۱۱/۸۶^{a}	۰/۱۹۸	۰/۰۴۳
توده تخم	۹/۸۵^{c}	۱۰/۴۸^{ab}	۱۰/۲۹^{bc}	۱۰/۶۱^{ab}	۱۰/۹۳^{a}	۱۰/۳۰^{ab}	۱۰/۴۸^{ab}	۰/۳۳۱	۰/۰۱
تولید تخم	۸۵/۹۴^{c}	۸۹/۷۸^{ab}	۸۷/۵۰^{bc}	۸۸/۷۷^{abc}	۹۱/۱۵^{a}	۸۷/۱۳^{bc}	۸۸/۳۷^{ab}	۱/۸۶۴	۰/۰۲۴

۱: تیمار کنترل بدون افزودنی، ۲: تیمار کنترل به همراه ۰/۳ گرم در کیلوگرم کلرلا، ۳: تیمار کنترل به همراه ۰/۶ گرم در کیلوگرم کلرلا، ۴: تیمار کنترل به همراه ۰/۳ گرم در کیلوگرم اسپیرولینا، ۵: تیمار کنترل به همراه ۰/۶ گرم در کیلوگرم اسپیرولینا، ۶: تیمار کنترل به همراه ۰/۳ گرم در کیلوگرم آزولا و ۷: تیمار کنترل به همراه ۰/۶ گرم در کیلوگرم آزولا. حروف متفاوت در جدول بیانگر اختلاف بین میانگین تیمارهای آزمایش در سطح ۵ درصد می‌باشد

قابل توجه است که چنین بهبودی با تفاوت‌های ناچیز در مصرف خوراک روزانه مرغ‌ها همراه بود. مطابق با نتایج حاضر، چندین نویسنده گزارش کردند که مرغ‌های تخم‌گذار تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی اسپیرولینا، به‌ویژه آن‌هایی که با جیره حاوی ۰/۶ درصد اسپیرولینا تغذیه شده‌اند، بهترین ابزار تولید تخم‌مرغ و تبدیل خوراک را در مقایسه با مرغ‌های گروه شاهد (Ross and Dominy 1990, Ross, Puapong et al. 1994, Nikodémusz, Páskai et al. 2010)در این رابطه راس و همکاران دریافتند که وزن تخم‌مرغ برای مرغ‌هایی که با جیره‌های حاوی سطوح مختلف اسپیرولینا تغذیه شده بودند به طور قابل توجهی بالاتر بود. علاوه بر این، محققین دیگر مشاهده کردند که تغذیه با جیره‌های حاوی اسپیرولینا تأثیر مفیدی بر عملکرد تولیدی مرغ‌های تخم‌گذار دارد. از سوی دیگر، بهبود تولید تخم‌مرغ و توده تخم‌مرغ‌هایی که با جیره غذایی اسپیرولینا تغذیه می‌شوند نیز می‌تواند مفید باشد(Takashi 2003, Nikodémusz, Páskai et al. 2010). عوامل مؤثر در بهبود عملکرد تولیدی به دست آمده توسط این مرغ‌ها توسط یافته‌های قریشی و همکاران تأیید شد. که دریافتند که اسپیرولینا می‌تواند عملکرد ایمنی، تولید مثل و افزایش رشد جوجه‌های گوشتی را افزایش دهد. همچنین، گزارش شده است که افزودن کمتر از ۱ درصد اسپیرولینا به جیره مرغ به

طور قابل توجهی باعث افزایش می‌شود. مشاهده شده در این مطالعه از گزارش (Janczyk, Langhammer et al. 2006) پشتیبانی می‌کند که اشاره کرد که افزایش بهره‌وری و کیفیت تخم‌مرغ در مرغ‌های تخم‌گذار تغذیه شده تا ۰/۵ گرم بر کیلوگرم کلرلا مشاهده شد. (Lawas, Roxas et al. 1998)تفاوت غیر قابل توجهی در مقادیر میانگین وزن تخم‌مرغ در تغذیه آزولا تازه به اردک‌های تخم‌گذار مشاهده کردند. در مقابل، (Bolka 2011) وزن تخم‌مرغ بالاتری را در مرغ‌های تغذیه شده با ۷.۵٪ آزولا گزارش کرد.

۴. نتیجه‌گیری

از این آزمایش می‌توان نتیجه گرفت که جلبک‌های دریایی اســـپیرولینا، کلرلا و آزولا باعث بهبود عملکرد پرنده از نظر تولید تخم و افزایش وزن تخم می‌شود و همچنین می‌توان نتیجه گرفت که سطوح بالاتر این جلبک‌ها نیز باعث بهبود این عملکردها می‌شود.

منابع

32. Al-Batshan, H. A., et al. (2001). "Enhancement of chicken macrophage phagocytic function and nitrite production by dietary Spirulina platensis." Immunopharmacology and immunotoxicology 23(2): 281-289.
33. Arakawa, S. (1960). "Experimental breeding of White Leghorn with the Chlorella-added combined feed." Japanese Journal of Experimental Medicine 30???? :(۳)
34. Basak, B., et al. (2002). "Azolla (Azolla pinnata) as a feed ingredient in broiler ration." Int. J. Poult. Sci 1(1): 29-34.
35. Bolka, P. (2011). Nutritional evaluation of azolla (Azolla pinnata) in broilers and layers, Karnataka Veterinary, Animal and Fisheries Sciences University, Bidar.
36. De Oliveira, M., et al. (1999). "Growth and chemical composition of Spirulina maxima and Spirulina platensis biomass at different temperatures." Aquaculture international 7(4): 261-275.
37. Dhumal, M., et al. (2009). "Performance of broilers fed on different levels of Azolla meal." Indian Journal of Poultry Science 44(1): 65-68.
38. Evans, A., et al. (2015). "Effects of algae incorporation into broiler starter diet formulations on nutrient digestibility and 3 to 21 d bird performance." Journal of applied poultry research 24(2): 206-214.
39. Janczyk, P., et al. (2006). "Effect of feed supplementation with Chlorella vulgaris powder on mice reproduction." Archiva Zootechnica 9: 122-134.
40. Lawas, M., et al. (1998). Laying performance of Philippine Mallard ducks fed diets substituted with fresh Azolla. 35. Annual Convention of the Philippine Society of Animal Science, Manila (Philippines), 15-16 Oct 1998.
41. Meineri, G., et al. (2009). "Effects of high fat diets and Spirulina Platensis supplementation in New Zealand White rabbit".
42. Nikodémusz, E., et al. (2010). "Effect of dietary Spirulina supplementation on the reproductive performance of farmed pheasants." Technical Articles-Poultry Industry: 1-2.
43. Ross, E. and W. Dominy (1990). "The nutritional value of dehydrated, blue-green algae (Spirulina plantensis) for poultry." Poultry science 69(5): 794-800.
44. Ross, E., et al. (1994). Comparison of freeze-dried and extruded Spirulina platensis as yolk pigmenting agents." Poultry science 73(8): 1282-1289.
45. Sujatha, T. and D. Narahari (2011). "Effect of designer diets on egg yolk composition of ‘White Leghorn’hens." Journal of food science and technology 48(4): 494-497.
46. Takashi, S. (2003). "Effect of administration of Spirulina on egg quality and egg components." Animal Husbandry 57(1): 191-195.

Histological study of the uropygial gland of common starling (*Sturnus vulgaris*)

Reza Sayrafi

Department of Veterinary Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

Email: r.sayrafi@ausmt.ac.ir

Abstract

The uropygial gland, also called the preen gland, is a holocrine gland located at the base of the tail of many avian species. The secretions of this gland have several functions: it contributes to waterproofing the plumage, aids in maintaining feather condition and acts as an antimicrobial agent. The present study aimed to study the histological structure of the uropygial gland of starling. The histological structure of the uropygial gland was examined using haematoxylin and eosin .Sampling was performed from each bird and the samples were placed in 10% Formalin solution. After the routine histological processing the tissues were embedded into paraffin. Tissue sections were stained and studied under a light microscope. The gland is surrounded by a capsule of dense connective tissue. The branches of connective tissue surrounding the adenomers (secretory unities) were thin. The adenomers were tubular and the epithelium of the adenomers can be divided into different strata: germinative, intermediate, secretory and degenerative stratum. In this species, the general structure of the uropygial gland tissue is similar to other birds.

Keywords: Preen gland, Starling, Microscopic structure

مطالعه بافت شناسی غده یوروپیجیال در سار (Sturnus vulgaris)

رضا صیرفی

استادیار گروه علوم پایه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل

Email: r.sayrafi@ausmt.ac.ir

چکیده

غده یوروپیجیال که غده پرین نیز نامیده می‌شود، یک غده هولوکرین است که در قاعده دم بسیاری از گونه های پرندگان قرار دارد. ترشحات این غده عملکردهای متعددی دارد: به ضد آب بودن پرها کمک می‌کند، به حفظ وضعیت پر کمک می‌نماید و به عنوان یک عامل ضد میکروبی عمل می‌کند. مطالعه حاضر با هدف بررسی ساختار بافت شناسی غده یوروپیجیال در سار انجام شد. بافت شناسی غده یوروپیجیال با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین بررسی شد. از هر کدام از پرندگان نمونه برداری به عمل آمد و نمونه‌ها در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرارگرفت. پس از طی مراحل معمول آماده سازی بافت‌ها، آنها با پارافین قالب‌گیری شدند. برش‌های بافتی رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری مطالعه شدند. غده توسط کپسولی از بافت همبند متراکم احاطه شده بود. انشعابات بافت همبند در اطراف آدنومرها (واحدهای ترشحی) نازک بودند. آدنومرها لوله‌ای بودند و اپیتلیوم آدنومرها را می‌توان به لایه‌های مختلفی تقسیم کرد: لایه زایگر، میانی، ترشحی و دژنراتیو. در این گونه، ساختار کلی بافت غده یوروپیجیال مشابه سایر پرندگان است.

واژگان کلیدی: غده پرین، سار، ساختار میکروسکوپی

۱.مقدمه

غده یوروپیجیال، غده پرین نیز نامیده می‌شود. این غده در زیر پوست و در ناحیه قاعده دم پرندگان وجود دارد. غده یوروپیجیال از دو لوب تشکیل شده که از طریق یک پاپیلا و با مجرایی مشترک در سطح پوست باز می‌شود. این غده از خارج توسط کپسول همبندی سخت پوشیده می‌شود. از کپسول غده انشعاباتی به داخل غده رفته و حجرات یا آلوئول‌های غده را از خارج دربر می‌گیرد. این غده مشابه غده چربی در پستانداران در نظر گرفته می‌شود، زیرا ماده‌ای چرب و روغنی تولید می‌کند که به صورت ترشح هولوکرین آزاد شده و توسط تأثیرات هورمونی تنظیم می‌شود. ترکیبی از ماده ترشحی غده یوروپیجیال و لیپید سلول‌های اپیدرمی به عنوان یک عامل ضد باکتری عمل کرده، از خشک شدن کراتین پر جلوگیری می‌کند و به عنوان یک عامل ضد آب عمل می‌نماید (پوستی و همکاران، ۱۳۹۵ - Eurell et al., 206).

مطالعه بافت شناسی و یا هیستوشیمیایی غده یوروپیجیال در تعدادی از پرندگان مانند مرغان گوشتی و بومی (مبینی و ضیائی، ۱۳۸۹)، غاز (Shafiian and Mobini, 2014)، اردک و کبوتر (Hassanin et al., 2021)، چنگر نوک سرخ (Sawad et al., 2006)، طوطی راهب (Carril et al., 2020) و کشیم کلاهدار (Chiale et al., 2020) به انجام رسیده است.

این غده در پرندگان آبزی بزرگتر از پرندگان غیر آبزی می‌باشـــد. این غده در اکثر گونه‌های پرندگان وجود دارد و در برخی از پرندگان وجود نداشته و یا به صورت تحلیلی رفته است (Shafiian and Mobini, 2014).

سارها به طور گسترده در اکثر نقاط زمین پراکنده شده‌اند و بومی اروپا، جنوب غربی آسیا و شمال آفریقا هستند. این گونه از پرندگان جزء پرندگان همه‌چیزخوار محسـوب می‌شـوند (Linz et al., 2007). ســارها علاوه بر زندگی آزادانه در طبیعت، در قفس نیز توسط انسان نگهداری می‌شوند. این پرندگان در ارتباط نزدیک با انسان و حیوانات خانگی قرار داشته و لازم است که در ارتباط با بیماری‌های پرندگان و بیماری‌های مشـترک، مورد توجه بیشـتری قرار بگیرند. در این ارتباط، شـناخت سـاختار بافتی اعضای مختلف بدن آنها حائز اهمیت است. مطالعه حاضر با هدف بررسی ساختار میکروسکوپی غده یوروپیجیال در سار انجام شد.

۲.مواد و روش‌ها

برای مطالعه ساختار بافتی غده یوروپیجیال در سار، نمونه‌های بالغ و سالم از فروشگاه پرندگان زینتی خریداری گردید. نمونه برداری از پرندگان، طبق رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات در تحقیقات، انجام گرفت. بدین منظور برای آسان کشی پرندگان از کتامین استفاده شد. سپس غده یوروپیجیال پرندگان جدا شده و جهت تثبیت بافت، نمونه‌ها در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرارگرفتند. از نمونه‌ها پس از تثبیت و آماده سازی بافت‌ها به روش معمول بافت شناسی (آبگیری با الکل، شفاف سازی با زایلین و آغشتگی با پارافین)، قالب‌های پارافینی تهیه و اسلایدهای بافتی به روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین تهیه گردید (Suvarna et al., 2018).

در اسلایدهای رنگ آمیزی شده ساختار میکروسکوپی بافت غده یوروپیجیال با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد. از نمونه‌ها با استفاده از دوربین دیجیتالی متصل به میکروسکوپ، تصاویر مربوطه تهیه شد.

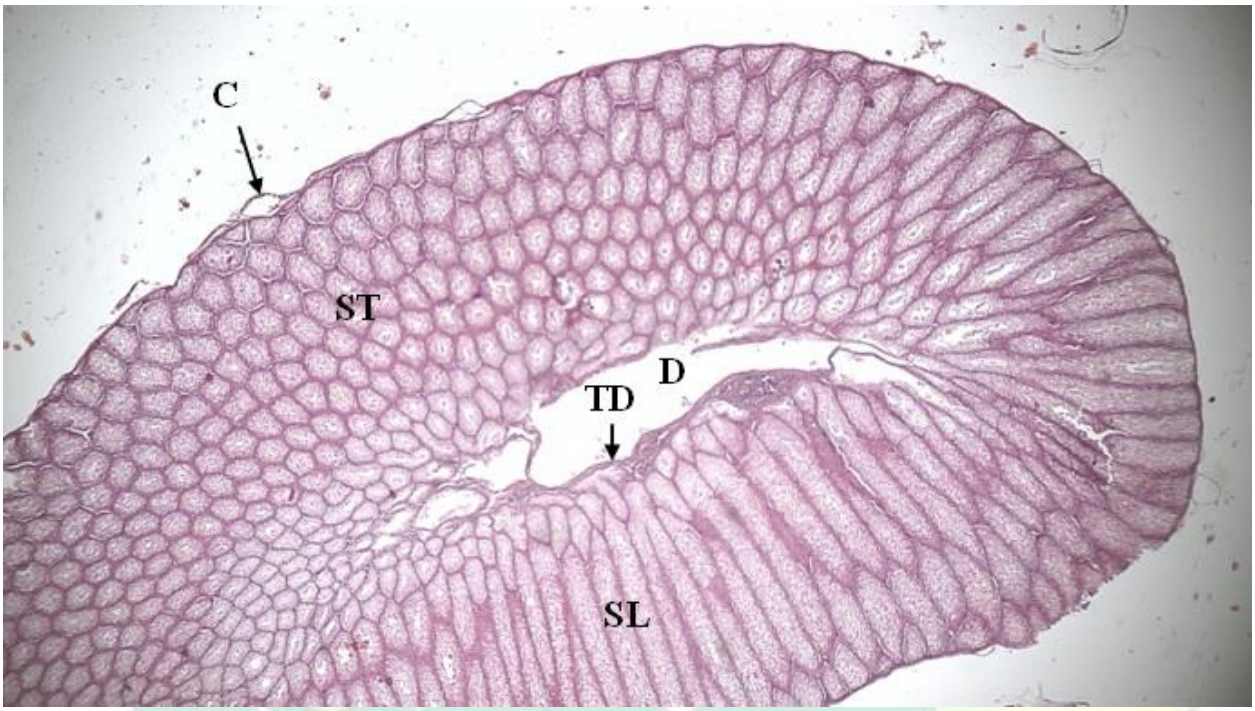
۳. نتایج و بحث

بررسی اسلایدهای تهیه شده از بافت غده یوروپیجیال در سار نشان داد که کپسولی از بافت همبند سخت غده را احاطه می‌کرد. از کپسول انشعابات بافت همبندی به صورت ترابکول‌هایی در پارانشیم غده و بین لوله‌های ترشحی نفوذ کرده بود (شکل‌های ۱ الی ۳) و این حالت در غده پرین پرندگان دیگری مانند مرغان گوشتی و بومی، غاز، اردک و کشیم کلاهدار نیز مشاهده شده است (مبینی و ضیائی، ۱۳۸۹- Chiale et al., 2020- Hassanin et al., 2021-Shafiian and Mobini, 2014). در سار در ادامه ترابکول‌های بین لوله‌های ترشحی، ترابکول‌های همبندی در سطح لوله‌ها و در مجرای مرکزی غده نیز ادامه داشت (شکل‌های ۱ و ۲). وجود سلول‌های عضلانی صاف در کپسول این غده در مرغان گوشتی و بومی و اردک گزارش شده است (مبینی و ضیائی، ۱۳۸۹- Hassanin et al., 2021).

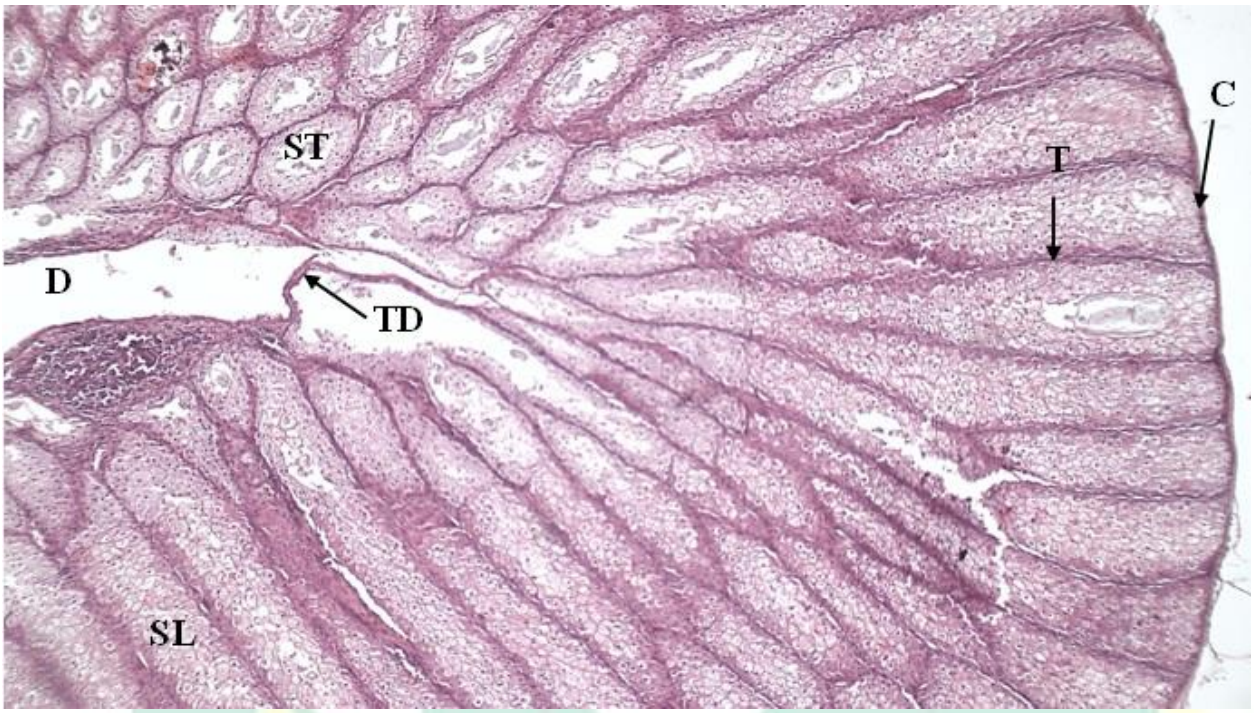
در پارانشیم غده لوله‌های ترشحی به صورت شعاعی در اطراف مجرای مرکزی قرار داشتند (شکل‌های ۱ و ۲). بر خلاف آن در طوطی راهب واحدهای ترشحی منشعب و پیچیده بودند (Carril et al., 2020). به نظر می‌رسد که در غده پرین، وجود غدد مستقیم یا با حداقل انشعاب، در پرندگانی که نیاز به دسترسی فوری به ترشحات این غده را دارند، قابل توجیه است (Chiale et al., 2014) و وجود پیچ خوردگی در غدد سبب محدود شدن سرعت خروج ترشحات غده می‌گردد.

سلول‌های پوششی لوله‌های ترشحی در چهار لایه قرار داشتند. در پرندگان دیگری مانند مرغان گوشتی و بومی، غاز، طوطی راهب و چنگر نوک سرخ نیز سلولهای پوششی لوله‌های ترشحی در چهار لایه گزارش شده اند که از قاعده به سمت سطح شامل لایه‌های زایگر یا قاعده ای، بینابینی، ترشحی و دژنراتیو می شوند (مبینی و ضیائی، ۱۳۸۹- Shafiian and Mobini, 2014 -et

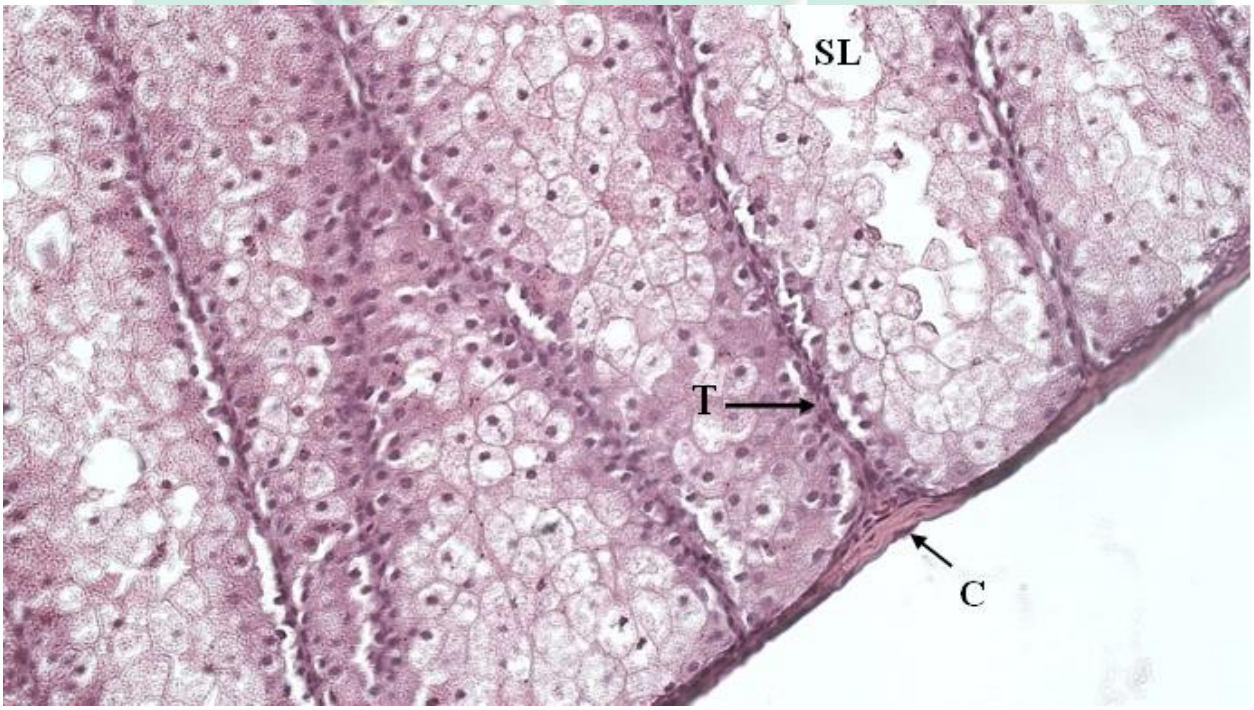
Carril et al., 2020 -Sawad al., 2006). در لایه زایگر سلول‌ها از مسطح تا مکعبی کوتاه و در سایر لایه‌ها از نوع چند وجهی بودند (شکل‌های ۳ و ۴).



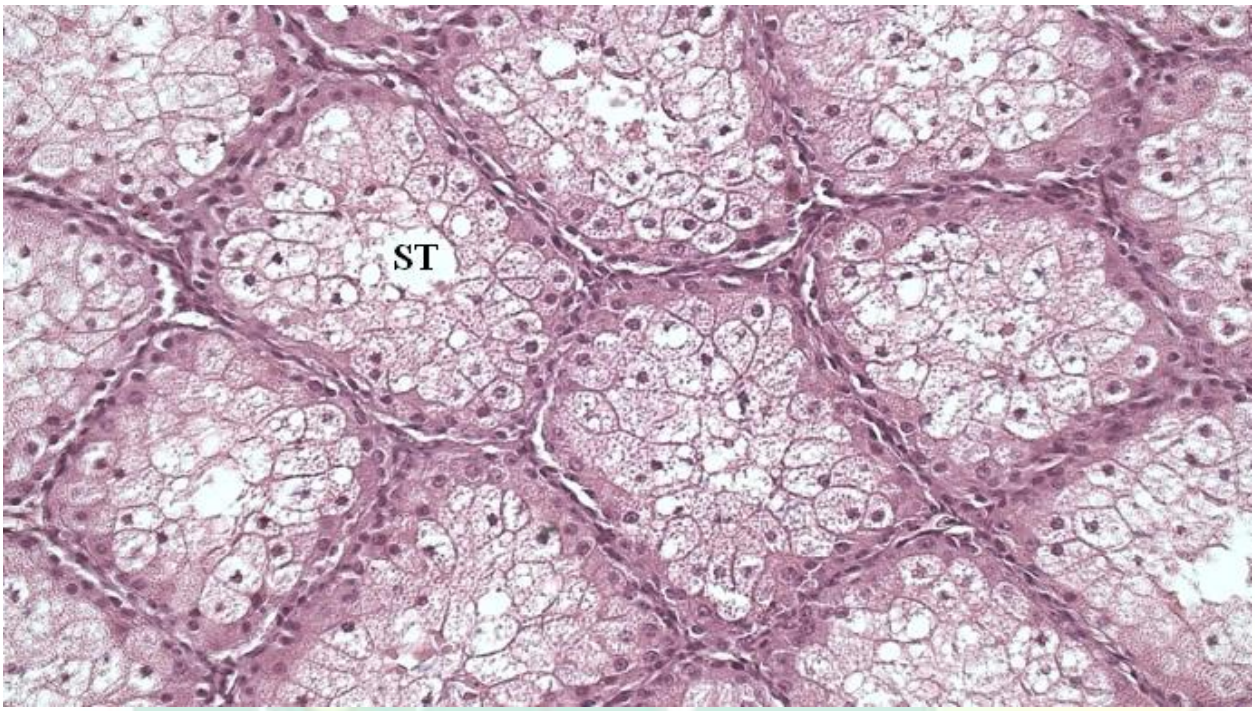
شکل ۱: مقطع بافت غده یوروپیجیال سار: D: مجرای مرکزی، C: کپسول، SL: لوله‌های ترشحی به شکل طولی، ST: لوله‌های ترشحی به شکل عرضی، TD: بافت همبندی در سطح لوله‌های ترشحی و در مجرای مرکزی (H-E; 40X)



شکل ۲: مقطع بافت غده یوروپیجیال سار: D: مجرای مرکزی، C: کپسول، SL: لوله ترشحی به شکل طولی، ST: لوله ترشحی به شکل عرضی، T: ترابکول همبندی در بین لوله‌های ترسحی، TD: بافت همبندی در سطح لوله‌های ترشحی و در مجرای مرکزی (H-E; 100X)



شکل ۳: مقطع بافت غده یوروپیجیال سار: C: کپسول، SL: لوله ترشحی به شکل طولی، T: ترابکول همبندی در بین لوله‌های ترشحی (H-E; 400X)



شکل ۴: مقطع بافت غده یوروپیجیال سار: ST: لوله ترشحی به شکل عرضی (H-E; 400X)

۴. نتیجه‌گیری

بررسی اسلایدهای تهیه شده از بافت غده یوروپیجیال در سار نشان داد که خصوصیات کلی ساختار آن مشابه با غالب گونه‌های پرندگان بوده و با برخی از پرندگان تفاوت های جزئی نیز مشاهده شد.

منابع

۱- **پوستی، الف.، ادیب مرادی، م. و فضیلی، ا. ۱۳۹۵.** بافت شناسی مقایسه ای. چاپ دهم، انتشارات دانشگاه تهران.

۲- **مبینی ب و ضیائی ا. ۱۳۸۹.** بررسی مقایسه ای بافت شناسی غده پرین مرغان گوشتی و بومی. پژوهشنامه دامپزشکی، شماره ۲، ص: ۱۲۱-۱۲۸

3- **Carril, J., Chiale, M.C. and Barbeito, C.G. 2020.** The uropygial gland of the monk parakeet Myiopsitta monachus: Histology, morphogenesis, and evolution within Psittaciformes (Aves). Evolution & development, 22(3): 269-282.

4- **Chiale, M.C., Carril, J., Montalti, D. and Barbeito, C.G. 2020.** Comparative morphology and histochemistry of the uropygial gland of the endangered and endemic Hooded Grebe (Podiceps gallardoi, Podicipediformes). Acta Zoologica.

5- **Chiale, M.C., Fernández, P.E., Gimeno, E.J., Barbeito, C. and Montalti, D. 2014.** Morphology and histology of the uropygial gland in Antarctic birds: relationship with their contact with the aquatic environment?. Australian Journal of Zoology, 62(2): 157-165.

6- **Eurell JA, Frappier BL. 2006.** Dellmann's textbook of veterinary histology. Iowa, USA: Ames, P: 208-210.

7- **Hassanin, A., Shoeib, M. and Massoud, D.** 2021. Micro-and macroanatomical features of the uropygial gland of duck (Anas platyrhynchos) and pigeon (Columba livia). Biotechnic & Histochemistry, 96(3):.213-222.

8- **Linz, G.M., Homan, H.J., Gaulker, S.M., Penry, L.B., and Bleier, W.J. 2007.** European starlings: A review of an invasive species with farreaching impacts. In Managing vertebrate invasive species: Proceedings of an International Symposium, 378–386).

9-**Sawad, A.A.** (2006) Morphological and histological study of uropygial gland in Moorhen (G. gallinula C. choropus). International Journal of Poultry Science, **5 (10)**: 938-941.

10- **Shafiian, A.H. and Mobini, B. 2014.** Histological and histochemical study on the uropygial gland of the goose (Anser Anser). Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 17(1).

11- **Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD. 2018.** Bancroft's theory and practice of histological techniques. 8th ed. China: Elsevier Health Sciences;

A review on the effect of omega-3 fatty acids on health and prevention of cardiovascular diseases and cancer

Sajad Tajeddini[1 *]; Mehdi Taati Keley[2]; Mehran Habibi-Rezaei [2]; Fatemeh Eshari[2]

1- School of Chemical Engineering, College of Engineering, University of Tehran
2- School of Biology, College of Science, University of Tehran

*Corresponding Author Email address: sajadtajedini@ut.ac.ir

Abstract

Omega-3 fatty acids, especially eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) are essential fatty acids that play an important role in human health. Reduction of the blood cholesterol level, prevention from cardiovascular diseases, brain cells growth, boosting of the immune system, and reducing the chance of cancer affliction are benefits of these fatty acids. Omega-3 acids are made in the body, but in most cases, they are not enough and must be supplied from the diet. Omega-3 fatty acids are essential for people in society, especially those who are in stressful situations or depression. Also, this product is one of the few recommended supplements by the FDA.

Keywords: Fatty acids, Eicosapentaenoic acid, Cancer, Docosahexaenoic acid, cardiovascular diseases

مروری بر تاثیر اسیدهای چرب امگا۳ درتامین سلامت و پیشگیری از بیماری های قلب و عروقی و سرطان

سجاد تاجدینی[1*]؛ مهدی طاعتی کلی [2]؛ مهران حبیبی رضائی[2]؛ فاطمه اشعاری[2]

۱- دانشکده مهندسی شیمی، دانشکدگان فنی، دانشگاه تهران

۲- دانشکده زیست، دانشکدگان علوم، دانشگاه تهران

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات :sajadtajedini@ut.ac.ir

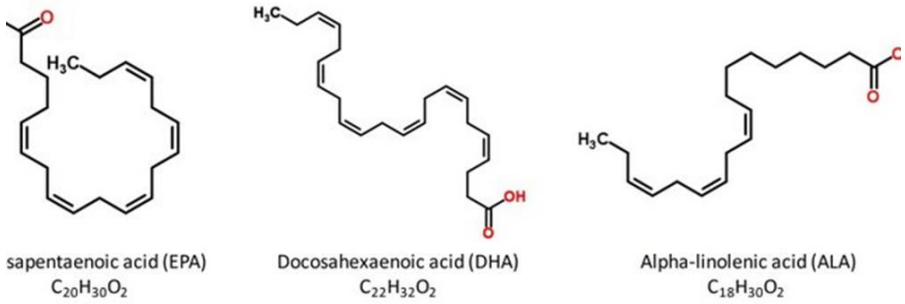
چکیده

اسیدهای چرب امگا ۳ به ویژه ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) و دکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) از اسیدهای چرب ضروری هستند که نقش مهمی در سلامت انسان دارند. کاهش کلسترول خون، پیشگیری از بیماریهای قلبی -عروقی، رشد سلولهای مغز، تقویت سیستم ایمنی بدن و کاهش ابتلا به سرطان از جمله فواید این اسیدهای چرب هستند اسیدهای امگا ۳ در بدن ساخته می شوند اما در بیشتر موارد مقدار آن ها به حد کافی نبوده و می باید از رژیم غذایی تامین شود مصرف امگا ۳ برای آحاد جامعه و به ویژه افرادی که در شرایط و یا افسردگی هستند بسیار ضروری بوده و یکی از چند مکمل دارویی می باشد که مصرف آن توسط سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) توصیه شده است.

واژگان کلیدی: اسیدهای چرب، ایکوزاپنتانوئیک اسید، سرطان، دکوزاهگزانوئیک اسید، بیماری های قلب و عروقی

۱.مقدمه

اسید چرب امگا ۳ خانواده‌ای از اسیدهای چرب اشباع نشده هستند که دارای زنجیره کربنی خطی (۱۸ تا ۲۲ کربن) منتهی به گروه کربوکسیلیک بوده و دارای ۳ تا ۶ پیوند دوگانه می باشند که اولین پیوند دوگانه آن‌ها از پایانه غیر کربونیل روی سومین کربن در زنجیره کربنی قرار گرفته‌است. (Su et al., 2003) . رژیم غذایی انسان ها عمدتاً غنی از اسیدهای چرب امگا ۶ است، که به¬طور عمده از روغن‌های گیاهی غنی از لینولئیک اسید (LA, C18:2n-6) تهیه می‌شود. ولی، در بدن انسان آنزیم‌های ضروری برای تبدیل اسیدهای چرب امگا ۶ به اسیدهای چرب امگا ۳ به اندازه کافی وجود ندارد اگرچه اسیدهای چرب امگا ۳ برای تنظیم فعالیت‌های انسان ضروری هستند با این حال در انسان ساخته نمی‌شوند و انواع امگا ۳ باید از منابع غذایی مناسب تامین شود (Dunstan et al., 2007). منبع اصلی تامین امگا ۳، بعنوان اسیدهای چرب ضروری (اسیدهای چربی که در بدن سنتز نمی شوند) عمدتاً منابع دریایی به ویژه ماهیان می باشند. روغن ماهی منبع غنی از اسیدهای چرب بس غیراشباع بلند زنجیره می باشد که نقش آن در سلامت انسان، تغذیه و همچنین رشد به خوبی شناخته شده و علاوه بر توسعه بازار آن، سبب گسترش روش‌های استخراج روغن ماهی و به تبع آن تخلیص امگا ۳ گشته است. PUFAها در ساختارهای تری گلیسریدی که تحت عنوان تری آسیل گلیسرول (TAG) نامیده می شوند قرار گرفته و سطوح آنها به عنوان شاخص اصلی کیفیت، در روغن ماهی بسته به نوع گونه بین ۱۰ تا ۲۵ درصد می باشد (Haq et al., 2018). مهم ترین اسید های چرب امگا ۳ عبارت‌اند از: ایکوزا پنتانوئیک اسید (EPA) و دوکوزاهگزائنوئیک ا سید (DHA) آلفا-لینولنیک اسید(ALA) (Swanson et al., 2012).



شکل ۱: ساختار اسیدهای چرب EPA و DHA و ALA

آلفا-لینولنیک اسید در گردو، دانه‌های چیا، برخی از انواع لوبیا، سبزیجات و در روغن سویا و... یافت می‌شود(Ayerza, 2009). دو اسید چرب دیگر، یعنی ایکوزا پنتانوئیک اسید (EPA) و دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) در روغن ماهی‌هایی همچون سالمون، تن، کیلکا و ... وجود دارد(Wanasundara et al., 2002).

این اسیدهای چرب می توانند در بروز بسیاری از بیماری ها که به صورت معمول وجود دارند، نقش پیشگیرانه ایفا نمایند. از میان اسیدهای چرب امگا ۳ EPAو DHA (جدول ۱) به دلیل اثر بخشی متمایز، اهمیت بسیار بالاتری داشته و دارای ارزش دارویی و پیشگیرانه بالایی برای بیماری های گوناگون است .

تحقیقات بسیار زیادی اثرات مثبت اسیدهای چرب امگا ۳ را بر بیماری های قلبی و عروقی، التهابات شدید مانند آسم، پسوریازیس، بیماری های روانی، جلوگیری از چندین نوع از انواع سرطان، بیماری های روده، پیشگیری از ابتلا به کبد چرب و کاستن از بروز عوارض بیماری آلزایمر و ... گزارش کرده اند (Handelsman & Shapiro, 2017). همچنین، نتایج پژوهش های کلینیکی و اپیدمیولوژیکی پیشنهاد می کنند که EPA و DHA که تنها در ماهی و غذاهای دریایی وجود دارند، تاثیرات بسیار زیادی در جلوگیری از بیماری های قلبی عروقی انسان دارند (Hu et al., 2019a; Maki & Dicklin, 2018)

جدول 1: انواع اسیدهای چرب

نام اسید چرب	نام تجاری	نام شیمیایی
اسیدهای چرب امگا ۳		
۱۶:۳ (n-3)		all-cis 7,10,13-hexadecatrienoic acid
۱۸:۳ (n-3)	آلفالینولنیک اسید (ALA)	all-cis-9,12,15-octadecatrienoic acid
۱۸:۴ (n-3)	استئاریدونیک اسید (STD)	all-cis-6,9,12,15,-octadecatetraenoic acid
۲۰:۳ (n-3)	ایکوزاترینوئیک اسید (ETE)	all-cis-11,14,17-eicosatrienoic acid
۲۰:۴ (n-3)	ایکوزاتترانوئیک اسید (ETA)	all-cis-8,11,14,17-eicosatetraenoic acid
۲۰:۵ (n-3)	ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA)	all-cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid
۲۲:۵ (n-3)	دکوزاپنتانوئیک اسید (DPA, Clupanodonic acid)	all-cis-7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid
۲۲:۶ (n-3)	دکوزاهگزانوئیک اسید (DHA)	all-cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid

۲۴:۵ (n-3)	تتراکوزاپنتانوئیک اسید	all-cis-9,12,15,18,21-tetracosapentaenoic acid
۲۴:۶ (n-3)	تتراکوزاهگزانوئیک اسید (Nisinic acid)	all-cis-6,9,12,15,18,21-tetracosahexaenoic acid
اسیدهای چرب امگا ۶		
۱۸:۲ (n-6)	لینولئیک اسید	all-cis-9,12-octadecadienoic acid
۱۸:۳ (n-6)	گاما-لینولنیک اسید (GLA)	all-cis-6,9,12-octadecatrienoic acid
۲۰:۲ (n-6)	ایکوزادینوئیک اسید	all-cis-11,14-eicosadienoic acid
۲۰:۳ (n-6)	دیومو-گاما-لینولنیک اسید (DGLA)	all-cis-8,11,14-eicosatrienoic acid
۲۰:۴ (n-6)	آراشیدونیک اسید (AA)	all-cis-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid
۲۲:۲ (n-6)	دکوزادینوئیک اسید	all-cis-13,16-docosadienoic acid
۲۲:۴ (n-6)	آدرنیک اسید	all-cis-7,10,13,16-docosatetraenoic acid
۲۲:۵ (n-6)	دکوزاپنتانوئیک اسید (Osbond acid)	all-cis-4,7,10,13,16-docosapentaenoic acid
اسیدهای چرب امگا ۹		
۱۸:۱ (n-9)	اولوئیک اسید	cis-9-octadecenoic acid
۱۸:۱ (n-9)	ایکوزنوئیک اسید	cis-11-eicosenoic acid
۱۸:۱ (n-9)	مید اسید	all-cis-5,8,11-eicosatrienoic acid
۱۸:۱ (n-9)	اروسیک اسید	cis-13-docosenoic acid
۱۸:۱ (n-9)	اسید نرونیک	cis-15-tetracosenoic acid

بر اساس گزارش مشترک سازمان بهداشت جهانی (WHO) و نیز سازمان خواروبار جهانی(FAO)، میزان ۲-۱ درصد انرژی مورد نیاز بدن در روز باید توسط EPA و DHA تامین گردد (WHO/FAO, 2003). همچنین، ناتو (NATO) مصرف ۴۰۰-۳۰۰ میلی گرم از EPA+DHA را در روز توصیه می نماید (Simopoulous, 1989).

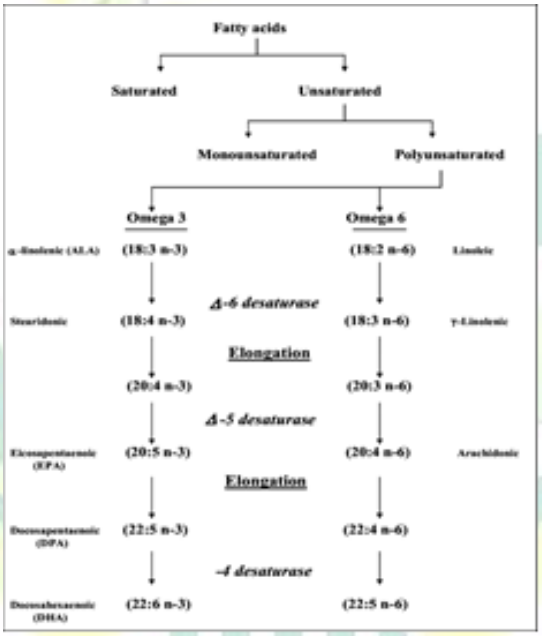
یکی از مواردی که سبب کاهش انواع تنش های روانی و فیزیولوژیک در نیروهای نظامی می گردد مصرف اسیدهای چرب امگا ۳ است. بر اساس مطالعاتی که غالباً در آمریکا بعد از سال ۲۰۰۸ و توسط وزارت دفاع و سازمان های بهداشتی زیرمجموعه ارتش این کشور صورت پذیرفته است، نشان داده شد که امگا ۳ (اسیدهای چرب EPA و DHA) از مکمل های بسیار مهم دارویی و غذایی است که علاوه بر پیشگیری از ابتلا به بیماری های مختلف بویژه بیماری های استرس اکسیداتیو ، از تاثیرات بسیار مثبت بر عملکرد فیزیکی و روانشناختی نیروهای نظامی (Baker, 2017)، بهبود رفتاری در مصدومان جنگی، کاهش افسردگی در سربازان وظیفه (Barringer et al., 2016)، تاثیر مثبت بر ویژگی های روان شناختی و رفتاری سربازان استخدام شده در ارتش آمریکا (Dretsch et al., 2014)، کاهش افسردگی، خودکشی و رفتارهای تهاجمی و پرخاشگرانه نیروهای نظامی (Hibbeln & Gow, 2014)، کاهش اختلالات رفتاری سربازان و نیز کاهش میزان خودکشی نظامیان (Lewis et al., 2011) ، برخوردار است.

۲.ساختار شیمیائی اسید های چرب های امگا ۳

اهمیت عمده‌ی PUFAها به لحاظ بیولوژیکی به اسیدهای چرب امگا ۶ و امگا ۳ مرتبط می‌باشد. اسیدهای چرب غیراشباع بر اساس موقعیت پیوند دوگانه نسبت به انتهای متیل و یا کربوکسیل نامگذاری می‌شوند. در نامگذاری "امگا" یا "n-" ، پیوند

دوگانه از انتهای متیل زنجیره کربن شمارش می‌شود. در اسیدهای چرب امگا ۳، نخستین پیوند دوگانه در سومین اتم کربن بعد از انتهای متیل قرار گرفته است (Sahena et al., 2009). ساختار شیمیایی اسیدهای چرب EPA و DHA در شکل ۱ نشان داده شده است. بر اساس موقعیت قرارگیری پیوند دوگانه نوع سیس غیر مزدوج، زنجیره کربن دارای خمیدگی در جایگاه پیوند دوگانه بوده و مولکول چند شکستگی را نشان می دهد. بر اساس برخی نظریات، این اسیدهای چرب در فیتوپلانکتون‌ها و اسیدهای چرب سنتز شده و به واسطه‌ی تغذیه ماهی از این موجودات، در بدن آنها تجمع می‌یابد.

آلفالینولنیک اسید[۳۵۷] (ALA: $3\Delta^{9,12,15}$) و آلفالینولئیک اسید[۳۵۸] (LA: $2\Delta^{9,12}$) به ترتیب نخستین عضو خانواده اسیدهای چرب امگا ۳ و امگا ۶ می‌باشند که به اسیدهای چرب بلند زنجیره‌ی دیگری از طریق طویل شدن و یا غیر اشباع شدن به EPA و DHA تبدیل می‌شوند (Sahena et al., 2009). EPA و DHA در ساختار تری‌گلیسریدها و فسفولیپیدهای ماهی حضور دارند. آلفالینولنیک اسید شکل ۲ مسیر سنتز اسیدهای چرب امگا ۳ و امگا ۶ را نشان می دهد.



شکل 2: مسیر متابولیک سنتز اسیدهای چرب امگا ۳ و امگا ۶

۳.اسید های چرب امگا ۳ در سلامت انسان

PUFAهای امگا ۳ ویژگی‌های ساختاری و عملکردی زیادی در بدن داشته و در تامین و نیز ساختار و عملکرد بخش های وسیعی از ترکیبات زیستی از جمله فسفولیپیدهای غشا دخالت دارند. این اسیدهای چرب در ساخت، پویایی، تراوایی غشا و کنترل فرآیندهای مرتبط با آن نقش دارند. همچنین، امگا ۳ در تنظیم پروتئین‌های غشائی مانند پروتئین‌های ترابری[۳۵۹]، ATPase و کمپلکس‌های تطابق پذیری[۳۶۰] موثر است. علاوه‌بر این، اسیدهای چرب امگا ۳ بیان برخی از ژن‌ها مانندا‌سید چرب سنتاز [۳۶۱]،

357. α-linolenic acid
358. linoleic acid
359. transporters
360. compatibility complex
361. Fatty-acid-synthase

نیتریک اسید سنتاز[۳۶۲] و پروتئین‌های کانال سدیم را تنظیم می‌کنند(Gerling et al., 2019). بنابراین، این گروه از اسیدهای چرب دارای تاثیرات مهمی بر فعالیت‌های بیوشیمیایی سلولی، فرآیندهای انتقالی سلول و نیز پاسخ آن‌ها به محرک‌ها می‌باشند. همچنین، امگا ۳ در برخی فرآیندهای فیزیولوژیک مانند پاسخ‌های ایمنی و سازگاری با سرما نیز دخیل است (Gutiérrez et al., 2019). در انسان، اهمیت متابولیسم PUFAها و عملکرد ایکوزانوئیدها پس از آن که کشف گردید اسید آراشیدونیک پیش‌سازی برای پروستاگلاندین‌ها[۳۶۳] (PG) هاست، جلوه بیشتری یافت. ایکوزانوئیدها گروه‌های مشتق هورمونی مانند پروستاگلاندین‌ها، ترومبوکسان‌ها (TX) و لوکوترین‌ها (LT) هستند که بوسیله اکسیداسیون آنزیمی و یا غیرآنزیمی اسیدهای چرب غیراشباع که دارای ۲۰ کربن می‌باشند ساخته می‌شوند ترومبوکسان‌ها در تنظیم تشکیل لخته خون دخالت دارند(Sahena et al., 2009).

در حال حاضر اتفاق نظر وجود دارد که PUFAها باید حداقل ۳ درصد و ترجیحاً ۱۰ تا ۲۰ درصد از کل مصرف چربی انسان را تشکیل دهند و نسبت اسیدهای چرب امگا ۶ به امگا ۳ در حالت ایده آل ۱:۴ یا ۱:۵ باشد (Jump et al., 2018). اهمیت تعادل در جذب PUFAهای جذب شده و تاثیر آن‌ها بر سلامتی انسان از دو دهه اخیر در جهان شناخته شده است. در سال ۱۹۷۰ نخستین دانشمندان مطالعاتی را در منطقه گرینلند انجام داده و علت عدم ابتلای اسکیموها به بیماری‌های قلبی را (علیرغم مصرف بالای چربی و روغن) به روغن ماهی نسبت دادند و مصرف آن را برای سلامتی انسان مفید دانستند. تقریباً ۱۰ سال پس از آن و در سال ۱۹۷۹ ثابت شد که علت این امر وجود اسیدهای چرب امگا ۳ (ω-3) به ویژهEPA و DHAدر روغن ماهی بوده که تاثیرات مثبت و بسیاری بر سلامتی انسان دارد (Ruxton et al., 2005). اهمیت استفاده از امگا ۳ به‌ویژه در مطالعاتی که از سال ۲۰۰۰ به بعد انجام شده‌اند مورد تاکید و توجه قرار گرفته است (Rubio-Rodríguez et al., 2012). تحقیقات بسیار زیادی تاثیرات مثبت اسیدهای چرب امگا ۳ را بر بیماری‌های قلبی و عروقی به ویژه تصلب شرایین[۳۶۴] (Hu et al., 2019b; Ruxton et al., 2005; Siscovick et al., 2017a)، روماتیسم[۳۶۵] (Maki & Dicklin, 2018)، التهابات شدید مانند آسم (Reisman et al., 2006; Stoodley et al., 2019) ، پسوریازیس (بیماری پوستی مزمن ناشی از خود ایمنی) (Balić et al., 2020; Freitas do Nascimento Junior & Avelino da Silva, 2018; Zulfakar et al., 2007)، بیماری‌های روانی (Balić et al., 2020; Natacci et al., 2018; Ross et al., 2007; Wani et al., 2015)، جلوگیری از چندین نوع از انواع سرطان (Black, 2017; Fabian et al., 2015; Freitas & Campos, 2019)، بیماری‌های روده (Song et al., 2019; Turner et al., 2009)، پیشگیری از ابتلا به بیماری های استرس اکسیداتیو از جمله کبد چرب غیر الکلی [۳۶۶] (NAFLD) (Ruxton et al., 2005; Yan et al., 2018) و بیماری آلزایمر[۳۶۷] (AD) (Belkouch et al., 2016) و ... گزارش کرده‌اند.

۱-۳- اسیدهای چرب امگا ۳ و بیماری‌های قلبی عروقی

بیماری قلبی‌عروقی[۳۶۸] (CVD) اصطلاحی است که برای تمام بیماری‌هایی به‌کار می‌رود که بر قلب و سیستم گردش خون اثر می‌گذارد، از جمله آن‌ها بیماری قلبی ایسکمیک[۳۶۹]، بیماری قلبی میوکارد غیرایسکمیک[۳۷۰]، بیماری فشار خون بالا و بیماری دریچه قلبی[۳۷۱] را می‌توان نام برد (Manson et al., 2019). این بیماری‌ها عامل بیش از ۱۷ درصد از مرگ و میر های ناشیی از

362. Nitric-oxide synthase
363. Prostaglandins
364. Athrosclerosis
365. Rheumatoid arthritis
366. Non- alcoholic fatty liver disease
367 Alzheimer’s disease
368 Cardiovascular disease
369. Ischemic heart disease
370. Nonischemic myocardial heart disease
371. Valvular heart disease

بیماری در جهان و بویژه در جوامع غربی هستند که دلیل بروز آن‌ها را مصرف بالای چربی و سایر عوامل خطر برای بیماری‌های قلبی عروقی مانند دیابت شیرین، استعمال دخانیات، استرس، کمبود فعالیت بدنی، مصرف سدیم زیاد و استعداد ژنتیکی می‌دانند (Aung et al., 2018). نشانه مهم بیماری‌های قلبی‌عروقی عبارتست از اختلال در عملکرد قلب که در اکثر موارد بر اثر فشار خون بالا (به دلیل باریک شدن شریان‌های بزرگ با پلاک‌های آتروماتوز[۳۷۲]) یا انسداد کامل شریان‌های عروقی (ترومبوز[۳۷۳]) بر اثر انسداد آتروماتوز ایجاد می‌شود، که منجر به نکروزه شدن بافت میوکارد می‌گردد. هر دو شرایط، موجب کاهش توانایی قلب در پمپ کردن خون در اختلالات حاد و مزمن قلبی می‌شود (WHO/FAO, 2003).

در حال حاضر، مشخص شده است که مصرف منظم ماهی‌های چرب یا روغن ماهی حاوی اسیدهای چرب بلند زنجیره امگا ۳ میزان وقوع بیماری و مرگ بر اثر بیماری‌های قلبی عروقی را کاهش می‌دهد (Siscovick et al., 2017b). احتمالاً چند فاکتور در این زمینه موثر هستند که در مجموع موجب افزایش تغییرات در ضربان قلب[۳۷۴]، کاهش توسعه آتروما[۳۷۵] و کاهش واکنش و یا تجمع پلاکت‌ها[۳۷۶] می‌شوند (Mach et al., 2019). تحقیقات صورت پذیرفته روی بررسی ارتباط بین روغن ماهی و بیماری‌های قلبی-عروقی هم در مدل‌های حیوانی و هم انسانی نشان می‌دهند که این تاثیر می‌تواند از طریق رقابت سوبسترا بین اسیدهای چرب امگا ۳ و اسید آراشیدونیک (AA, 20:4n-6) برای آنزیم‌های سیکلواکسیژناز[۳۷۷] (COX) باشد که پروستاگلاندین ها و ترومبوکسان‌ها[۳۷۸] را تولید می‌کنند (Dinicolantonio et al., 2014). رقابت بین اسیدهای چرب امگا ۳ و AA می‌تواند منجر به تاثیرات مثبت بر سلامتی انسان شود، که سه دلیل آن عبارتند از:

۱) اسیدهای چرب امگا ۳ مانع تولید اسید آراشیدونیک از طریق رقابت سوبسترا برای Δ^6 غیر شباع ساز[۳۷۹] می‌شوند. عملکرد این آنزیم برای غیراشباع‌سازی، طویل‌سازی و بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع بلند زنجیره کلیدی است.

۲) اسیدهای چرب بلند زنجیره امگا ۳ برای وارد شدن به موقعیت sn-2 تری‌آسیل‌گلیسرول‌های فسفولیپید غشا، از طریق کاهش سطوح AA غشا با آن رقابت می‌کنند.

۳) ترکیبات بیست کربنه [۳۸۰] تولید شده از EPA دارای اثرات ضدالتهابی و ضد تجمعی [۳۸۱] هستند(Innes & Calder, 2020).

برای مثال افزایش نسبت EPA/AA در غشای سلولی موجب تغییر جهت تولید ایکوزانوئید از ایکوزانوئیدهای دارای قابلیت انباشتگی پروستاگلاندین [382]$_2$ I_2 (PGI_2) و ترومبوکسان [383]A_2 (TXA_2) به سمت ایکوزانوئیدهای ضد تجمع ترومبوکسان [۳۸۴] A_3(TXA_3) در پلاکت‌ها و پروستاگلاندین [385] I PGI_3 [386] (PGI_3) در سلول‌های اندوتلیال می‌شود (Manson et al., 2019). این فعالیت‌ها منجر به باز شدن بیشتر شریان‌ها و کاهش تجمع پلاکتی می‌شود که هر دو مورد باعث اثرات آنتی ترومبوتیک[۳۸۷] (ضد لختگی) می‌گردند (Innes & Calder, 2020). از سوی دیگر، اسیدهای چرب امگا ۳ دارای خصوصیات بالقوه ضد آریتمی

372. Atheromatous
373. Thrombus
374. Antiarrhythmic
375. Antiatherogenic
376. Antithrombotic
377. Cyclooxygenase
378. Prostaglandins and Thromboxanes
379. Δ^6 desaturase
380. Eicosanoids
381. Anti-aggregative
382. Prostaglandin I2 or Prostacyclin
383. Thromboxane A_2
384. Thromboxane A_2
385. Prostaglandin I2 or Prostacyclin
386. Prostaglandin I3
387. Antithrombotic

قلب هستند (Hu et al., 2019). مکانیسم‌های اثرات ضدآریتمی EPA و DHA به واسطه ممانعت از فیبریلاسیون[۳۸۸] بطنی می‌باشد. اسیدهای چرب امگا ۳ قادر هستند که فعالیت کانال‌های یونی خاص را در سارکولمای میوکارد[۳۸۹] تعدیل کنند (Mach et al., 2019).

۲-۳- اسیدهای چرب امگا ۳ و سرطان

سرطان یک واژه عمومی است که برای بیش از ۱۰۰ بیماری به کار می‌رود که ویژگی مهم آنها رشد بدون کنترل و غیرعادی سلول‌ها ، در بافت‌های مختلف است .. مطالعات تجربی و اپیدمیولوژی نشان داده است که ترکیب چربی رژیم غذایی روی بروز و پیشرفت برخی سرطان‌ها اثر می‌گذارد (Freitas & Campos, 2019). مشخص شده است که اسیدهای چرب امگا ۳ دارای اثرات ضدسرطان هستند، درحالی‌که اسیدهای اشباع و امگا ۶ ممکن است موجب توسعه سرطان گردند (Liang et al., 2020).

شواهد اولیه از مطالعات اپیدمیولوژیک نشان دادند که اسیدهای چرب امگا ۳ ممکن است در مقابل سرطان پروستات اثر محافظت‌کننده داشته باشند. مطالعات بین مردم بومی و غیربومی در کانادا، آلاسکا و گرینلند از سال ۱۹۶۹ تا ۱۹۸۸ نشان داد که میزان وقوع سرطان پروستات در بین جمعیت‌های بومی ۷۰ تا ۸۰ درصد کمتر از میزان آن در بین جمعیت‌های غیربومی بود (Liang et al., 2020). این شواهد را به تفاوت در رژیم غذایی بین دو جمعیت به خصوص رژیم غذایی دریایی مردم بومی نسبت می‌دهند که بسیار غنی از اسیدهای چرب امگا ۳ است که دارای اثرات ضدسرطان[۳۹۰] می‌باشند (Liotti et al., 2018). افزایش قابل توجه سطوح اسیدهای چرب اشباع در بافت چربی بدن بیماران سرطانی نشان‌دهنده نقش احتمالی چربی‌های اشباع رژیم غذایی در فرآیندهای نئوپلاستیک می‌باشد، زیرا ترکیب اسیدهای چرب در بافت‌های چربی مشابه چربی‌های غذایی مصرف شده است. کاهش سطوح PUFAهای C20 و C22 بافت پروستات در سرطان پروستات، احتمالاً ناشی از افزایش متابولیسم این اسیدهای چرب بوسیله آنزیم‌های لیپوکسی‌ژناز[۳۹۱] (LOX) و سیکلو اکسیژناز[۳۹۲] (COX)می‌باشد (Schmidt et al., 2020).

مصرف سه وعده یا بیشتر ماهی به‌عنوان غذا در هفته با کاهش خطر سرطان پروستات در مقایسه با مصرف کمتر از دو وعده آن در ماه همراه است. مصرف اسیدهای چرب امگا ۳ از غذاهایی به جز ماهی ارتباطی مشابه ولی ضعیف تر را نشان داد. مصرف روزانه اسید چرب امگا ۳ به‌میزان ۰/۵ گرم درغذای روزانه با ۲۴ درصد کاهش در خطر متاستاز سرطان پروستات همراه است. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اسیدهای چرب امگا ۳ ماهی و سایر منابع غذایی خطر سرطان پروستات را (به‌خصوص در انواع پیشرفته آن) کاهش می‌دهد. این نتایج نشان می‌دهند که مصرف بلندمدت گوشت ماهی و اسیدهای چرب امگا ۳ می‌تواند توسعه سرطان پروستات را کاهش دهد(Augustsson et al., 2003).

مطالعات آزمایشگاهی و اپیدیلوژیک نشان می‌دهد که اسیدهای چرب امگا ۳ دارای اثرات ضد تومور در مراحل آغاز و پس از ابتلا به سرطان روده بزرگ می‌باشند. در جوامع غربی، میزان وقوع سرطان روده بزرگ و مرگ بر اثر آن به‌طور معنی‌داری بیشتر از جوامع آسیایی است که به اعتقاد محققین به دلیل میزان بالای مصرف چربی حیوانی در رژیم غذایی است (Song et al., 2019). نتایج مطالعاتی که اثرات اسیدهای چرب امگا ۳ بر روی تکثیر سلول‌های روده بزرگ (در معرض خطر بالای سرطان روده بزرگ) را بررسی نمودند نشان می‌دهد که اسیدهای چرب امگا ۳ سبب کاهش گسترش سلول‌های سرطانی روده بزرگ در مراحل اولیه می‌گردد، که این امر می‌تواند سرطانی‌شدن پولیپ‌های کولرکتال[۳۹۳] را کاهش داده و از افراد در مقابل خطرابتلا به سرطان روده بزرگ محافظت نماید (Volpato & Hull, 2018). از سوی دیگر، مطالعات نشان می‌دهند که DHA میزان بیان چندین ژن کد

388. Fibrillation
389. Myocardial sarcolemma
390. Anticarcinogenic
391. lipooxygenase
392. Cyclooxygenase
393. Colorectal

کننده فاکتورهای رونویسی، تقویت کننده‌های رونویسی، RNA پلیمرازها، لیپوکسیژنازها، COX-2 و نیتریک اکسید سنتاز القایی[۳۹۴] (iNOS) را کاهش می‌دهد (White et al., 2019). همچنین، تیمارهای حاوی DHA سبب افزایش بیش از دو برابری بیان گیرنده‌های α و γ فعال کننده تکثیر پروکسی زوم[395] (PPAR) شدند. این تغییرات می‌تواند حاکی از نقش DHA در افزایش آپوپتوز سلول Caco-2 از طریق تنظیم چندین فعالیت بیولوژیکی بوده و نشان دهد که DHA ماده شیمیایی موثر در جلوگیری از سرطان روده بزرگ است (Narayanan et al., 2001).

مطالعات اپیدمیولوژیک بسیار کمی اثر اسیدهای چرب امگا ۳ در رژیم غذایی را بر سرطان سینه ارزیابی کرده‌اند. به‌عنوان مثال داده‌های مربوط به بیماران مبتلا به سرطان سینه با متوسط سن ۵۴ نشان داد که مصرف اسیدهای چرب امگا ۳ به‌طور معنی‌داری میزان مرگ بر اثر سرطان سینه را تا ۴۸ درصد کاهش می‌دهد (Maillard et al., 2002). مطالعات متعددی نشان داده‌اند اسیدهای چرب امگا ۳ قادر هستند که سیستم‌های پیام رسان ثانویه و جریان سیگنال رسانی سلولی را در سلول‌های سرطانی سینه تعدیل نمایند. مطالعات گوناگون این فرضیه را تایید می‌کنند که اسیدهای چرب امگا ۳ از طریق تاثیر بر وقایع بیوشیمیایی که پس از آغاز تشکیل تومور رخ می‌دهند، مانع از توسعه سرطان سینه می‌گردند (Kalu et al., 2019).

۴.نتیجه‌گیری

اسیدهای چرب امگا ۳ از اسیدهای چرب ضروری برای بدن انسان هستند که به واسطه عدم سنتز در بدن، باید از طریق مواد خوراکی تامین شوند. مهمترین اسیدهای چرب امگا ۳ EPA و DHA هستند که در محصولات دریایی و مقدار بسیار کم در برخی میکروارگانیسم‌ها وجود دارند. تاثیرات امگا ۳ بر ابعاد مختلف سلامتی مورد مطالعه قرار گرفته و به عنوان عامل پیشگیرانه و درمانی سودمند و مثبت شناخته می‌شود. اسیدهای چرب امگا ۳ با اثرات ضد التهابی ثابت شده، در بیماری‌های قلبی از طریق رقابت با اسید آراشیدونیک برای آنزیم‌های سیکلواکسیژناز، سبب تولید ایکوزانوئیدهایی می‌گردند که با اعمال فرآیندهای فیزیولوژیکی گوناگون موجب افزایش تغییرات در ضربان قلب، کاهش توسعه آتروما و کاهش واکنش و یا تجمع پلاکت‌ها می‌گردند. همچنین، امگا ۳ می‌تواند با کاهش میزان بیان چندین ژن خاص، لیپوکسیژنازها، COX-2 و نیتریک اکسید سنتاز القایی و نیز افزایش بیان گیرنده‌های α و γ فعال کننده تکثیر پروکسی زوم، در جلوگیری از برخی سرطان‌ها تاثیرگذار باشد. در زمینه تاثیرات مثبت اسیدهای چرب بلند زنجیره امگا ۳ بر نظامیان نیز مواردی چون کاهش میزان خستگی، افسردگی، خودکشی، خواب آلودگی روزانه سربازان، حرکات پرخشگرانه و بهبود خلق و خوی نظامیان حاضر در میادین جنگی را می‌توان برشمرد. همانگونه که در ابتدا نیز اشاره گردید، امگا ۳ یکی از معدود مکمل‌هایی است که توسط FDA مصرف آن به صورت روزانه توصیه گشته است. لذا، مصرف این نوع مکمل به میزان یک عدد کپسول با حداقل ۳۰ درصد (EPA+DHA) ماده موثره در روز در صورت عدم مصرف ۲ وعده ماهی در هفته مناسب می‌باشد.

منابع

12. Augustsson, K., Michaud, D. S., Rimm, E. B., Leitzmann, M. F., Stampfer, M. J., Willett, W. C., & Giovannucci, E. (2003). A prospective study of intake of fish and marine fatty acids and prostate cancer. Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention, 12(1), 64–67 .
https://wwww.unboundmedicine.com/medline/citation/12540506/A_prospective_study_of_intake_of_fish_and_marine_fatty_acids_and_prostate_cancer_

394. inducible Nitric Oxide Synthase
395. Peroxisome proliferator–activated receptors

13. Aung, T., Halsey, J., Kromhout, D., Gerstein, H. C., Marchioli, R., Tavazzi, L., Geleijnse, J. M., Rauch, B., Ness, A., Galan, P., Chew, E. Y., Bosch, J., Collins, R., Lewington, S., Armitage, J., & Clarke, R. (2018). Associations of Omega-3 Fatty Acid Supplement Use With Cardiovascular Disease Risks: Meta-analysis of 10 Trials Involving 77 917 Individuals. JAMA Cardiology, 3(3), 14. https://doi.org/10.1001/JAMACARDIO.2017.5205

14. Ayerza, R. (2009). The seed's protein and oil content, fatty acid composition, and growing cycle length of a single genotype of chia (Salvia hispanica L.) as affected by environmental factors. Journal of Oleo Science, 58(7), 347–554. https://doi.org/10.5650/JOS.58.347

15. Baker, B. (2017). Military Effectiveness of Five Dietary Supplements Purported to Aid Cognitive and Physical Performance. 25(2).

16. Balić, A., Vlašić, D., Žužul, K., Marinović, B., & Mokos, Z. B. (2020). Omega-3 Versus Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids in the Prevention and Treatment of Inflammatory Skin Diseases. International Journal of Molecular Sciences, 21(3). https://doi.org/10.3390/IJMS21030741

17. Barringer, N. D., Kotwal, R. S., Lewis, M. D., Funderburk, L. K., Elliott, T. R., Crouse, S. F., Smith, S. B., Greenwood, M., & Kreider, R. B. (2016). Fatty acid blood levels, vitamin d status, physical performance, activity, and resiliency: A novel potential screening tool for depressed mood in active duty soldiers. Military Medicine, 181(9), 1114–1120. https://doi.org/10.7205/MILMED-D-15-00456

18. Belkouch, M., Hachem, M., Elgot, A., Van, A. lo, Picq, M., Guichardant, M., Lagarde, M., & Bernoud-Hubac, N. (2016). The pleiotropic effects of omega-3 docosahexaenoic acid on the hallmarks of Alzheimer's disease. The Journal of Nutritional Biochemistry, 38, 1–11. https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2016.03.002

19. Black, H. S. (2017). Omega-3 Fatty Acids and Cancer Prevention. Journal of Brain Tumors & Neurooncology, 06(01). https://doi.org/10.4172/2475-3203.1000E112

20. Dinicolantonio, J. J., McCarty, M. F., Chatterjee, S., Lavie, C. J., & Okeefe, J. H. (2014). A higher dietary ratio of long-chain omega-3 to total omega-6 fatty acids for prevention of COX-2-dependent adenocarcinomas. Nutrition and Cancer, 66(8), 1279–1284. https://doi.org/10.1080/01635581.2014.956262

21. Dretsch, M. N., Johnston, D., Bradley, R. S., MacRae, H., Deuster, P. A., & Harris, W. S. (2014). Effects of omega-3 fatty acid supplementation on neurocognitive functioning and mood in deployed U.S. soldiers: a pilot study. Military Medicine, 179(4), 396–403. https://doi.org/10.7205/MILMED-D-13-00395

22. Dunstan, J. A., Mitoulas, L. R., Dixon, G., Doherty, D. A., Hartmann, P. E., Simmer, K., & Prescott, S. L. (2007). The effects of fish oil supplementation in pregnancy on breast milk fatty acid composition over the course of lactation: a randomized controlled trial. Pediatric Research, 62(6), 689–694. https://doi.org/10.1203/PDR.0B013E318159A93A

23. Fabian, C. J., Kimler, B. F., & Hursting, S. D. (2015). Omega-3 fatty acids for breast cancer prevention and survivorship. Breast Cancer Research : BCR, 17(1). https://doi.org/10.1186/S13058-015-0571-6

24. Freitas do Nascimento Junior, J., & Avelino da Silva, J. (2018). The influence of nutritional status and food consumption in psoriasis. International Journal of Family & Community Medicine , Volume 2(Issue 4). https://doi.org/10.15406/IJFCM.2018.02.00086

25. Freitas, R. D. S., & Campos, M. M. (2019). Protective Effects of Omega-3 Fatty Acids in Cancer-Related Complications. Nutrients, 11(5). https://doi.org/10.3390/NU11050945

26. Gerling, C. J., Mukai, K., Chabowski, A., Heigenhauser, G. J. F., Holloway, G. P., Spriet, L. L., & Jannas-Vela, S. (2019). Incorporation of omega-3 fatty acids into human skeletal muscle sarcolemmal and mitochondrial membranes following 12 weeks of fish oil supplementation. Frontiers in Physiology, 10(MAR), 348. https://doi.org/10.3389/FPHYS.2019.00348/FULL

27. Gutiérrez, S., Svahn, S. L., & Johansson, M. E. (2019). Effects of Omega-3 Fatty Acids on Immune Cells. International Journal of Molecular Sciences, 20(20). https://doi.org/10.3390/IJMS20205028

28. Handelsman, Y., & Shapiro, M. D. (2017). Triglycerides, Atherosclerosis, and Cardiovascular Outcome Studies: Focus on Omega-3 Fatty Acids. Endocrine Practice, 23(1), 100–112. https://doi.org/10.4158/EP161445.RA

29. Haq, M., Park, S. K., Kim, M. J., Cho, Y. J., & Chun, B. S. (2018). Modifications of Atlantic salmon by-product oil for obtaining different ω-3 polyunsaturated fatty acids concentrates: An approach to comparative analysis. Journal of Food and Drug Analysis, 26(2), 545–556. https://doi.org/10.1016/J.JFDA.2017.05.006

30. Hibbeln, J. R., & Gow, R. v. (2014). The potential for military diets to reduce depression, suicide, and impulsive aggression: a review of current evidence for omega-3 and omega-6 fatty acids. Military Medicine, 179(11), 117–128. https://doi.org/10.7205/MILMED-D-14-00153

31. Hu, Y., Hu, F. B., & Manson, J. A. E. (2019a). Marine Omega-3 Supplementation and Cardiovascular Disease: An Updated Meta-Analysis of 13 Randomized Controlled Trials Involving 127 477 Participants. Journal of the American Heart Association, 8(19). https://doi.org/10.1161/JAHA.119.013543

32. Hu, Y., Hu, F. B., & Manson, J. A. E. (2019b). Marine Omega-3 Supplementation and Cardiovascular Disease: An Updated Meta-Analysis of 13 Randomized Controlled Trials Involving 127 477 Participants. Journal of the American Heart Association, 8(19). https://doi.org/10.1161/JAHA.119.013543

33. Innes, J. K., & Calder, P. C. (2020). Marine omega-3 (N-3) fatty acids for cardiovascular health: An update for 2020. International Journal of Molecular Sciences, 21(4). https://doi.org/10.3390/IJMS21041362

34. Jump, D. B., Lytle, K. A., Depner, C. M., & Tripathy, S. (2018). Omega-3 polyunsaturated fatty acids as a treatment strategy for nonalcoholic fatty liver disease. Pharmacology & Therapeutics, 181, 108–125. https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2017.07.007

35. Kalu, C., Woelke, S., Zhang, J., Belury, M., Shen, R., Clinton, S. K., & Yee, L. (2019). Omega-3 fatty acids and ERPR(-) and HER2/neu(+/-) breast cancer prevention. Https://Doi.Org/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.TPS1589, 37(15_suppl), TPS1589–TPS1589. https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15_SUPPL.TPS1589

36. Lewis, M. D., Hibbeln, J. R., Johnson, J. E., Lin, Y. H., Hyun, D. Y., & Loewke, J. D. (2011). Suicide Deaths of Active Duty U.S. Military and Omega-3 Fatty Acid Status: A Case Control Comparison. The Journal of Clinical Psychiatry, 72(12), 1585. https://doi.org/10.4088/JCP.11M06879

37. Liang, P., Henning, S. M., Guan, J., Grogan, T., Elashoff, D., Cohen, P., & Aronson, W. J. (2020). Effect of dietary omega-3 fatty acids on castrate-resistant prostate cancer and tumor-associated macrophages. Prostate Cancer and Prostatic Diseases, 23(1), 127–135. https://doi.org/10.1038/S41391-019-0168-8

38. Mach, F., Baigent, C., Catapano, A. L., Koskina, K. C., Casula, M., Badimon, L., Chapman, M. J., de Backer, G. G., Delgado, V., Ference, B. A., Graham, I. M., Halliday, A., Landmesser, U., Mihaylova, B., Pedersen, T. R., Riccardi, G., Richter, D. J., Sabatine, M. S., Taskinen, M. R., … Patel, R. S. (2019). 2019

ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk. Atherosclerosis, 290, 140–205. https://doi.org/10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2019.08.014

39. Maillard, V., Bougnoux, P., Ferrari, P., Jourdan, M. L., Pinault, M., Lavillonnìre, F., Body, G., le Floch, O., & Chajès, V. (2002). N-3 and N-6 fatty acids in breast adipose tissue and relative risk of breast cancer in a case-control study in Tours, France. International Journal of Cancer, 98(1), 78–83. https://doi.org/10.1002/IJC.10130

40. Maki, K. C., & Dicklin, M. R. (2018). Omega-3 Fatty Acid Supplementation and Cardiovascular Disease Risk: Glass Half Full or Time to Nail the Coffin Shut? Nutrients 2018, Vol. 10, Page 864, 10(7), 864. https://doi.org/10.3390/NU10070864

41. Manson, J. E., Cook, N. R., Lee, I.-M., Christen, W., Bassuk, S. S., Mora, S., Gibson, H., Albert, C. M., Gordon, D., Copeland, T., D'Agostino, D., Friedenberg, G., Ridge, C., Bubes, V., Giovannucci, E. L., Willett, W. C., & Buring, J. E. (2019). Marine n-3 Fatty Acids and Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. The New England Journal of Medicine, 380(1), 23–32. https://doi.org/10.1056/NEJMOA1811403

42. Narayanan, B. A., Narayanan, N. K., & Reddy, B. S. (2001). Docosahexaenoic acid regulated genes and transcription factors inducing apoptosis in human colon cancer cells. International Journal of Oncology, 19(6), 1255–1262. https://doi.org/10.3892/IJO.19.6.1255/HTML

43. Natacci, L., Marchioni, D. M., Goulart, A. C., Nunes, M. A., Moreno, A. B., Cardoso, L. O., Giatti, L., Molina, M. D. C. B., Santos, I. S., Brunoni, A. R., Lotufo, P. A., & Bensenor, I. M. (2018). Omega 3 Consumption and Anxiety Disorders: A Cross-Sectional Analysis of the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). Nutrients, 10(6). https://doi.org/10.3390/NU10060663

44. Reisman, J., Schachter, H. M., Dales, R. E., Tran, K., Kourad, K., Barnes, D., Sampson, M., Morrison, A., Gaboury, I., & Blackman, J. (2006). Treating asthma with omega-3 fatty acids: Where is the evidence? A systematic review. BMC Complementary and Alternative Medicine, 6(1), 1–8. https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-26/TABLES/1

45. Ross, B. M., Seguin, J., & Sieswerda, L. E. (2007). Omega-3 fatty acids as treatments for mental illness: which disorder and which fatty acid? Lipids in Health and Disease, 6, 21. https://doi.org/10.1186/1476-511X-6-21

46. Rubio-Rodríguez, N., de Diego, S. M., Beltrán, S., Jaime, I., Sanz, M. T., & Rovira, J. (2012). Supercritical fluid extraction of fish oil from fish by-products: A comparison with other extraction methods. Journal of Food Engineering, 109(2), 238–248. https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2011.10.011

47. Ruxton, C. H. S., Calder, P. C., Reed, S. C., & Simpson, M. J. A. (2005). The impact of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on human health. Nutrition Research Reviews, 18(1), 113–129. https://doi.org/10.1079/NRR200497

48. Sahena, F., Zaidul, I. S. M., Jinap, S., Saari, N., Jahurul, H. A., Abbas, K. A., & Norulaini, N. A. (2009). PUFAs in Fish: Extraction, Fractionation, Importance in Health. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 8(2), 59–74. https://doi.org/10.1111/J.1541-4337.2009.00069.X

49. Schmidt, N., Møller, G., Bæksgaard, L., Østerlind, K., Stark, K. D., Lauritzen, L., & Andersen, J. R. (2020). Fish oil supplementation in cancer patients. Capsules or nutritional drink supplements? A controlled study of compliance. Clinical Nutrition ESPEN, 35, 63–68. https://doi.org/10.1016/J.CLNESP.2019.12.004

50. Simopoulous, A. P. (1989). Summary of the NATO Advanced Research Workshop on Dietary ω3 and ω6 Fatty Acids: Biological Effects and Nutritional Essentiality. The Journal of Nutrition, 119(4), 521–528. https://doi.org/10.1093/JN/119.4.521

51. Siscovick, D. S., Barringer, T. A., Fretts, A. M., Wu, J. H. Y., Lichtenstein, A. H., Costello, R. B., Kris-Etherton, P. M., Jacobson, T. A., Engler, M. B., Alger, H. M., Appel, L. J., & Mozaffarian, D. (2017a). Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid (Fish Oil) Supplementation and the Prevention of Clinical Cardiovascular Disease: A Science Advisory from the American Heart Association. Circulation, 135(15), e867–e884. https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000482/-/DC1

52. Siscovick, D. S., Barringer, T. A., Fretts, A. M., Wu, J. H. Y., Lichtenstein, A. H., Costello, R. B., Kris-Etherton, P. M., Jacobson, T. A., Engler, M. B., Alger, H. M., Appel, L. J., & Mozaffarian, D. (2017b). Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid (Fish Oil) Supplementation and the Prevention of Clinical Cardiovascular Disease: A Science Advisory from the American Heart Association. Circulation, 135(15), e867–e884. https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000482/-/DC1

53. Song, M., Ou, F. S., Zemla, T. J., Hull, M. A., Shi, Q., Limburg, P. J., Alberts, S. R., Sinicrope, F. A., Giovannucci, E. L., van Blarigan, E. L., Meyerhardt, J. A., & Chan, A. T. (2019). Marine omega-3 fatty acid intake and survival of stage III colon cancer according to tumor molecular markers in NCCTG Phase III trial N0147 (Alliance). International Journal of Cancer, 145(2), 380–389. https://doi.org/10.1002/IJC.32113

54. Stoodley, I., Garg, M., Scott, H., Macdonald-Wicks, L., Berthon, B., & Wood, L. (2019). Higher Omega-3 Index Is Associated with Better Asthma Control and Lower Medication Dose: A Cross-Sectional Study. Nutrients, 12(1). https://doi.org/10.3390/NU12010074

55. Su, K. P., Huang, S. Y., Chiu, C. C., & Shen, W. W. (2003). Omega-3 fatty acids in major depressive disorder. A preliminary double-blind, placebo-controlled trial. European Neuropsychopharmacology : The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology, 13(4), 267–271. https://doi.org/10.1016/S0924-977X(03)00032-4

56. Swanson, D., Block, R., & Mousa, S. A. (2012). Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. Advances in Nutrition (Bethesda, Md.), 3(1), 1–7. https://doi.org/10.3945/AN.111.000893

57. Turner, D., Zlotkin, S. H., Shah, P. S., & Griffiths, A. M. (2009). Omega 3 fatty acids (fish oil) for maintenance of remission in Crohn's disease. The Cochrane Database of Systematic Reviews, 1. https://doi.org/10.1002/14651858.CD006320.PUB3

58. Volpato, M., & Hull, M. A. (2018). Omega-3 polyunsaturated fatty acids as adjuvant therapy of colorectal cancer. Cancer Metastasis Reviews, 37(2), 545. https://doi.org/10.1007/S10555-018-9744-Y

59. Wanasundara, U. N., Wanasundara, J., & Shahidi, F. (2002). Omega-3 Fatty Acid Concentrates: a Review of Production Technologies. Undefined, 157–174. https://doi.org/10.1007/978-3-662-09836-3_14

60. Wani, A. L., Bhat, S. A., & Ara, A. (2015). Omega-3 fatty acids and the treatment of depression: a review of scientific evidence. Integrative Medicine Research, 4(3), 132. https://doi.org/10.1016/J.IMR.2015.07.003

61. White, M. N., Shrubsole, M. J., Cai, Q., Su, T., Hardee, J., Coppola, J. A., Cai, S. S., Martin, S. M., Motley, S., Swift, L. L., Milne, G. L., Zheng, W., Dai, Q., & Murff, H. J. (2019). Effects of fish oil supplementation on eicosanoid production in patients at higher risk for colorectal cancer. European Journal of Cancer Prevention : The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP), 28(3), 188–195. https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000455

62. WHO/FAO. (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: Recommendations for preventing excess weight gains and obesity. WHO, 2, 1–148. https://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS_916/en/

63. Yan, J. H., Guan, B. J., Gao, H. Y., & Peng, X. E. (2018). Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: A meta-analysis of randomized controlled trials. Medicine, 97(37). https://doi.org/10.1097/MD.0000000000012271

64. Zulfakar, M. H., Edwards, M., & Heard, C. M. (2007). Is there a role for topically delivered eicosapentaenoic acid in the treatment of psoriasis? European Journal of Dermatology : EJD, 17(4), 284–291. https://doi.org/10.1684/EJD.2007.0201

Investigation of the ability of predator bacterium *Halobacteriovorax* sp. MAH8 isolated from the Caspian Sea to control human pathogenic bacteria

Anfal Hasan[1*]; Mojtaba Mohseni[2]; Hoda Ebrahimi[3]; Ezatollah Ghaemi[4]

[1]MSc. student in Microbiology, Department of Microbiology, University of Mazandaran, Iran
[2]Associate Professor of Microbiology, Department of Microbiology, University of Mazandaran, Iran
[3]PhD in Microbiology, Department of Microbiology, University of Mazandaran, Iran
[4]Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Golestan University of Medical Sciences, Iran

A.Hasan@stu.umz.ac.ir

Abstract

The threat of infectious diseases caused by pathogenic bacteria that have become resistant to antibiotics has become a major problem. Therefore, it is necessary to look for new effective alternative methods, one of which is to use predatory bacteria to control human pathogenic bacteria. The aim of this study was to isolate Halobacteriovorax from the Caspian Sea and evaluate its ability to control some human pathogenic bacteria. To isolate the predatory bacteria, water samples were collected from the shores of the Caspian Sea. To increase the population of predatory bacteria, the samples were enriched in a culture medium by adding yeast extract for 24 hours at 28°C. For isolation of the predatory bacterium, double-layer agar culture technique was used. In addition, to evaluate the predatory activity of the isolate, the lytic activity evaluation against some pathogenic bacteria was used bacteria. The results indicated that the first clear plaques appeared after 72 hours and the plaque diameter reached a maximum of 5 mm after the seventh day. The results showed the predatory ability of the MAH8 bacterial isolate in controlling some pathogenic bacteria including Escherichia coli and Acinetobacter baumannii. The findings of the present study show that the predatory Halobacteriovorax sp. MAH8 isolated from the Caspian Sea has the ability to biologically control of some Gram negative human pathogenic bacteria. However, the use of the predatory bacterium Halobacteriovorax sp. MAH8 to replace antimicrobial compounds such as antibiotics requires further research.

Keywords: Halobacteriovorax, predator bacterium, human pathogenic bacteria, Caspian Sea

بررسی توانایی باکتری شکارچی هالوباکتریووراکس MAH8 جدا شده از دریای مازندران در کنترل برخی باکتری‌های بیماریزای انسان

انفال حسن[۱*]؛ مجتبی محسنی[۲]؛ هدی ابراهیمی[۳]؛ عزت‌اله قائمی[۴]

[۱*]دانشجو کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران
[۲]دانشیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه مازندران
[۳]دکتری میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه مازندران
[۴]استاد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

*A.Hasan@stu.umz.ac.ir

چکیده

تهدید بیماری‌های عفونی ناشی از باکتری‌های بیماری‌زا که به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده‌اند، موجب مشکلات عمده شده است. استفاده از باکتری‌های شکارچی یکی از روش‌های نوین و مؤثر جایگزین برای کنترل باکتری‌های بیماریزا مورد توجه قرار گرفته است. جداسازی *هالوباکتریووراکس* از آب دریای مازندران و بررسی توانایی آن در کنترل برخی باکتری‌های بیماریزای انسان از اهداف پژوهش حاضر بود. برای جداسازی باکتری شکارچی، نمونه آب از سواحل دریای مازندران جمع‌آوری شد. برای افزایش جمعیت باکتری شکارچی، غنی‌سازی نمونه‌ها در محیط کشت حاوی عصاره مخمر به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای جداسازی باکتری شکارچی از روش کشت آگار دو لایه استفاده شد. پلاک‌ها ایجاد شده جمع آوری و باکتری شکارچی خالص سازی شد. همچنین برای سنجش فعالیت شکارگری جدایه، از روش ارزیابی فعالیت لیتیکی علیه برخی باکتری‌های بیماریزا استفاده شد. نتایج نشان داد اولین پلاک‌های شفاف پس از ۷۲ ساعت ظاهر شد و قطر پلاک پس از روز هفتم، به حداکثر ۵ میلی‌متر رسید. نتایج بررسی فعالیت شکارگری، نشان داد جدایه MAH8 توانایی شکار و کنترل برخی باکتری‌های بیماریزا شامل *اشریشیا کلی* و *اسینتوباکتر بومانی* را دارد. یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد *هالوباکتریووراکس* MAH8 جدا شده از دریای مازندران، توانایی کنترل زیستی برخی باکتری‌های گرم منفی بیماریزای انسان را دارد. اگرچه استفاده از باکتری شکارچی *هالوباکتریووراکس* MAH8 برای جایگزینی ترکیبات ضد میکروبی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

واژگان کلیدی: *هالوباکتریووراکس*، باکتری شکارچی، باکتری‌های بیماریزای انسان، دریای مازندران

مقدمه

تعداد بیماری‌های عفونی ناشی از باکتری‌های بیماری‌زا که به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده‌اند، رو به فزونی است و موجب مشکلات عمده در ریشه کنی بیماری‌های عفونی به ویژه در شکل بیوفیلم است. بیوفیلم یک ساختار چسبنده به سطح توسط باکتری‌های مختلف از جمله باکتری‌های پاتوژن است. بیوفیلم‌ها موجب می‌شود تا باکتری‌های بیماریزا تا هزار برابر بیشتر از شکل پلانکتونیک خود در برابر عوامل ضد میکروبی مقاوم باشند. با تمام این نگرانی‌ها، نیاز به استراتژی‌های جایگزین مؤثر برای مبارزه با عفونت‌های مقاوم به چند دارو است. به این منظور باکتری‌های شکارچی به عنوان عوامل ضد باکتریایی زنده پیشنهاد شده‌اند و نتایج پژوهش‌های متعدد دلالت بر حساسیت پاتوژن‌های انسانی به فعالیت شکارگری سویه‌های *دلوویبریو* داشت. *دلوویبریو* و

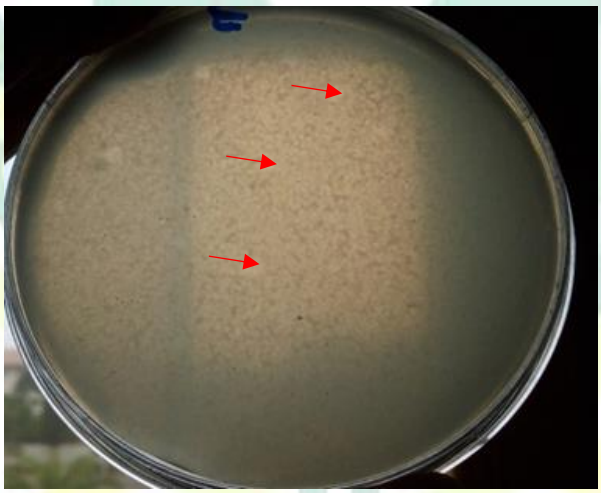
ارگانیسم‌های مشابه (BALOs) از گروه *دلتاپروتئوباکتر* به صورت گرم منفی کوچک، ویبریو شکل متحرک با یک تاژک منفرد قطبی و غلاف‌دار هستند (۴). پراکنش BALOs در طبیعت بسیار گسترده است و در خاک، آب‌های شیرین، دریاها و نیز در فاضلاب، سیستم‌های توزیع آب و حتی در دستگاه گوارش برخی حیوانات زندگی می‌کنند (۶). شکار باکتری‌های گرم منفی به عنوان سبک زندگی درنده خویی از ویژگی‌های BALOs است. فعالیت شکارگری آنها با دو مرحله مشخص می‌شود و شامل مرحله حمله (زندگی آزاد) و مرحله رشد درون پری‌پلاسمی است. در مرحله زندگی آزاد، این باکتری بسیار متحرک بوده و به دنبال طعمه خود می‌گردد. پس از اتصال به غشای خارجی طعمه، از لایه پپتیدوگلیکان دیواره سلولی عبور کرده و در فضای پری‌پلاسمی، مرحله رشد درون سلولی خود را آغاز می‌کند. داخل پری‌پلاسم، با استفاده از انواع مختلف آنزیم‌های هیدرولیتیک خود از ماکرومولکول‌های میزبان تغذیه می‌کند و رشته سلولی دراز و طویل شامل چند هسته ایجاد می‌شود. هنگامی که منابع سلول میزبان تمام می‌شود، چندین دیواره عرضی به طور همزمان در رشته سلولی دراز ایجاد می‌شود. باکتری‌های جدید ایجاد شده، پس از متلاشی شدن دیواره دلوپلاست، آزاد می‌شوند (۲). به منظور کنترل رشد بیش از حد برخی باکتری‌های بیماریزا در مزارع پروش آبزیان نظیر ماهی و میگو، مطالعات مختلف به کمک *دلوویبریو باکتریووروس* انجام شده است (۱). همچنین مطالعاتی به منظور ارزیابی اثر شکارگری *دلوویبریو باکتریووروس* بر برخی پاتوژن‌های گرم منفی مقاوم به چند دارو و نیز بیوفیلم‌های مربوط به آن‌ها انجام شده است. این نتایج توانایی *دلوویبریو باکتریووروس* برای شکار و کنترل برخی باکتری‌های بیماریزا گرم منفی از جمله *کلبسیلا پنومونیه*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *اسینتوباکتر بومانی* را نشان داد. همچنین باکتری شکارچی قادر به شکار تمام باکتری‌های بیماریزا به شکل پلانکتونی بود و نیز در جلوگیری از تشکیل و پراکندگی بیوفیلم آنها نیز موثر بود (۵). هدف پژوهش حاضر جداسازی باکتری شکارچی *هالوباکتریووراکس* از آب دریای مازندران و بررسی توانایی آن در حذف برخی باکتری‌های بیماریزای انسان بود.

2.مواد و روش‌ها

برای جداسازی باکتری شکارچی، نمونه آب از سواحل دریای مازندران جمع‌آوری و در شرایط کنترل شده به آزمایشگاه منتقل شد. برای افزایش جمعیت باکتری‌های شکارچی، غنی‌سازی نمونه‌های آب با افزودن ۰/۱ درصد عصاره مخمر انجام شد. ارلن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. برای حذف سایر باکتری‌های محیطی، نمونه غنی شده در دور ۵۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس برای حذف باکتریوفاژها، محلول بالایی در ۲۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب سلولی (حاوی BALOs) با بافر هپس شستشو داده شد. سپس برای جداسازی باکتری شکارچی از روش کشت آگار دو لایه همراه با باکتری طعمه استفاده شد (۳). لایه بالایی حاوی رسوب سلولی شسته شده و باکتری طعمه بود. باکتری‌های طعمه شامل *اشریشیا کلی* و *اسینتوباکتر بومانی* بود. پلیت‌های آگار دو لایه در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ تا ۷ روز گرمخانه‌گذاری شد .ظاهر شدن پلاک‌های شفاف پس از حداقل ۴۸ ساعت و گسترش پلاک‌ها با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری، نشانه حضور باکتری شکارچی است. تجدید کشت متوالی در محیط کشت آگار دو لایه موجب خالص سازی بیشتر باکتری شکارچی می‌شود. به این منظور پلاک باکتری شکارچی از سطح محیط رشد آگار دولایه جدا شد. یک پلاک با قطر حدود ۵ میلی‌متر به کمک نوک پیپت استریل، از سطح محیط رشد آگار دولایه بریده شد و به محیط رشد مایع حاوی باکتری طعمه، منتقل گردید. پس از ۱۸ تا ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، لیزات حاوی باکتری شکارچی فعال به محیط کشت تازه آگار دولایه منتقل شد و تشکیل پلاک در آن مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تعیین فعالیت لیتیکی جدایه شکارچی علیه برخی باکتری‌های بیماریزا، از فاز حمله جدایه استفاده شد. حجم یک میلی‌لیتر لیزات حاوی جدایه شکارچی به ۱۰ میلی‌لیتر باکتری طعمه شامل *اشریشیا کلی* و *اسینتوباکتر بومانی* شسته شده در بافر هپس، تلقیح شد و در گرمخانه شیکردار با دمای ۲۵ درجه سانتی¬گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. برای پایش فعالیت لیتیکی جدایه شکارچی، کاهش جذب نوری سوسپانسیون در فواصل زمانی ۱۲ ساعت و در طول موج ۶۰۰ نانومتر سنجیده شد.

3.نتایج و بحث

پلاک اولیه به قطر ۲ میلی‌متر پس از ۳ روز گرمخانه‌گذاری در سطح پلیت آگار دو لایه ظاهر شد. نتایج نشان داد با ادامه‌ی گرمخانه‌گذاری قطر پلاک‌ها افزایش یافت به طوریکه پس از روز هفتم، قطر پلاک‌ها به حداکثر ۵ میلی‌متر رسید (شکل ۱) برای تجدید کشت و تخلیص باکتری شکارچی، لیزات تهیه شد و به محیط کشت آگار دو لایه تازه حاوی باکتری‌های بیماریزا طعمه منتقل شد. نتایج نشان داد پس از ۱۸ تا ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، تعداد باکتری شکارچی فعال در لیزات افزایش یافت. نتایج بررسی پلاک‌های ثانویه تشکیل شده در سطح پلیت آگار دو لایه نشان داد اولین پلاک‌ها پس از ۴۸ ساعت ظاهر شد به طوری که قطر پلاک‌ها پس از ۷۲ ساعت به ۵ میلی‌متر افزایش یافت. هچنین با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری، قطر پلاک‌ها توسعه یافت (شکل ۲). با تجدید کشت باکتری شکارچی جدا شده از آب دریای مازندران، باکتری شکارچی *هالوباکتریووراکس* جداسازی شد. نتایج بررسی فعالیت شکارگری نشان داد جدایه *هالوباکتریووراکس* توانایی خوبی در شکار و کنترل باکتری‌های بیماریزا شامل *اشریشیا کلی* و *اسینتوباکتر بومانی* را داشت. به طوری که مقدار جذب نوری سوسپانسیون حاوی جدایه و طعمه پس از ۱۲ ساعت از ۱٫۲ به ۰٫۹۸ کاهش یافت. با توجه به کاهش مقدار ۰/۲ در جذب نوری سوسپانسیون، فعالیت شکارگری جدایه *هالوباکتریووراکس* تایید شد. همچنین با تخلیص و تکثیر جدایه شکارچی *هالوباکتریووراکس* در شرایط بهینه آزمایشگاهی، توانایی شکار آن‌ها افزایش یافته و کارایی بالاتری پیدا کرد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد باکتری شکارچی *هالوباکتریووراکس* دریای مازندران می‌تواند گزینه مناسبی برای حذف و کنترل زیستی برخی باکتری‌های بیماریزا گرم منفی در انسان باشد.



شکل ۱ : پلاک‌های اولیه باکتری شکارچی جدا شده از آب دریای مازندران با قطر ۲ میلی‌متر پس از ۳ روز گرم خانه‌گذاری بر سطح محیط کشت آگار دو لایه



شکل ۲: پلاک‌های ثانویه جدایه شکارچی هالوباکتریووراکس به قطر ۶ میلی‌متر بعد از ۵ روز گرمخانه‌گذاری

منابع

56. Jurkevitch, E., & Mitchell, R. J. (Eds.). (2020). *The ecology of predation at the microscale*. Springer.

57. Makowski, Ł., Donczew, R., Weigel, C., Zawilak-Pawlik, A., & Zakrzewska-Czerwińska, J. (2016). Initiation of chromosomal replication in predatory bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1898.

58. Mohseni, M., Mohammadhosseinzadeh, N., & Keramat, A. (2018). A predator *Halobacteriovorax* isolated from the Caspian Sea and the investigation of its ability to control some gram negative pathogenic bacteria. *Journal of Cellular and Molecular Researches*, *31*(3), 422-435.

59. Monnappa, A. K., Bari, W., Choi, S. Y., & Mitchell, R. J. (2016). Investigating the responses of human epithelial cells to predatory bacteria. *Scientific Reports*, *6*(1), 1-14.

60. Sun, Y., Ye, J., Hou, Y., Chen, H., Cao, J., & Zhou, T. (2017). Predation efficacy of *Bdellovibrio bacteriovorus* on multidrug-resistant clinical pathogens and their corresponding biofilms. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, *70*(5), 485-489.

61. Williams, H. N., Baer, M. L., & Tudor, J. J. (2015). *Bdellovibrio*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.

Analgesic effects of trans-anethole on pain behavior in a rat model

Mohammad javad mohammad pour [1]; Ezzat nourizadeh[2]; Fariba mahmoudi[3*]

1- Student, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
2- Assistant, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
3. Associate, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Corresponding Author Email address:f.mahmoudi@uma.ac.ir

Abstract

Background : Pain is an unpleasant feeling that is influenced by physiological and emotional processes. Pain can cause disability in the long run. Trans-anethole is a plant-derived drug compound that has analgesic and anti-inflammatory effects. In this study, was investigated the analgesic effects of trans-anethole on the pain behavior of male rats**.**

Materials and Methods: 10 male rats weighing 180-200 g were used for the experiment. Male rats were divided into two groups and 50 µl of 5% formalin was injected into the hind paw of the left leg. One group was injected with saline as a control group and the other group received 150 mg / kg trans-anethole Subcutaneous. Pain behaviors were assessed for 60 min. The data were analyzed using one-way ANOVA and SPSS software. In all analyzes, the results were statistically significant with $P \geq 0.05$.

Results: Injection of 150 mg / kg, significantly reduced the pain score in male model rats compared to the formalin control group.

Conclusion: In this study, the analgesic effects of trans-anethole were observed. Therefore, trans anethole can be used as an analgesic herbal compound.

Keywords: trans-anethole, pain, formalin

اثرات ضد دردی ترانس آنتول بر رفتار درد در مدل موش‌های صحرایی

محمد جواد محمدپور[۱]؛ عزت نوری زاده*[۲]؛ فریبا محمودی[۳]

۱- (دانشجو) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی

۲- (استادیار) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی

۳-(دانشیار)، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی

** ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: nourizade@yahoo.com*

چکیده

مقدمه: درد احساس ناخوشایندی است که تحت تاثیر فرایندهای فیزیولوژیکی و عاطفی قرار دارد و می‌تواند در طولانی مدت باعث ناتوانی در فرد شود. ترانس آنتول ترکیب دارویی مشتق از گیاهان است که دارای اثرات ضد دردی و ضد التهابی می‌باشد. در این مطالعه اثرات ضد دردی ترانس آنتول روی رفتار درد موش‌های صحرایی نر بررسی شده است.

مواد و روش:برای انجام آزمایش ۱۰ موش صحرایی نر به وزن ۱۸۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. موش‌های صحرایی نر به دو گروه تقسیم شدند و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۵ درصد به پنجه عقب پا چپ تزریق شد. به یک گروه به عنوان گروه کنترل سالین تزریق شد و یک گروه ۱۵۰mg/kg ترانس آنتول به صورت داخل صفاقی دریافت کرد. رفتار های درد در طول مدت ۶۰ دقیقه بررسی شد. داده های حاصل با استفاده از آزمون آنوای یک طرفه و نرم افزارSPSS آنالیز شدند .در تمام آنالیزها نتایج با$P \leq 0.05$ از نظر آماری معنی دار گزارش گردید.

نتایج: تزریق داخل صفاقی mg/kg ۱۵۰ به موش‌های صحرایی نر مدل درد باعث کاهش معنی داری در نمره درد نسبت به گروه کنترل فرمالین شد که از نظر آماری معنی دار بود.

نتیجه گیری کلی: در این مطالعه اثرات ضد دردی ترانس آنتول مشاهده شد بنابرین ترانس آنتول می‌تواند به عنوان ترکیب گیاهی ضد دردی مورد استفاده قرار بگیرد.

واژگان کلیدی: ترانس آنتول، درد، فرمالین

1.مقدمه

درد فرایندی است که وقتی ناحیه ای از بدن تحت تاثیر موارد آسیب زا قرار گیرد توسط فرد احساس می شود. در صورت ادامه بیش از چند ماه می تواند به نوع مزمن تبدیل شود و زندگی بیمار را دچار مشکل کند درد می‌تواند تحت تأثیر فرایندهای فیزیولوژیکی، روانشناختی و عاطفی قرار گیرد. تاکنون ۱۲۰ میلیون نفر از درد مزمن رنج می برند بنابرین شناسایی علت و درمان آن ضرروری می باشد (Meeus, 2018). نواحی مختلف در تعدیل درد نقش دارند به عنوان مثال هیپوتالاموس جانبی یکی از نواحی مهم دستگاه عصبی مرکزی است که در مهار درد نقش مهمی دارد. (Fakhoury et al. 2020).

ترانس آنتول بخش عمده گیاهانینظیر انیسون و رازیانه را تشکیل می دهد (Helah et al. 2019; Moradi et al. 2014). مطالعات ثابت کرده است که ترانس آنتول اثرات استروئیدوژنیک قوی و ضد التهابی دارد و تزریق داخل صفاقی ترانس آنتول سبب کاهش فاکتورهای التهابی می شود (Moradi et al. 2014; Atesh & Erdogrul, 2003; Mahboubi, 2019; Al-Snafi AE, 2018). همچنین تعدادی از تحقیقات اثرات ضد میکروبی، ضد دردی، ضد ویروسی و آنتی اکسیدانی ترانس آنتول را گزارش کرده اند(Wang et al,2018). در این تحقیق اثرات ضد دردی ترانس آنتول بر روی رفتار درد در موش‌های صحرایی نر بررسی شده است.

۲.مواد و روش‌ها

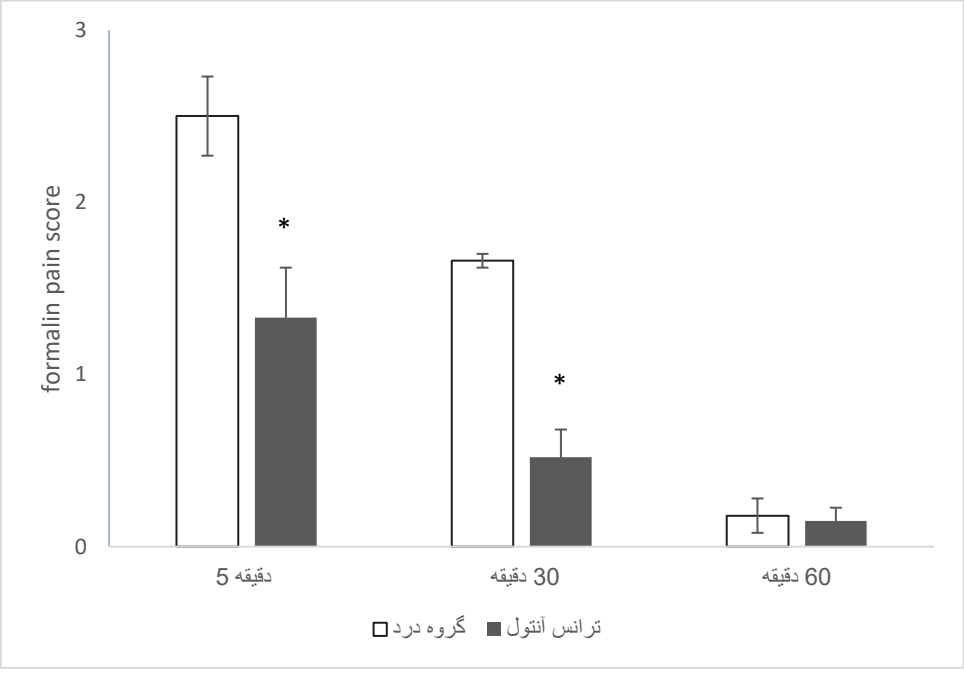
برای انجام آزمایش ۱۰ موش صحرایی نر به وزن ۱۸۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. گروه کنترل به صورت داخل صفاقی ۳۰ دقیقه قبل از تزریق زیر پوستی ۵۰ میکرولیترفرمالین ۵ درصد به پنجه عقب پای چپ، سالین دریافت کردند. به گروه دوم۱۵۰mg/kg ترانس آنتول به صورت داخل صفاقی تزریق شد. بعد از ۳۰ دقیقه ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۵ درصد به صورت زیر پوستی به پنجه عقب تزرق شد. بلافاصله رفتار درد مثل لسیسیدن، بالا نگه داشتن پا نزدیک بدن و نگه داشتن پا روی نوک پنجه پا در طول ۶۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت نمره درد طبق فرمول زیر برای هر گروه محاسبه شد. رفتار صفر: زمانی که حیوان هر دو پا را راحت روی زمین قرار می‌دهد، رفتار۱: زمانی که حیوان نوک پنجه ای که فرمالین تزریق شده است را روی زمین نگه می دارد، رفتار۲: زمانی که حیوان پای که فرمالین تزریق شده است را بالای بدن نگه می دارد، رفتار۳: زمانی که حیوان پایی که فرمالین تزریق شده است را می لیسید.

$$\text{نمره درد} = \frac{3\times \text{رفتار}3 + 2\times \text{رفتار}2 + 1\times \text{رفتار}1 + 0\times \text{رفتارصفر}}{20}$$

برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS version 16 استفاده شد. نتایج حاصل به صورت میانگین ± انحراف معیار میانگین(± SEM) ارائه شدند. در تمام آنالیزهای آماری انجام شده، نتایج با $p\leq 0.05$ معنی‌دار گزارش شدند.

3.نتایج و بحث

بررسی رفتار درد در فاصله زمانی ۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه نشان داد که در موش‌های صحرایی دریافت کننده ۱۵۰mg/kg ترانس آنتول نسبت به گروه کنترل دریافت کننده سالین، نمره درد کاهش یافته است که این کاهش از نظر آماری در زمان ۵ و ۳۰ دقیقه معنی دار بود. و لی در در فاصله زمانی ۶۰ دقیقه کاهش معنی داری مشاهده نشد



نمودار۱: اثر تزریق داخل صفاقی ۱۵۰mg/kg ترانس آنتول بر رفتار درد موش‌های صحرایی در مقایسه با گروه کنترل دریافت کننده سالین با استفاده از تست فرمالین. نتایج به صورت میانگین ± SEM ارائه شده اند و$P\leq 0/05$ از نظر آماری معنی دار گزارش شده است.*: نسبت به گروه کنترل معنی دار

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تزریق داخل صفاقی ترانس آنتول به مقدار ۱۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن باعث کاهش رفتار درد در مدل درد موش های صحرایی نر نسبت به گروه کنترل شد که این کاهش رفتار دردی از نظر آماری معنی دار بود. همچنین تعدادی از مطالعات اثرات ضد دردی ترانس آنتول را گزارش کرده اند که مطابق با یافته های این تحقیق بود(Wang et al, 2018 & Ritter et al, 2013) . واسطه‌های التهابی مانند پروستاگلاندین، سیتوکین‌های پیش التهابی و کموکاین‌ها از طریق فعال‌سازی مستقیم گیرنده‌های درد، نورون‌های حسی اولیه درد را القا می‌کنند .Matsuda & Ji) (2019. نشان داده شده است که ترانس آنتول از طریق مهار فاکتورهای التهابی سبب کاهش درد القایی با فرمالین می شود(Versuti, 2014). بنابرین در این تحقیق نیز احتمالا تراس آنتول با مداخله در مسیر های التهابی و با کاهش فاکتورهای التهابی اثرات ضد دردی خود را اعمال می‌کند.

۴. نتیجه‌گیری

اثرات ضد دردی تزریق داخل صفاقی ترانس آنتول در مدل درد موش‌های صحرایی نر القا شده با فرمالین در این تحقیق مشاهده شد. بنابرین ترانس آنتول می‌تواند با کاهش درد به بیمارانی که از درد به دلیل بیماری‌های مختلف رنج می برند کمک شایانی کند.

سپاسگزاری

نوسندگان از دانشگاه محقق اردبیلی برای حمایت های مالی کمال تشکر و قدردانی را دارد.

منابع

13. Al-Snafi AE. 2018.The chemical constituents and pharmacological effects of Foeniculum vulgare - A review, Journal Of Pharmacy,8(5): 81-96.
14. Fakhoury M, Salman I, Najjar W, Merhej G and Lawand N.2020 .The lateral hypothalamus: An uncharted territory for processing peripheral neurogenic inflammation, Front Neurosci,14: 101.
15. Helal1 EGE, AL Jalaud NAA, El-Aleem MA and Ahmed SS.2019. Effect of phytoestrogen (Fennel) on some sex hormones and other physiological parameters in male albino rats, The Egyptian Journal of Hospital Medicine ,74 (7):1616-1620.
16. Mahboubi M. 2019 Foeniculum vulgare as valuable plant in management of women's health, J Menopausal Med,25(1): 1–14.
17. Matsuda, M., Huh, Y. and Ji, R. R.2019. Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain, Journal of anesthesia, *33*(1), 131-139.
18. Meeus M. 2018.Are pain beliefs, cognitions, and behaviors influenced by race, ethnicity, and culture in patients with chronic musculoskeletal pain: a systematic review, Pain Physician,21:541-558.
19. Moradi J, Abbasipour F, Zaringhalam J, Maleki B, Ziaee N, Khodadoustan A.and Janahmadi M.2014.Anethole, a medicinal plant compound, decreases the production of pro-inflammatory TNF-α and IL-1β in a rat model of LPS-induced periodontitis, Iran J Pharm Res, 13(4):1319-1325.
20. Ritter, A. M., Domiciano, T. P., Verri, W. A., Zarpelon, A. C., da Silva, L. G., Barbosa, C. P., ... and Bersani-Amado, C. A. 2013. Antihypernociceptive activity of anethole in experimental inflammatory pain, Inflammopharmacology, *21*(2), 187-197.
21. Versuti Ritter AM, Franciele Queiroz Ames FQ, Otani F, de Oliveira RMW, Nakamura Cuman RK. and Bersani-Amado CA. 2014.Effects of anethole in nociception experimental models Evid Based Complement Alternat Med, 2014: 345829.

22. Wang, B., Zhang, G., Yang, M., Liu, N., Li, Y. X., Ma, H., ... and Yu, J.2018. Neuroprotective effect of anethole against neuropathic pain induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in mice, Neurochemical research, *43*(12), 2404-2422.

The effect of different pH on water absorption capacity of fish protein isolate obtained from grass carp (Ctenopharyngodon idella) by-products

Shima Mansouri Moghadam[1], Mina Esmaeili[1*], Sakineh Yeganeh[1], Sedigheh Babaei[2]

1-Department of Fisheries, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari. Iran.

2-Department of Natural Resources and Environmental Engineering, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

* Mina.smaily@gmail.com

Abstract

In the seafood processing industries, large amounts of by-products are produced annually that are rich in protein but are mostly discarded or turned into inedible products for humans. In the present study, in order to optimal use of Grass carp by-products, protein isolates were extracted at three acidic pH (2، 2.5 ، 3) and three alkaline pH (11.5 ،12 ، 12.5) and the water holding capacity of protein samples were compared. According to the results, the products produced in alkaline conditions exhibited higher water holding capacity compared to acidic treatments and the highest amount was observed in the protein sample obtained from treatment with pH 12 (15.65 ± 0.52). However, the highest value of acidic treatments was observed in the sample extracted at pH 3 (14.22 ± 0.16), which was significantly lower than alkaline treatment ($p < 0.05$). In general, it can be said that the pH-shift method is an efficient method for extracting protein from by-products of seafood processing industries and different extraction pH can also produce products with different properties.

Keywords: Fish protein isolated, By-products, Grass carp, Water absorption capacity, pH-shift method

تأثیر pH های مختلف استخراج بر ظرفیت جذب آب پروتئین ایزوله ضایعات ماهی کپورعلفخوار (Ctenopharyngodon idella)

شیما منصوری‌مقدم[۱]، مینا اسمعیلی خاریکی*[۱]، سکینه یگانه[۱]، سیده صدیقه بابایی[۲]

۱-گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- بخش مهندسی منابع طبیعی و محیط زیست، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

*Mina.smaily@gmail.com

چکیده

در صنعت فرآوری آبزیان مقادیر زیادی ضایعات حاصل از فرآوری تولید می‌شود که غنی از پروتئین می‌باشند اما عمدتا دور ریز می‌شوند و یا تبدیل به محصولاتی غیرقابل مصرف برای انسان می‌گردند. در پژوهش حاضر جهت استفاده بهینه از ضایعات ماهی کپور عفخوار، پروتئین ایزوله ضایعات در سه pH اسیدی (۲، ۲/۵، ۳) و سه pH قلیایی (۱۱/۵، ۱۲، ۱۲/۵) استخراج شده و ظرفیت جذب آب محصولات تولید شده مورد مقایسه قرار گرفت. با توجه به نتایج، تمامی پروتئین‌های تولید شده در شرایط قلیایی ظرفیت جذب آب بالاتری در مقایسه با تیمارهای اسیدی نشان دادند و بیشترین مقدار آن در نمونه پروتئین حاصل از تیمار با pH ۱۲ (۰/۵۲±۱۵/۶۵) مشاهده گردید. بیشترین مقداری که تیمارهای اسیدی به خود اختصاص دادند نیز در نمونه استخراج شده در pH ۳ (۲۲/۱۶±۱۴/۰) مشاهده شد که به طور معنی‌داری پایین‌تر از تیمارهای قلیایی بود ($p<0/05$). در مجموع می‌توان بیان نمود که روش تغییر pH یک روش کارآمد جهت استخراج پروتئین از ضایعات حاصل از فرآوری آبزیان بوده و pH های متفاوت استخراج نیز می‌توانند محصولاتی با خصوصیات متفاوت تولید نمایند.

کلمات کلیدی: پروتئین ایزوله ماهی، محصولات جانبی، کپور علفخوار، ظرفیت جذب آب، روش تغییر pH

۱.مقدمه

غذاهای دریایی بعلت کیفیت بالای پروتئینی، از اهمیت بسیار زیادی برخوردارند. در صنعت فرآوری آبزیان مقادیر زیادی ضایعات حاصل از فرآوری تولید می‌شود که غنی از پروتئین می‌باشند اما عمدتا دور ریز می‌شوند و یا تبدیل به محصولاتی غیرقابل مصرف برای انسان می‌گردند. با تبدیل این ضایعات به فرآورده‌های دارای ارزش افزوده مانند پروتئین ایزوله ماهی (FPI: Fish Protein Isolate) می‌توان مشکلات زیست محیطی ناشی از دورریز ضایعات محصولات دریایی را به حداقل رسانید و از اتلاف منابع غنی از پروتئین نیز جلوگیری کرد. انحلال اسیدی/ قلیایی و به دنبال آن ترسیب ایزوالکتریک که به آن روش تغییر pH (pH-shift) هم گفته می‌شود، یکی از روش‌های موفق جهت بازیافت مستقیم پروتئین از مواد اولیه‌ای همانند ضایعات حاصل از فرآوری آبزیان می‌باشد (Abdollahi *et al.*, 2017). این فرآیند شامل انحلال پروتئین‌های ماده اولیه هموژن شده در آب با استفاده از pH بالا (بالاتر از ۱۰/۵) و یا پایین (پایین تر از ۳/۵) و به دنبال آن سانتریفیوژ کردن برای تفکیک پروتئین محلول از ضایعات باقی مانده می باشد و در نهایت پروتئین محلول با استفاده از ترسیب ایزوالکتریک (عموما pH ۵/۵) استخراج می‌گردد

(Abdollahi *et al.*, 2017). پروتئین ایزوله شده ماهی به روش تغییر pH یک محصول حد واسط با ارزش تغذیه‌ای مناسب است که دارای درصد بسیار پایین چربی و درصد بسیار بالای پروتئین می‌باشد که می‌تواند به عنوان اتصال‌دهنده (بایندر)، مرطوب‌کننده، ایجادکننده کف و امولسیون‌کننده و یا جهت غنی‌سازی محصولات غذایی مختلف به کار برده شود. در پژوهش حاضر نیز، پروتئین ایزوله از ضایعات ماهی کپور علفخوار با نام علمی *(Ctenopharyngodon idella)* در pH های مختلف اسیدی و قلیایی به روش تغییر pH استخراج گردیده و خواص کاربردی محصولات تولید شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲.مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه ماده اولیه

در پژوهش حاضر ابتدا تعدادی ماهی کپور علفخوار تازه صید شده با میانگین وزنی حدود ۱ کیلوگرم از بازار ماهی‌فروشان تهیه شده و به صورت منجمد در جعبه‌های یونولیتی حاوی یخ (نسبت یخ به ماهی ۳:۱) در کوتاه‌ترین زمان به آزمایشگاه محل انجام آزمایش انتقال یافتند. ماهی‌ها پس از شستشوی کامل با آب، به روش دستی فیله شده و ضایعات حاصل از فیله (شامل سر، باله‌ها و ستون فقرات) با استفاده از چرخ گوشت به طور کامل چرخ شدند. سپس ضایعات چرخ شده در بسته‌های پلی‌اتیلنی بسته‌بندی شده و تا زمان انجام آزمایشات در فریزر (۲۰- درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند.

۲-۲- تولید پروتئین ایزوله به روش تغییر pH:

تولید پروتئین ایزوله از ضایعات به روش Abdollahi و همکاران (2020) با تغییرات اندک صورت گرفت. بدین منظور ابتدا ۱۰۰ گرم از ضایعات چرخ شده، پس از خروج از فریزر و انجمادزدائی در یخچال، با ۶ برابر حجمی آب مقطر سرد مخلوط شده و با استفاده از دستگاه هموژنایزر به مدت ۲ دقیقه به طور کامل هموژن شدند. سپس با استفاده دستگاه pH متر و افزودن تدریجی محلول‌های اسیدکلریدریک و هیدروکسید سدیم ۲ مولار، pH محلول با توجه به تیمارهای تعریف شده به pH اسیدی (۲ ، ۲/۵ ، ۳) یا قلیایی (۱۱/۵ ، ۱۲ ،۱۲/۵) رسانده شد. پس از تنظیم pH، ظرف حاوی نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در یک ظرف حاوی یخ انکوبه شد. سپس نمونه‌ها با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار با دور ۸۵۰۰ g و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از طی مدت زمان سانتریفیوز، لایه محلول میانی که حاوی پروتئین می‌باشد با استفاده از سمپلر و یا سرنگ، از لایه چربی (فاز بالائی) و لایه رسوب (فاز پائینی) جداگردید. سپس pH محلول جداسازی شده به pH ایزوالکتریک (۵/۵) رسانده شد تا پروتئین‌ها رسوب نمایند. پس از تنظیم pH مجددا ظرف حاوی نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در یک ظرف حاوی یخ انکوبه شده و سپس با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۸۵۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و در نهایت در این مرحله فاز رسوب که به عنوان پروتئین ایزوله می‌باشد جداسازی شد. نمونه‌های پروتئین ایزوله با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (فریز درایر) خشک شده و تا زمان استفاده جهت انجام آزمایشات آتی، در فریزر (۲۰- درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند.

۲-۳- سنجش ظرفیت جذب آب

برای اندازه‌گیری ظرفیت جذب آب، ابتدا ۱ گرم از هر پودر پروتئین (WInitial) در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط بر روی همزن قرار گرفت تا به طور کامل مخلوط شود. در ادامه مخلوط پودر پروتئین و آب مقطر به مدت ۲۰ دقیقه با درو ۶۰۰۰ g سانتریفیوز شدند و فاز آب بالایی به طور کامل خارج گردیده و نمونه مرطوب نهایی وزن گردید (W secondary). ظرفیت جذب آب با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Sethi et al., 2021).

$$\text{Water Absorption Capacity} = \frac{\mathbf{W\ secondary - W}\ \boldsymbol{initial}}{\mathbf{W}\ \boldsymbol{initial}} \times \boldsymbol{100}$$

۳.نتایج و بحث

نتایج حاصل از بررسی ظرفیت جذب آب پروتئین‌های ایزوله ضایعات ماهی کپور علفخوار که به روش تغییر pH و در pH های مختلف اسیدی و قلیایی استخراج گردیدند در جدول ۱ گزارش گردیده است.

جدول ۱: ظرفیت جذب آب پروتئین ایزوله ضایعات ماهی کپور علفخوار حاصل از pH های مختلف اسیدی و قلیایی

pH	۲	۲/۵	۳	۱۱/۵	۱۲	۱۲/۵
ظرفیت جذب آب (٪)	۹/۷۶± ۰/۷۴^{d}	۱۲/۸۷± ۰/۱۸^{c}	۱۴/۲۲± ۰/۱۶^{b}	۱۵/۵۷± ۰/۲۲^{a}	۱۵/۶۵± ۰/۵۲^{a}	۱۴/۴۶±۰/۳۲^{b}

تمامی داده‌ها حاصل سه تکرار بوده و حروف متفاوت در هر سطر نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها می‌باشد (p<۰/۰۵)

با توجه به نتایج، ظرفیت جذب آب پروتئین‌های تهیه شده به روش قلیایی به طور معنی‌داری نسبت به نمونه‌های حاصل از روش اسیدی بالاتر بود (p<۰/۰۵) که همراستا با نتایج پژوهش Sethi و همکاران (2021) درمورد بررسی ظرفیت جذب آب پروتئین ایزوله استخراج شده از Lathyrus sativus به روش تغییر pH می‌باشد. این محققین بیان کردند که بالاتر بودن درصد ظرفیت جذب آب پروتئین‌های حاصل از pH قلیایی می‌تواند مرتبط با تعامل بین پروتئین و آب باشد که در محیط‌های قلیایی تقویت می‌شود و منجر به بهبود حلالیت پروتئین‌ها در آب در شرایط قلیایی می‌گردد (Hultin et al., 2001). همچنین تفاوت نتایج پژوهش‌های مختلف درمورد مقادیر ظرفیت اتصال پروتئین‌های ایزوله به آب را می‌توان به تفاوت در روش تهیه، متغیرهای فرآیند استخراج و ویژگی‌های ساختاری و پایداری پروتئین‌های ماده اولیه نسبت داد (Lqari et al.2002).

در مجموع می‌توان بیان نمود که روش تغییر pH یک روش کارآمد جهت استخراج پروتئین از ضایعات حاصل از فرآوری آبزیان بوده و pH های متفاوت استخراج نیز می‌توانند محصولاتی با خصوصیات متفاوت تولید نمایند.

منابع

7. Abdollahi, M., Olofsson, E., Zhang, J., Alminger, M., Undeland, I. 2020. Minimizing lipid oxidation during pH-shift processing of fish by-products by cross-processing with lingonberry press cake, shrimp shells or brown seaweed. Food Chemistry. 327: 127078.
8. Abdollahi, M., Rezaei, M., Jafarpour, A., & Undeland, I. 2017. Dynamic rheological, microstructural and physicochemical properties of blend fish protein recovered from kilka (*Clupeonella cultriventris*) and silver

carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by the pH-shift process or washing-based technology. Food Chemistry, 229: 695–709.

9. Hultin, H.O., Kelleher, S.D., Feng, Y., Richards, M.P., Kristinsson, H., Undeland, I., Ke, S. 2001. High efficiency protein extraction. Google patents.

10. Lqari, H., Vioque, J., Pedroche, J. and Millán, F., 2002. *Lupinus angustifolius* protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization. Food Chemistry, 76(3). 349-356.

11. Sethi, S., Yadav, D.N., Snigdha, S. and Gupta, A., 2021. Optimization of process parameters for extraction of protein isolates from Khesari dhal (*Lathyrus sativus* L). LWT, 137, p.110368.

Evaluation of oxidation inhibition of fish waste oil treated with Padina macroalgae extract

Sedigheh Babaei[1]*; Nesa Mousavipour[2]; Marzieh Moosavi-Nasab[3]; Behrooz Mohammadzadeh[4]

1. Assistant Professor, Department of Natural Resources and Environmental Engineering, School of Agriculture, Shiraz University

2. Master student of Fisheries Products Processing, Department of Natural Resources and Environmental Engineering, School of Agriculture, Shiraz University

3. Professor of Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Shiraz University

4.Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University

**Babaei.Sedigheh@gmail.com*

Abstract

In this study, the effect of antioxidant property of brown macroalga *Padina* sp. hot water extract on the prevention of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) viscera oil oxidation at 30°C in a 42-day period, was investigated. The treatments were conducted as a control group (fish oil without preservative), fish oil containing 100 ppm of BHT, and fish oil containing 1000 ppm of aqueous extract of Padina. The results of peroxide value, FFA, and L*a*b* value indicated that the oil containing Padina extract delayed the oxidation compared to the control group, although it showed a relatively lower efficacy compared to the BHT. The Padina treatment showed the highest values of peroxide and FFA value on the 35th day which were 34.3 meqo2/kg and 4.5%, respectively. While, the BHT treatment showed 30.3 meqo2/kg and 4.2% for peroxide and FFA value at the end of the experiment, respectively. The results of L* a* b* have not shown a significant difference during the storage period. In general, the results of this study showed that Padina hot water extract as a natural antioxidant delayed the primary spoilage (peroxide value) for 1 week and can be offered in the feed and aquaculture industry.

Keywords: Algae extraction, Fish oil, Natural antioxidant, Persian Gulf, BHT

بررسی مهار اکسیداسیون روغن ضایعات ماهی تیمار شده با عصاره ماکروجلبک دریایی پادینا

صدیقه بابایی[۱*]؛ نسا موسوی پور[۲]؛ مرضیه موسوی نسب[۳]؛ بهروز محمدزاده[۴]

۱-استادیار، بخش مهندسی منابع طبیعی و محیط زیست، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۲-دانش آموخته، بخش مهندسی منابع طبیعی و محیط زیست، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۳-استاد، بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۴-استادیار، گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس

Babaei.Sedigheh@gmail.com*

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی اثر آنتی اکسیدانی عصاره آب داغ ماکروجلبک قهوه ای پادینا بر اکسیداسیون روغن حاصل از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در یک دوره‌ی ۴۲ روزه و دمای ۱ ± ۳۰ درجه سلسیوس انجام گرفت. تیمارها به ترتیب شامل کنترل (روغن ماهی بدون نگهدارنده)، روغن ماهی حاوی BHT ۱۰۰ ppm و روغن ماهی حاوی ۱۰۰۰ ppm عصاره آبی جلبک پادینا بودند. نتایج آزمون‌های فساد شاخص پراکساید، اسیدهای چرب آزاد FFA و شاخص L*a*b* نشان داد که روغن حاوی عصاره جلبکی نسبت به تیمار کنترل باعث تاخیر در فساد اکسیداسیون شده است و نسبت به روغن حاوی BHT در برخی تست‌ها عملکرد نسبتا مشابه داشته است. نتایج آزمون‌های پراکساید و FFA در تیمار پادینا به ترتیب ۳۴/۳ $meqo_2/kg$ و ۴/۵ درصد اولئیک اسید در روز ۳۵، و در تیمار BHT در انتهای دوره به ترتیب ۳۰/۳ $meqo_2/kg$ و ۴/۲ درصد اولئیک اسید در بالاترین مقدار بود. نتایج مربوط به شاخص رنگ L* a* b* روند مشخصی را در تیمارها نشان نداده و به لحاظ آماری معنادار نبوده است. بطور کلی نتایج این تحقیق نشان داد عصاره آب داغ جلبک دریایی قهوه ای پادینا بعنوان یک پاداکسنده طبیعی به مدت ۱ هفته فساد اولیه (شاخص پراکساید) را به تاخیر انداخته و مانع از افزایش تولید FFA در روغن پسماند ماهی شده است، لذا می‌تواند بعنوان یک نگهدارنده طبیعی در نگهداری روغن آبزیان پیشنهاد گردد.

واژگان کلیدی: عصاره جلبکی، روغن ماهی، آنتی اکسیدان طبیعی، خلیج فارس، BHT

۱.مقدمه

در فرآیند تهیه فیله ماهی از ماهی تازه تا ۶۰ درصد از ضایعات ماهیان ازجمله سر، پوست، حاشیه‌ها و استخوان‌ها جداشده و به‌طور کلی به‌عنوان زباله تلقی می‌شود؛ که این پسماندها پتانسیل عظیمی از فرآورده‌های فرعی دریایی برای تولید روغن ماهی و امگا ۳ می‌باشند (Ghaly, 2013). به همین جهت، توسعه تولید امگا-۳ از ماهیان از طریق این پسماندها، قادر به بازیابی و انتقال مواد مغذی ضروری از دریا به زنجیره غذایی انسان با مزایای اقتصادی، زیست‌محیطی و بهداشتی

می‌باشد(Ciriminna *et al.*, 2019). اسیدهای چرب غیراشباع در روغن ماهی در طول ذخیره‌سازی مواد خام، پردازش و عملیات حرارتی محصولات نهایی می‌تواند به‌راحتی توسط نور، درجه حرارت بالا، اکسیژن فعال و پرواکسیدان‌ها، اکسید شوند و سبب ترشیدگی، افت کیفیت در رنگ، طعم، بافت و ایمنی محصولات غذایی شوند (Yue *et al.*, 2008). لذا به‌منظور افزایش پایداری این چربی‌ها، پاداکسنده‌ها مورداستفاده قرار می‌گیرند.

در حال حاضر برای مهار اکسیداسیون روغن ماهی پاداکسنده‌های مصنوعی ازجمله: الفاتوکوفرول استات، TBHQ، BHA، BHT و EDTA مورداستفاده قرار می‌گیرند. این در حالی است که بسیاری از ترکیبات طبیعی خواص پاداکسندگی مشابه دارند. همچنین، تحقیقات سم‌شناسان و متخصصان تغذیه، برخی اثرات مضر از مصرف این ترکیبات مصنوعی را نشان داده‌اند علاوه بر این استفاده از این مواد شیمیایی مصنوعی توسط FDA به دلیل نگرانی در مورد ایمنی مواد غذایی محدودشده است (Yue *et al.*, 2008). پاداکسنده‌های مصنوعی حتی می‌توانند اثرات بالقوه مضر پس از مصرف طولانی‌مدت بر سلامت مصرف‌کننده داشته باشند و همین مسئله موجب نگرانی مصرف‌کنندگان از تأثیرات بالقوه مواد افزودنی مصنوعی شده است (Gachkar *et al.*, 2007).

پاداکسنده‌های طبیعی شامل پاداکسنده‌های آنزیمی و غیر آنزیمی می‌باشد. از پاداکسنده‌های غیر آنزیمی می‌توان ویتامین‌ها، کو فاکتورها، فنولیک‌اسیدها، کاروتنوئیدها و غیره را نام برد (Carocho & Ferreira, 2013) که ترکیبات فنولی (مانند گالیک اسید، کاتچین، کوماریک اسید، مریستین، کافئیک و ...) در ساختار بسیاری از عصاره‌های گیاهی و جلبکی یافت می‌شوند (López et al., 2011؛ ابراهیمی، ۱۳۹۸). این ترکیبات زیست فعال می‌توانند در مواد غذایی، دارویی و محصولات آرایشی استفاده شوند (Yip *et al.*, 2014). در ایران بسیاری از تحقیقات پیرامون ترکیبات پاداکسنده موجود در گیاهان انجام شده است ولی در رابطه با جلبک‌ها این تحقیقات کم و محدود بوده‌اند. ترکیبات فنولی گروه مهمی از ترکیبات شیمیایی موجود در جلبک دریایی هستند که از نظر کمی و کیفی برای هر نمونه جلبک دریایی قرمز، قهوه‌ای و سبز متفاوت هستند (Rodrigues et al., 2015). مطالعات متعددی بر روی خواص پاداکسنده ماکرو جلبک‌های مختلف صورت گرفته است. تحقیقات نشان داده ماکروجلبک Saragassum illicifolium دارای خاصیت پاداکسندگی و ضد میکروبی می‌باشد (پارسا زاده و همکاران، ۱۳۹۷)، همچنین گزارش‌شده است که عصاره آبی و اتانولی ماکرو جلبک Saragassum boveanum دارای ترکیبات فنولی فراوان می‌باشد (Rastian *et al.*, 2007) که می‌تواند پتانسیل پاداکسندگی مناسبی داشته باشد. در بررسی خواص پاداکسندگی دو گونه ماکرو جلبک سواحل نیوزلند .Champia sp., Porphyra sp در ۶۰ درجه سلسیوس و طی ۱۲ روز، اثر پاداکسندگی قوی این دو گونه بر ماندگاری روغن ماهی اثبات‌شده است (Kindleysides et al., 2012). لذا در این تحقیق سعی بر آن است از عصاره آبی ماکرو جلبک‌های بومی خلیج‌فارس .Padina sp در نگهداری روغن ماهی استحصال‌شده از پسماند ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Oncorhynchus mykiss)، به‌منظور جلوگیری از فساد اکسیداسیونی آن استفاده شود.

۲.مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه مواد خام

امعاء و احشا ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به صورت تازه از فروشگاه ماهی فروشی، به صورت روزانه تهیه شدند و بعد از انتقال به آزمایشگاه کاملا از وجود خون و سایر اجزاء پاکسازی و پس از شستشو و آب‌گیری کامل بسته‌بندی و در فریزر با دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار داده شد. جهت استخراج روغن از پسماند ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، از روش طراحی شده توسط وفا و همکاران استفاده شد (وفا و همکاران، ۱۳۹۷). ماکروجلبک پادینا از شرکت توسعه ذخایر زیستی جلبک (از سواحل بوشهر) تهیه گردید. ماکروجلبک‌ها تمیز و سپس

چند مرحله با آب شیرین شستشو و در آون در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. سپس با آسیاب (یا مخلوط کن) پودر و در کیسه‌های پلاستیکی در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتیگراد نگه‌داری گردید.

۲-۲- استخراج عصاره آبی از جلبک

جهت عصاره‌گیری، ۱۰ گرم پودر جلبک در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر (1:20 W:V) مخلوط و در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد (Yang et al., 2017)، پس از خنک شدن عصاره آبی را از جلبک‌ها فیلتر شده و در دمای ۴۰ درجه سلسیوس در آون خشک شدند. سپس عصاره خشک شده در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند.

۲-۳- تیمارها

تیمارهای این آزمایش به ترتیب زیر آماده سازی شدند:

تیمار اول: روغن ماهی بدون نگهدارنده

تیمار دوم: روغن ماهی + نگهدارنده تجاری (BHT دوز ۱۰۰ ppm) (Yeşilsu et al., 2013)

تیمار سوم: روغن ماهی + ۱۰۰۰ ppm عصاره آبی جلبک پادینا

برای آماده سازی تیمارها، ابتدا روغن ماهی به میزان مورد نیاز توزین شد سپس عصاره جلبک و BHT به‌طور جداگانه توزین شدند و با هموژنایزر با نمونه روغن هموژن شد. هرکدام از آن‌ها را به‌طور مساوی درون لوله‌های آزمایش اضافه شدند و پس از پوشانده شدن کامل با فویل آلومینیوم، بدون درب، درون انکوباتور در دمای ۱ ±۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. شاخص‌های فساد چربی طی یک دوره زمانی ۴۲ روزه در فواصل زمانی ۷ روز به صورت سه تکرار از هر تیمار بررسی شدند (Chatterjee and Bhattacharjee, 2013).

۲-۴- اندازه‌گیری شاخص پراکسید

۱ گرم از نمونه روغن از هر تیمار، در یک ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد سپس به آن ۱۰ میلی‌لیتر مخلوط کلروفرم و استیک اسید (به نسبت ۲ به ۳ به ترتیب) و ۰/۵ میلی‌لیتر یدور پتاسیم اشباع اضافه شد و به مدت ۱ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. سپس ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر و چند قطره چسب نشاسته اضافه شد و تا شفاف شدن رنگ نمونه‌ها، با محلول تیوسولفات ۰/۱ نرمال تیتر شد. میزان پراکساید هر یک از نمونه‌ها به کمک فرمول زیر محاسبه شد. برای تهیه چسب نشاسته ابتدا ۱ گرم نشاسته در ۱۰ سی‌سی آب مقطر سرد حل شد. سپس ۳۸ سی‌سی آب مقطر در حال جوش به آن اضافه شد و پس از به جوش آمدن از روی حرارت برداشته شد (AOCS, 2000).

$$H_2O_2(\text{meq } O_2/\text{kg oil}) = \frac{\text{حجم تیتراسیون مصرفی}(ml) \times \text{نرمالیته تیوسولفات} \times ۱۰۰۰}{\text{حجم نمونه}}$$

۲-۵- اندازه‌گیری شاخص اسیدهای چرب آزاد

در این روش ۰/۵ گرم روغن در ۱۵ سی‌سی الکل خنثی‌شده حل شد سپس چند قطره معرف فنول فتالئین برای خنثی کردن الکل به محلول اضافه شد و تا زمانی که رنگ مخلوط الکل و روغن به صورتی تغییر کند با سود ۰/۱ نرمال تیتر شد سپس به کمک رابطه‌ی زیر میزان اسیدهای چرب آزاد محاسبه شد (Egan et al., 1997).

$$FFA\ (mg/g) = \frac{\text{حجم سود ممصرفی (ml)} \times \text{نرمالیته سود} \times 28/2}{\text{وزن چربی (g)}}$$

۲-۶- ارزیابی رنگ روغن با روش L* a* b*

شاخص رنگ L* بیانگر میزان روشنایی بوده و از صفر تا ۱۰۰ متغیر می‌باشد که صفر ضریب تاریکی و ۱۰۰ بالاترین میزان سفیدی است. شاخص رنگ a* نشان دهنده‌ی طیف رنگی از قرمز تا سبز و شاخص رنگ b* نشانگر طیف رنگی از آبی تا زرد است. a* و b* دو طیف رنگی کروماتیک می‌باشند که مقادیری بین ۱۲۰- الی ۱۲۰+ را شامل می‌شوند. که با دستگاه رنگ سنج (MAT 2000 ایرانیان طب بارز، ایران)، اندازه‌گیری شد. ۹ نقطه از هر نمونه بطور تصادفی انتخاب و شاخص‌های L*،a* و b* آن قرائت شد.

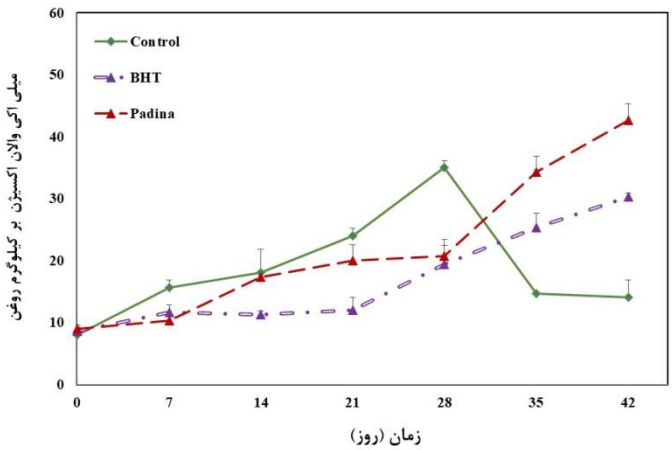
۲-۷- تجزیه و تحلیل آماری داده ها

ابتدا بعد از بررسی نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از روش تجزیه واریانس یک طرفه (One – Way ANOVA) انجام گرفت. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون آماری دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد استفاده شد. برای مقایسه هریک از شاخص‌های کیفی چربی با استانداردهای تعیین شده از آزمون One sample t-test استفاده شد. از نرم‌افزار SPSS برای آنالیز آماری و از نرم‌افزار Excel برای رسم نمودارها استفاده گردید.

۳. نتایج و بحث

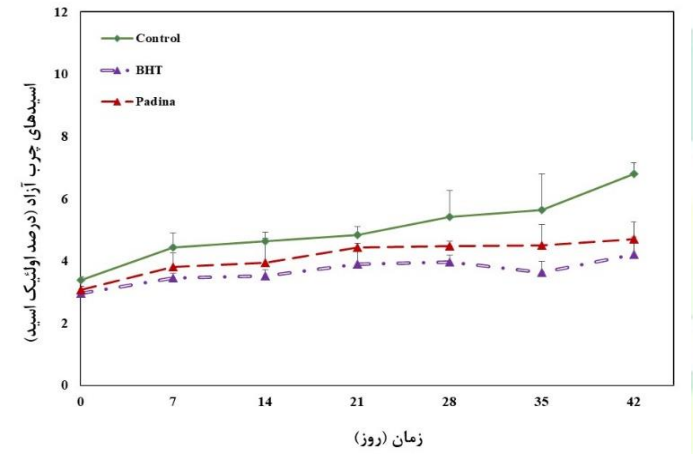
۳-۱- شاخص پراکسید (PV) و اسیدهای چرب آزاد (FFA)

عدد پراکسید نشان‌دهنده محتوای کل هیدروپراکسیدها می‌باشد. هیدروپراکسیدها محصولات اولیه اکسیداسیون هستند و فاقد طعم و بو هستند اما به‌سرعت منجر به تشکیل مواد غیر واکنشی مانند آلدهیدها، الکل‌ها، اسیدها و کتون‌ها می‌شوند که با طعم و بوی نامطبوع، مهم‌ترین علت بدتر شدن کیفیت روغن هستند (Jamshidi et al., 2020). نتایج مربوط به PV در شکل ۱ نشان داده شده است. بطور کلی روند تغییرات عدد پراکسید تمام نمونه‌ها، در طی دوره نگهداری به‌تدریج افزایش یافته و سپس در برخی تیمارها روند کاهشی داشته است. در بین تیمارها، گروه کنترل در زمان زودتری به نقطه اوج خود رسیده (۳۵ meqo2/kg) و زودتر از تیمارهای دیگر وارد فساد ثانویه شده است. تیمار پادینا و BHT روند افزایشی را تا انتهای دوره، روز ۴۲ نشان داده‌اند. حد مجاز میزان این شاخص برای روغن‌های خوراکی مورد مصرف انسان کمتر از ۱۰ و برای مصارف دام کمتر از ۲۰ (میلی‌اکی والان گرم اکسیژن/ کیلوگرم روغن) گزارش شده است (Deepika et al., 2014; Uçak et al., 2011). بررسی اختلاف پراکساید در هر یک از تیمارها با استانداردهای تعریف شده، به کمک آزمون One sample t-test نشان داد تیمار کنترل در روز ۱۴، تیمار پادینا در روز ۲۱ و تیمار BHT در روز ۲۸ از حد استاندارد خارج شده بود (P<۰/۰۵).



شکل۱: شاخص پراکسید روغن پسماند ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تاثیر تیمارهای مختلف: Padina: عصاره پادینا، Control: گروه کنترل (بدون هیچ نگهدارنده) و آنتی‌اکسیدان صنعتی BHT و در دمای ۱ ± ۳۰ درجه سلسیوس. نتایج میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد.

هیدرولیز لیپید یک واکنش آنزیمی است که توسط لیپاز کاتالیز می‌شود و FFAها را در طول نگهداری به وجود می‌آورد (Gokoglu et al., 2012). روند تغییرات FFA در شکل ۲ گزارش شده است. تیمار کنترل مقادیر بالایی از FFAها را تا انتهای دوره نشان می دهد. حد مجاز اسیدهای چرب آزاد برای روغن ماهی خام در محدوده ۱-۷٪ اولئیک اسید و معمولاً ۲-۵ ٪ اولئیک اسید گزارش شده است (Dave *et al.*, 2014). بررسی اختلاف FFA در هر یک از تیمارها با استاندارد تعریف شده به کمک آزمون One sample t-test نشان می‌دهد تیمار کنترل تا روز ۲۸ نگهداری با حد مجاز اختلاف معنادار داشت و از آن کمتر بود درحالی که باقی تیمارها تا روز ۴۲ بطور معناداری کمتر از حد مجاز بودند.



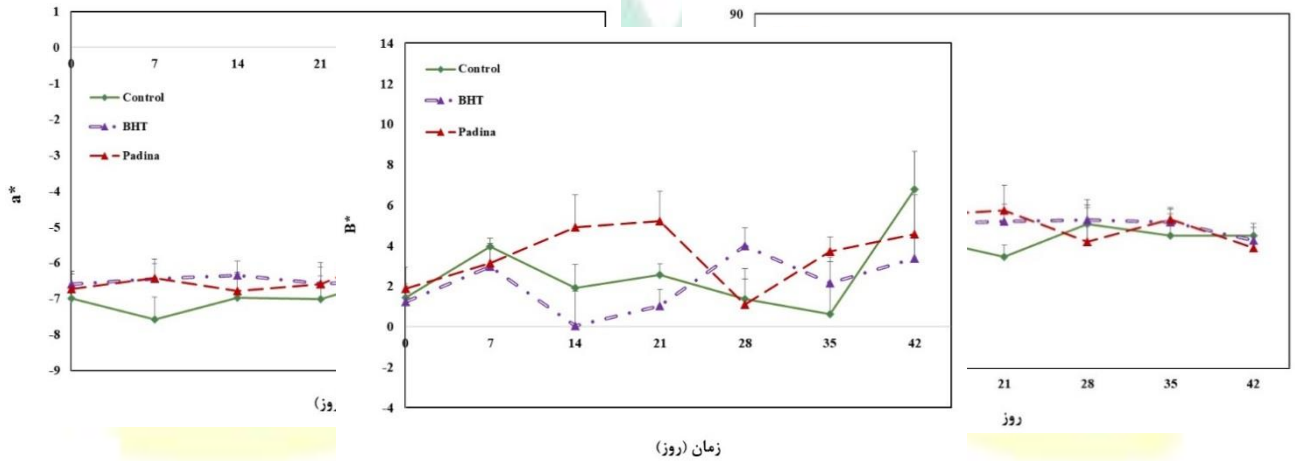
شکل ۲: شاخص FFA روغن پسماند ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تاثیر تیمارهای مختلف: Padina: عصاره پادینا، Control: گروه کنترل (بدون هیچ نگهدارنده) و آنتی‌اکسیدان صنعتی BHT و در دمای ۱ ± ۳۰ درجه سلسیوس. نتایج میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد.

نتایج تحقیقات پیشین از جمله؛ عصاره‌های جلبکی در حفظ و نگهداری روغن در جهان کار شده است. برای مثال بررسی عصاره‌های دو جلبک قهوه‌ای Ecklonia radiate و Macrocystis pyrifera و دو گونه قرمز Champia sp و Porphyra sp. بر نگهداری روغن ماهی هوکی Macruronus novaezelandiae در دمای ۶۰ درجه و طی ۱۲ روز نشان‌داد جلبک‌های قهوه‌ای ظرفیت پاداکسندگی بهتری نسبت به گونه‌های جلبک دریایی قرمز داشتند و عصاره جلبک E. radiata، برای استفاده به‌عنوان پاداکسنده در محصولات روغن ماهی عمکرد بهتری دارد (Kindleysides et al., 2012)، عصاره متانولی جلبک Caulerpa sertularoides در روغن ماهی منهدن در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و در زمان ۳ و ۲۴ ساعت (Santoso *et al.*, 2004) همچنین عصاره متانولی جلبک Hizikia fusiformis در دمای ۶۰ درجه سلسیوس و طی ۱۲ روز در روغن ماهی (Siriwardhana et al., 2004) تاثیر مثبت عصاره های جلبکی را بر ماندگاری روغن تایید می‌کند و با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت. نتایج حاصل از این بررسی‌های انجام شده نشان داد پلی‌فنول‌های موجود در عصاره های جلبکی می‌توانند با دادن یک هیدروژن به رادیکال‌های پراکسید چربی، رادیکال‌های پایدارتری مانند فنوکسیل و هیدروپراکسید سیس و

ترانس که کم اثرتر هستند را تولید کنند همچنین ترکیبات فنولی می‌توانند با انتقال الکترون منفرد به رادیکال‌های پراکسید، آن‌ها را بی اثر کنند (Womeni et al., 2016; Ou et al., 2002). همچنین وجود ترکیبات زیست فعال مختلفی مانند؛ گروه‌های سولفات، ویتامین E، پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها، پپتیدها و همچنین رنگدانه‌ها در عصاره‌های جلبکی دارای خاصیت مهار رادیکال آزاد و فعالیت پاداکسندگی هستند و می‌توانند باعث تاخیر در شروع و پیشرفت اکسیداسیون چربی و تجزیه‌ی هیدروپراکسیدها در مواد غذایی شوند (Fernando et al., 2016).

۳-۲- شاخص L*a*b*

نتایج مربوط به شاخص‌های رنگ L*a*b*، در شکل ۳ نمایش داده شده است. شاخص L*، b* و a* دارای نوساناتی در کل دوره بود و روند مشخصی در یک تیمار نداشته است. شاخص a* در نمونه کنترل با پیشرفت اکسیداسیون افزایش یافت که نشان دهنده پیشرفت اکسیداسیون اولیه است و با مطالعه‌ی Sabzipour و همکاران (۲۰۱۹) بر روی روغن پسماند ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و Shabanpour و همکاران (۲۰۱۶) بر روی فیله‌ی ماهی کپور، مطابقت داشت (Shabanpour *et al*., 2016; Sabzipour *et al*., 2019). همچنین شاخص‌های L*a*b* در مطالعه‌ی شعبانپور و همکاران (۱۳۹۲) بر روی ناگت قزل‌آلای رنگین کمان نشان داد که، با گذشت زمان شاخص L* کاهش و دو شاخص b* و a* افزایش پیدا کرد.



شکل ۳: شاخص‌های رنگ L*a*b* روغن پسماند ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تاثیر تیمارهای مختلف: Padina: عصاره پادینا، Control: گروه کنترل (بدون هیچ نگهدارنده) و آنتی‌اکسیدان صنعتی BHT و در دمای ۱ ± ۳۰ درجه سلسیوس. نتایج میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می‌باشد.

۴. نتیجه‌گیری

از ماکروجلبک‌ها در زیستگاه‌های پیچیده با شرایطی که منجر به تشکیل رادیکال‌های آزاد و دیگر عوامل اکسید کننده می‌شود، زندگی می‌کنند. با این حال، عدم وجود ساختار و خسارت ناشی از فوتودینامیک نشان می‌دهد که، سلول‌های آن‌ها دارای مکانیسمی جهت سازگاری سریع و تولید متابولیت‌های ثانویه مانند پلی‌فنول‌ها، رنگدانه‌ها و پلی‌ساکاریدهای سولفاته است که آن‌ها را در برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند. در مطالعه حاضر نشان داده شده است که عصاره جلبکی پادینا می تواند بعنوان یک پاداکسنده طبیعی در نگهداری روغن ماهی استفاده گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله، نویسندگان از همکاری پرسنل محترم آزمایشگاه شیلات، مرکز پژوهشی فرآوری آبزیان و بخش علوم و صنایع غذایی دانشگاه شیراز، تشکر و سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

۱۷. ابراهیمی، شیما. ۱۳۹۸. ویژگی‌های پاداکسندگی، ضدباکتریایی و فنول کل عصاره‌های ماکروجلبک‌های خلیج فارس (Sargassum sp.، Padina sp. و Caulerpa sp.) پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی. دانشگاه شیراز.

۱۸. پارسا زاده، م. خدادادی، م. تدینی، م. ۱۳۹۷. استخراج پروتئین از جلبک قهوه‌ای و بررسی خصوصیات عملکردی آن. علوم و صنایع غذایی، ۸۲(۱۵)، ۱۰۵-۱۱۸.

۱۹. وفا، س. ناصری، م. وفایی، م. ۱۳۹۷. تأثیر روش‌های مختلف استخراج بر کیفیت و کمیت روغن ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus. mykiss*) فصلنامه‌ی علوم و صنایع غذایی، ۷۴(۱۵)، ۲۲۹ -۳۱۲.

20. AOCS. 2000. Official methods and recommended practices of the American oil chemists' society, 5th ed. USA, AOCS Press, Champaign, Illinois.

21. Carocho M., and Ferreira I. C. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food and chemical toxicology, 51: 15-25.

22. Chatterjee D., and Bhattacharjee P. 2013. Comparative evaluation of the antioxidant efficacy of encapsulated and un-encapsulated eugenol-rich clove extracts in soybean oil : Shelf-life and frying stability of soybean oil. Journal of Food Engineering, 117(4): 545–550.

23. Ciriminna R., Scurria A., Avellone G., and Pagliaro M. 2019. A Circular Economy Approach to Fish Oil Extraction. ChemistrySelect, 4(17): 5106–5109.

24. Dave D., Ramakrishnan V.V., Trenholm S., Manuel H., Pohling J., Murphy W. 2014. Marine oils as potential feedstock for biodiesel production: physicochemical characterization. Journal of Bioprocessing and Biotechniques 4(5): 1.

25. Deepika D., Vegneshwaran V. R., Julia P., Sukhinder K. C., Sheila T., Heather M., and Wade M. 2014. Investigation on oil extraction methods and its influence on omega-3 content from cultured salmon. Journal of Food Processing and Technology, 5(12): 140–159.

26. Egan H., Kirk R.S., and Sawyer R. 1997. Pearson's Chemical Analysis of Food, 9th Ed Churchill Livingstone, Edinburgh, UK. Pp. 609–634.

27. Fernando I. P. S., Kim M., Son K.T., Jeong Y., and Jeon, Y.J. 2016. Antioxidant activity of marine algal polyphenolic compounds: A Mechanistic Approach. Journal of Medicinal Food, 19(7): 615–628.
28. Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M. B., Taghizadeh M., Astaneh S. A., and Rasooli I. 2007. Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils. Food chemistry, 102(3): 898-904.
29. Ghaly A. 2013. Microbial andamp; Biochemical technology fish processing wastes as a potential source of proteins, amino acids and oils: a critical review. j microb biochem technol amino acids and oils: a critical review. Microb Biochem Technol, 54172(5): 107–129.
30. Gokoglu N., Yerlikaya P., Topuz O. K., and Buyukbenli H.A. 2012. Effects of Plant Extracts on Lipid Oxidation in Fish Croquette during Frozen Storage. Food science and biotechnology, 21(6): 1641–1645.
31. Jamshidi A., Cao H., Xiao J., and Simal-Gandara J. 2020. Advantages of techniques to fortify food products with the benefits of fish oil. Food Research International, 137: 109353.
32. Kindleysides S., Quek S., and Miller M.R. 2012. Inhibition of fish oil oxidation and the radical scavenging activity of New Zealand seaweed extracts. Food Chemistry, 133(4): 1624–1631.
33. Kindleysides S., Quek S., and Miller M.R. 2012. Inhibition of fish oil oxidation and the radical scavenging activity of New Zealand seaweed extracts. Food Chemistry, 133(4): 1624–1631.
34. López A., Rico M., Rivero A., and de Tangil M.S. 2011. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of Stypocaulon scoparium algae extracts. Food Chemistry, 125(3): 1104-1109.
35. Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J.A., and Deemer E.K. 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. Journal of Agricultural And Food Chemistry, 50(11): 3122–3128.
36. Rastian Z., Mehranian M., Vahabzadeh F., Sartavi K. 2007. Antioxidant activity of extract from a brown alga, *Sargassum boveanum*. African Journal of Biotechnology 6(24): 2740–2745.
37. Rodrigues D., Freitas A. C., Pereira L., Rocha-santos T.A. P., Vasconcelos M.W., Roriz M., and Duarte A.C. 2015. Chemical composition of red , brown and green macroalgae from buarcos bay in central west coast of portugal. food chemistry, 183: 197–207.
38. Sabzipour F., Naseri M., Babaei S., and Imani A. 2019. Effect of various postmortem processing times and blanching methods on quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) waste oil. Food Science and Nutrition, 7(9): 3093–3102.
39. Shabanpour B., Asghari M., Heydari S., Baee H., Ghorbani A., and Jafar A. 2016. Comparing of qualitative changes among the carps culturing in a pond, an under controlled place and marine carp during refrigeration. Journal of animal research (Iranian journal of biology), 28 (4): 466-480.
40. Siriwardhana N., Lee K.W., Kim S. H., Ha, J.H., Park G.T., Jeon Y.J., 2004. Lipid peroxidation inhibitory effects of Hizikia fusiformis methanolic extract on fish oil and linoleic acid. Food Science and Technology International 10(2): 65-72.
41. Uçak İ., Özogul Y., and Durmuş M. 2011. The effects of rosemary extract combination with vacuum packing on the quality changes of Atlantic mackerel fish burgers. International Journal of Food Science and Technology, 46(6): 1157–1163.
42. Womeni H. M., Djikeng F.T., Anjaneyulu B., Karuna M.S.L., Prasad R.B.N., and Linder M. 2016. Oxidative stabilization of RBD palm olein under forced storage conditions by old Cameroonian green tea leaves methanolic extract. NFS journal, 3(8): 33-40.
43. Yang T.-H., Yao, H.-T., and Chiang M.-T. 2017. Red algae (*Gelidium amansii*) hot-water extract ameliorates lipid metabolism in hamsters fed a high-fat diet. Journal of Food and Drug Analysis, 25(4): 931–938.
44. Yeşilsu A. F., and Özyurt G. 2013. Su ürünlerinin kalite ve güvenliği için türkiye ve dünyada uygulanan mevzuatlar. Journal Fisheries sciences. 7(1): 58-71.
45. Yip W.H., Joe L.S., Mustapha W.A.W., Maskat M.Y., and Said M. 2014. Characterization and stability of pigments extracted from Sargassum binderi obtained from Semporna, Sabah. Sains Malaysiana, 43(9): 1345-1354.
46. Yue X., Xu Z., Prinyawiwatkul W., Losso J.N., King J.M., and Godber J.S. 2008. Comparison of soybean oils, gum, and defatted soy flour extract in stabilizing menhaden oil during heating. Journal of Food Science, 73(1): 19–23.

A review of the effect of micro-plastics on aquatic organisms

Ashraf sarli [1*], Ainaz shirangi[2]

.1- Masters Student See Biology, Gonbad Kavous University, Golestan, Iran

2- Associate Professor of Biology of Sciences, Gonbad Kavous University, Gonbad, Golestan, Iran

*Email: sarliashraf@gmail.com

Abstract

The global demand for the use of plastics is increasing due to its many applications. About 60-80% of marine environments are made of plastic. There is a lack of information and research on the existence of plastic and microplastic contamination in aquatic animals. In recent years, the accumulation of plastic waste in aquatic ecosystems has become a global environmental problem. Microplastics and nanoplastics may enter the aquatic body orally or otherwise. Microplastics (MSp) may be absorbed through the gastrointestinal tract or gills and then enter the circulatory system and be distributed throughout the body. Therefore, exposure to microplastics may lead to impaired biochemical homeostasis and bioaccumulation. Since aquatic animals are an important part of the food chain, this review study was conducted to better understand the mechanism of absorption and transport of microplastics in the aquatic body and their effect on various aquatic biomarkers.

Keywords: Ecosystem, Microplastic, Aquatic, Garbage, blood circulation

مروری بر تاثیر ریزپلاستیک‌ها، بر ارگانیسم‌های آبزیان

اشرف سارلی [*۱]؛ آیناز شیرنگی [۲]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد زیست دریا، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گنبد کاووس

۲-استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گنبدکاووس

* ایمیل: sarliashraf@gmail.com

چکیده

تقاضای جهانی برای استفاده از پلاستیک‌ها به علت کاربردهای فراوان آن رو به افزایش می‌باشد. حدود ۶۰-۸۰ درصد از زباله‌های محیط دریا را مواد پلاستیکی تشکیل می‌دهند. کمبود اطلاعات و پژوهش در مورد وجود آلودگی پلاستیکی و میکروپلاستیکی در آبزیان وجود دارد. در سال‌های اخیر، انباشت زباله‌های پلاستیکی در اکوسیستم‌های آبی به یک معضل زیست محیطی جهانی تبدیل شده است. ریزپلاستیک‌ها و نانوپلاستیک‌ها ممکن است از مسیر خوراکی و یا از مسیر دیگری وارد بدن آبزیان شوند. ریزپلاستیک‌ها (MSp) ممکن است از طریق سیستم گوارشی یا آبشش جذب و سپس وارد سیستم گردش خون شوند و در همه بخش‌های بدن توزیع شوند. بنابراین قرار گرفتن در معرض ریزپلاستیک‌ها ممکن است منجر به بروز اختلال در هموستازی بیوشیمیایی و تجمع زیستی شود. از آنجایی که آبزیان بخش مهمی را در زنجیره‌ی غذایی تشکیل میدهند، برای درک بهتر مکانیسم جذب و انتقال ریزپلاستیک‌ها در بدن آبزیان و تاثیر آن‌ها بر انواع شاخص‌های زیستی آبزیان، این مطالعه مروری انجام شده است.

کلمات کلیدی: اکوسیستم، میکروپلاستیک، آبزیان، زباله، گردش خون

۱.مقدمه

در سال ۲۰۱۵ میلادی، تولید پلاستیک در سراسر جهان به ۳۲۲ میلیون تن رسیده است؛ که از این مقدار سالانه حدود ۱۳-۵ تن وارد محیط زیست دریایی می‌شوند. از جمله اثرات زیست محیطی پلاستیک‌ها، آسیب و مرگ پرندگان دریایی، پستانداران و خزندگان بوده که ناشی از به دام افتادن در پلاستیک و بلعیدن آنهاست (کرد و ناجی، ۱۳۹۸). در سال‌های اخیر، نگرانی‌های زیست محیطی علاوه بر پلاستیک‌های بزرگ، در مورد افزایش میکروپلاستیک‌ها، که قطعات پلاستیکی کوچک بدست آمده از تجزیه ماکروپلاستیک‌ها هستند، میکروپلاستیک‌ها می‌توانند به طور مستقیم یا به صورت دانه‌های گرانول و پودر که برای تولید آنها استفاده می‌شوند وارد محیط دریایی شوند (Tompson et al., 2009).

میکروپلاستیک‌ها از ذرات، شکل و ترکیب شیمیایی متفاوتی تشکیل شده‌اند که ممکن است با سمیت آن‌ها ارتباط داشته باشد؛ این ذرات، قابلیت بالایی در نقل و انتقال باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا و همچنین آلاینده‌های زیست محیطی دارند

(بنایی و شاکری، ۱۳۹۹). ریزپلاستیک‌ها به تنهایی و یا همراه دیگر آلاینده‌های محیطی می‌توانند بر روی آبزیان، تاثیر سمی داشته باشند؛ ماهیان ممکن است به صورت مستقیم (از ستون آب یا رسوبات) و غیرمستقیم (از مصرف میکروارگانیسم‌هایی که قبلا میکروپلاستیک مصرف کرده‌اند)، میکروپلاستیک‌ها را استفاده کنند. میکروپلاستیک‌ها می‌توانند در دستگاه گوارش موجودات آبزی برای مدت زمان زیادی باقی بمانند و مانع ورود غذا شوند و راه روده را مسدود کنند (غطاوی و ناجی، ۱۳۹۸). قرار گرفتن آبزیان در معرض این آلاینده‌ها می‌تواند منجر به بروز آسیب‌های اکسیداتیو، سمیت سلولی، اختلال در عملکرد غدد ترشحی درون‌ریز، سرکوب سیستم ایمنی، اختلال در عملکرد میانجی‌گرهای عصبی، و سمیت ژنتیکی و حتی مرگ آبزیان شوند (Chen et al., 2020).

تجمع ریزپلاستیک‌ها و نانوپلاستیک‌ها در اندام‌های آبزیان و انتقال آنها در طول زنجیره غذایی همیشه، موجب نگرانی زیست‌شناسان بوده است. از این رو، برای درک بهتر مکانیسم جذب و انتقال ریزپلاستیک‌ها در بدن آبزیان و تاثیر آن‌ها بر انواع شاخص‌های زیستی آبزیان، این مطالعه مروری انجام شده است.

۲.مواد و روش ها

مقاله حاصل یک مطالعه مروری و حاصل استخراج و تحلیل نکات مهم از مقالات مرتبط است؛ که با جستجو در پایگاه‌های ایرانی و بین‌المللی ، Springer، Elsevier ، Google Scholar، Science Direct، Google، CIVILICA،SID می‌باشد. در انگلیسی از ترکیب کلیدواژگان: Micro plastic و Environment« و در فارسی از ترکیب کلیدواژگان «میکروپلاستیک »، و «محیط زیست» استفاده گردید.

۳.نتایج .بحث

در تحقیقی، به منظور بررسی و سنجش میکروپلاستیک‌های موجود در ماهیان خلیج فارس از روش نمونه‌برداری تصادفی و هضم نمودن بافت‌ها و شناورسازی میکروپلاستیک‌ها استفاده شد؛ و با این روش به بررسی فراوانی، توزیع، شکل و رنگ میکروپلاستیک‌ها در دستگاه گوارش ماهیان خلیج فارس پرداخته شده است. با توجه به نتایج به دست آمده، تعداد میکروپلاستیک متعلق به گونه شورت ماهیان (Sillago sihama) (۶۲ درصد)، خنو خاکستری (Diagramma pictum) (۲۶ درصد)، سرخو معمولی (Lutjanus johnii) (۶ درصد)، شوریده (Otolithes ruber) (۵ درصد)، و هامور (Epinephelus coioides) (۱ درصد) بود. سهم نسبی اشکال مختلف میکروپلاستیک‌ها در هر گونه از ماهیان نشان داد که میکروفیبرها با بیش از ۸۷ درصد فراوان‌ترین اشکال میکروپلاستیک و فرگمنت‌ها و فیلم‌ها با به ترتیب ۱۱ درصد و ۲ درصد کمترین غلظت مشاهده شده بودند. (غطاوی و ناجی، ۱۳۹۸).

در تحقیق دیگر، به بررسی فراوانی، توزیع، اندازه، رنگ و نوع میکروپلاستیک‌ها در دستگاه گوارش ۵ گونه از ماهیان سواحل حوزه خلیج چابهار، دریای عمان پرداخته شد. تعداد کل میکروپلاستیک‌های یافت شده در گونه‌های مورد مطالعه متغیر بود و بیشترین درصد شکل میکرو پلاستیک‌ها در دستگاه گوارش ماهیان متعلق به فیبر (۵۵٪)، قطعات (۲۶٪)، گلوله (۱۸٪) و فیلم (۱ درصد) بوده است. بر اساس نتایج حاصل از آنالیز طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR) از نمونه‌های میکروپلاستیک‌های یافت شده نشان داد؛ که شایع‌ترین پلیمرهای یافت شده، پلی‌اتیلن (PE)، پلی‌اتیلن ترفتالات (PET) و نایلون بودند. نتایج نشان داد که تمامی ماهیان نمونه‌برداری شده از خلیج چابهار حاوی میکروپلاستیک بودند. (کرد و ناجی، ۱۳۹۸).

در پژوهشی با هدف بررسی پاسخ‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی ماهی کپور معمولی به عنوان مدل زیستی، در مواجه با نانو پلاستیک پلی‌استایرن به عنوان یک پلیمر پر مصرف، آزمایشی انجام شد. نتیجه‌گیری کلی نشان داد احتمالاً غلظت‌های بالاتر نانوپلاستیک پلی‌استایرن موجب افزایش استرس و پاسخ‌های التهابی در ماهی کپور معمولی میشود (مهری و همکاران، ۱۴۰۰).
کاپوسی و همکاران (۲۰۱۴)، مواجهه کوتاه مدت مواد پلی اتیلن برروی توتیای دریایی Tripneustes gratilla با استفاده از فلورسنت سبز ریزدانه‌های پلی اتیلن با قطر ۴۵- ۱۰ میکرومتر مورد بررسی قرار داد. لارو T. gratilla میکروپلاستیک‌ها را در عرض چند ساعت پس از مصرف از معده خود دفع می‌کند. میکروپلاستی PE، با تزریق باعث اثرات کوچک و غیر وابسته به دوز در رشد لاروهایT. gratilla ایجاد کرد. این مطالعه به این نتیجه رسید که جمع‌شدگی میکروپلاستیک‌ها در اکوسیستم‌های واقعی دریایی، لاروهای بی‌مهرگان دریایی ، از جمله T. gratillaرا تهدید می کند (Kaposi et al., 2014).
نتیجه‌ی یک پژوهش مروری نشان داد که، تجمع ریزپلاستیک‌ها در بدن آبزیان تاثیر معنی‌داری بر پارامترهای خون‌شناسی و بیوشیمیایی می‌گذارد که این امر می‌تواند نشان‌دهنده بروز اختلال در عملکرد اندام‌های حیاتی و برهم خوردن هموستازی بیوشیمیایی باشد (بنایی و شاکری، ۱۳۹۹).
در بررسی که روی مجموعه داده‌های مختلف آب شیرین و دریایی بود نتایج حاکی از این بود که، نانوپلاستیک‌ها سمیت کمتری نسبت به میکروپلاستیک‌ها دارند و بسیاری از آنها مهندسی شده‌اند. نتایج آزمایشات، تفاوت معنی داری را در سمیت زیست‌محیطی برای انواع نانوپلاستیک‌های با اندازه‌های مختلف نشان می‌داد؛ در حالی که نانوپلاستیک‌های پلی‌استایرن به طور معنی‌داری سمی‌تر از سایر نانوپلاستیک‌های شناخته شده است (Yang & Nowak, 2020).
در اقیانوس اطلس، ماهیان مزوپلاژیکی مانند فانوس ماهیان مورد بررسی قرار گرفتند؛ در مجموع ۱۴۱ ماهی از ۲۷ گونه تشریح شد تا بررسی شود که آیا محتویات معده آنها حاوی ذرات پلاستیکی است یا خیر؛ که مشخص شد ماهیان به وسیله قطعات میکروپلاستیک با اندازه ۲mm فیبرهای پلاستیکی آلوده شده‌اند (Davidson & Asch 2011).

۴.نتیجه‌گیری

قرار گرفتن در معرض ریزپلاستیک‌ها میتواند منجر به تجمع زیستی ریزپلاستیک‌ها در آبشش‌ها و روده آبزیان می‌شود؛ این ذرات ممکن است از طریق سیستم گردش خون وارد دیگر بافت‌ها شود و در آنها نیز تجمع یابند. اندازه ریزپلاستیک‌ها و مسیر انتقال ریزپلاستیک‌ها، نوع اکوسیستم آبی از مهمترین عوامل تعیین کننده و تاثیرگذار بر قابلیت تجمع زیستی ریزپلاستیک‌ها در بدن آبزیان و تغییر فیزیولوژیکی آنها در مواجه به این آلاینده‌های نوظهور است. مرور مطالعات پیشین نشان میدهد که تجمع ریزپلاستیک‌ها در بدن آبزیان تاثیر معنی‌داری بر پارامترهای خونشناسی و بیوشیمیایی می‌گذارد که این امر میتواند نشان‌دهنده بروز اختلال در عملکرد اندام‌های حیاتی و برهم خوردن هموستازی بیوشیمیایی باشد.

منابع

۱۳. بنایی، م؛ شاکری، ر؛ ۱۳۹۹، تاثیر ریزپلاستیک‌ها بر شاخص‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی در آبزیان، نشریه علوم آبزیان، دوره ۸، شماره ۱۵.

۱۴. غطاوی، خ؛ ناجی، ا؛ ۱۳۹۸. بررسی میکروپلاستیک ها در دستگاه گوارش بعضی از انواع ماهیهای صید شده برای مصرف انسانی در بندرعباس، خلیج فارس. مجله سلامت و محیط زیست، فصلنامهی علمی پژوهشی انجمن علمی بهداشت محیط ایران. دوره دوازدهم، شماره سوم، پاییز صفحات ۴۴۹ تا ۴.

۱۵. کرمی، ا؛ طولابی دزفولی، ز؛ بیتا، س؛ مصباح، م؛ ۱۳۹۶؛ بررسی اثرات نانو ذرات نقره بیوسنتز شده از جلبک دریایی Sargassum angustifoliumبر شاخصهای خونی ماهی کپور معمولی (C. فصلنامه علمی پژوهشی اکوبیولوژی تالاب- دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز. سال نهم / شماره / ۲۳ تابستان ۱.

۱۶. کرد، س؛ ناجی، ا؛ ۱۳۹۸، مطالعه آلودگی میکرو پلاستیکها در ۵ گونه از ماهیان غالب خلیج چابهار (استان سیستان و بلوچستان)، مجله شیلات ایران، سال بیست و هشت، شماره ۳.

۱۷. مهری، ،؛ هدایتی، س ع ا؛ محمدی آذرم، ح؛ جافر نوده، ع؛ ابرقویی، ص؛ ۱۴۰۰، بررسی شاخص‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی ماهی کپور معمولی (Cyprinus carpio) در مواجهه با غلظت‌های مختلف نانوپلاستیک پلیاستایرن، بهره‌برداری و پرورش آبزیان،

۱۸. جلد دهم، شماره سوم، ۱۰۶-۹۷.

19. Chen Q., Lv W., Jiao Y., Liu Z., Li Y., Cai M., Wu D., Zhou W., Zhou W.Z. 2020. Effects of exposure to waterborne polystyrene microspheres on lipid metabolism in the hepatopancreas of juvenile redclaw crayfish, Cherax quadricarinatus. Aquatic Toxicology 224, 105497.

20. Davison P. and Asch R.G. (2011). Plastic ingestion by mesopelagic fishes in the North Pacific Subtropical Gyre. Mar. Ecol. Prog. Ser., 432, 173-180.

21. Katrina L. Kaposi, Benjamin Mos, Brendan P. Kelaher, and Symon A. Dworjanyn, 2014. Ingestion of Microplastic Has Limited Impact on a Marine Larva, Environmental Science & Technology. 1638–1645.

22. Yang T, Nowak B, 2020. A Meta-analysis of Ecotoxicological Hazard Data for Nanoplastics in Marine and Freshwater Systems, Environmental Toxicology and Chemistry Volume 39, Number 12 pp. 2588–2598.

23. Thompson, R.C., Olsen, Y., Mitchell, R.P., Davis, A., Rowland, S.J., John, A.W., McGonigle, D. and Russell, A.E., 2004. Lost at sea: where is all the plastic. Science, 304(5672), pp.838-838. DOI: 10.1126/science.1094559.

Microplastic pollution in water and its dangers

Fatemeh Savari Katoli [1]; Seyedeh Ainaz Shirangi*[2]

1- M.Sc. Student in Marine Biology, Department of Biology, Faculty of Basic Science and Engineering, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran
2- Assistant Professor, Department of Fishery, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad

*a.shirangi@gonbad.ac.ir

Abstract
Plastic waste is a major source of pollution in aquatic ecosystems. Plastic debris with a diameter of less than 5 mm is called microplastic. Microplastics are eaten by a wide range of organisms, including fish, crustaceans, and mollusks, and enter the food chain. Consumption of these waves has dangerous toxic and physical effects on living organisms, especially humans. The physical and chemical properties of microplastics make them easily attached to the surface of the gastrointestinal tract after being eaten by organisms and cause problems for the organism. The purpose of this review article is to investigate microplastic contamination in water and its hazards.

Keywords: **Microplastics, food chains, plastics**

آلودگی میکروپلاستیک در آب‌ها و خطرات ناشی از آن

فاطمه ساوری کتولی[۱]؛ سیده آیناز شیرنگی*[۲]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد زیست دریا، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، دانشگاه گنبدکاووس

۲-استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی‌مهندسی، دانشگاه گنبدکاووس

a.shirangi@gonbad.ac.ir

چکیده

زباله های پلاستیکی بخش عمده آلودگی در اکوسیستم‌های آبی را به خود اختصاص می‌دهند. بقایای پلاستیکی با قطر کمتر از ۵ میلی‌متر را میکروپلاستیک می‌گویند. میکروپلاستیک‌ها توسط طیف وسیعی از موجودات ازجمله ماهی‌ها، سخت‌پوستان و نرم‌تنان خورده شده و وارد زنجیره غذایی می‌شوند. مصرف این موجوات اثرات سمی و فیزیکی خطرناکی را روی موجودات زنده و به‌خصوص انسان به همراه دارد. خواص فیزیکی و شیمیایی میکروپلاستیک سبب شده که پس از خورده شدن توسط موجودات به راحتی به سطح دستگاه گوارش متصل شوند و برای موجود ایجاد مشکل نمایند. هدف این مقاله مروری، بررسی آلودگی میکروپلاستیک در آب‌ها و خطرات ناشی از آن است.

واژگان کلیدی: میکرو پلاستیک ، زنجیره غذایی ، پلاستیک

۱. مقدمه

اکوسیستم‌های آبی یکی از مهم‌ترین و غنی‌ترین اکوسیستم‌های جهان هستند که نقش مهمی در زندگی بشر و سایر موجودات زنده دارند (Haghshenas et al., 2017). بیش از۷۵ درصد وزن یک انسان و بیش از ۷۰ درصد سطح کره زمین را آب تشکیل می دهد (رحیمی ح، ۱۳۸۲). داشتن منابع آب سالم یکی از پیش نیازهای ضروری و اساسی برای حفظ کیفیت محیط زیست و رشد توسعه اقتصادی، اجتماعی و فرهنگی است. از آن‌جایی که در سال‌های اخیر گزارشات متعددی از حضور انواع آلودگی‌ها از قبیل پساب‌های صنعتی، کودهای شیمیایی، فلزات سنگین، پلاستیک‌ها و فاضلاب‌های شهری در منابع علمی ارائه شده است، داشتن یک استراتژی و برنامه مدون برای حفظ منابع آب و کنترل آلودگی‌های آن به‌عنوان یک مساله زیربنایی مطرح است. در راستای تحقق این امر مهم شناسایی منابع و عوامل آلاینده و دستیابی به راه حل‌های اصولی و عملی جهت کاهش میزان ورود ضایعات و آلاینده‌ها باید در اولویت برنامه‌های هر کشوری قرار گیرد (امیری و همکاران، ۱۳۹۹). پلاستیک‌ها از ترکیبات آلی مصنوعی و نیمه مصنوعی مختلف ساخته می‌شوند. میکروپلاستیک‌ها (ذرات پلاستیک کمتر از ۵ میلی متر) یک آلاینده محیطی نوظهور است که به دلیل فراوانی و ماندگاری در سرتاسر محیط زیست نگران کننده است. میکروپلاستیک‌ها می‌توانند از طریق رواناب و سیستم‌های زهکشی، ورودی پساب و تجزیه زباله‌ها وارد رودخانه‌ها شوند. هنگامی که در محیط آبی قرار می گیرند، توسط موجودات دریایی بلعیده می‌شوند(Horton et al.2018). پلاستیک ۸۵ درصد از کل زباله‌های دریایی را تشکیل می‌دهد که ۸۰ درصد آن از منابع زمینی است، در حالی که تنها ۱۸ درصد به زباله‌های ناشی از زباله‌های دریایی و صنعت ماهی‌گیری مربوط می‌شود(Auta et al., 2017; Mattsson et al., 2015). طی این مطالعه مروری

به جستجو مطالعات مرتبط با آلودگی میکروپلاستیک در آب‌ها و خطرات ناشی از آن در پایگاه‌های معتبر علمی نظیر Science Direct، Springer، Google Scholar و SID پرداخته شد.

۲. خطرات ناشی از میکروپلاستیک‌ها

پیش‌بینی می‌شود ورود پلاستیک به اکوسیستم دریایی تا چند دهه آینده به اندازه‌ای افزایش خواهد یافت که جرم پلاستیک در اقیانوس‌ها بیشتر از جرم ماهی‌ها خواهد بود (Simon and Schulte, 2017). میکروپلاستیک‌ها وارد زنجیره‌غذایی جانوران دریایی شده و سالانه موجب آسیب و مرگ هزاران گونه از جانداران مثل پرندگان‌دریایی، پستانداران، ماهی‌ها و خزندگان می‌شوند، زیرا این جانداران در اثر بلع پلاستیک‌ها خفه شده و دچار مرگ می‌شوند. پلاستیک‌های بلعیده شده حتی پس از مرگ جانداران و تجزیه آن‌ها نیز سالم باقی می‌مانند و دوباره در محیط پراکنده می‌شوند و باعث از بین بردن دیگر جانداران می‌گردند (Castañeda et al., 2014).

خطرات ناشی از این ذرات ریز به سه شکل کلی است:

۱- به عنوان جسم خارجی با طعمه اشتباه گرفته شده و با بلعیده شدن به وسیله موجودات کوچک آبزی، وارد زنجیره غذایی می‌شود.

با توجه به اینکه بقایای پلاستیکی به آسانی درمحیط تجزیه نمی‌شوند، دربدن موجودات آبزی تجمع یافته اثرسمیت آن در درازمدت مشخص می گردد. انسان نیز با مصرف آبزیان آلوده می‌تواند دچار بیماری گردد.

۲-میکروپلاستیک‌ها توانایی جذب آلاینده‌ها و یا جذب شدن بر روی سطوح را دارند. همچنین ممکن است به عنوان بستری برای رشد میکروارگانیسم‌ها باشند. این ذرات می‌توانند برخی از فلزات سنگین از جمله آلومینیوم،کادمیوم،کبالت،کروم، مس، آهن، نیکل، سرب و روی را از محیط جذب کنند.

۳- موادشیمیایی سمی که درساختار پلیمری ذرات میکروپلاستیک‌ها وجود دارد؛ می‌توانند به طور مستقیم یا به صورت دانه‌های گرانول و پودر که برای تولید آن‌ها استفاده می‌شوند ؛وارد اکوسیستم آبی شوند (Thompson et al., 2012, Barboza et al.,2018).

موجودات موجود در سطوح پایین تغذیه، به دلیل اینکه بسیاری از آن ها فیلتر فیدر هستند و توانایی محدودی جهت تمایز بین ذرات پلاستیکی و مواد غذایی را دارند؛ نسبت به خوردن میکروپلاستیک ها حساس هستند. ماهی‌ها مهره داران آبزی هستند که به طور گسترده در جهان پراکنده شده‌اند و شامل موجوداتی از آب شیرین و محیط های دریایی می شوند. آنها نقش مهمی را به عنوان یک محصول برای مصرف انسان ایفا می کنند و تقاضای رو به رشد پروتئین در سراسر جهان را برآورده می کنند (FAO., 2018) .در مورد ارگانیسم‌های تغذیه‌ای بالاتر مانند ماهی، بلع ممکن است مستقیم (از ستون آب یا رسوب) یا غیرمستقیم (بلع موجوداتی که قبلا میکروپلاستیک‌ها را بلعیده‌اند) باشد (Campbell et al., 2017). یکی از بارزترین پیامدهای بلع میکروپلاستیک توسط ماهی، انسداد فیزیکی اندام های گوارشی و تداخل در تغذیه است (Jovanovic., 2017). اثرات مشاهده شده از بلع میکروپلاستیک ها شامل انسداد روده، آسیب فیزیکی، تغییرات هیستوپاتولوژیک در روده، تغییر در رفتار، تغییر در متابولیسم لیپید و انتقال به کبد است (Jovanovic., 2017). احتمال انتقال آلاینده ها به قسمت های خوراکی ماهی ها و نرم تنان، نگرانی هایی را در مورد کیفیت و ایمنی این غذاها ایجاد می کنند(Ašmonaite et al., 2018) . بنابراین، تحقیقات علمی زیادی برای ارزیابی پیامدهای فیزیولوژیکی، اکولوژیکی و محیطی حضور این ذرات پلاستیکی کوچک در حال انجام است (Baria et al ., 2019).

۳. آلودگی میکروپلاستیک در آب‌ها و آبزیان

زباله‌های پلاستیکی موجود در محیط های دریایی در حال حاضر سالانه ۱۳ میلیارد دلار خسارت مالی در سراسر جهان ایجاد می‌کند (UNEP 2014) . هزینه عملیات پاک‌سازی زباله‌های پلاستیکی بسیار بالا است و تا ۴۸۹ میلیون دلار فقط برای تمیز کردن ماکروپلاستیک‌ها از ۱ درصد از اقیانوس آرام شمالی (NOAA 2016) مورد نیاز است. پاکسازی میکروپلاستیک ها به دلیل غیرممکن بودن، حتی در چنین عملیاتی گنجانده نمی شود. همانطور که غلظت میکروپلاستیک ها هر سال در محیط های دریایی افزایش می یابد، دفعات مصرف میکروپلاستیک ها توسط ماهی نیز افزایش می یابد. قرار گرفتن انسان در معرض میکرو و نانوپلاستیک ها از طریق مصرف ماهی های آلوده اخیراً شتاب بیشتری گرفته است و در آینده نیز ادامه خواهد داشت. اگرچه اکثر بررسی‌های کارشناسان موافق هستند که ماهی‌های آلوده به میکروپلاستیک خطرات ناچیزی را برای سلامت انسان به همراه دارند، اما آنها همچنین موافقند که نمی‌توان در مورد نانوپلاستیک‌ها به دلیل ناتوانی‌های فنی در ارزیابی خطر بیان داشت (Bouwmeester et al. 2015; EFSA 2016). مطالعات محدودی توانسته‌اند کمیت و متوسط ذرات میکروپلاستیک موجود در بافت ماهی‌ها را گزارش کنند. تعداد و اندازه ذرات پلاستیکی مصرف شده به طور متوسط با افزایش سایز ماهی، افزایش می‌یابد. میکروپلاستیک‌های دریایی را می‌توان بر اساس معیارهایی مانند رنگ، مرحله فرسایشی، شکل (فیبر، فیلم، دایره کوچک و قطعه) یا نوع پلیمر (پلی اتیلن، پلی استایرن، نایلون و غیره) تقسیم بندی کرد(Hidalgo- Ruz et al.,2012).
برخی از مطالعات انجام شده در این زمینه عبارتند از:

Lönnstedt و Eklöv در سال ۲۰۱۶ با بررسی غلظت های سازگار بر محیط زیست میکروپلاستیک بر اکولوژی لارو ماهی سوف اروپایی نشان دادند که غلظت‌های مرتبط با محیط زیست ذرات میکروپلاستیک عملکردی فیزیکی و شیمیایی برروی مراحل اولیه زندگی تخم‌های لقاح یافته ماهی سوف دارد. این ذرات نه تنها برروی رفتارهای حیاتی جانور مانند فعالیت و تغذیه آن تاثیرگذار بود بلکه موجب تخریب و آسیب زدن به واکنش غریزی به نشانه‌های بویایی نیز شد. Davidsonو Dudas در سال ۲۰۱۶ به بررسی ذرات پلاستیکی کوچکتر از ۵ میلیمتر پرداختند و نتایج نشان داد که میکروپلاستیک‌ها از آنجایی که کوچک هستند، از طریق فیلتر کردن ارگانیسم‌ها وارد بدن آبزیان می‌شوند که می‌توانند از طریق ارگانیسم‌های سطح بالاتر زنجیره غذایی از جمله انسان مصرف شوند.

Vendelو همکاران در سال ۲۰۱۷، آلودگی میکروپلاستیک را در ۲۲۳۳ قطعه ماهی که شامل ۶۹ گونه بودند در دو خور استوایی برزیل بررسی کردند. ۹٪ این ماهیان که شامل ۲۴ گونه بودند، آلوده به میکروپلاستیک گزارش شد.

در بررسی Ory در سال ۲۰۱۸ محتویات روده از ۲۹۲ ماهی پلانکتون‌خوار، جهت بررسی آلودگی میکروپلاستیک مورد بررسی قرار گرفتند که فقط بخش کوچکی از تمام ماهی مورد مطالعه (۶۲/۱٪ قطعه) ذرات میکرو پلاستیکی در دستگاه گوارش داشتند.

Catarinoو همکاران در سال ۲۰۱۸ آلودگی میکروپلاستیک در دوکفه ای Mytilus edulis را در سواحل انگلستان و اسکاتلند در ۸ ایستگاه بررسی کردند که بیشترین میزان میکروپلاستیک، میکروفیبر گزارش شد.

در مطالعه Lee و همکاران ۲۰۱۹، در جنین ماهی زبرای گور خری انجام شد؛ مشخص شد که میکروپلاستیک های پلی استایرن کوچکتر، به آسانی در کوریون و در جنین در حال رشد نفوذ کرده (بیشتر در مناطق غنی از لیپیدها مانند لیپیدهای کیسه ی زرده) و در کل بدن تجمع می یابند. ابرقویی و همکاران در سال ۲۰۲۱ جهت تعیین بیومارکرهای آلودگی میکروپلاستیک در دو اندازه مختلف در شرایط آزمایشگاهی بر روی ماهی کاراس طلایی نشان دادند؛ ذرات میکروپلاستیک در هر دو اندازه، توانایی جذب در سه اندام کبد، آبشش و روده را در مدت زمان ۱۶۸ ساعت دارند و با افزایش مواجهه، غلظت این ذرات در این بافت‌ها افزایش پیدا می‌کند.

مطالعه ای در سال ۲۰۲۰ توسط Han xuekai و همکاران صورت پذیرفت که در آن میگوی آب شور Artemia franciscana به مدت ۱۴ روز در معرض سه غلظت MP (۰، ۰.۲ و ۲.۰ میلی گرم در لیتر) قرار گرفت. غلظت میکروپلاستیک منجر به به کاهش میکروویل های روده آرتمیا و سلول های اپیتلیوم روده وکاهش نرخ بقا و رشد شد.

مطالعه ای دیگر ماهی کپور معمولی (Cyprinus carpio) توسط Nematdoost haghi و همکاران در سال ۲۰۱۷ با غلظت های ۱و۲ میلی گرم بر لیتر میکروپلاستیک در ۲۱ روز بررسی شد.با افزایش فعالیت های آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلکالین فسفاتاز (ALP) و کراتین فسفوکیناز (CPK) و سطح گلوکز همراه بود.

بررسی Romano و همکاران در سال ۲۰۲۰بچه ماهی قرمز (Carassius auratus) به مدت چهار روز در معرض میکروپلاستیک های پلی وینیل کلرید بکر (PVC-MPs) در سه تکرار در ۰، ۰.۱ یا ۰.۵ میلی گرم در لیتر قرار دادند. هیستوپاتولوژی آبشش، کبد و روده به همراه آنزیم های آنتی اکسیدانی مختلف و شاخص های آسیب اکسیداتیو (مالون دی آلدئید (MDA) و پراکسید هیدروژن (H2O2))، در مغز، کبد و آبشش مورد بررسی قرار گرفت. . نتایج نشان می دهد که قرار گرفتن در معرض PVC-MP مرتبط با محیط زیست می تواند باعث آسیب اکسیداتیو در مغز و کبد، تغییرات هیستومورفولوژیکی نامطلوب در روده و کبد و تغییر بیان ژن در ماهی قرمز شود.
در سال ۱۳۹۷مطالعه ای توسط ذاکری و همکاران صورت گرفت. این مطالعه بر روی ۵۱ قطعه ماهی سفید جمع آوری شده در فصل صیداست
نتایج نشان داد که در دستگاه گوارش ۶۶/۶ ٪ از ماهیان مورد مطالعه، میکروپلاستیک وجود داشت. بهطور میانگین هر ماهی تعداد ۱/۴۷ قطعه میکروپلاستیک بلعیده بود که بیشترین میزان این میکروپلاستیکها را الیاف)با ۳۸/۷۵ ٪(، سپس فرگمنتها)۳۱/۴۲ ٪(، فیلمها)۳۰ ٪(و دانهها)با ۱۱/۴۲ ٪(بهخود اختصاص دادند. حناچی و همکاران در سال ۱۳۹۸ پژوهشی انجام دادند که هدف از انجام این پژوهش، بررسی تاثیر میکروپلاستیک پلیا ستایرین بر روی ماهی قزل آلای رنگین کمان بود. تاثیر این نوع میکروپلاستیک بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در سه بافت کبد،کلیه و ماهیچه ماهی قزلآلای رنگین کمان بود که نتایج نشان داد در هر سه بافت ایجاد آسیب های جدی کرده است. ماهی مداکای جاوه ای به مدت ۲۱ روز در معرض دانه های میکروپلاستیک پلی استایرن (PS-MPs) توسط Usman و همکاران در سال ۲۰۲۱انجام گرفت. تغییرات بافتی، استرس اکسیداتیو روده، نفوذپذیری و سمیت عصبی مورد بررسی قرار گرفت. تغییرات التهابی قابل توجهی و آسیب بافتی در روده، کبد و کلیه مشاهده شد. استرس اکسیداتیو روده و نفوذپذیری به طور قابل توجهی افزایش یافته است. در مغز، سمیت عصبی با القای قابل توجهی از استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدی و مهار آنزیم استیل کولین استراز مشخص شد. این مطالعه بینشی را در مورد تأثیر اندام های متعدد قرار گرفتن در معرض میکروپلاستیک ها ارائه کرد، که نیاز به کاوش بیشتر و شناسایی نشانگرهای زیستی برای نظارت بر جمعیت در معرض خطر در آینده را دارد.

مطالعه ای دیگر اثرات میکروذرات پلی وینیل کلراید (MP) (PVC) بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی کبدی، بیوشیمیایی سرم و بافت شناسی کبد Clarias gariepinus نوجوان را بررسی کرد.این مطالعه در سال ۲۰۲۰ توسط Odo Iheanacho and انجام شد.پس از ۳۰ روز نتایج نشان داد که ارزیابی هیستوپاتولوژیک کبد ماهی سطوح خفیف تا شدید کاهش گلیکوژن، واکوئل شدن و دژنراسیون چربی، نکروز سلولی کبدی را در گروههای تیمار شده با PVC با اشاره به شاهد نشان داد. مطالعه حاضر نشان داد که میکروپلاستیک پی وی سی باعث آسیب اکسیداتیو و تغییرات هیستوپاتولوژیک کبدی در ماهی در معرض خطر می شود.بررسی و پژوهشی در سال ۲۰۱۹ توسط Zhang و همکاران صورت گرفت .هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر حضور میکروپلاستیک‌های پلی استایرن (PS-MPs) بر روی ماهی قرمز ماهی آب شیرین (Oreochromisniloticus) بود.نتایج پس از ۱۴ روز حاکی از این بود که حضور MPs می تواند بر سرنوشت و سمیت سایر آلاینده های آلی در ماهی تأثیر بگذارد. نتایج بر اهمیت مطالعه برهمکنش بین MPs و سایر آلاینده‌های آلی در محیط‌های آبی تاکید می‌کند.

۴. نتیجه‌گیری

نگرانی‌های روزافزون و جدی در مورد ایمنی غذاهای دریایی و حفاظت از سلامت انسان، ضرورت بررسی در خصوص شناسایی میزان آلودگی و ارائه راهکار مناسب را آشکار کرده است. در دهه‌های اخیر، میکروپلاستیک‌ها به‌عنوان آلاینده نوظهور شناخته شده‌اند و نگرانی‌های گسترده‌ای در مورد اثرات سمی بالقوه آن وجود دارد. این مواد به دلیل اندازه کوچک و تجزیه زیستی پایین، توسط موجودات زنده مصرف می‌شوند و برای مدت طولانی در بدن تجمع و از طریق زنجیره غذایی انتقال یافته و سلامت محیط زیست را تهدید کنند. از اینرو لزوم توجه به میکروپلاستیک‌ها به عنوان یک مبحث جدی در حفاظت محیط زیست و بهداشت عمومی لازم است.

منابع

۴. رحیمی ح.۱۳۸۲. مشکل ناشناختهٔ جهانی. بحران آب. پیک نور.۲۲، ص ۲۳-۳۳.

۵. امیری، پ. احمدی کلان، م. بیگ محمدی، ف.۱۳۹۹. ارزیابی پتانسیل آلودگی مواد آلی موجود در پسماندهای خانگی و دامی (مطالعه موردی: حوضه آبریز سد چمگردلان ایلام) انسان و محیط زیست. ۵۵، ص. ۷۱-۸۲

۶. ذاکری, اکبرزاده, & ناجی. آلودگی میکروپلاستیک در ماهی سفید (Rutilus frisii kutum) سواحل جنوبی دریای خزر. فصلنامه محیط زیست جانوری, ۱۱(۱), ۱۷۵-۱۸۰.

۷. ملکی, موژان, حناچی, پریچهر, & کربلائی. ۲۰۲۰. تاثیر میکروپلاستیک پلی استایرین و آفت کش کلرپیریفوس بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در بافت های ماهی قزل آلای رنگین کمان. شیلات, ۷۲(۴), ۳۲۹-۳۳۸.

8. Haghshenas A, Hatami-manesh M, Mirzaei M, Mir Sanjari M, Hossein Khezri P. 2017. Measurement and Evaluation of Ecological Risk of Heavy Metals in Surface Sediments of Pars Special Economic Energy Zone. ISMJ, 20(5), 448-469.

9. Simon, N., Schulte, M. L. 2017. Stopping global plastic pollution: The case for an international convention. Ecology Publication Series, 43

10. Castañeda, R. A., Avlijas, S., Simard, M. A., & Ricciardi, A. 2014. Microplastic pollution in St. Lawrence river sediments. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 71(12), 1767-1771.

11. Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R. C., & Thiel, M. 2012. Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. Environmental science & technology, 46(6), 3060-3075.

12. Barboza LGA, Vieira LR, Branco V. Microplastics cause neurotoxicity, oxidative damage and energy-related changes and interact with the bioaccumulation of mercury in the European seabass, Dicentrarchus labrax (Linnaeus, 1758). 2018.Aquat Toxicol;195:49-57.

13. Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R. C., & Thiel, M. 2012. Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. Environmental science & technology, 46(6), 3060-3075.

14. Lönnstedt, O. M., and Eklöv, P. 2016. Environmentally relevant concentrations of microplastic particles influence larval fish ecology. Science, 352(6290), 1213-1216.

15. Davidson, K., & Dudas, S. E. 2016. Microplastic ingestion by wild and cultured Manila clams (Venerupis philippinarum) from Baynes Sound, British Columbia. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 71(2), 147-156.

16. Catarino, A.I., Macchia, V., Sanderson, W.G., Thompson, R.C. and Henry, T.B., 2018. Low levels of microplastics (MP) in wild mussels indicate that MP ingestion by humans is minimal compared to exposure via household fibres fallout during a meal. Environmental Pollution, 237, pp.675-684.

17. Abarghouei S, Hedayati S A, Raeisi M, Shirkand hadavand B, Rezaei H, Abed-Elmdoust A. 2021. Study on bioaccumulation and histopathological effects of microplastic polystyrene on Goldfish (Carassius auratus). JAIR.; 9 (2) :51-60.

18. Lee, W. S., Cho, H. J., Kim, E., Huh, Y. H., Kim, H. J., Kim, B., ... & Jeong, J. 2019. Bioaccumulation of polystyrene nanoplastics and their effect on the toxicity of Au ions in zebrafish embryos. Nanoscale, 11(7), 3173-3185.

19. Vendel, A. L., Bessa, F., Alves, V. E. N., Amorim, A. L. A., Patrício, J., & Palma, A. R. T. 2017. Widespread microplastic ingestion by fish assemblages in tropical estuaries subjected to anthropogenic pressures. Marine Pollution Bulletin, 117(1-2), 448-455.
20. Ory, N., Chagnon, C., Felix, F., Fernández, C., Ferreira, J. L., Gallardo, C., ... & Thiel, M. 2018. Low prevalence of microplastic contamination in planktivorous fish species from the southeast Pacific Ocean. Marine Pollution Bulletin, 127, 211-216.
21. Han, X., Zheng, Y., Dai, C., Duan, H., Gao, M., Ali, M. R., & Sui, L. 2021. Effect of polystyrene microplastics and temperature on growth, intestinal histology and immune responses of brine shrimp Artemia franciscana. Journal of Oceanology and Limnology, 39(3), 979-988
22. Zhang, S., Ding, J., Razanajatovo, R. M., Jiang, H., Zou, H., & Zhu, W. 2019. Interactive effects of polystyrene microplastics and roxithromycin on bioaccumulation and biochemical status in the freshwater fish red tilapia (Oreochromis niloticus). Science of the total environment, 648, 1431-1439
23. Usman, S., Abdull Razis, A. F., Shaari, K., Amal, M. N. A., Saad, M. Z., Mat Isa, N., & Nazarudin, M. F.2021 Polystyrene Microplastics Exposure: An Insight into Multiple Organ Histological Alterations, Oxidative Stress and Neurotoxicity in Javanese Medaka Fish (Oryzias javanicus Bleeker, 1854). International Journal of Environmental Research and Public Health, 18(18), 9449
24. Barría, C., Brandts, I., Tort, L., Oliveira, M., & Teles, M. 2020. Effect of nanoplastics on fish health and performance: A review. Marine pollution bulletin, 151, 110791
25. Jovanović, B.2017. Ingestion of microplastics by fish and its potential consequences from a physical perspective. Integrated environmental assessment and management, 13(3), 510-515
26. Horton, A. A., Jürgens, M. D., Lahive, E., van Bodegom, P. M., & Vijver, M. G.2018. The influence of exposure and physiology on microplastic ingestion by the freshwater fish Rutilus rutilus (roach) in the River Thames, UK. Environmental Pollution, 236, 188-194
27. Yang, Y., Liu, W., Zhang, Z., Grossart, H. P., & Gadd, G. M.2020. Microplastics provide new microbial niches in aquatic environments. Applied microbiology and biotechnology, 104, 6501-6511
28. Haghi, B. N., & Banaee, M. 2017. Effects of micro-plastic particles on paraquat toxicity to common carp (Cyprinus carpio): biochemical changes. International Journal of Environmental Science and Technology, 14(3), 521-530.
29. Romano, N., Renukdas, N., Fischer, H., Shrivastava, J., Baruah, K., Egnew, N., & Sinha, A. K. 2020. Differential modulation of oxidative stress, antioxidant defense, histomorphology, ion-regulation and growth marker gene expression in goldfish (Carassius auratus) following exposure to different dose of virgin microplastics. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 238, 108862
30. Xia, X., Sun, M., Zhou, M., Chang, Z., & Li, L. 2020. Polyvinyl chloride microplastics induce growth inhibition and oxidative stress in Cyprinus carpio var. larvae. Science of the Total Environment, 716, 136479
31. Iheanacho, S. C., & Odo, G. E.2020. Dietary exposure to polyvinyl chloride microparticles induced oxidative stress and hepatic damage in Clarias gariepinus (Burchell, 1822). Environmental Science and Pollution Research, 27(17), 21159-21173.

The effect of different dilutions of celery extract on Listeria isolated from the body of rainbow trout.

Marzieh Ghasemi Pirbalouti [1]*, Farzaneh Nikokhah[2], Fardin Shaloui[3]

1- Graduate Student, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and General Land, Shahrekord University
2- Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, Shahrekord University
3- Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, Shahrekord University

m.shahrad76@gmail.com

Abstract

With increasing human population, the demand for protein is increasing, so with increasing fish density, bacterial and parasitic diseases in the breeding environment are increasing. One of the bacterial diseases is Listeriosis, which is caused by Listeria bacteria. According to studies, this bacterium has been resistant to antibiotics, so herbal medicines, which have antibacterial properties, were used to treat this disease. In this study, fish were fed from four breeding treatments prepared from different dilutions (4.4-6.8.8) of mountain celery extract. Twenty fish with a mean weight of 30 g were randomly selected from the liver tissue (1 g) of rainbow trout Oncorhynchus mykiss in 9 cc of physiological saline and cultured by serial dilution in blood agar medium. The results showed that celery extract in dilution of 0.8 g / ml acts as a lethal concentration for Listeria bacteria and in dilution of 0.6 g / ml as an inhibitory agent for the bacterium.

Keywords: Rainbow trout, Listeria bacteria, Celery extract, Liver, Immune system

اثر رقتهای مختلف عصاره کرفس کوهی بر روی لیستریا ی جدا شده ازبدن ماهی قزل الای رنگین کمان

مرضیه قاسمی پیربلوطی[1*]، فرزانه نیکوخواه[2]، فردین شالویی[3]

۱- دانشجوی ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و عوم زمین، دانشگاه شهرکرد

۲- استادیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین ، دانشگاه شهرکرد

۳- استادیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین ، دانشگاه شهرکرد

m.shahrad76@gmail.com

چکیده

با افزایش جمعیت بشر، تقاضا برای تامین پروتئین در حال افزایش است بنابراین با افزایش تراکم ماهیان ، بیماری‌های باکتریایی و انگلی در محیط پرورش درحال افزایش اند، یکی از بیماریهای باکتریایی، بیماری لیستریوزیس است که عامل آن باکتری لیستریا میباشد. بر اساس مطالعات انجام شده، این باکتری به انتی بیوتیک ها مقاوم بوده است به همین جهت از داروهای گیاهی، که خاصیت ضد باکتریایی داشته در درمان این بیماری استفاده شد. در این مطالعه از چهار تیمار پرورشی که از رقت‌های (۰/۴-۰/۶-۰/۸) مختلف عصاره کرفس کوهی تهیه گردید ماهیان مورد تغذیه قرار گرفتند. تعداد ۲۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۳۰ گرم به صورت تصادفی انتخاب گردید از بافت کبد(۱ گرم) ماهی قزل الای رنگین کمان Oncorhynchus mykiss در ۹ سیسی سرم فیزولوژی همگن گردید و به روش رقت سریالی در محیط کشت بلاد اگار کشت داده شد. نتایج بدست امده نشان داد که عصاره ی کرفس کوهی در رقت ۰/۸ گرم بر میلی لیتر به عنوان غلظت کشنده برای باکتری لیستریا Listeria و در رقت ۰/۶ گرم بر میلی لیتر به عنوان عامل بازدارند برای باکتری مذکور عمل مینماید.

واژگان کلیدی: ماهی قزل الای رنگین کمان، باکتری لیستریا، عصاره کرفس کوهی، کبد ، سیستم ایمنی

۱.مقدمه

لیستریایک باکتری میله ای گرم مثبت و بیهوازی اختیاری است. یکی از گونه‌های این باکتری به نام لیستریا مونوسیتوژنز، یک باکتری بیماریزا و فرصت طلب است. که عفونت حادی بنام لیستریوزیس را در حیوانات و انسان باعث میشود. لیستریا مونوسایتوژنز از شایع‌ترین باکتری‌هایی ایجاد کننده مننژیت نیز می‌باشد. این باکتری از طریق غذاهای الوده مانندپنیر، سبزیجات خام، سالاد اماده فروش و ماهی به انسان منتقل می‌یابد(Heinitz et al. 1997).

از سال ۱۹۷۹ موارد متعدد شیوع عفونت از طریق سبزیجات، فراورده های لبنی و ماهی به عنوان حاملین عفونت گزارش شده است .الودگی مواد غذایی به میکرو ارگانیسم‌های بیماریزا از جمله مسائل مهم در صنعت غذا بوده است که می‌تواند در برخی موارد منجر به مسمومیت‌های غذایی گسترده به شکل اپیدمی‌های فراگیر تبدیل شده و بهداشت عمومی را دچار مخاطره کند(Dillon and Elshenawy, 1996).

از بین عوامل بیماریزایی که از طریق مصرف مواد غذایی الوده به انسان انتقال می‌یابند باکتری‌ها به نسبت ویروس‌ها ، انگل‌ها و قارچ‌ها فراوانی و اهمیت بیشتری دارند . برای پیشگیری و کنترل بیماری‌هایی با منشا مواد غذایی باید به طور متناوب به شناسایی عوامل ایجاد کننده و بررسی وضعیت الودگی مواد غذایی اقدام نمود(Krhshnasamy et al.، 2020)

امروزه ماهی و سایر فراورده‌های شیلاتی نقش با اهمیتی را در امنیت غذایی جهانی و نیازهای تغذیه‌ای انسان در کشورهای درحال توسعه و همچنین توسعه یافته ایفا می‌کند. همچنین ابزیان به واسطه محل پرورش یا زندگی ، مخزن تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها بوده وبقیه در مراحل مختلف از زمان صید تا رسیدن بدست مصرف کننده، ابزی را الوده می‌کند.بنابراین پایش منظم این گروه از مواد غذایی از نظر عوامل بیماریزا ضروری به نظر می‌رسد(Abera et al., 2010).

گزارشات متعددی ازجداسازی لیستریامونوسیتوژنز از قسمتهای مختلف ماهیان در ایران وجود دارد برای مثال ۴ درصد از محتویات لوله گوارش ماهی قزل الای رنگین کمان نمونه برداری شده از ۳۰ استخر در چهارمحال و بختیاری الوده به باکتری لیستریا مونوسیتوژنز بودند(فتاحیان و اذرگون، ۱۳۹۲). همچنین در دیگر مطالعات نشان داده شده است که باکتری لیستریامونوسیتوژنز حدا شده از ماهی، به انتی بیوتیک اکساسیلین مقاومت نشان میدهد. (پیرعلی خیر ابادی و حسینی، ۱۳۹۶).

از این رو برای درمان ماهیان بیمار به جای استفاده از انتی بیوتیک‌ها که امکان مقاوم شدن سویه‌های باکتری را به انتی بیوتیک‌های استفاده شده میدهد می توان از ترکیبات گیاهی که خاصیت ضدباکتریایی دارند استفاده کرد. یکی از گیاهانی که خاصیت ضدباکتریایی قوی دارد عصاره کرفس کوهی می‌باشد. کرفس کوهی با نام محلی کلوس به عنوان گونه جدید از جنس کلوسیا از تیره چتریان، یکی از گیاهان تغذیه‌ای، مرتعی و بومی ایران بوده و تاکنون وجود ان در سایر مناطق جهان گزارش نشده است. کرفس کوهی در منابع مختلف با نام‌های علمی نام‌گذاری گردیده است(Elbashir et al.،2018).

در این مطالعه سعی بر ان شده است که اثر ضد باکتریایی کرفس کوهی روی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز جداسازی شده از کبد ماهی قزل الای رنگین کمان مورد برسی و مطالعه قرار گیرد.

۲.مواد و روش‌ها

این مطالعه در دانشگاه شهرکرد در پاییز سال ۱۴۰۰ انجام شد تعداد ۲۰ عدد ماهی قزل الای رنگین کمان با وزن متوسط ۳۰ گرم ازکارگاه ابری پروری دانشگاه شهرکرد نمونه برداری شد.. ماهیان پرورشی از رقت‌های مختلف عصاره کرفس کوهی در غلظت‌های (۰/۸، ۰/۶، ۰/۴ گرم بر میلی لیتر) اسپری شده در جیره غذایی تغذیه شده بودند . یک گروه نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. سپس تعداد ۵ عدد ماهی به صورت تصادفی از تیمار شاهد و ۱۵ عدد ماهی از تیمار های تغذیه شده با غلظت های مختلف عصاره کرفس کوهی نمونه برداری شد. بعد از بی‌هوشی با پودر گل میخک، ماهیها برای کالبد گشایی به ازمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده منابع طبیعی منتقل شدند. در ازمایشگاه در شرایطی کاملا استریل در کنار شعله از کبد ماهیان به میزان یک گرم با ترازوی دیجیتالی(به دقت ۰/۰۱ گرم) نمونه برداری شد . سپس اقدام به رقیق سازی بافت مورد نظر گردید. رقیق سازی در لوله ازمایش که حاوی ۹ سی سی اب مقطر استریل شده بود انجام شد. به وسیله سمپلر ، یک سی سی از رقت تهیه شده از بافت کبد به محیط کشت بلاد اگار تلقیح و در انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت خصوصیات ظاهری، شکل و رنگ کلونی باکتری رشد کرده در محیط کشت بلاد اگار ، مورد توجه قرار گرفت . برای شناسایی دقیق‌تر باکتری از تست‌های بیوشیمیایی و رنگ امیزی گرم استفاده گردید

۳. نتایج و بحث

ماهیان قزل الای رنگین کمان هیچ گونه علامت ظاهری نداشتند و کاملا سالم به نظر می‌رسیدند. پس از کالبد گشایی ماهیان، ،نمونه برداری از بافت کلیه و کبد انجام شد و کشت باکتری در محیط کشت ژلوز خوندار صورت گرفت. کشت مربوط به ماهیان تیمار گروه شاهد پس از گذشت ۲۴ ساعت حاوی کلونی‌های باکتری با رنگ خاکستری و به صورت خشک در محیط کشت ژلوز خوندار بود. و در تیمار ماهیان تغذیه شده با غلظت‌ها مختلف عصاره کرفس کوهی تعداد کلنی باکتری در محیط کشت ژلوز خوندار کمتر از گروه شاهد بود. به طوریکه بیشترین تعداد باکتری در گروه شاهد و کم‌ترین تعداد باکتری در گروه ۰/۶ عصاره کرفس کوهی مشاهده شد. در تیمار ۰/۸ عصاره کرفس کوهی باکتری مذکور رشد نکرده بود. برای شناسایی باکتری در ابتدا از رنگ امیزی گرم استفاده شد باکتری مشاهده شده در زیر لوپ به شکل میله‌ای ریز و بنفش رنگ مشاهد شد. همچنین برای تشخیص دقیق‌تر باکتری از تست‌های بیو شیمایی استفاده شد. نتایج تست‌های بیو شیمیایی و رنگ امیزی گرم در جدول زیر گزارش شده است.

جدول۱: نتایج ازمایشهای تست‌های بیوشیمیایی و رنگ امیزی گرم باکتری جدا شده از کبد ماهی قزل الای رنگین کمان

تست بیوشیمایی	نتایج
اوره	–
کاتالاز	+
H2S	–
حرکت	+
سیمون سیترات	–
گلوکز	–
گالاکتوز	–
مانیتول	–
TSA	–
VP	–
گرم	+
همولیز	نواری
رنگ کلونی	خاکستری
شکل باکتری	میله ای

نتایج بدست امده از این تحقیق نشان داد که عصاره کرفس کوهی سبب تقویت سیستم ایمنی بدن ماهی قزل الای رنگین کمان شده است .در گروه شاهد بیشترین تعداد باکتری مشاهده شد در تیمار غلظت‌های مختلف عصاره کرفس کوهی در جیره شاهد کم‌ترین تعداد باکتری در محیط کشت ژلوز خوندار بودیم. در تیمار غلظت ۰/۸ گرم بر میلی لیتر عصاره کرفی کوهی ، باکتری مذکور رشد نکرده بود و این غلظت به عنوان غلظت کشندگی باکتری لیستریا گزارش شد. جهت بررسی دقیق تر اثر عصاره کرفس این ازمایشات در محیط کشت مولر هینتون بر روی باکتریهای مورد نظر نیز صورت

گرفت. در غلظت ۰/۶ تعداد باکتری پس از گذشت ۱۸ ساعت رشد کرده و این غلظت به عنوان غلظت بازدارنده ثبت شد. اما در تیمار ۰/۴ عصاره کرفس کوهی باکتری مورد نظر در محیط کشت رشد کرد این غلظت تاثیر کمتری بر روی سویه مورد نظر داشته است. همچنین مطالعه ایی بر روی اثر زعفران، دانه بارهنگ، برگ کلپوره، لعل کوهستان، شیشه شور برروی باکتری لیستریا صورت گرفته نتایج نشان داد که زعفران بهترین تاثیر را برروی باکتری گذاشته و بارهنگ هیچگونه اثرضدباکتریایی علیه لیستریا نشان نداد(معتمدی وهمکاران ۱۳۸۹).

بنابراین باتوجه به نتایج بدست امده از مطالعات انجام شده می‌توان گفت که عصاره کرفس کوهی خاصیت ضد باکتریایی دارد و این امر غیر قابل کتمان است. ضروری است برای برسی دقیق‌تر خاصیت ضد باکتری کرفس کوهی روی باکتری لیسریا و جنس‌های مختلف ان مطالعات گسترده‌تری در این زمینه صورت گیرد. با انجام این مطالعات سلامت مصرف کنندگان و ابزیان تضمین خواهد شد.

۴. نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج بدست امده مشخص شد که عصاره کرفس کوهی خاصیت ضد باکتریایی قوی داشته و باعث مهار رشد باکتری در این مطالعه شده است.

منابع

٤. پیرعلی خیر ابادی ا. و حسینی شکرایی پ. ۱۳۹۶. مطالعه وقوع لیستریا مونوسیتوژنز در ماهیان قزل الای رنگین کمان عرضه شده در برخی بازارهای شهرکرد. مجله تحقیقات منابع طبیعی تجدید شونده، سال هشتم، شماره۲، صفحه ۸۱-۸۸.

٥. فتاحیان، ا. و اذرگون، ر. ۱۳۹۲ .برسی حضور لیستریا مونوسیتوژنز در دستگاه گوارش قزل الای رنگین کمان. همایش ملی توسعه و پرورش ماهیان سرد ابی. شهرکرد ۱۰ الی ۱۱ اردیبهشت۹ ۹۲.

٦. معتمدی ح، داراب پور ا، نیک نژاد م، سیدنژاد س، ۱۳۸۹. بررسی اثر ضد لیستریوزی برخی گیاهان دارویی علیه لیتریا مونوسایتوژن، همایش ملی گیاهان دارویی

٧. Abera B., BiaddgelgenF. and Bezabih, B. 2010. Prevalencd of *Salmonella ryphi* and intestinal parasites among food handlers in Bahir Dar Town, Northwest Ethiopia. Ethiop J Health Dev. 24(1):46-50.

٨. Dillon R. M. and Patel T.R. 1992. Listeria in seafood:a review.J. Food Prot.55(1): 1009-1015.

٩. Elbashir s., Parveen S., Schwarz J., Rippen T., Jahncke M. and Depaola A. 20018. Seafood pathogens and information on antimicrobial resistance: A review, Food Microbiol. 70(1): 85-93.

١٠. Heinitz L. and Johnson J.M. 1997. The incidence of Listeria spp., Salmonella spp., and Clostridium in smoked fish and shellfish. J. Food Prot. 61(1): 318-323.

11. Krishasamy V., Marshall K., Dewey-Mattia D. and Wise M. 2020. Outbreak characteristics and epidemic curves for multistate outbreaks of *Salmonella* infections associated with produce: United States, 2009-2015. Foodborne Pathog Dis. 17(1): 15-22.

Effect of different dilutions of celery extract on Staphylococcus aureus from rainbow trout

Marzieh Ghasemi Pirbalouti[1] *, Fardin Shaloui[2,] Farzaneh Nikokhah[3],

1- Graduate Student, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and General Land, Shahrekord University
2- Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, Shahrekord University
3- Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, Shahrekord University

m.shahrad76@gmail.com

Abstract

Rainbow trout farming has increased dramatically over the past few years. With increasing breeding density, the prevalence of bacterial diseases has increased. Staphylococcus is one of the most important pathogenic microorganisms in rainbow trout. One of the most important species of this genus is Staphylococcus aureus. Some of them produce enterotoxins. Conventional treatments for diseases, such as the use of antibiotics and chemical drugs, have drawbacks and problems.Therefore, in this study, celery extract was used in vitro to strengthen the immune system of fish against Staphylococcus aureus. In this study, different dilutions (0.04, 0.6, / 08) of hydroalcoholic extract of celery were used in four treatments. Twenty pieces of fish with an average weight of 30 grams were randomly sampled and one gram was isolated from fish liver tissue. Bacteria isolated from the liver tissue of rainbow trout were cultured in agar culture medium and identified by hot staining and biochemical tests. The results showed that celery extract at a concentration of 0.6 g / ml is an inhibitor of bacterial growth and a concentration of 0.8 g / ml is a lethal agent for Staphylococcus aureus.

Keywords: Rainbow trout, Staphylococcus aureus, Celery extract, Liver, Immune system

اثر رقت‌های مختلف عصاره کرفس کوهی بر روی استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ماهی قزل الای رنگین کمان

مرضیه قاسمی پیربلوطی[1*]، فرزانه نیکوخواه[2] ، فردین شالویی[3]

۱- دانشجوی ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و عوم زمین، دانشگاه شهرکرد

۲- ، استادیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین ، دانشگاه شهرکرد

۸- استادیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین ، دانشگاه شهرکرد

m.shahrad76@gmail.com

چکیده

درچندین ساله گذشته پرورش ماهی قزل الای رنگین کمان افزایش چشمگیری داشته است. با افزایش تراکم پرورش، شیوع بیماری های باکتریایی افزایش یافته است. یکی از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در ماهی قزل الای رنگین کمان باکتری استافیلوکوکوس می باشد. از مهم‌ترین گونه‌های این جنس استافیلوکوکوس اورئوس است. برخی از ان‌ها تولید انتروتوکسین می‌نمایند. اعمال روش های درمانی مرسوم علیه بیماری‌ها، نظیر استفاده از انواع انتی بیوتیک‌ها و داروهای شمیایی دارای معایب و مشکلاتی است. از این رو در این مطالعه از عصاره گیاه کرفس کوهی به صورت ازمایشگاهی برای تقویت سیستم ایمنی ماهی در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شد. در این مطالعه اا‌ز رقت‌های(۰/۴، ۰/۶، ۰/۸) عصاره هیدرو الکلی کرفس کوهی(Kelussia odratissma) در چهار تیمار استفاده گردید. تعداد ۲۰ قطعه ماهی باوزن متوسط ۳۰ گرم به صورت رندوم نمونه برداری و یک گرم از بافت کبد ماهیان جداسازی شد. باکتریهای جدا شده از بافت کبد ماهی قزل الای رنگین کمان را در محیط کشت بلاد اگار کشت داده شد. و با استفاده از رنگ امیزی گرم و تستهای بیوشیمیایی شناسایی شدند. نتایج بدست امده نشان داد که عصاره کرفس کوهی در غلظت ۰/۶ گرم بر میلی لیتر عامل بازدارنده در رشد باکتری و غلظت ۰/۸گرم بر میلی لیتر عامل کشنده برای باکتری استافیلو کوکوس ارئوس میباشد.

واژگان کلیدی: ماهی قزل الای رنگین کمان، باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ، عصاره کرفس کوهی، کبد ، سیستم ایمنی

۱.مقدمه

قزل الای رنگین کمان با نام علمی(*Oncorhynchus mykiss*)از خانواده سالمونیده است این ماهی دارای یک نوار پهن به صورت رنگین کمان در هر طرف بدن می‌باشد. بر روی سر، بدن، پشت، باله‌چربی، باله دمی این ماهی لکه‌های تیره رنگ دیده می‌شود. این ماهی بومی سواحل غربی شمال امریکا است و از سال ۱۸۸۰ به سایر نقاط دنیا انتقال یافت. امروزه ماهی قزل الای رنگین کمان به صورت ماهی شماره یک اکثر کارگاه‌های تکثیر و پروش ماهیان سردابی در بیشتر نقاط جهان در امده است. از خصوصیاتی که این ماهی را مورد توجه قرار داده، سازش خوب ان با شرایط پرورش متراکم است از این رو ابزی پروری در ایران در طی سالیان اخیر روند رو به رشدی داشته است و نقش مهمی در تامین غذا و امنیت غذا ایفا نموده است و در دنیا با رشد سالیانه ۸/۵ ٪ یکی از سریع‌ترین بخش های صنعت تولید غذا محسوب می‌گردد (Bondad 2005). افزایش نیازها برای

تولیدات ابزی‌پروری منجر به پرورش متراکم تعداد زیادی از ماهیان گردیده است با افزایش تراکم پرورش، شیوع بیماری باکتریایی افزایش یافته است(Hoshina 1957). تلفات ناشی از بروز و شیوع بیماری عفونی و انگلی که به دنبال عوامل استرس‌زا و کاهش سیستم ایمنی رخ می‌دهد .از مهم‌ترین مشکلات پرورش دهندگان توسعه این صنعت در ایران می‌باشد.(Beack 2006). بیماری‌های باکتریایی از مهم ترین بیماری‌های عفونی است که سبب تلفات و ضرر اقتصادی بسیاری در صنعت ابزی‌پروری ماهیان سردابی می‌شوند. بنابراین شناخت باکتری‌های بیماریزا یکی از مهم‌ترین راه‌ها جهت کنترل و پیشگیری از بروز بیماری‌های باکتریایی است برخی از باکتری‌های گرم مثبت مانند استرپتوکوکوس، استافیلوکوکوس، میکروکوکوس در ماهی خطرناک هستند. به همین جهت شناخت این میکروارگانیسم‌های بیماریزا امری ضروری است. یکی از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های بیماریزا در ماهی قزل الای رنگین کمان باکتری استافیلوکوکوس می‌باشد. عامل این بیماری به صورت کوکسی خوشه‌ای، گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری می‌باشد. از مهم‌ترین گونه‌های این جنس استافیلوکوکوس اورئوس (Staphylococcus aureus)است. که بسیاری از نژادهای بتاهمولیتیک و کواگولاز مثبت این باکتری، فرصت طلب است. و برخی از ان‌ها تولید انتروتوکسین می‌نمایند. که منجربه بروز مسمویت‌های غذایی در انسان می‌شود(Dinges et al. 2000). این باکتری به عنوان یک عامل بیماریزای اجباری در ماهیان است که از راه اب و غذای الوده وارد بدن ماهی می‌گردد برخی نژادهای این باکتری جز میکروفلور طبیعی روده هستند. که در شرایط تضعیف سیستم ایمنی بدن ماهیان و استرس‌های محیطی مختلف (حمل ونقل، دستکاری‌های محیطی، تراکم بالا، استفاده از منابع ابی باکیفیت پایین،تغییر عوامل فیزیکی و شیمیایی اب و تغذیه نامطلوب) شروع به تکثیر می‌کند(موسوی و همکاران،۱۳۸۸).

توسعه پایدار ابزی پروری در بخش کشاورزی نیازمند به کارگیری تکنیک‌های نوین می‌باشد استفاده از تکنولوژی‌های نوین در افزایش بهره وری و کاهش هزینه تولید از جمله موارد قابل اهمیت در ابزی‌پروری پایدار است .باتوجه به تحقیقاتی که بر روری عوامل محرک ایمنی گیاهی در دنیا صورت گرفته است نشان داده است این مواد علاوه بر افزایش راندمان رشد ماهیان و رسیدن به وزن مناسب در زمان کوتاه با بهبود عملکرد سیستم ایمنی موجب افزایش مقاومت ماهی در برابر عوامل بیماری‌زا می‌گردد و نیز موجب افزایش ماندگاری ان‌ها می‌شود (عادل و همکاران، ۱۳۹۴).

کرفس کوهی،با نام محلی کلوس به عنوان گونه جدید از جنس کلوسیا از تیره چتریان، یکی از گیاهان تغذیه‌ای، مرتعی و بومی ایران بوده و تاکنون وجود ان در سایر مناطق جهان گزارش نشده است. کرفس کوهی در منابع مختلف با نام‌های علمی نام‌گذاری گردیده است. بررسی اثرات ضد باکتریایی اسانس کرفس کوهی علیه برخی پاتوژن‌های مواد غذایی، نشان میدهدکه از این گیاهان می‌توان در راستای کنترل موثر پاتوژن‌های مواد غذایی به عنوان یک روش مکمل استفاده کرد. باتوجه به اهمیت روز افزون گیاهان داروی به عنوان جایگزین انتی بیوتیک، میتوان از وجود ترکیبات زیستی موجود در گیاه کرفس کوهی هم‌چون فنالیدها و فلاوونوئیدها بهره گرفت (سعیدی و امید بیگی،۱۳۸۸ و سلیمی و همکاران، ۱۳۸۹) .

باتوجه به اهمیت پرورش ماهی قزل الای رنگین کمان در کشور تحقیق در رابطه با جنبه‌های مختلف مدیریتی از جمله مدیریت تغذیه‌ای لازم و ضروری است در این راستا بر اساس شواهد مبنی برنتایج مثبت حاصل از اثرات محرک‌های گیاهی بر رشد پاسخ ایمنی ماهیان در این تحقیق سعی بر ان شده است که تاثیر سطوح مختلف اسانس کرفس کوهی بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از کبد ماهی قزل الای رنگین کمان مورد برسی قرار گیرد.

۲.مواد و روش‌ها

این مطالعه در پاییز سال ۱۴۰۰ در دانشگاه شهرکرد انجام شد. تعداد ۲۰ ماهی قزل الای رنگین کمان با وزن متوسط ۵۵ گرم به صورت تصادفی از کارگاه ابزی پروری دانشگاه شهرکرد انتخاب شدند. ماهیان گروه شاهد از غذای تجاری تغذیه شدند. از

عصاره کرفس کوهی در غلظت‌های ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ به منظور بالا بردن سیستم ایمنی بدن ماهی قزل الای رنگین کمان استفاده گردید وبه غذای تجاری ماهی اسپری شد. تهیه غذا در مکانی خشک و کاملا تمیز انجام شد .

به منظور بررسی میکروبی، در مرحله اول اقدام به بی‌هوش کردن ماهیان، با استفاده از پودر گل میخک گردید سپس ماهیان به ازمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه شهرکرد منتقل و در شرایط کاملا استریل ، از کبد نمونه برداری شد.

جهت رقیق سازی بافت کبد (رقت سریالی) از لوله های ازمایش که حاوی ۹ سی سی اب مقطر استریل بودند، استفاده شد. در کنار شعله در شرایط کاملا استریل یک گرم از نمونه کبد به محتویات لوله ازمایش اول اضافه و سپس به وسیله دستگاه ورتکس همگن سازی انجام شد(سلطانی وهمکاران، ۱۳۹۴).

با استفاده از سمپلر میزان یک سی سی از لوله ازمایش شماره یک را به لوله ازمایش شماره دو انتقال دادیم و با تعویض سر سمپلر تا لوله ازمایش شماره چهار مراحل ازمایش را تکرار کردیم و در نهایت یک سی سی از اخرین لوله ازمایش(لوله ازمایش شماره چهار) دور ریختیم. رقیق سازی به همین شکل برای سایر نمونه ها انجام گرفت.

بعد از تهیه محیط کشت بلاد اگار ، کشت باکتری صورت گرفت. محیطهای کشت داده شده در گرمخانه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. در ۲۴ ساعت اول کلونی باکتری ها روی محیط کشت بلاد اگار رشد کردند. برای تشخیص نوع باکتری باتوجه به شکل و رنگ باکتری، رنگ امیزی گرم انجام گرفت. یکی از انواع باکتری های جدا شده از بافت کبد دارای کلنی طلایی رنگ بر روی بلاداگار بود که به صورت کوکسی خوشه‌ای، بنفش رنگ در زیرمیکروسکوپ دیده می شد. تشخیص اولیه از این باکتری استافیلو کوکوس ارئوس بود که جهت تشخیص بهتر باکتری از تست‌های بیوشیمیایی استفاده کردیم. شناسایی و شمارش باکتری در گروههای شاهد و تیمارهای مورد مطالعه به منظور مقایسه و بررسی اثر عصاره کرفس صورت گرفت. جهت اثبات درستی کار باکتری بر روی محیط کشت مولر هینتون نیز کشت داده شد و با استفاده از روش چاهک و کشت، مقایسه نتایج صورت گرفت.

۳. نتایج و بحث

ماهیان قزل الای رنگین کمان استفاده شده در این مطالعه هیچگونه علامت ظاهری نداشته و کاملا سالم به نظر می‌رسیدند. رنگ کلونی باکتری جدا سازی شده از کبد و کلیه طلایی رنگ مشاهده شد همچنین رنگ امیزی گرم نشان داد باکتری مذکور گرم مثبت و به شکل خوشه‌ای شکل است. با توجه به مشخصات ظاهری باکتری استافیلوکوکوس‌اورئوس شناسایی شد. اما برای تشخیص دقیق‌تر باکتری از تست‌های بیوشیمیایی استفاده گردید.

جدول۱: نتایج ازمایشهای تستهای بیوشیمیایی باکتری جدا شده از کبد و کلیه ماهی قزل الای رنگین کمان

مشخصه باکتری	نتایج

شکل باکتری	کوکسی خوشه ایی
رنگ کلونی	طلایی
گرم	مثبت
کاتلاز	مثبت
گالاکتوز	منفی
مانیتول	مثبت

نتایج بدست امده از مقایسه ۴ تیمار مورد مطالعه نشان داد که تیمار گروه شاهد که تنها از غذای تجاری تغذیه شده بود، در هنگام کالبدگشایی وبعد از کشت باکتری بر روی محیط کشت بلاداگار، دارای کلونی شمارش شده بیشتری ازباکتری استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با سایر تیمارها بود. به نظر می‌رسد که ماهیان قزل الای رنگین کمان تغذیه شده با غلظت های مختلف عصاره کرفس کوهی سیستم ایمنی بدنشان تقویت شده و مانع از تکثیر زیاد این باکتری گردیده اند.

در مطالعات انجام شده توسط دادگر وهمکاران، بر روی عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس، نعنا، رزماری، اویشن باغی، گل راعی، سیاه دانه ، گزنه ، سیر و زرشک مشاهده شد که عصاره اتانولی سیاه دانه، زرشک و گل راعی خاصیت ضد باکتریایی بیش‌تری در مواجه با باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به گزنه و نعنا داشته‌اند(دادگر وهمکاران، ۱۳۸۶).

باتوجه به نتایج بدست امده می‌توان گفت که عصاره کرفس کوهی در غلظت۰/۶ اثر بازدارنده بر روی رشد استافیلوکوکوس اورئوس داشته است. در مقایسه با تیمار شاهد هیچگونه اسیب بافتی مشاذه نشد. همچنین می‌توان نتیجه گرفت که عصاره کرفس کوهی سبب افزایش سطح سیستم ایمنی بدن ماهی قزل الای رنگین کمان شده و مانع از رشد باکتری مذکور بصورت کشنده در غلظت ۰/۸ گرم بر میلی لیتر شده است بنابراین می‌توان از این ماده گیاهی به عنوان درمان بیماری ماهیان در برابر این نوع باکتری اقدام کرد. درمان بیماری به روش گیاهی علاوه بر به صرفه بودن از لحاظ اقتصادی، نسبت به داروهای شیمیایی به حفظ محیط زیست نیز کمک مینماید زیرا این متابولیت‌ها به صورت خودبه خودی تجزیه می‌شوند وسلامت مصرف کنندگان را نیز تضمین می‌کند.

۴.نتیجه‌گیری

نتایج بدست امده نشان میدهدکه عصاره کرفس علاوه بر تاثیر کشندگی (باکتری استافیلو کوکوس اورئوس) دارای خاصیت انتی اکسیدانی و ضدباکتریایی بالاتری نسبت به غذای تجاری ماهی بوده است. رقت‌های مختلف عصاره کرفس کوهی استفاده شده در جیره نشان داد که عصاره کرفس کوهی در رقت ۰/۸ گرم بر میلی لیتر سبب کشته شدن باکتری مورد نظر شده است. تمامی مطالعات انجام شده صرفا به صورت ازمایشگاهی بوده است و نیاز به تحقیقات گسترده تری در این زمینه می‌باشد.

منابع

۱. سعیدی، ک. امید بیگی، ر. ۱۳۸۸. بررسی میزان و ترکیب اسیدهای چرب، میزان کل مواد فنولیکی و میزان اسانس بذر گیاه دارویی کلوس (*Kelussia odratissma*) فصل‌نامه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، صفحات ۱۱۳-۱۱۹ .

۲. دادگر ت.، قائمی ع.، بازوری م.، مازندرانی م.، سیفی ا. و بیات ه. ۱۳۸۶. اثر ضد باکتریایی ۲۰ گونه از گیاهان دارویی علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم و حساس به متی سلین. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان . دوره ۱۹. شماره ۲۱. صفحات ۵۵-۶۲.

۳. سلطانی نژاد ز.، پیرعلی ا. و نعمت اللهی ا. ۱۳۹۴. مقایسه اثر ضد باکتری کرفس کوهی بر روی باکتری اینیایی در مزارع قزل الای رنگین کمان کشور. صفحه۱۷-۲۰.

۴. عادل م.، پورغلام ر.، ذریه زهرا ج.، صفری ر. و قیاسی م . ۱۳۹۴. برسی سطوح عصاره نعناع فلفلی بر شاخص رشد، ترکیبات لاشه، باکتری روده و بازماندگی ماهی قزل الای رنگین کمان() در مواجه با یرسینیا راکی(*Yersinia ruckeei*) مجله بوم شناسی ایران، دوره ۷۰، صفحات ۶۲-۷۰.

۵. موسوی ع.، سعیدی م.، قیاسی م. و زاهدی ا. ۱۳۸۸. استافیلوکوکوزیس در مزارع منتخب پرورشی قزل الای رنگین کمان در استان مازندران، پانزدهمین کنگره دامپزشکی ایران. تهران. ۵۲-۵۴.

6. Beak G.H., Kim J.H., Gomes D.K. and Park S.C. 2006. Isolation and characterization of Sterpetococus SP. From disesed flounder *(Parlitichthys olivaceus*) in Jeju Island. Jornal of Veterinary Science, 7(1): 53-58.

7. Bondad M.G., Subasinghe R.P., Arthur J.R., Ogwa K., Adlard R. and Shariff M. 2005 Diseseand heahth management in Asian aquaculture. Ueterinary parasitology 132(2): 249-272.

8. Dinges M.M., Dinges P., Orwin M. and Schlievert, P. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus.* Clinical and microbio liolgical Research, 13(1): 16-34.

9.Hoshina T., Sano T. and Mormoto Y. 1958. A Streptococcus pathogenic to fish. *J. Tokyo Univ. Fish.* 44(1): 57-68.

An overview of the use of medicinal plants in aquaculture

Ashraf sarli [1*,] Mohammad farhangi [2,] Hojatoallah Jafaryan[3]

.1- Masters Student See Biology, Gonbad Kavous University, Golestan, Iran
2- Assistance Professor of Fisheries, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran
3- Associate Professor of Fisheries, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran

**Email: sarliashraf@gmail.com*

Abstract

Plants are among the valuable resources of any country and have different uses; One of these applications is their medicinal use. In addition to treating various diseases in humans, medicinal plants have had many benefits in improving the quality of life of other organisms, including aquatic animals. In recent years, the aquaculture industry and the use of medicinal plants to improve aquatic life has become very popular .In addition to this significant growth, aquaculture has always faced problems such as nutritional problems and the growth and incidence of diseases. The use of antibiotics and chemicals to address these problems will always have irreparable consequences for the environment and adverse effects on aquatic meat, and ultimately risks to human health and nutrition. It seems that herbal medicines, as natural ingredients, can be a very good alternative to drugs and chemicals to prevent the mentioned problems. The study was conducted to review the reports of the use of medicinal plants in aquaculture.

Keywords: Aquatic, immune system, growth stimulant, medicinal plants

مروری بر کاربرد گیاهان دارویی بر آبزی‌پروری

اشرف سارلی *[۱]؛ محمد فرهنگی[۲] ؛حجت الله جعفریان[۳]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد زیست دریا، گروه زیست‌شناسی، دانشگده علوم، دانشگاه گنبد کاووس

۲-استادیار گروه شیلات، دانشگاه گنبدکاووس گنبدکاووس، ایران

۳- دانشیار گروه شیلات، دانشگاه گنبدکاووس گنبدکاووس، ایران

*ایمیل: *sarliashraf@gmail.com*

چکیده

گیاهان جزو ذخایر با ارزش هر کشور محسوب می‌شوند و کاربردهای مختلفی دارند؛ یکی از این کاربردها، استفاده‌ی دارویی از آن‌ها است. گیاهان دارویی علاوه بر درمان بیماری‌های مختلف در انسان، فواید فراوانی بر بهبود کیفیت زندگی سایر جانداران، از جمله آبزیان نیز داشته است. در سال‌های اخیر، صنعت پرورش آبزیان و استفاده از گیاهان دارویی در بهبود زندگی آبزیان بسیار رواج یافته است. در کنار این رشد قابل توجه، آبزی‌پروری همواره با مشکلاتی از جمله، مشکلات تغذیه‌ای و رشد و بروز بیماری‌ها مواجه بوده است. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی برای برطرف کردن این مشکلات، همواره پیامدهای غیر قابل جبرانی برای محیط زیست و اثرات سوء در گوشت آبزیان و در نهایت خطراتی برای سلامت و تغذیه‌ی انسان به دنبال خواهد داشت. به نظر می‌رسد، فرآورده‌های دارویی گیاهان، به عنوان مواد طبیعی می‌توانند جایگزین بسیار مناسبی برای داروها و مواد شیمیایی، جهت جلوگیری از مشکلات ذکر شده باشد. تحقیق حاضر به جهت مروری بر گزارشات کاربرد گیاهان دارویی در آبزی‌پروری انجام شده است.

واژگان کلیدی: آبزیان، سیستم ایمنی، محرک رشد، گیاهان دارویی

مقدمه

امروزه آبزی پروری یکی از صنایع در حال رشد در زمینه‌ی تولید غذا در سراسر دنیا می‌باشد. با توجه به محدودیت منابع آب و زمین، توسعه این صنعت برای تولید بیشتر، منجر به تولید متراکم شده است؛ که این امر خود باعث افزایش میزان استرس بر آبزیان پرورشی و کاهش سطح ایمنی آنها شده و زمینه را برای بروز انواع بیماری‌های عفونی خصوصا بیماری‌های باکتریایی فراهم نموده است (اکرمی، ۱۳۹۴). تا بحال استفاده از مواد شیمیایی به طور گسترده‌ای برای پیشگیری و درمان استفاده شده است، ولی استفاده از داروهای شیمیایی دارای اثرات منفی متعددی بر محیط زیست و حتی انسان می‌باشد (فتح الهی و جوهری، ۱۳۹۴). در بسیاری از کشورها استفاده از این داروهای شیمیایی، محدود و یا ممنوع شده است که این مورد سبب توسعه استفاده از محرک‌های طبیعی ایمنی و رشد نظیر گیاهان دارویی و عصاره‌های آنها، پروبیوتیک‌ها و پربیوتیک‌ها شده است. وجود ترکیبات متنوع در گیاهان دارویی علاوه بر بهبود ایمنی آبزیان، سبب افزایش اشتها، تحریک رشد و کاهش استرس نیز میگردد. این درحالی است که اثرات ضد میکروبی، ضد قارچی و ضد انگلی بسیاری از گیاهان دارویی در آبزیان پرورشی تحقیق شده و اثبات گردیده است (فراشی و همکاران، ۱۳۹۹۸).

موارد استفاده دارو های گیاهی در آبزیان

۱- بیماری‌های باکتریایی

از مهمترین بیماری‌های باکتریائی ماهی موارد زیر را میتوان نام برد: بیماری فرونکولوزیس (Furunculosis) که عامل آن Aeromonos salmonicida است .بیماری باکتریایی آبشش (BGD (Bacterial gill disease : عامل میکسو باکتریا، بیماری طاعون سرخ (Red pest) عامل: باکتری گرم منفی *Vibiro anguillarum*، پوسیدگی باله و دم : عامل باکتری‌های آنترو موناس -پزودوموناس است (مخیر، ۱۳۷۵).

گیاهان داروئی و داروهای گیاهی زیر بر علیه باکتری‌ها موثر شناخته شده‌اند: داروی Bio gammamix توسط محققان کشور کره ساخته شده این دارو حاوی شیرین بیان، سیر به همراه صفرای گاو می‌باشد؛ که به‌صورت مخلوط با غذا، ۲ بار در روز بمدت ۷ روز برای درمان بیماری‌های آزاد ماهیان ، کپور ماهیان و مارماهی به کارگرفته شد. این دارو هیچ گونه عوارض جانبی نداشته و برروی اکثر باکتری‌های پاتوژن مؤثر واقع شده است (Heo & Kim, 1994). در تحقیقی، فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ی ۵ گیاه ژاپنی شامل: Lonicera japonica، Artemisia vulgaris، Oenothera biennis، Impatiens biflora و Stellaria aquatica در برابر ۱۳ پاتوژن باکتریایی مورد مطالعه قرار گرفت. Aeromonas salmonicida و Edwardsiella ictalurid حساسترین پاتوژن نسبت به این عصاره‌ها بودند. در بین عصاره-ها S. *aquatic*/ز نظر شدت مهار و از بین بردن تعداد پاتوژن مؤثرتر واقع شد (Shangliang, 1990).

۲-درمان بیماری‌های ویروسی

از مهمترین بیماری‌های ویروسی آبزیان میتوان به موارد زیر اشاره نمود:

عفونتهای نکروزی پانکراس IPN، سپتمی سمی خونریزی دهنده ویروسی (Viral Hemorrhagic septicemi)، نکروز عفونی بافت‌های خونساز (Infection Hematopoientic necrosis) ، عفونت ویروسی بهاره کپور ماهیان (Spring virema of carp)، التهاب کیسه شنا (Swim bladder Inflammation) (مخیر، ۱۳۷۵).

برای درمان این دسته از بیماری‌ها در مورد تعدادی از گیاهان تحقیقاتی بعمل آمده است که در اینجا به آنها اشاره میشود: داروی CIFax : مخلوط یک ماده شیمیائی همراه با ترکیبات گیاهی است که با غلظت ۰۱/ میلی گرم در لیتر در آب مصرف میشود سه‌روز پس از مصرف اثر درمانی آن ظاهر میشود ، شدت بیماری را کاهش داده والتیام زخم‌های جلدی شروع می‌شود (آذری ۱۳۷۶). دیرک بوساراکوم، در سال ۱۹۹۶، عصاره‌ی اتانلی ۱۸ گیاه مختلف را بروری ویروس‌های IHNV,OMV,IPNV به کار برد؛ که در مورد OMV 65-100 درصد، و IHNV 25-100 درصد موثر بود. استفاده از این عصاره ها حتی تا مقادیر ۳-۲ برابر مقدار مؤثر بر ویروس هیچ اثر مضر سلولی‌نشان نداده است (Direkbusarakom, 1996). در آزمایشی توانایی عصاره‌ی اتانولی polyvinylpyrolidone از Clinacanthus *nutans*روی میگوی ببری سیاه مورد بررسی قرار گرفت. این عصاره باعث افزایش مقاومت میگو در برابر ویروس YHVشد (Yoogeeswaran 2007).

۳-درمان‌بیماری‌های قارچی

مهمترین بیماری‌های قارچی آبزیان عبارتند از ساپرولگنیا – ایکیتوفونوس – برانکیلومایکوزیس

سیر (Allium sativum) توسط راموس (۱۹۹۱) در درمان ساپرولگینا مورد ارزیابی قرار گرفت و اثرات مثبتی از خود نشان داده است Caruana .(Ramos, 1991) و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثر عصاره‌های ۱۲ گیاه دارویی و بیوفلانویئدی را در شرایط درون کشتگاهی (in vitno) بر قارچ ساپرولگنیا بررسی کردند و نشان دادند که تمامی گیاهان دارویی استفاده شده، پتانسیل جایگزینی با مالاشیت گرین را دارند. (Caruana et al, 2012). شریفی و همکاران در سال ۱۳۹۱، اثر وابسته به غلظت عصاره بلوط را در ایجاد هاله‌ی عدم رشد قارچ ساپرولگنیا در شرایط in vitro نشان دادند (شریفی و همکاران، ۱۳۹۱).

۴-درمان بیماری‌های انگلی

سستودهائی مانند: دیفلوبوتریوم لاتوم – لیگولا انتسیتنالیس – تریپانونکا –کاریومینه ارس لاتیسس – پروتئوسفالیده و ترماتودهای مانند: اوپیستورکیس – متورکیس آلبیدوس – هتروفیس و ترماتودهای مونوژن ژیروداکتیلوس – داکتیلوژیروس – بنه ده نیا – دیپلوزئون، از جمله مهمترین بیماری‌های انگلی آبزیان محسوب می‌شوند (مخیر، ۱۳۷۵).

با وجود اینکه در خصوص داروهای گیاهی ضد انگل در سایر موجودات فعالیت‌های زیادی صورت گرفته است ولی در مورد آبزیان این‌فعالیت‌ها بسیار محدود بوده است که در اینجا به انها اشاره می شود. توتون (Nicotina Tabacum)، حاوی الکالوئید نیکوتین ، نیکوتئین، نیکو تل لین، نیکوتیمین است، که عمدتا در برگ آن وجود دارد. این مواد دارای سمیت زیادی هستند؛ که عمده ترین اثر این مواد اثرات ضد انگلی‌آن است. توتون برای مبارزه با انگل بوتریوسفال ماهی استفاده میشود؛ اگر در این کار دقت به عمل نیاید در عرض چند دقیقه باعث مرگ ماهی خواهد شد (عزیزی و ایمانی، ۱۳۹۷). در آزمایشی، به تانک‌های حاوی کپور ماهی مقادیر متفاوتی سیر تازه اضافه شد؛ بعد از ارزیابی تعداد تخمها و نماتدها، مشخص شد که بین ۷۵ تا ۱۰۰ درصد در درمان موثر بوده است (Pena et al, 1988). سخت پوستان انگلی مانند آرگولوس (Argulus) و لرنهآ (Lernaea) در پرورش آبزیان خسارت های عمده ای را بوجود آورده و اهمیت فوق‌العاده ای دارند. گیاهان دارویی از جمله سیر و پیاز، در مبارزه با این موارد بسیار موثر گزارش شده اند (نژادمقدم و صفری، ۱۳۹۵).

۵-ایجاد بی‌حسی

در مراکز تکثیر و پرورش ماهی جهت بدست آوردن سلول‌های جنسی مانند تخمک و اسپرم و به منظور کاهش استرس و کاهش تحرک آن، نیاز به بی هوش کردن ماهی است. برای بی هوش کردن قزل آلا از MS222 تری کائین متان سولفونات، که یک ماده گران قیمت و وارداتی است؛ استفاده می شود. اوژنول ماده اصلی موجود در پودر گل میخک است، که اثرات بی حسی را از خود نشان میدهد. طول مدت بیهوش شدن ۳-۲ دقیقه گزارش شده است. اسانس از تقطیر برگ گل غنچه و حتی‌شاخه‌های گلدار گیاه بوسیله آب و افزودن مقدار نمک تهیه می‌شود. اسانس گل میخک به میزان ۶۰-۴۰ ٪ بهتر از MS222 بوده است (Keene, 1998).

۶- افزایش رشد

دارو livol (IHF-looo) یک داروی گیاهی است، که در هندوستان تولید شده و این دارو در دوزهای ۵ و ۵، ۱ ، ۵/۱ ، ۲ و ۵/۲ وزن برای مدت ۱۱۲ روز بکار گرفته شد. در مجموع با دو درصد از این دارو، بیشترین میزان رشد بدست‌آمد؛ ماهی‌هائی

که با این دارو درمان شدند راندمان غذائی بالاتر، نسبت جذب پروتئین و کربوهیدرات بهتر، و توانائی هضم بهتری در مقایسه با گروه کنترل نشـــان دادند (Jayaprakas, 1997). پودر گیاه Papaya حاوی آنزیمی به نام papain می‌باشـــد. افزایش هضـــم پروتئین، ضـریب تبدیل غذایی، نرخ رشـد ویژه و افزایش وزن در پسـت لاروهای میگوی ببری سـیاه که با جیره‌ی ۱۶ درصـد کنجاله‌ی این گیاه تغذیه شدند، مشاهده شد (Penaflorida, 1995). ساپونین موجود در گیاه Quillajaپتانسیل افزایش عملکرد رشد در گونه‌های پرورشی ماهی و کاهش سوخت و ساز در ماهی تیلاپیا را دارد (اکرمی، ۱۳۹۴).

با توجه به بررسی‌های به عمل آمده، در تحقیقی، به نظر می رسد افزودن ۵-۱/۲سیر به جیره غذایی فیل ماهی، که از ماهیان بســیار با ارزش محســوب می‌شــود، می‌تواند با افزایش رشــد، بقا و ســلامتی از طریق بهبود پارامترهای خونی و ایمنی غیر اختصــاصــی کمک شــایانی به حفظ و بازســازی ذخایر این گونه کند. محرک‌های رشــد گیاهی به القاء نرخ رونویســی کمک می‌کنند، این فرایند منجر به افزایش مقدار ،RNA اسیدامینه و در نهایت افزایش تولید پروتئین کل در سلول می‌شوند (نوبهار و همکاران، ۱۳۹۲). نتایج یک بررسی بر روی ماهی گور خری (*Danio rerio*)، نشـــان داد، عصـــاره هیدروالکلی گیاه رازیانه به طور معنی‌داری باعث افزایش وزن نهایی، افزایش وزن بدن، درصـــــــــد افزایش وزن بدن، کارایی غذایی، فاکتور وضعیت، شاخص رشد روزانه، ضریب رشد ویژه، میزان بقاء و کاهش ضریب تبدیل غذایی و غذای خورده شده روزانه در هر دو جنس ماهی گورخری گردید که از روند وابسته به دز پیروی میکرد (عبدالمنافی و همکاران، ۱۳۹۹).

۷-محرک سیستم ایمنی

مواد محرک ایمنی گروه نسـبتا وسـیعی از ترکیبات با منشـا طبیعی یا مصـنوعی هسـتند که از این میان انواع طبیعی بویژه عصاره‌های گیاهی به علت ایجاد آسیب کمتر به ماهی و محیط زیست اخیرا بیشتر مورد توجه قرار گرفتهاند (Alishahi et,al 2010). در تحقیقاتی که روی تاثیر گیاه آنغوزه (Ferula assafoetida) بر کپور معمولی (Cyprinus carpio) انجام شد، مشخص شـد که این گیاه با افزایش میزان بیان ژن ایمنی، باعث افزایش سـطح ایمنی در این گونه می‌شـود (نژادمقدم ش.، صـفری ر.، ۱۳۹۵). گیاه نعناع فلفلی (Mentha piperita)، با افزایش معنادار سطح پروتئین، لیزوزیم و آنزیم الکالین فسفاتاز قلیایی مخاط پوســـت و همچنین افزایش پارامترهای ایمنی همورال خون، در ماهی آزاد دریای خزر (Salmo truttacaspius)، باعث افزایش سطح ایمنی در این ماهی شد (ملکی و اعتصامی، ۱۳۹۲). قاسمی و همکاران، طی بررسی به این نتیجه رسیدند که، افزودن ۱ درصـد اسـانس گیاهان دارویی به خصـوص پونه و مزره بختیاری به روغن زیتون به همراه جیره غذایی ماهی قزل آلای رنگین کمان سبب تقویت سیستم ایمنی ماهی می شود (قاسمی و همکاران، ۱۳۹۰).

۲.نتیجه‌گیری

از آنجایی که اغلب گیاهان دارویی مورد استفاده در آبزیان فاقد اثرات منفی خاصی بر ماهیان و محیط زیست هستند؛ و باقیمانده‌های دارویی نامطلوب ایجاد نمی‌کنند، در آبزی‌پروری استفاده از این ترکیبات گیاهی، به عنوان محرک‌های ایمنی جهت تقویت سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهیان پرورشی رایج شده است. با مروری بر مطالعات انجام شده در این زمینه به نظر می‌رسد، رژیم‌های غذایی با مشا طبیعی از جمله گیاهان دارویی می‌توانند پاسخ ایمنی ماهی نسبت به بیماری‌ها را بهبود بخشند و به عنوان محرک‌های ایمنی، جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها، واکسن‌ها و ترکیبات سنتزی و شیمیایی باشند.

منابع

٦. آذری تاکامی، قباد. ۱۳۷۶ . مدیریت بهداشتی و روشهای پیشگیری و درمان بیماریهای ماهی .انتشارا پریور. ۳۰۴ صفحه

۷. اکرمی ر.، ۱۳۹۴، استفاده از گیاهان دارویی در آبزی پروری بعنوان جایگزین برای داروهای شیمیایی (مطالعه موردی فیل ماهی پرورشی)، دو فصلنامه علوم تکثیر و آبزی پروری، سال سوم، شماره هفتم.

۸. شریفی، ا، گرجی‌پور، ر، گرجی پور، ع، سردسیری،م، محمدی، ر، جبارنژاد، ع، ۱۳۹۱. اثر ضد قارچی عصاره هیدروالکلی جفت گیاه بلوط بر روی قارچ ساپرولگنیا. شماره ۱: ۸۴-۸۷.

۹. عبدالمنافی م.، شعبانی ع.، صفری ر.، ۱۳۹۹ تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه رازیانه (Foeniculum vulgare) بر شاخص های رشد و بقای هر دو جنس نر و ماده ماهی گورخری(Danio rerio)، فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری شماره پیاپی ،۴۹ جلد ،۱۳ شماره ،۲ بهار ،۹۹ صفحه ۱۳ تا ۲.

۱۰. عزیزی بصیر م.، ایمانی ا.، ۱۳۹۷، استفاده از گیاهان دارویی به عنوان محرک سیستم ایمنی در آبزی پروری، سومین همایش ملی کشت ارگانیک و ازدیاد گیاهان دارویی، ارومیه. ایران.

۱۱. فتح الهی ت.، جوهری س ع.، ۱۳۹۴، مروری بر کاربردهای گیاهان دارویی در تکثیر و پرورش آبزیان، همایش بین المللی پژوهش‌های کاربردی در کشاورزی.

۱۲. فراشی ز.، غلامرضایی س.، قنبری موحد ر.، ۱۳۹۸، بررسی عوامل موثر بر آبزی پروری پایدار (مورد: مزارع آبزی پروری استان لرستان)، مجله تحقیقات اقتصاد و توسعه کشاورزی ایران دوره ،۵۰-۲، شماره ۱.

۱۳. قاسمی پیربلوطی ع.، پیرعلی ا.، پیشکار غ ر.، جلالی س م ع.، رئیسی م.، جعفریان دهکردی م.، حامدی ب.، ۱۳۹۰، اثر اسانس چند گیاه دارویی بر سیستم ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان (Oncorhynchus mykiss)، فصل‌نامه گیاهان دارویی، سال دوم، شماره ی ۲، صفحه ۱۵۵-۱۴۹.

۱۴. ملکی پ.، اعتصامی م.، ۱۳۹۲، نقش گیاهان دارویی در حیات آبزیان، همایش ملی گیاهان دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی.

۱۵. مخیر ، بابا. ۱۳۷۵. بیماریهای ماهی .انتشارات دانشگاه تهران .

۱۶. نژادمقدم ش.، صفری ر.، ۱۳۹۵، مروری بر گیاهان دارویی: یک فرصت جدید برای صنعت آبزی پروری، نخستین همایش ملی گیاهان دارویی، معطر و ادویه‌ای، دانشگاه گنبدکاووس، گلستان، ایران.

۱۷. نوبهار ز.، قلیپور کنعانی ح.، جعفریان ح ا.، ۱۳۹۲، تاثیر پودر خوراکی سیر بر پارامترهای خون شناسی و رشد فیل ماهی (Huso huso)، نشریه پژوهش‌های ماهی شناسی کاربردی، دانشگاه گنبدکاووس، دوره اول، شماره سوم.

18. Alishahi, M., Ranjbar, M., Ghorbanpour, M., Peyghan, R., Mesbah, M. and Razi Jalali, M. 2010. Effects of dietary Aloevera on specific and nonspecific immunity of Common carp (Cyprinus carpio). Iranian Journal of Veterinary Medicine.۹۱-۸۵:(۳)٤ ,

19. Caruana, S, Yoon, G.H, Freeman, M.A, Mackie, J.A, Shinna, A.P. 2012. The efficacy of selected plant extracts and bioflavonoid in controlling infection of Saprolegnia australis (Saprolegniales Oomycetes). Aquaculture 358.359:146-154.

20. Direkbusarakom , S; Herunsalee, A; 1996. Antiviral activity of several Thai traditional herb extracts against fish pathogenic viruses. Gyobyo-Kenkyu-=-Fish-Pathology. 1996,31: 4, 209-213;

21. Heo, GJ; Kim, BG. 1994. A study on efficacy and safety of Bio-Gammamix by oral administration to cultured fish. Korean-Journal-of-Veterinary-Research.1994, 34: 3, 627-633.

22. Jayaprakas, V; Euphrasia, CJ., 1997. Growth performance of Labeo rohita (Ham.) to Livol (IHF-1000), a Proceedings-of-the-Indian-National-Science-Academy.-Part-B,-Biological-Sciences. 1997, 63: 1-2, 21-30

23. Keene, JL; Noakes, DLG,. 1998. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout,Oncorhynchus mykiss (Walbaum).Aquaculture-Research. 1998, 29: 2, 89-101;

24. Pena, N; Auro, A; Sumano, H,. 1988, A comparative trial of garlic, its extract and ammonium- potassium tartrate as anthelmintics in carp. Journal-of-Ethnopharmacology. 1988, 24:2-3, 199-203

25. Peñaflorida, V. D. (1995). Growth and survival of juvenile tiger shrimp fed diet where fish meal is partially replaced with papaya (Carica papaya L.) or camote (Ipomea batatas Lam.) leaf meal. The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 47(1), 25-33.

26. Ramos, A., 1991. tretment of saprolegniasis in rain trout with garlic . Veterinaria -Mexico,1991,22,1 ,98.

27. Shangliang, T. 1990. The antibacterial and antiviral activity of herbal extracts for fish pathogens. J Ocean Univ Qingdao, 2:53–60.

28. Yoogeeswaran, A. 2007. Protection of Penaeus monodon against white spot syndrome virus by inactivated vaccine and herbal immunostimulants, M.Phil Dissertation submitted to Manonmaniam Sundaranar University, Tirunalveli.



مقالات کامل

(فیـــاهـــی)

دبیـــرخـــانه:
استان گلستان، شهرستان گنبد کاووس، دانشگاه گنبد کاووس، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، گروه زیست‌شناسی

Effects of silibinin as an anti-cancer agent on human skin fibroblast cells

Zohreh Jahanafrooz*

Assistant Professor of Cell and Molecular Biology
Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Maragheh, Maragheh, Iran.

Email: jahanafrooz@maragheh.ac.ir

Abstract

Background and purpose: Silibinin is a natural polyphenol with high antioxidant and anticancer properties. In addition to in vitro and in vivo studies, phase I and II clinical trials reported silibinin as a promising anticancer agent. However, there is few studies regarding on the silibinin effects on normal cells. In this study, the cellular effects of silibinin on the human skin fibroblast as a normal cell have been investigated. Fibroblast is one of the main cells in connective tissues.

Materials and methods: Silibinin influence on the morphology of fibroblast cells was evaluated with phase-contrast microscopy. We used MTS assay for viability assessment under silibinin treatment in fibroblast. Apoptosis induction was analyzed by Annexin V /PI (Propidium Iodide) kit and flow cytometry.

Results: Silibinin effect on morphology and viability of fibroblast at 70, 110, and 150 µg/ml was negligible after 24h. However, silibinin induced a cytotoxic effect on fibroblast after 48h at concentrations more than 110 µg/ml and caused cell shrinkage and cell death. According to the apoptotic assay, a few percent of dead cells sustain apoptotic or necrotic cell death.

Conclusion: These results suggest that silibinin at higher concentrations (i.e., which is effective on cancer cells) can cause a cytotoxic effect on fibroblasts as normal cells. Therefore, a controlled release system for targeted delivery of silibinin toward cancer cells is necessary.

Keywords: Cell morphology, Viability, Apoptosis

تاثیر سیلیبینین به عنوان ماده ضد سرطان بر فیبروبلاست

زهره جهان‌افروز*

۱- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه

jahanafrooz@maragheh.ac.ir *

چکیده

سابقه و هدف: اثرات چندگانه ضد سرطانی سیلیبینین در سرطان‌های متعدد به صورت in vitro و in vivo تایید شده است. برخی از مطالعات اثر ضد سرطانی سیلیبینین را در فاز I و II کلینیکی هم گزارش کرده‌اند. با این حال تاثیرات سیلیبینین در غلظت موثر بر سلول سرطانی در فیبروبلاست بررسی نشده است. فیبروبلاست سلول اصلی موجود در بافت پیوندی است. در این پژوهش تاثیر سیلیبینین بر زیستایی فیبروبلاست پوست انسانی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: تغییرات مورفولوژی فیبروبلاست تحت تاثیر سیلیبینین با میکروسکوپ فاز متضاد بررسی شد. برای سنجش زیستایی (میزان زنده ماندن/بقا داخل) سلول از کیت MTS استفاده شد. کیت آنکسین V و PI نیز برای بررسی آپوپتوز و نکروز سلول تحت تیمار با سیلیبینین استفاده شد.

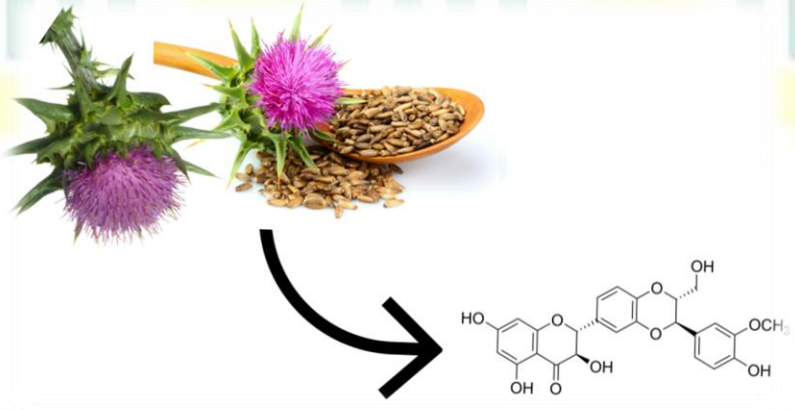
یافته‌ها: تاثیر سیلیبینین در زمان ۲۴ ساعت در غلظت‌های ۷۰، ۱۱۰، ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر مورفولوژی و زیستایی فیبروبلاست ناچیز بود. با این حال سیلیبینین در غلظت‌های بالاتر از ۱۱۰ در زمان ۴۸ ساعت زیستایی فیبروبلاست‌ها را به طور معنی داری کاهش داده و باعث چروکیدی و کوچک شدن اندازه و در نهایت مرگ آن‌ها شد. طبق نتایج تست آپوپتوز، درصد پایینی از مرگ القا شده در فیبروبلاست‌های تیمار شده با سیلیبینین بعد از ۴۸ ساعت از نوع آپوپتوز و نکروز بوده است.

استنتاج: سیلیبینین به عنوان ماده ضد سرطان شناخته شده، در غلظت‌های بالا و در زمان طولانی‌تر (۴۸ ساعت) بر سلول نرمال مثل فیبروبلاست نیز می‌تواند سمی باشد که این مسئله باعث نیاز به تکنیک‌هایی چون رهایش کنترل شده بر علیه سلول سرطانی می‌شود تا اثرات جانبی سیلیبینین به حداقل برسد.

واژگان کلیدی: مورفولوژی سلول، زیستایی، آپوپتوز

۱. مقدمه

امروزه کاربرد ترکیبات طبیعی و گیاهی در درمان سرطان‌ها به دلیل عارضه جانبی پایین و تاثیر گذاری بر چندین مسیر سلولی به طور همزمان توجه دنیا را جلب کرده است. سیلیبینین یک فلاونوئید استخراج شده از گیاه خار مریم با نام **علمی Silybum Msrianum** و نام **انگلیسی Milk Thistle** است. خار مریم جز فلور طبیعی ایران محسوب می‌شود و در مناطق شمال، شمال غرب، غرب و جنوب ایران رویش دارد. این گیاه بومی جنوب اروپا، جنوب روسیه، آسیای صغیر، شمال آفریقا، شمال وجنوب آمریکا، آلمان، آرژانتین، چین، رومانی، مجارستان و جنوب استرالیا است (**Jahanafrooz et al., 2018a**). تاریخ درمانی خار مریم به بیش از دو هزار سال پیش برمی‌گردد و در منابع یونانی از آن به عنوان یک محافظت کننده کبدی نام برده شده است. از میوه‌های گیاه خار مریم ماده‌ای به نام سیلی مارین که خود شامل سه ایزومر اصلی سیلی‌بین، سیلی‌دیانین و سیلی‌کریستین می‌باشد، استخراج و شناسایی شده‌اند که بیشترین اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی این گیاه به این دسته از مواد نسبت داده شده است (**Boojar et al., 2020**). سیلی‌بین که نام دیگر آن سیلیبینین است بخش عمده سیلی‌مارین را تشکیل می‌دهد و موثرترین ترکیب زیستی فعال موجود در سیلی‌مارین است (شکل ۱). امروزه به مکانیسم‌های ضد سرطانی سیلیبینین توجه زیادی معطوف شده است. در سرطان پروستات، کبد و شش به صورت کلینیکی در فازهای **I و II** بررسی شده است و نوع تجاری سیلیبنین موسوم به سیلیبینین- فیتوزوم به دلیل حلالیت بهتر در محیط‌های آبی در این مطالعات استفاده شده است (**Flaig et al., 2010**; **Flaig et al., 2007**; **Verdura** et al., 2021). تاثیر ضد سرطانی سیلیبینین در اکثر سرطان‌ها تایید شده است و مطالعات زیادی بر روی رده‌های سلولی متعددی گزارش شده است و در مطالعات کلینیکی فاز I و II تاثیر سمی قابل توجهی در غلظت‌های مورد استفاده بر بدن افراد سرطانی گزارش نشده است (**Jahanafrooz et al., 2016**; **Jahanafrooz et al., 2018b**). با این حال گزارش چندانی از تاثیر آن بر روی رده‌های سلولی نرمال و سلول‌های طبیعی بدن (به صورت کشت اولیه) وجود ندارد. بر طبق مطالعه‌ی اخیر گروه ما، سیلیبینین بر مورفولوژی و زیستایی رده سلولی **MCF-10A** تا غلظت **300** میکروگرم بر میلی لیتر در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت بی تاثیر بود که با نتایج تیاواری و همکاران مطابقت داشت (**Jahanafrooz et al., 2017**; **Tiwari et al., 2011**). فیبروبلاست یکی از سلول‌های اصلی بافت پیوندی است و نقش مهمی در حفظ هموستازی اندام‌های بدن از جمله پوست، استخوان و غضروف دارد (**Zhai et al., 2019**). در این مطالعه تاثیر سیلیبینین بر مورفولوژی و زیستایی سلول‌های طبیعی فیبروبلاست پوست بررسی شده است.



شکل ۸ : گیاه خار مریم و ساختار مولکولی سیلیبینین

۲.مواد و روش‌ها

۲-۱-مواد و سلول

سلول‌های فیبروبلاست استفاده شده در این مطالعه از لایه درم پوست انسان تهیه شده بود که در بانک سلول دانشگاه علوم پزشکی گراتس موجود بود. سلول‌ها در محیط کشت **DMEM** (**Life technologies**) که حاوی ۱۰ درصد سرم[۳۹۶] (**M&B Stricker**) و ۱ درصد آنتی بیوتیک (**Life technologies**) بود در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد کشت داد شدند. سیلیبینین (**Sigma**) در دی‌متیل سولفوکساید (**DMSO**) (**10 mg/ml**) قابل حل است. برای بررسی زیستایی سلول از **کیت**(**ab211091**) **MTS** استفاده شد. برای تهیه ۱۰ میلی‌لیتر از این محلول، ابتدا ۵۰ میلی‌گرم از پودر **MTS** را وزن کرده، با آب دیونیزه استریل حل نموده و برای حل شدن بهتر می توان از ورتکس استفاده نمود. سپس با فیلتر سرسرنگی با منافذ **0.22mm** در فالکون‌های ۱۵ تقسیم کرده و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌نماییم. باید دور فالکون‌های حاوی **MTS** فویل پیچانده شود تا در معرض نور قرار نگیرد. بررسی آپوپتوز با استفاده از کیت رنگ آمیزی دو گانه آنکسین و پروپیوم یدید (**Annexin V/PI (BD, USA** صورت گرفت.

۲-۲-کشت سلول، شمارش سلول و تیمار سلول با سیلیبینین

برای جمع‌آوری سلول‌ها پس از رشد ۸۰ درصدی، از محلول تریپسین (**Sigma**) استفاده شد. بعد از کنده شدن سلول‌ها از کف پلیت، تریپسین با ریختن محیط حاوی سرم به اندازه دو برابر تریپسین غیرفعال شد. بعد از جمع آوری، سانتریفوژ، شستشو و شمارش سلول با دستگاه سل کانتر (**Vi-CELL BLU**) انجام شد که تعداد سلول‌های زنده و کل سلول‌ها را نشان می‌دهد. سلول‌ها به تعداد ۵۰۰۰۰ در هر چاهک در پلیت‌های ۲۴ خانه در حجم ۵۰۰ میکرولیتر کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت که سلول‌ها به کف پلیت چسبیدند و شکل طبیعی به خود گرفتند، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف سیلیبینین به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت با غلظت‌های ذکر شده در بخش‌های بعدی تیمار شدند و بررسی‌های مورفولوژیکی، زیستایی و آپوپتوز بر روی آن‌ها انجام شد.

۲-۳-بررسی مورفولوژی و زیستایی فیبروبلاست

به منظور بررسی مورفولوژی سلول‌های تحت تیمار با سلیبینین (به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت) از میکروسکوپ فاز کنتراست (**MCXI600, Austria**) استفاده شد. در بررسی زیستایی پس از طی شدن مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، محیط کشت قبلی در هر چاهک را برداشته و ۱۰۰ میکرولیتر **MTS** را به درون هر چاهک اضافه کرده و به مدت سه ساعت در انکوباتور قرار دادیم. واکنشگر **MTS** باعث ایجاد کریستال‌های فورمازان در سلول‌هایی که آنزیم‌های میتوکندریایی فعال دارند می‌شود (**Chan et al., 2013**). محتویات رویی هر چاهک به نحوی که کریستال‌های فورمازان کشیده نشوند به آرامی خارج شده و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر **DMSO** (به عنوان حلال فورمازان) اضافه شد. پلیت به مدت ۱۰ تا ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و سپس در طول موج ۵۷۰ نانو مترجذب پلیت با دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۹۰ نانومترخوانده شد.

روش محاسبه :

- میزان جذب هر چاهک از هر تیمار از جذب کنترل که همان جذب **DMSO** می‌باشد کم می‌شود.
- با استفاده از فرمول زیر سطح فعالیت آنزیماتیک سلول‌ها را محاسبه شد.

[396] Fetal bovine serum

100 ×(میانگین جذب کنترل)/ (میانگین جذب هر تیمار)

۲-۴-بررسی آپوپتوز فیبروبلاست

اساس این روش بر این مبنا استوار است که در طی مراحل اولیه آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین که به طور طبیعی در نیمه داخلی غشاء وجود دارد به نیمه خارجی غشاء منتقل می شود که این عمل به دلیل اختلال در آنزیم ترانس لوکاز وابسته به ATP می‌باشد. قرار گرفتن فسفاتیدیل سرین در لایه خارجی غشاء سلولی سیگنال طبیعی است که سلول های آپوپتوتیک توسط ماکروفاژها و سلول‌های مجاور شناسایی و فاگوسیت می‌شوند. مشخص شده است که انکسین V که یک پروتئین ضد انعقادی و دارای وزن مولکولی ۳۵ کیلودالتون است و در حضور کلسیم با تمایل بالایی به فسفاتیدیل سرین متصل می شود و از کونژوگه این پروتئین با رنگ FITC به طور گسترده در بررسی آپوپتوز به وسیله فلوسیتومتری استفاده می‌شود. از آنجایی که سلول‌های زنده و فعال از نظر متابولیکی فقط می‌توانند PI را از غشا به بیرون سلول انتقال دهند سلول‌های PI مثبت مرده به حساب می آیند. پس از پایان زمان تیمار (۴۸ ساعت) سلول‌ها در پلیت ۲۴ خانه، محیط رویی سلول‌ها به فالکون‌های جداگانه منتقل شدند و برای اینکه به غشای سلول‌ها آسیب وارد نشود به جای محلول تریپسین-EDTA از محلول Accutase (Sigma) برای کندن سلول استفاده شد. بعد از سانتریفیوژ سلول‌ها با بافر فسفات یا PBS (Lonza) بصورت سوسپانسیون در آمدند و دوباره مرحله‌ی سانتریفیوژ را تکرار کرده و مایع رویی را خارج کرده ویک بار دیگر شستشو تکرار شد. محتویات هر فلاسک به فالکون مربوطه حاوی محیط کشت روی سلول‌ها، منتقل شدند و با دور ۱۵۰۰ rpm به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ کرده تا سلول‌ها و بقایای سلولی ته نشین شود. سپس محیط رویی را خارج کرده و به رسوب سلولی، بافر PBS سرد اضافه کرده. بر طبق دستورالعمل کیت آپوپتور به رسوب سلولی، بافر Binding افزوده شد و به ازای هر ۱۰۰ میکرولیتر نمونه، حدود ۵ میکرولیتر آنکسین V اضافه شد. بعد از قرار دادن سلول‌ها را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی با افزودن یک میکرولیتر رنگ PI به هر نمونه و انتقال به لوله‌های مخصوص دستگاه فلوسایتومتر در دستگاه قرار داده شد و نتایج حاصل با نرم افزارFloMax آنالیز شد. آنکسین V به فسفاتیدیل سرین که در نیم غشای خارجی سلولی که دچار آپوپتوز شده قرار می‌گیرد متصل می‌شود و از طریق رنگ فلورسنت متصل به آن تشخیص داده می‌شود. رنگ PI به سلول مرده نفوذ می‌کند در حالی که سلول زنده نسبت به آن نفوذ ناپذیر است. سلول‌های نکروز شده فقط نسبت به رنگ PI مثبت می‌شوند در حالی که سلولی که دچار آپوپتوز شده باشد نسبت به آنکسین مثبت است و بر حسب اینکه ابتدای آپوپتوز باشد یا اواخر آن می‌تواند PI منفی یا مثبت باشد (Kupcho et al., 2019).

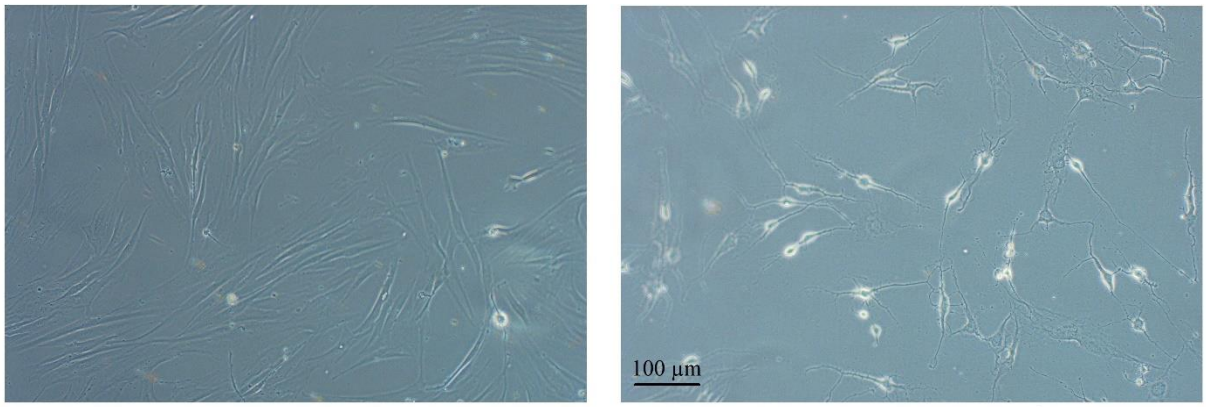
۲-۵-آنالیز آماری

نتایج بدست آمده از هر آزمایش به صورت میانگین حداقل دو بار تکرار ± انحراف معیار ارائه شده است. معنی دار بودن داده‌ها با استفاده از نرم افزار آنلاین VassarState به روش T-student test انجام گرفته است و سطح معنی دار p کمتر از ۰.۰۵ در نظر گرفته شده است.

۳.نتایج و بحث

۳-۱-مورفولوژی سلول تحت تیمار سیلیبینین

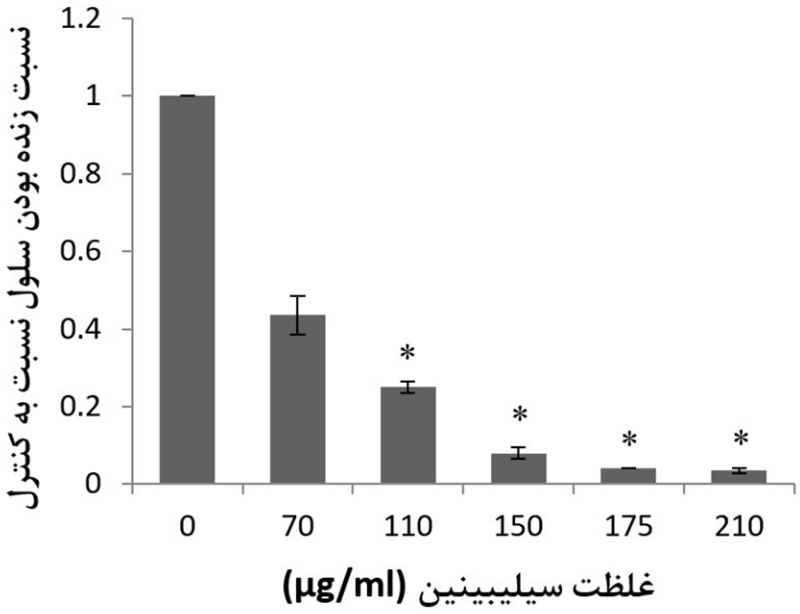
تغییر شکل ظاهری یا مورفولوژی فیبروبلاست‌ها بعد از اتمام زمان تیمار با میکروسکوپ بررسی شد. در غلظت‌های مورد استفاده (۷۰، ۱۱۰ و ۱۵۰) از سیلیبینین بعد از ۲۴ ساعت تغییر واضحی در مورفولوژی سلول‌ها ایجاد نشد در حالی که بعد از زمان ۴۸ ساعت، غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث ایجاد تغییر واضحی در مورفولوژی سلول‌ها شد (شکل ۲).



شکل ۹:تاثیر سیلیبینین بر مورفولوژی فیبروبلاست. طبق تصویر میکروسکوپ فاز متضاد، سلول‌های فیبروبلاست بعد از ۴۸ ساعت در اثر تیمار با سیلیبینین دچار چروکیدگی شده‌اند.

۳-۲-زیستایی سلول تحت تیمار سیلیبینین

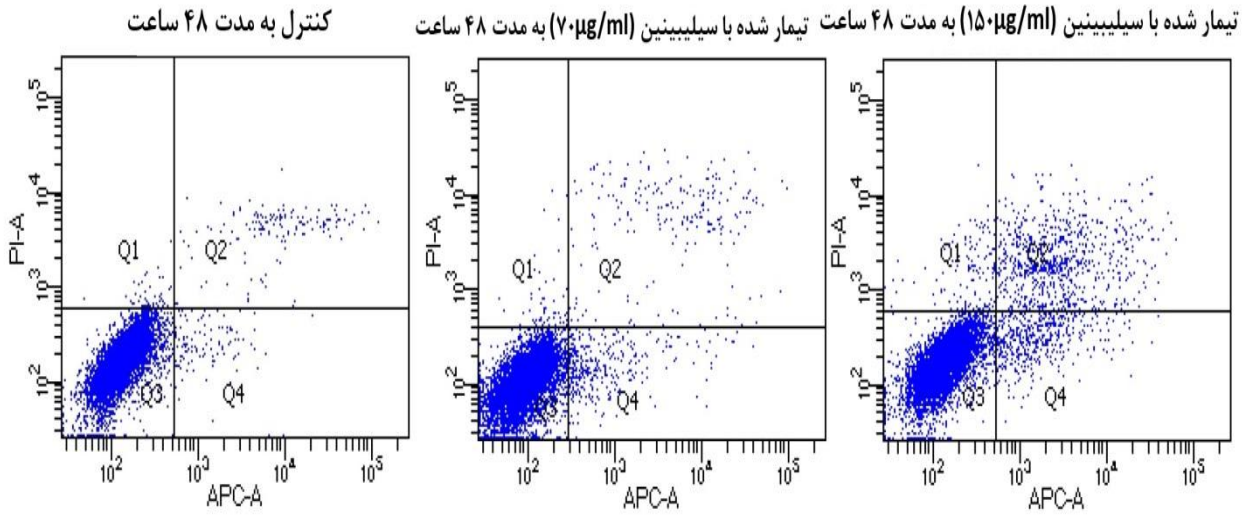
طبق نتایج MTS، تیمار سیلیبینین بعد از ۲۴ ساعت کاهش چندانی در جذب فیبروبلاست ایجاد نکرد با این حال بعد از ۴۸ ساعت این کاهش معنی دار و زیاد بود. در این آزمایش درصد نسبت جذب هر تیمار نسبت به کنترل سنجیده شد. همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است در زمان ۴۸ ساعت سیلیبینین باعث کاهش زیستایی و فعالیت متابولیک فیبروبلاست‌ها شده است که با افزایش غلظت سیلیبین میزان زیستایی کمتر شده است.



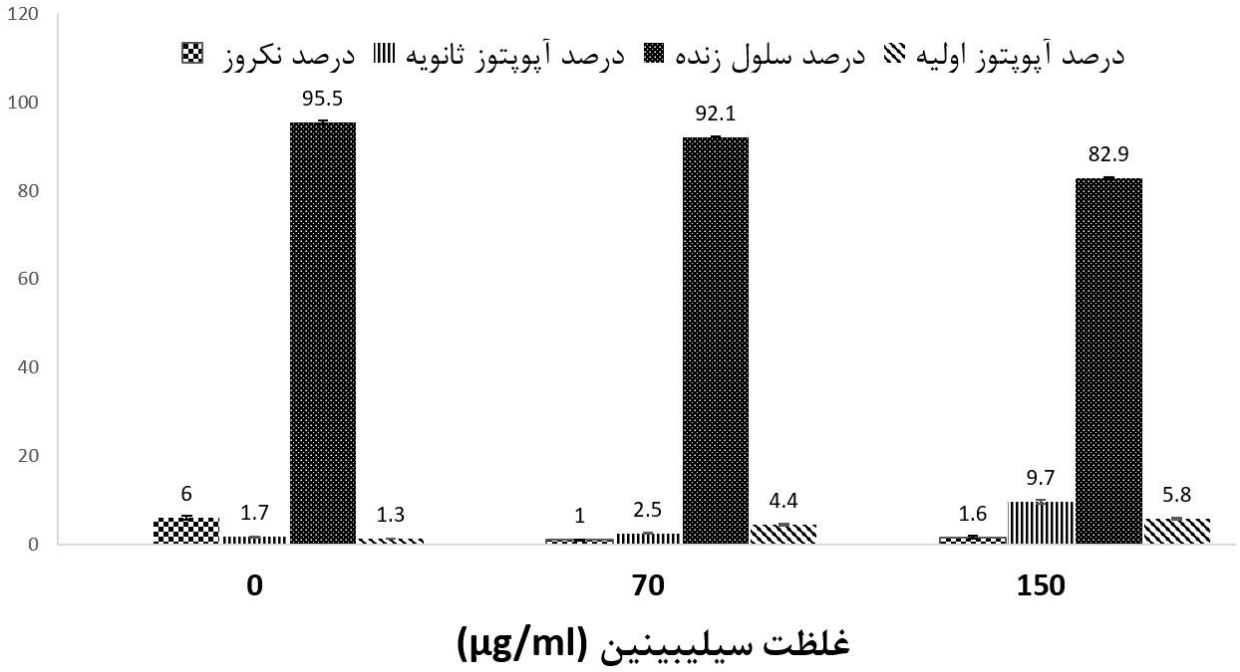
شکل ۱۰ : نتایج زیستایی. طبق بررسی با کیت MTS در غلظت‌های بالای ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان ۴۸ ساعت زیستایی فیبروبلاست‌ها به طور معنی دار تحت تاثیر سیلیبینین کاهش پیدا کرده است.

۳-۳-میزان آپوپتوز سلول تحت تیمار سیلیبینین

برای تعیین اینکه نوع مرگ اعمال شده توسط سیلیبینین در فیبروبلاست‌ها آزمایش آپوپتوز انجام شد. نمودار حاصل از دستگاه فلوسیتومتری در سه نمونه کنترل و غظت ۷۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در شکل ۴ نشان داده شده است. بر طبق این شکل میزان آپوپتوز اعمال شده توسط سیلیبین بر فیبروبلاست‌ها ناچیز بوده است. درصد سلول‌هایی که تحت تیمار سیلیبینین دچار آپوپتوز اولیه، آپوپتوز ثانویه و نکروز شده‌اند در شکل ۵ نشان داده شده است.



شکل ۱۱ : نمودارهای حاصل از دستگاه فلوسیتومتری با کیت آنکسین V و PI (پروپیوم یدید). طبق این نتایج میزان افزایش آپوپتوز اولیه و ثانویه تحت تیمار سیلیبینین در ۴۸ ساعت در سلول‌های فیبروبلاست ناچیز بوده است. Q1: ناحیه مربوط به درصد سلول نکروز شده که برای رنگ آنکسین V منفی و برای PI مثبت است. Q2: ناحیه مربوط به آپوپتوز ثانویه که سلول‌ها در این ناحیه برای هر دو رنگ مثبت هستند. Q3: ناحیه مربوط به سلول زنده که برای هر دو رنگ منفی است. Q4: ناحیه مربوط به آپوپتوز اولیه که در آن سلول‌ها برای رنگ آنکسین مثبت و برای رنگ PI منفی هستند.



شکل ۱۲ . نمودار درصد سلول‌های نکروز شده، آپوپتوز شده و زنده تحت تیمار با سیلیبینین. همانطور که در نمودار نشان داده شده است افزایش میزان نکروز و آپوپتوز فیبروبلاست‌ها ناچیز است (درصد سلول‌های زنده با نتایج تست MTS مطابقت ندارد بنابراین درصد کمی از مرگ القا شده از نوع آپوپتوز و نکروز بوده است).

٤ . نـتـیـجه‌گـیـری

در این پژوهش تمرکز اصلی بر روی تاثیر سیلیبینین بر فیبروبلاست‌های پوست بود که در آن غلظت‌هایی از سیلیبینین که موثر بر سلول سرطانی است به این سلول‌ها به عنوان سلول نرمال بدن تاثیر داده شد. در اکثر مطالعات سرطانی از رده سلولی غیر سرطانی همان بافت از جمله MCF-10A که رده سلولی غیر سرطانی مربوط به پستان است استفاده شده است. تاکنون مطالعات کمی درباره تاثیر سیلیبینین بر سلول فیبروبلاست نرمال گزارش شده است. Ting و همکاران نشان دادند که تیمار سلول‌های سرطان پروستات با سیلیبینین تا غلظت ۱۰۰ میکرومولار از تمایز فیبروبلاست نرمال و سلول استرومایی به میوفیبروبلاست در بافت توموری پروستات جلوگیری می‌کند. همچنین این اثر مهاری سیلیبینین بر تمایز به طور مستقیم در فیبروبلاست‌های مستخرج از بافت سرطانی پروستات که با سیلیبینین تیمار شده بودند نیز مشاهده شد. میوفیبروبلاست در میکرومحیط توموری یافت می‌شود و در رشد و پیشروی بافت سرطانی نقش مهمی دارند (Ting et al., 2015). تاثیر سیلیبینین بر فیبروبلاست در بیمارهای غیر سرطانی از جمله آرتریت روماتوئید نیز بررسی شده است که در آن سیلیبینین در غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار و در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت باعث آپوپتوز سلول‌های شبه فیبروبلاستی در بافت سینوویال بیماران آرتریت روماتوئیدی و کاهش شرایط التهابی شده است (Tong et al., 2018). در مطالعه‌ای دیگر مشاهده شد که سیلیبینین باعث کاهش کلوئید (فزون گوشت پوستی) و تغییرات فیبروزی پوست می‌شود. در مطالعه ذکر شده سیلیبینین باعث کاهش بیان کلاژن نوع I در فیبروبلاست‌های پوست شده است ولی تاثیری معنی‌دار بر زیستایی فیبروبلاست‌ها نداشته است. قابل ذکر است در آن مطالعه از غلظت‌های پایین‌تر سیلیبین استفاده شده است و بالاترین غلظت استفاده شده ۲۰۰ میکرومولار (تقریباً برابر با ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بوده است (Cho et al., 2013). در یک مطالعه که در علوم پزشکی شیراز انجام شده است تاثیر سیلیبینین بر زخم‌های ایجاد شده در موش صحرایی بررسی شد و نشان داده شد که سیلیبینین به میزان ۲ درصد در ژل باعث افزایش

تکثیر فیبروبلاست و افزایش آنژیوژنز در محل زخم شده است (Ashkani-Esfahani et al., 2013). تفاوت نتایج مطالعه ذکر شده با مطالعه حاضر می‌تواند به دلیل تفاوت فیزیولوژیک موش صحرایی با انسان و همچنین غلظت مورد استفاده باشد. در مطالعه‌ای دیگر سیلیبینین باعث کاهش اثر فرابنفش بر فیبروبلاست پوستی از طریق القای افزایش بیان گیرنده استروژن شده است و طبق نتایج آن مطالعه سیلیبینین در غلظت‌های پایین از ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر محافظتی در برابر اشعه فرابنفش دارد (Liu et al., 2021).

از نتایج مطالعات ذکر شده و مطالعه حاضر چنین برمی‌آید که سیلیبینین در غلظت‌های پایین اثر سمی بر سلول فیبروبلاست ندارد این در حالی است که در این غلظت‌های پایین بر سلول‌های سرطانی بی تاثیر خواهد بود و احتمالاً یکی از دلایلی که تاکنون سیلیبینین به عنوان داروی ضد سرطان به تایید سازمان غذا و دارو به عنوان ماده ضد سرطان نرسیده است همین دلیل باشد. در مطالعه حاضر غلظت‌هایی از سیلیبینین استفاده شد که در آن غلظت‌ها طبق مطالعات قبلی گروه ما و گروه‌های دیگر اثر ضد سرطانی داشت (Jahanafrooz et al., 2018b; Tiwari et al., 2011). در مطالعه حاضر در طی ۲۴ ساعت غلظت‌های مورد استفاده تاثیر سمی معنی داری بر زیستایی فیبروبلاست‌ها نشان نداند با این حال طبق نتایج MTS، در این غلظت‌ها در زمان ۴۸ ساعت تاثیر سمی بر فیبروبلاست انسان نشان داد که این مسئله برای یک ترکیب ضد سرطانی مطلوب نیست و نیازمند رهایش کنترل شده آن ماده ضد سرطانی در بافت‌های توموری است. مثال‌های زیادی از استفاده از نانوذرات مختلف برای هدایت سیلیبینین به بافت توموری موجود است. تکنولوژی به کاربرده شده برای هدایت هدفمند و کپسوله کردن سیلیبینین و سایر داروهای ضد سرطان علاوه بر اینکه باعث کاهش عوارض جانبی و غلظت استفاده شده دارو می‌شود، بازده و کارایی عملکرد بالاتری هم نسبت به داروهای کپسوله نشده دارند (Amirsaadat et al., 2021; Nawaz et al., 2020). طبق نتایج تست آپوپتوز، درصد پایینی از مرگ القا شده در فیبروبلاست‌های تیمار شده با سیلیبینین بعد از ۴۸ ساعت از نوع آپوپتوز و نکروز بوده است. مرگ سلولی انواع مختلف دارد و با توجه به کوچک شدن و ظاهر چروکیده فیبروبلاست‌ها این مرگ می‌تواند از نوع خاصی به نام autoschizis بوده است که چروکیدگی هسته و سیتوزول و آزاد شدن اندامک‌ها از سلول از مشخصات اصلی این نوع مرگ سلولی است (Gilloteaux et al., 2018).

طبق نتایج این مطالعه سیلیبینین در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در زمان بالاتر از ۴۸ ساعت باعث کاهش زیستایی فیبروبلاست‌های پوستی شده است. درصد کمی از مرگ القا شده در فیبروبلاست از نوع آپوپتوز و نکروز بوده است و تعیین نوع دقیق آن نیاز به مطالعات دیگری دارد. بررسی تاثیرات مولکولی سیلیبینین از جمله تغییر بیان ژن‌های فیبروبلاست نیز نیازمند مطالعات بیشتر است.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر با کمک و حمایت خانم دکتر بآته رینر از دانشگاه علوم پزشکی گراتس (کشور اتریش) انجام شد که بدین وسیله از حمایت ایشان کمال تشکر می‌گردد.

منابع

1. Amirsaadat, S., Jafari-Gharabaghlou, D., Alijani, S., Mousazadeh, H., Dadashpour, M. and Zarghami, N., 2021. Metformin and Silibinin co-loaded PLGA-PEG nanoparticles for effective combination therapy against human breast cancer cells. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 61, p.102107.
2. Ashkani-Esfahani, S., Emami, Y., Esmaeilzadeh, E., Bagheri, F., Namazi, M.R., Keshtkar, M., Khoshneviszadeh, M. and Noorafshan, A., 2013. Silymarin enhanced fibroblast proliferation and tissue regeneration in full thickness skin wounds in rat models; a stereological study. Journal of the Saudi Society of Dermatology & Dermatologic Surgery, 17(1), pp.7-12.

3. Boojar, M.M.A., Boojar, M.M.A. and Golmohammad, S., 2020. Overview of Silibinin anti-tumor effects. Journal of Herbal Medicine, 23, p.100375.
4. Chan, G.K.Y., Kleinheinz, T.L., Peterson, D. and Moffat, J.G., 2013. A simple high-content cell cycle assay reveals frequent discrepancies between cell number and ATP and MTS proliferation assays. PloS one, 8(5), p.e63583.
5. Cho, J.W., IL, K.J. and LEE, K.S., 2013. Downregulation of type I collagen expression in silibinin-treated human skin fibroblasts by blocking the activation of Smad2/3-dependent signaling pathways: Potential therapeutic use in the chemoprevention of keloids.
6. Flaig, T.W., Glodé, M., Gustafson, D., van Bokhoven, A., Tao, Y., Wilson, S., Su, L.J., Li, Y., Harrison, G., Agarwal, R. and Crawford, E.D., 2010. A study of high-dose oral silybin-phytosome followed by prostatectomy in patients with localized prostate cancer. The Prostate, 70(8), pp.848-855.
7. Flaig, T.W., Gustafson, D.L., Su, L.J., Zirrolli, J.A., Crighton, F., Harrison, G.S., Pierson, A.S., Agarwal, R. and Glodé, L.M., 2007. A phase I and pharmacokinetic study of silybin-phytosome in prostate cancer patients. Investigational new drugs, 25(2), pp.139-146.
8. Gilloteaux, J., Jamison, J.M., Arnold, D. and Summers, J.L., 2018. Autoschizis: a mode of cell death of cancer cells induced by a pro-oxidant treatment in vitro and in vivo. Apoptosis and Other Cell Deaths. J. Radovich (ed.), Springer Verlag, New York-Heidelberg.
9. Jahanafrooz, Z., Motameh, N. and Bakhshandeh, B., 2016. Comparative evaluation of silibinin effects on cell cycling and apoptosis in human breast cancer MCF-7 and T47D cell lines. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 17(5), pp.2661-2665.
10. Jahanafrooz, Z., Motamed, N. and Bakhshandeh, B., 2017. Effects of miR-21 downregulation and silibinin treatment in breast cancer cell lines. Cytotechnology, 69(4), pp.667-680.
11. Jahanafrooz, Z., Motamed, N., Rinner, B., Mokhtarzadeh, A. and Baradaran, B., 2018. Silibinin to improve cancer therapeutic, as an apoptotic inducer, autophagy modulator, cell cycle inhibitor, and microRNAs regulator. Life sciences, 213, pp.236-247.
12. Jahanafrooz, Z., Stallinger, A., Anders, I., Kleinegger, F., Lohberger, B., Durchschein, C., Bauer, R., Deutsch, A., Rinner, B. and Kretschmer, N., 2018. Influence of silibinin and β-β-dimethylacrylshikonin on chordoma cells. Phytomedicine, 49, pp.32-40.
13. Kupcho, K., Shultz, J., Hurst, R., Hartnett, J., Zhou, W., Machleidt, T., Grailer, J., Worzella, T., Riss, T., Lazar, D. and Cali, J.J., 2019. A real-time, bioluminescent annexin V assay for the assessment of apoptosis. Apoptosis, 24(1), pp.184-197.
14. Liu, W., Wang, F., Li, C., Otkur, W., Hayashi, T., Mizuno, K., Hattori, S., Fujisaki, H., Onodera, S. and Ikejima, T., 2021. Silibinin treatment protects human skin cells from UVB injury through upregulation of estrogen receptors. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 216, p.112147.
15. Nawaz, Q., Fuentes-Chandia, M., Tharmalingam, V., Rehman, M.A.U., Leal-Egana, A. and Boccaccini, A.R., 2020. Silibinin releasing mesoporous bioactive glass nanoparticles with potential for breast cancer therapy. Ceramics International, 46(18), pp.29111-29119.
16. Ting, H.J., Deep, G., Jain, A.K., Cimic, A., Sirintrapun, J., Romero, L.M., Cramer, S.D., Agarwal, C. and Agarwal, R., 2015. Silibinin prevents prostate cancer cell-mediated differentiation of naïve fibroblasts into cancer-associated fibroblast phenotype by targeting TGF β2. Molecular carcinogenesis, 54(9), pp.730-741.
17. Tiwari, P., Kumar, A., Balakrishnan, S., Kushwaha, H.S. and Mishra, K.P., 2011. Silibinin-induced apoptosis in MCF7 and T47D human breast carcinoma cells involves caspase-8 activation and mitochondrial pathway. Cancer investigation, 29(1), pp.12-20.
18. Tong, W.W., Zhang, C., Hong, T., Liu, D.H., Wang, C., Li, J., He, X.K. and Xu, W.D., 2018. Silibinin alleviates inflammation and induces apoptosis in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes and has a therapeutic effect on arthritis in rats. Scientific reports, 8(1), pp.1-12.
19. Verdura, S., Cuyàs, E., Ruiz-Torres, V., Micol, V., Joven, J., Bosch-Barrera, J. and Menendez, J.A., 2021. Lung Cancer Management with Silibinin: A Historical and Translational Perspective. Pharmaceuticals, 14(6), p.559.
20. Zhai, C., Zhang, X., Chen, J., He, J., Fei, H., Liu, Y., Luo, C. and Fan, W., 2019. The effect of cartilage extracellular matrix particle size on the chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. Regenerative medicine, 14(7), pp.663-680.

The place of using silver nanoparticles in packaging and extending the shelf life of vegetables and fruits

Raziye Parvaneh[1]; Mohammad Etemadi[1*]; Asghar Ramezanian[1] and Maryam Tohidi[2]

1- Ph.D Student, Assistant Professor and Professor of the Department of Horticultural Science, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz
2- Assistant Professor of the Department of Nano Chemical Engineering, School of Advanced Technology, Shiraz University, Shiraz

**Corresponding Author Email Adress: m.etemadi@shirazu.ac.ir*

Abstract

Post-harvest diseases of fruit and vegetables have to be controlled because of the high added value of commodities and the great economic loss related to spoilage. Synthetic fungicides are the first choice worldwide to control post-harvest diseases of fruit and vegetables. However, several problems and constraints related to their use have forced scientists to develop alternative control means to prevent post-harvest diseases. Physical and biological means, resistance inducers, and GRAS (generally recognized as safe) compounds are the most important alternatives used during the last 20 years. Recently, nanomaterial treatments, especially silver nanoparticles, have demonstrated promising results, and they are being investigated to reduce the use of synthetic fungicides to control post-harvest rot in fruit and vegetables. This article investigates the effect of different treatments of silver nanomaterials on the shelf life of vegetables and fruits.

Keywords: Green synthesis, Postharvest life, Silver nanoparticles

جایگاه استفاده از نانوذرات نقره در بسته‌بندی و افزایش عمر انبارمانی سبزی‌ها و میوه‌ها

راضیه پروانه[۱]، محمد اعتمادی*[۱]، اصغر رمضانیان[۱]، مریم توحیدی[۲]

۱- دانشجوی دکتری، استادیار و استاد بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز

۲- استادیار، بخش نانومهندسی شیمی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه شیراز، شیراز

*نویسنده مسئول: m.etemadi@shirazu.ac.ir

چکیده

بیماری‌های میوه‌ها و سبزی‌ها در طول مدت انبارمانی می‌تواند ارزش افزوده محصول را کاهش داده و زیان‌های اقتصادی زیادی را به کشاورزان وارد کند. استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی، اولین انتخاب در سراسر جهان برای کنترل بیماری‌های پس از برداشت می‌باشد. وجود چندین مشکل و محدودیت در استفاده از این قارچ‌کش‌ها، دانشمندان را به فکر استفاده از روش‌های جایگزین انداخته است. روش‌های فیزیکی و زیستی به منظور القاء مقاومت به محصولات و ترکیبات GRAS[397] به منظور ایمنی بالاتر در ۲۰ سال اخیر، مورد استفاده قرار گرفته است. به‌تازگی استفاده از تیمارهای نانو مواد و به‌ویژه نانو ذرات نقره، نتایج امیدوارکننده‌ای به‌دنبال داشته است. دانشمندان در حال بررسی اثر این تیمارها برای کاهش پوسیدگی پس از برداشت میوه‌ها و سبزی‌ها هستند. این مقاله به بررسی اثر تیمارهای مختلف نانومواد نقره بر عمر انبارمانی سبزی‌ها و میوه‌ها، می‌پردازد.

واژگان کلیدی: سنتز سبز،عمر پس از برداشت، نانوذرات نقره

۱.مقدمه

بیماری‌های پس از برداشت میوه‌ها و سبزی‌ها، به‌طور معمول توسط میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا از جمله باکتری‌ها و قارچ‌ها ایجاد می‌شود که منجر به آسیب‌های جدی در محصول به‌ویژه در زمان انبارداری و حمل و نقل، می‌شوند. فناوری نانو به عنوان یک رویکرد جدید در زمینه‌های مختلف به‌ویژه کشاورزی، مورد استفاده قرار گرفته است. خواص شگفت‌انگیز نانو مواد، این مواد را به گزینه استثنایی برای باغبانی پایدار و به‌ویژه کنترل بیماری میوه‌ها و سبزی‌ها در زمان پس از برداشت، تبدیل کرده است (Ruffo Roberto et al., 2019). در بین نانو ذرات مختلف موجود، نانو ذرات نقره بیشترین کاربرد را به خود اختصاص داده‌اند (Bapat et al., 2018).

خاصیت میکروب‌کشی و گندزدایی نانوذرات نقره، بیش از ۱۰۰ سال است که شناخته شده است و در طیف گسترده‌ای از زمینه‌ها مانند کشاورزی، غذا و داروهای پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Nowack et al., 2011; Gogos et al., 2012) آژانس حفاظت از محیط زیست ایالات متحده (EPA)، از زمان تاسیس خود در سال ۱۹۷۰ تاکنون، فراوانی محصولات حاوی نقره را روز به روز در حال افزایش، گزارش کرده است. محصولات حاوی نانوذرات نقره که توسط این سازمان به ثبت رسیده

[397] Generally Recognized as Safe

است به ۳ دسته تقسیم می‌شوندکه شامل افزودنی‌های زیستی حاوی نانوذرات نقره، فیلترهای آب آغشته به نانوذرات نقره و گندزداهای حاوی نانوذرات نقره (Nowack et al., 2011) می‌باشند. در سال‌های اخیر علاقه به استفاده از گندزداهای حاوی نانوذرات نقره به دلیل کارایی بیشتر آن‌ها رو به افزایش می‌باشد (Zhang et al., 2012).

نانوذرات تولید شده به روش شیمیایی به دلیل استفاده از مواد شیمیایی خطرناک، پرتوزایی و شرایط خاص واکنش، خطرات بالقوه‌ای برای انسان و محیط زیست دارند (Senapati et al., 2012). می‌توان این نانوذرات را به‌دلیل سمی بودن آن‌ها برای سلامت انسان، با پوشش‌دهی در ترکیبات گندزدا مورد استفاده قرار داد (Zhang et al., 2016). از روش‌های دیگر تولید نانوذرات، می‌توان به سنتز زیستی آن‌ها اشاره نمود که امروزه توجه به این روش روز به روز در حال افزایش است (Salehi et al., 2011; Rajeshkumar et al., 2013). نانوذرات تولید شده به این روش دوستدار محیط زیست بوده (Mittal et al., 2013) و دارای خطر کم‌تر و ایمنی بیشتر برای سلامت انسان می‌باشند (Hussain et al., 2019).

در این مطالعه به کاربرد نانوذرات نقره به روش شیمیایی و زیستی و تاثیر آن در عمر پس از برداشت سبزی‌ها و میوه‌ها پرداخته شده است.

۲.اهمیت اقتصادی بیماری‌های پس از برداشت

به طور کلی تلفات ناشی از بیماری‌های گیاهی به صورت مستقیم و غیرمستقیم می‌باشند. تلفات مستقیم ناشی از حیوانات، علف‌های هرز و آفات می‌باشند که بین ۲۰ تا ۴۰ درصد خسارت‌های وارده را به خود اختصاص می‌دهند، که از این میزان بیش از ۷۰ تا ۸۰ درصد خسارت‌ها مربوط به قارچ‌های بیماری‌زا می‌باشد. خسارت ناشی از بیماری‌های قارچی در مرحله پس از برداشت محصولات به خوبی مشخص نیست و بسته به روش بسته‌بندی و روش‌های پرورش محصول بین ۳۰ تا ۵۰ درصد را به خود اختصاص داده است. سازمان غذا و کشاورزی سازمان ملل متحد اعلام کرده است که ۳۳ درصد محصولات کشاورزی قبل از رسیدن به دست مصرف‌کننده از بین می‌روند، زیرا بیماری‌های ناشی از عوامل بیماری‌زا قسمت سهم قابل توجهی در هدررفت مواد غذایی دارد (Ruffo Roberto et al., 2019).

۳.راه‌کارهای جایگزین برای کنترل و نحوه عملکرد آن‌ها

استفاده از روش‌های فیزیکی (گرما، پرتو UV و اتمسفر تغییر یافته)، عوامل کنترل بیولوژیک (آنتاگونیست مخمر و آنتاگونیست باکتری) و ترکیبات طبیعی (کیتوزان، الیگوکیتوزان و نمک‌ها) در ۲ دهه‌ی گذشته به عنوان جایگزین ترکیبات شیمیایی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته‌اند. البته نحوه عملکرد این عوامل به خوبی بررسی نشده است. این عوامل می‌توانند با مهار جوانه‌زنی هاگ‌ها و رشد پرگنه بر مورفولوژی قارچ تاثیر گذاشته و از بیماری‌زایی آن جلوگیری کنند.

گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا، واکنش‌های دفاعی متفاوتی را از خود نشان می‌دهند و یکی از روش‌های ایجاد مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا، تیمار گیاهان با استفاده از ویروس‌های بیماری‌زا است که منجر به ایجاد مقاومت به صورت موضعی یا سیستمیک می‌شود (Sharma et al., 2002).

۴.نانومواد، انتخابی برای کاهش مصرف قارچ‌کش‌ها

نانومواد به دلیل ویژگی‌های خاص و منحصربه‌فرد خود در کشاورزی و صنایع غذایی از اهمیت بالایی برخوردار هستند. برای غلبه بر مشکلات گفته‌شده در زمینه پس از برداشت محصولات، نانومواد بسیار حیاتی و ضروری هستند. در زمینه‌ی پس از برداشت، استفاده از نانومواد برای کنترل بیماری‌های پس از برداشت محصولات، بسیار مفید است. از جمله کاربردهای این مواد

در زمینه‌ی پس از برداشت، می‌توان به بسته‌بندی‌ها و فیلم‌های جدید حاوی نانوذرات نقره، جلوگیری از تاثیر گازها و پرتوهای مضر روی محصول، بهبود ظاهر بسته‌بندی و همچنین استفاده از حسگرهای زیستی نانو در بسته‌بندی محصولات، اشاره نمود. استفاده از نانوذرات روی چند محصول مورد استفاده قرار گرفته است که نتایج امیدوارکننده‌ای را در پی داشته است (Khan et al., 2019). البته گزارش‌های کمی در این خصوص به ویژه برای سبزی‌ها موجود است که در ادامه مورد بررسی قرار می‌گیرد. در شکل ۱ (Ruffo Roberto et al., 2019) کاربرد نانومواد و ترکیبات آن‌ها با سایر ترکیبات دیگر و پوشش‌ها گزارش شده است.



شکل ۱. کاربرد نانومواد و ترکیبات آن‌ها بر محصولات باغبانی

۵.نانوذرات نقره و خاصیت قارچ‌کشی آن‌ها

یکی از کاربردهای بالقوه نقره در مدیریت بیماری‌های گیاهی می‌باشد. نقره، حالت‌های عملکردی مختلفی را برای مهار میکروارگانیسم‌ها، نشان می‌دهد. همچنین نانوذرات نقره، پرکاربردترین نانومواد می‌باشند که از خاصیت گندزدایی و قارچ‌کشی بالایی برخوردارد هستند. گزارش شده است که نقره می‌تولند در یک محیط آبی پر از اکسیژن باعث تخریب کامل میکروارگانیسم‌های موجود در محیط شود و به همین دلیل استفاده از این نانوذرات می‌تواند در کنترل بیماری‌های پس از برداشت موثر واقع شود (Song et al.,2012).

۶.تاثیر نانو ذرات نقره مورد استفاده در سبزی‌ها

تا کنون، تحقیقات زیادی در رابطه با استفاده از نانومواد در سبزی‌ها، صورت نگرفته است. به طور کلی محصولات کشاورزی به خصوص سبزی‌ها دارای ۱۰ هزار تا ۱ میلیون سلول میکروارگانیسم در هر گرم خود، می‌باشند و از این میان بیشترین عوامل بیماری‌زا شامل *Listeria monocytogenes*، *E. coli*، *Salmonella* sp. و *Staphylococcus aureus* می‌باشند. در هنگام انبارداری سبزی‌ها، زوال میکروبی در آن‌ها اتفاق می‌افتد که بیشتر در اثر عملکرد باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها می‌باشد و می‌تواند با نانوذرات نقره، مهار شود. نانوذرات نقره در شکل یونی، دارای عملکرد ضدباکتریایی هستند. مشخص شده‌است که

بعضی باکتری‌ها می‌توانند یون نقره را جذب کنند که در نتیجه آن، روند تولید DNA، مهار می‌شود و باکتری‌ها، نمی‌توانند تکثیر شوند (Ovington, 2004).

در پژوهشی توسط Robak Bożena و همکاران که بر روی گوجه‌فرنگی صورت گرفت، مشخص شد که استفاده از ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نیترات نقره می‌تولند عمر انبارداری گوجه‌فرنگی را ۲ برابر کرده و از کپک‌زدگی آن نیز جلوگیری کند. البته استفاده از نانوذرات نقره تاثیر کمی بر ویژگی‌های حسی محصول شامل عطر آن داشت (Bożena et al., 2015). همچنین استفاده از نانوذرات نقره در بسته‌بندی‌های هویج خرد شده نیز گزارش شده است. استفاده از این نانوذرات تولید شده به روش زیستی در بسته بندی‌ها باعث کاهش فرآیند کاهش وزن و افزایش اسید آسکوربیک موجود در محصول گردید. همچنین مشاهده‌ای از ورود این نانوذرات به محصول، گزارش نشده است (Becaro et al., 2016).

۷.تاثیر نانو ذرات نقره بر عمر پس از برداشت میوه‌ها

تا کنون پژوهش‌های بسیاری در این خصوص صورت گرفته‌است. میوه‌های موز، انبه، مرکبات، هلو و انگور مورد مطالعه و تحقیق قرار گرفته‌اند (Ruffo Roberto et al., 2019). البته استفاده از سایر نانوذرات مانند نانوذرات طلا و اکسید روی نیز برای افزایش ماندگاری محصولات، استفاده شده است (Ruffo Roberto et al., 2019). بیماری‌های موجود در مرکبات را می‌توان به ۲ دسته تقسیم بندی کرد، بیماری‌های ایجاد شده در مزرعه، مانند پوسیدگی قهوه‌ای، پوسیدگی انتهای ریشه و پوسیدگی قارچی و دسته‌ی دیگر بیماری‌های ایجاد شده پس از برداشت مانند پوسیدگی قارچی ناشی از قارچ‌های *Penicillium*، *Aspergillus* و کپک سبز و آبی به ترتیب مهم‌ترین بیماری‌های پس از برداشتی در مرکبات هستند (Youssef et al., 2012; Ruffo Roberto et al., 2019). نانوذرات نقره با اندازه ۱۰ نانومتر و به میزان ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر، در شرایط درون شیشه‌ای برای تاثیر بر قارچ‌های بیماری‌زای *Alternaria alternata*, *P. digitatum* و *Alternaria citri* مورد استفاده قرار گرفتند. مشخص شد که این نانو ذرات به‌خوبی توانسته‌اند اثرات ضد قارچی بالایی را از خود نشان دهند (Abdelmalek and Salaheldin, 2016).

انگور نیز یکی دیگر از میوه‌هایی است که خسارت کپک خاکستری در آن بسیار بالا می‌باشد. عامل ایجاد این بیماری *Botrytis cinerea* می‌باشد. گزارش شده است که استفاده از نانوذرات نقره با اندازه ۵۰ نانومتر و غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر به همراه قارچ‌کش تولکلوفوسمتیل[۳۹۸] عملکرد بسیار بهتری، نسبت به زمانی که از قارچ‌کش به تنهایی استفاده شده، داشته است. همچنین حداکثر مهار عامل بیماری‌زا در زمان استفاده از نسبت ۱۰ به ۱۰۰ نانوذرات نقره و قارچ کش، به دست آمد (Derbalah et al., 2012). استفاده از ترکیب نانوکامپوزیتی کیتوزان/ ژلاتین و نانوذرات نقره روی انگور نیز مورد بررسی قرار گرفت. استفاده از این ترکیب باعث افزایش ماندگاری میوه انگور به مدت ۲ هفته اضافه‌تر بدون هیچ‌گونه آسیب و سستی در بافت محصول گردید و میوه‌ها تازه و بدون پوسیدگی بود (Kumar et al., 2018).

موز (*Musa acuminata* L.) یکی از میوه‌های مهم در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری است. این میوه به عنوان یک میوه فرازگرا، ماندگاری پس از برداشت به‌نسبت کوتاهی دارد. آنتراکنوز موز ناشی از قارچ *Colletotrichum musae* مهم‌ترین بیماری‌ای است که به این محصول در دوره پس از برداشت، خسارت وارد می‌کند (Zhang et al., 2010). نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره‌ی زنیان (*Trachyspermum ammi*)، با اندازه ۶۸ نانومتر در شرایط درون شیشه‌ای برای مهار این قارچ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نانوذرات نقره در غلظت ۰/۲٪ توانست به‌طور کامل جوانه‌زنی اسپور قارچ

[398] Tolclofos-methyl

را مهار کند، همچنین در شرایط معمولی نیز، پاشش نانوذرات نقره با غلظت ۰/۲٪ توانست کمترین شدت آنتراکنوز را در موز نشان دهد (Jagana et al., 2017).

در میوه هلو (Prunus persica L.)، رقم Shan-i-Punjab، فیلم‌های نانوکامپوزیتی کیتوزان/ نشاسته برنج و نانوذرات نقره به روش پاشش به میوه‌ها، توانست باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* را کنترل کند و باعث کاهش بار میکروبی سطح هلو و بهبود ماندگاری میوه هلو بسته‌بندی در مقایسه با شاهد (بسته‌بندی شده و بدون بسته‌بندی) ، شد. میوه‌های بسته‌بندی شده به طور قابل توجهی بار میکروبی کمتری نسبت به شاهد داشتند و به نظر می‌رسد این فیلم‌ها برضد میکروارگانیسم‌های موجود بر سطح این میوه، موثر باشند (Kaur et al., 2017).

جنس Colletotrichum طیف وسیعی از گونه‌های بیماری‌زای قارچی را در بر دارد. این جنس باعث بیماری آنتراکنوز در بسیاری از محصولات باغبانی شده و به عنوان هشتمین جنس قارچی مهم بر اساس اهمیت اقتصادی و خسارت به محصولات باغبانی شناخته می‌شود (Dean et al., 2012). این جنس در انبه نیز باعث ایجاد خسارت می‌شود. کامپوزیت‌های کیتوزان/ نانوذرات نقره به صورت محلول با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر توانست جوانه‌زنی اسپور این قارچ را به طور کامل در شرایط درون شیشه‌ای مهار کند. همچنین استفاده از این ترکیب به صورت عادی روی محصول، باعث کاهش بیماری آنتراکنوز به میزان ۴۵/۷٪ شد (Chowdappa et al., 2014). استفاده از نانو مواد در پس از برداشت محصولات با کنترل بیماری‌های قارچی می‌تواند تاثیر قابل توجهی برای کاهش تلفات پس از برداشت داشته باشد.

۸.نتیجه‌گیری

با اینکه روش‌های کنترلی آسانی مانند زمان برداشت، شستن و گندزدایی میوه‌ها و سبزی‌ها و همچنین روش حمل و نقل محصولات می‌تواند بر عمر پس از برداشت میوه‌ها و سبزی‌ها اثر بگذارد، اما مدیریت بیماری‌های پس از برداشت و استفاده از قارچ‌کش‌ها یکی از مهم‌ترین عوامل افزایش عمر پس از برداشت در محصولات باغبانی است. باید توجه داشت که استفاده از نانومواد یک روش پر هزینه است اما تولید این مواد با روش‌های ارزانتر مانند سنتز زیستی آن‌ها می‌تواند کاربرد بسیار بالایی در افزایش عمر انبارمانی و بسته‌بندی محصولات باغبانی داشته باشد. استفاده از نانومواد در زمینه پس از برداشت می‌تواند به عنوان یک نسل جدید کنترل بیماری‌های پس از برداشت و موثرتر از قارچ‌کش‌های شیمیایی، معرفی شود. مطالعات کمی در خصوص استفاده از نانومواد روی سبزی‌ها وجود دارد، با وجود اینکه سبزی‌ها به‌خصوص سبزی‌های برگی ماندگاری بسیار کمی دارند، استفاده از نانومواد روی این محصولات باغبانی نیازمند تحقیقات بیشتر است. همچنین در کاربرد نانومواد روی محصولات کشاورزی باید به نوع نانومواد، مقدار مورد استفاده و زمان تیمار نیز توجه نمود.

منابع

1. Abdelmalek, G., and Salaheldin, T. (2016). Silver nanoparticles as a potent fungicide for citrus phytopathogenic fungi. *Journal of Nanomedicine Research*, *3*(5), 00065.
2. Bapat, R. A., Chaubal, T. V., Joshi, C. P., Bapat, P. R., Choudhury, H., Pandey, M., Gorain, B., and Kesharwani, P. (2018). An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry. *Materials Science and Engineering: C*, *91*, 881-898.
3. Becaro, A. A., Puti, F. C., Panosso, A. R., Gern, J. C., Brandão, H. M., Correa, D. S., and Ferreira, M. D. (2016). Postharvest quality of fresh-cut carrots packaged in plastic films containing silver nanoparticles. *Food and Bioprocess Technology*, *9*(4), 637-649.

4. Bożena, D. W.-R., Adam, D. E., Mieczyslaw, D. O., Elżbieta, D. B., and Ewa, M. G. Application of silver nanoparticles to fruits and vegetables to improve their postharvest shelf , 15thInternational SGEMGeoConference on Nano, Bio, Green: Technologies for Suitable Future, poland
5. Chowdappa, P., Gowda, S., Chethana, C., and Madhura, S. (2014). Antifungal activity of chitosan-silver nanoparticle composite against Colletotrichum gloeosporioides associated with mango anthracnose. *African Journal of Microbiology Research*, *8*(17), 1803-1812.
6. Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., and Ellis, J. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, *13*(4), 414-430.
7. Derbalah, A. S., Elkot, G. A. E., and Hamza, A. M. (2012). Laboratory evaluation of botanical extracts, microbial culture filtrates and silver nanoparticles against Botrytis cinerea. *Annals of microbiology*, *62*(3), 1331-1337.
8. Gogos, A., Knauer, K., and Bucheli, T. D. (2012). Nanomaterials in plant protection and fertilization: current state, foreseen applications, and research priorities. *Journal of agricultural and food chemistry*, *60*(39), 9781-9792.
9. Hussain, M., Raja, N. I., Iqbal, M., and Aslam, S. (2019). Applications of plant flavonoids in the green synthesis of colloidal silver nanoparticles and impacts on human health. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, *43*(3), 1381-1392.
10. Jagana, D., Hegde, Y. R., and Lella, R. (2017). Green nanoparticles: A novel approach for the management of banana anthracnose caused by Colletotrichum musae. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, *6*(10), 1749-1756.
11. Kaur, M., Kalia, A., and Thakur, A. (2017). Effect of biodegradable chitosan–rice-starch nanocomposite films on post-harvest quality of stored peach fruit. *Starch-Stärke*, *69*(1-2), 1600208.
12. Khan, I., Saeed, K., and Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian journal of chemistry*, *12*(7), 908-931.
13. Kumar, S., Shukla, A., Baul, P. P., Mitra, A., and Halder, D. (2018). Biodegradable hybrid nanocomposites of chitosan/gelatin and silver nanoparticles for active food packaging applications. *Food packaging and shelf life*, *16*, 178-184.
14. Mittal, A. K., Chisti, Y., and Banerjee, U. C. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology advances*, *31*(2), 346-356.
15. Ovington, L. G. (2004). The truth about silver. *Ostomy/wound management*, *50*(9A Suppl), 1S-10S.
16. Rajeshkumar, S., Malarkodi, C., Gnanajobitha, G., Paulkumar, K., Vanaja, M., Kannan, C., and Annadurai, G. (2013). Seaweed-mediated synthesis of gold nanoparticles using Turbinaria conoides and its characterization. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, *3*(1), 1-7.
17. Ruffo Roberto, S., Youssef, K., Hashim, A. F., and Ippolito, A. (2019). Nanomaterials as alternative control means against postharvest diseases in fruit crops. *Nanomaterials*, *9*(12), 1752.
18. Salehi, M., Reisnia, N., and Mehrabian, S. (2011). Antibacterial effect of external shell of Pistacia vera extract. *Islamic Azad Uni Microb Biotech Res J*, *3*(1), 53-59.
19. Senapati, S., Syed, A., Moeez, S., Kumar, A., and Ahmad, A. (2012). Intracellular synthesis of gold nanoparticles using alga Tetraselmis kochinensis. *Materials Letters*, *79*, 116-118.
20. Sharma, H., Crouch, J., Sharma, K., Seetharama, N., and Hash, C. (2002). Applications of biotechnology for crop improvement: prospects and constraints. *Plant Science*, *163*(3), 381-395.
21. Youssef, K., Ligorio, A., Sanzani, S. M., Nigro, F., and Ippolito, A. (2012). Control of storage diseases of citrus by pre-and postharvest application of salts. *Postharvest Biology and Technology*, *72*, 57-63.
22. Zhang, H., Yang, S., Joyce, D. C., Jiang, Y., Qu, H., and Duan, X. (2010). Physiology and quality response of harvested banana fruit to cold shock. *Postharvest Biology and Technology*, *55*(3), 154-159.
23. Zhang, Z., Guo, H., Carlisle, T., Mukherjee, A., Kinchla, A., White, J. C., Xing, B., and He, L. (2016). Evaluation of postharvest washing on removal of silver nanoparticles (AgNPs) from spinach leaves. *Journal of agricultural and food chemistry*, *64*(37), 6916-6922.
24. Zhang, Z., Kong, F., Vardhanabhuti, B., Mustapha, A., and Lin, M. (2012). Detection of engineered silver nanoparticle contamination in pears. *Journal of agricultural and food chemistry*, *60*(43), 10762-10767.

Investigate of biological and manure effect on decreasing demand chemical fertilizer in *Hyssopus officinalis L*

Gholamreza Naderi Boroujerdi, Golbarg Malekhosseini

Department of agriculture and natural resources, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran

* Corresponding Author Email: g1_malekhoseini@yahoo.com

Abstract

Phosphor, after nitrogen, is considered as one of the highly consumed elements for the herbs. This element is involved in all the biochemical process, energy and message transferring mechanisms, being among the nutritious substance for the plants that has influence on their growth and performance. Shortage of this element, currently, is compensated by applying chemical fertilizers. The chemical fertilizers have harmful impact on the environment and decrease the quality of the agricultural products. This test was carried out in order to analyze the phosphate solving bacterium type Bacillus Lentus (p5) and Pseudomonas Putida (p13) as the organic fertilizers and chemical phosphorus from the super phosphate Triple source as the chemical fertilizer. The effect of the two phosphorous factors (phosphor solving bacterium, chemical phosphor) and the medicinal herb "Hyssop" was analyzed by applying a factorial test as a complete random blocks in three times during the agricultural year of 2009 in Arak. The effect of the main two factors and their interaction with certain strains such as the height of bush, length of flower branch, number of flower branch, wet shoot yield, dry shoot yield, seeds yield, percent of essential oil, yield of essential oil per hectare, was meaningful. Of course, non meaningfulness of the effect of the phosphor releasing bacterium was examined in certain strains such as essence percentage and the results indicated that the application of phosphate solving bacterium have a meaningful effect on the studied strains, leading into increase of the performance elements parameters, in particular the dry shoot yield in phosphor releasing bacteria treatment alone, and application of the phosphor releasing bacteria with 115 kg phosphate fertilizer, and yield of essential oil per hectare in 90kg of phosphate fertilizer in the treatments including phosphate solving bacterium, comparing with the chemical treatment and Contour, was meaningfully dominant. There was at least 50% decrease in consumption of the phosphate chemical fertilizers of super phosphate Triple source by applying phosphor releasing bacterium.

Keywords: Phosphorus-releasing bacteria, phosphorus, hyssop, yield and essential oil

استفاده از کود بیولوژیک در کاهش نیاز به کود شیمیایی در گیاه دارویی

زوفا *Hyssopus officinalis L.*

غلامرضا نادری بروجردی- گلبرگ ملک حسینی*

گروه کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، اراک، ایران

*ایمیل نویسنده مسئول * g1_malekhoseini@yahoo.com

چکیده:

عنصر فسفر پس از نیتروژن یکی از عناصر پر مصرف برای گیاه به شمار می رود. این عنصر در تمام فرآیندهای بیوشیمیایی، سازوکارهای انتقال انرژی و انتقال پیام ها دخالت می نماید کمبود این عنصر در حال حاضر با کاربرد کودهای شیمیایی جبران می گردد. در این آزمایش به منظو.ر ارزیابی باکتریهای حل کننده فسفات به عنوان کودهای بیولوژیکی و فسفرشیمیایی از منبع سوپرفسفات تریپل به عنوان کود شیمیایی انجام شد. اثر دو فاکتور منابع فسفر (باکتریهای حل کننده فسفر ، فسفر شیمیایی) وگیاه دارویی زوفا با استفاده از یک آزمایش فاکتوریل در قالب بلوکهای کامل تصادفی با سه تکرار طی دراستان مرکزی شهر اراک ، ارزیابی شد. اثر دو فاکتور اصلی و اثرات متقابل آنها بر روی بعضی صفاتی مانند ارتفاع بوته ، طول سرشاخه گلدار ، تعداد سرشاخه گلدار ، ماده تر اندام هوایی ، ماده خشک اندام هوایی ، عملکرد بذر ،درصد اسانس، عملکرد اسانس تاثیر معنی دار داشته باشد. والبته معنی دار نبودن تاثیر باکتریهای آزادکننده فسفر در برخی صفات مانند درصد اسانس مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که کاربرد باکتریهای حل کننده فسفات به نحو معنی داری صفات مطالعه شده را تحت تاثیر قرار داده و باعث افزایش پارامترهای اجزاء عملکرد به ویژه عملکرد ماده خشک اندام هوایی در تیمار کاربرد باکتری آزادکننده فسفر به تنهایی و کاربرد باکتری آزادکننده فسفر همراه با ۱۱۵کیلوگرم کود فسفاته گردید و عملکرد اسانس در ۹۰ کیلوگرم کود فسفاته در تیمارهای حاوی باکتریهای حل کننده فسفات، نسبت به تیمارهای شیمیایی و شاهد به طور معنی داری برتری داشت.

کلمات کلیدی :باکتریهای آزادکننده فسفر، فسفر، زوفا ، عملکرد و اسانس

۱.مقدمه

فسفر یکی از عناصر اصلی مورد نیاز گیاه است. این عنصر در تمام فرایندهای بیوشیمیایی در ترکیبات انرژی زا و در مکانیسم های انتقال انرژی دخالت دارد. کودهای بیولوژیک یا کودهای میکروبی شامل موادی هستند(جامد، مایع یا نیمه جامد) که حاوی یک یا چند گونه میکروارگانیسم خاص بوده که از طریق تأمین بخشی از یک عنصر مورد نیاز گیاه و یا تولید مواد محرک رشد، به رشد بهتر گیاه کمک می کنند.(ارزانی.۱۳۸۰) کود بیولوژیک بارور ۲ استفاده شده در طرح حاصل ۸ سال پژوهش در ایران

می باشد . این کود حاوی دو نوع باکتری حل کننده فسفات از گونه های باسیلوس انتوس (سویه P5) وسودفوناس پوتیدا (سویهP12) که به ترتیب با استفاده از دو سازوکار ترشح اسیدهای آلی واسید فسفاتاز باعث تجزیه ترکیبات فسفره نامحلول ودر نتیجه قابل جذب شدن آن برای گیاه می گردد. نتایج حاکی از آن بود که این باکتریها قادرند دامنه وسیعی از PH بین ۵ الی ۱۱ وشوری تا ۳/۵ درصد را بخوبی تحمل نمایند .(راشی پور . ل و علی اصغر زاده . ن. ۱۳۸۶ - کسرایی. ر. ۱۳۷۲ - کیانی راد . مهران ۱۳۷۴- عشقی زاده1386 .) : گیاه دارویی زوفا با نام علمی(Hyssopus officinalis)گیاهی خشبی چند ساله می باشد. منشاء این گیاه آسیای صغیر گزارش شده و از دریای خزر تا دریای سیاه می روید.این گیاه دارای ریشه مستقیم با انشعابهای فراوان میباشد ، ساقه در این گیاه چهار گوش و مستقیم و ارتفاع آن بین ۵۰ الی ۷۰ سانتیمتر است. .برگهای زوفا به طول ۲ الی ۴سانتیمتر و به عرض ۰/۵ الی ۱ سانتیمتر که در طول ساقه به صورت متقابل (به شکل صلیب) قرار می گیرند گلهای زرفا در ۴ رنگ سفید- صورتی- آبی ومخلوط مقدار اسانس موجود در پیکر رویشی زوفا متفاوت بوده و بین ۰/۳ تا ۱ درصد می باشدو بیشترین میزان اسانس در گیاه زوفا در سر شاخه های گلدار آن وجود دارد.مهمترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس را «پینوکامفن» به میزان ۵۰٪ تشکیل می دهد ، از ترکیبات مهم دیگر اسانس می توان «آلفا و بتا پینن » ،« کامفن » و الکلهای سزکوئی را نام برد.(امید بیگی, رضا ۱۳۷۹ - برنامه راهبردی گیاهان دارویی - زمان , ساعد ۱۳۷۶).

۲.مواد و روش ها

این آزمایش در زمینی به مساحت ۲۰۰۰ متردر استان مرکزی شهر اراک به اجراء در آمد.در این آزمایش از یک طرح بلوک کامل تصادفی با ۳ تکرار استفاده شد. مقایسه میانگین ها توسط آزمون چند دامنه ای دانکن و تجزیه وتحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SAS انجام و کلیه گراف ها، اعم از نمودارهای ستونی و منحنی های آنالیز رشد با استفاده از نرم افزار Excel رسم گردید.

تیمارهای مورد بررسی عبارتند از:

✯ فاکتور اول : کودشیمیایی که ازکود سوپرفسفات تربیل ۵۰٪(P2O5)استفاده گردید.(در۵ سطح:)

P0: بدون استفاده از کود فسفاته+ ۳۴۸g اوره+g ۱۰۰ سولفات پتاسیم

P90 : ۹۰kg/h خالص فسفاته ← ۱۴۴ g/plot سوپرفسفات تریبل + ۳۴۸g اوره+g ۱۰۰ سولفات پتاسیم

P115: ۱۱۵kg/h خالص فسفاته ← ۱۸۴ g/plot سوپرفسفات تربیل + ۳۴۸g اوره+g ۱۰۰ سولفات پتاسیم

P140:۱۴۰ kg/h خالص فسفاته ← ۲۲۴ g/plot سوپرفسفات تربیل + ۳۴۸g اوره+g ۱۰۰ سولفات پتاسیم

P165:۱۶۵kg/h خالص فسفاته ← ۲۶۴ g/plot سوپرفسفات تربیل + ۳۴۸g اوره+g ۱۰۰ سولفات پتاسیم

❋ فاکتور دوم : کود زیستی فسفاته (PSb) = Phosphate Solubilizing در دو سطح :

PS1 ← مصرف بارور (۲) PS0 ← بدون بارور (۲)

صفات مورد یادداشت برداری :ارتفاع بوته ،تعداد سرشاخه گلدار، طول سرشاخه گلدار،وزن تر اندام هوایی ،وزن خشک اندام هوایی، ،وزن هزار دانه . درصد اسانس ،عملکرد اسانس

۳.نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان می دهد (جدول-۱) که بین بلوک ها در صفات مورد بررسی، غیر از ارتفاع بوته و طول سرشاخه گلدار اختلاف معنی دار مشاهده نشد. بین تیمار ها در تمامی صفات اختلاف بسیار معنی دار ($\alpha=0.01$) وجود داشت.غیر ازدرصد اسانس که درسطح ($\alpha=0.05$) اختلاف معنی دارنشان داد.

بین مقادیر مختلف کود فسفاته(فاکتور A) درصفات مختلف، در سطح ($\alpha=0.01$) اختلاف معنی دار وجود داشت. غیر از درصد اسانس که درسطح ($\alpha=0.05$) اختلاف معنی دار مشاهده شد. و بین مقادیر مختلف کود حل کننده فسفات(فاکتور B) درصفات مختلف، در سطح ($\alpha=0.01$) اختلاف معنی دار وجود داشت. غیر از عملکرد اسانس که درسطح ($\alpha=0.05$) اختلاف معنی دار مشاهده شد و درصد اسانس اختلاف معنی دار نبود. بررسی اثرات متقابل(بین عامل سطوح مختلف کود فسفاته و عامل کود حل کننده فسفات) درصفات مختلف نشان می دهد، بین صفات طول سرشاخه گلدار، تعداد سرشاخه گلدار،عملکرد ماده تر اندام هوایی در سطح ($\alpha=0.01$) و همچنین ارتفاع بوته و عملکرد ماده خشک اندام هوایی در سطح ($\alpha=0.05$) اختلاف معنی دار بود. در صفات عملکرد بذر، درصد اسانس و عملکرد اسانس اختلاف معنی دار وجود ندشت (جدول-۱)

جدول۱: تجزیه واریانس گیاه زوفا ازنظر صفات مورد برر سی

منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی(df)	میانگین مربعات			
		ارتفاع بوته	طول سرشاخه	تعداد سرشاخه	درصد اسانس
بلوک	۲	۶/۰۸ *	۰/۶۷۵ *	۰/۰۵۸ ns	۰/۰۱۰۳ ns
تیمار	۹	۳۹/۴۲**	۴/۶۴**	۷/۷۲**	۰/۰۱۱۳*
کود فسفاته	۴	۵۰/۱۲**	۷/۲۱**	۴/۶۲**	۰/۰۱۷*
حل کننده فسفات	۱	۱۳۸/۶۷ **	۷/۲۵ **	۳۴/۶۷ **	۰/۰۰۵۳ ns
اثرات متقابل	۴	۳/۹*	۱/۴۱۴**	۴/۰۸۵**	۰/۰۰۷ ns

اشتباه آزمایشی	۱۴	۱/۰۹	۰/۱۵۲	۰/۲۴۱	۰/۰۰۵۱
منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی(df)	میانگین مربعات			
		عملکرد تر	عملکرد خشک	عملکرد بذر	عملکرد اسانس
بلوک	۲	۱۲۹۲/۹ ns	۵۹۸/۶ ns	۱۱/۳۵ ns	۰/۳۱۴ ns
تیمار	۹	۱۰۹۰۰۱/۹**	۱۰۳۵۶/۹**	۳۳۸/۱۲**	۰/۷۵۱**
کود فسفاته	۴	۲۲۶۹۳۳/۵**	۲۰۹۰۵/۱**	۶۳۴/۶۴**	۱/۳۰۱**
حل کننده فسفات	۱	۴۴۹۳۴/۴ **	۶۱۶۹/۲ **	۳۸۱/۶۳ **	۰/۵۹۴ *

۴.نتیجه گیری

کاربرد باکتری آزاد کننده فسفر توانست بر روی صفات ارتفاع بوته، طول سرشاخه گلدار، تعداد سرشاخه گلدار،عملکرد دانه در هکتار،عملکرد ماده تر اندام هوای ، عملکرد ماده خشک اندام هوای و عملکرد اسانس تاثیر معنی داری داشته باشد و البته معنی دار نبودن تاثیر باکتریهای آزاد کننده فسفر در این صفات ، خود نشان دهنده کارایی بالای این باکتریها و توانایی رقابت با منابع شیمیایی فسفر می باشد . باکاربرد باکتری آزاد کننده فسفر ، مصرف کودهای شیمیایی فسفاته (سوپر فسفات تریپل) را به میزان قابل توجهی کاهش می یابد.

منابع

۱. امید بیگی, رضا ۱۳۷۹ . تولید و فراوری گیاهان دارویی . جلدسوم . ا نتشارات آستان قدس رضو ی , ۳۹۷ .

۲. ارزانی . الف .۱۳۸۰ . اصلاح گیاهان زراعی . ترجمه مرکز نشر دانشگاهی دانشگاه صنعتی اصفهان

۳. برنامه راهبردی گیاهان دارویی. موسسه جنگلها ومراتع کشور1387 فاطمه سفیدکن.و همکاران.

۴. راشی پور . ل و علی اصغر زاده . ن. ۱۳۸۶ . اثرات متقابل باکتریهای حل کننده فسفات و (Bradyhizobium japanicum) بر شاخص های رشد، غده بندی و جذب برخی عناصر غذایی در سویا . علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی . سال یازدهم . شماره چهلم (الف).

۵. زمان , ساعد ۱۳۷۶ . گیاهان دارویی روشهای کاشت و برداشت انتشارات ققنوس , ۳۶۷ صفحه, چاپ سوم .

۶. کسرایی. ر. ۱۳۷۲ چکیده های در مورد علم تغذیه گیاهی . ترجمه . انتشارات دانشگاه تبریز.

۷. کیانی راد . مهران ۱۳۷۴. بررسی میکرو ارگانیسم های حل کننده فسفات و تاثیرآنها در کاهش مصرف کودهای فسفره در کشت سویا . دانشگاه تهران دانشکده کشاورزی .

۸. علم، ا.ج .و ح.ر .عشقی زاده . 1386 .کاربرد کودهای بیولوژیک : مزیتها و محدودیتها.خلاصه مقالات **دومین** همایش ملی بوم شناسی ایران . .گرگان .ص

Studying morphological characteristics of *Verbascum speciosum* Shard. at Hamekasi mining area in Hamadan Province

Marzieh Mousaei

Assistant Professor, Department of Biology, University of Yasouj

*Corresponding Author's Email address: m.mousaei82@gmail.com

Abstract

Indicator plants are bio-monitors for ecological situation of their environment. The purposes of this research were identification of indicator plants for Fe and Cu and to study the morphology of *Verbascum speciosum* Shard. This study was carried out in the mine of Hamekasi located in 35 km to the north west of Hamedan . 12 tolerant and common plant spices growing on mineral veins and the soils of their habitat were analyzed for metal concentration in total plants tissues and their habitat soils. Results showed that *V. speciosum* can be considered as Cu and Fe indicator. *V. speciosum* as one of the most resistant and abundant plant was selected for morphological studies. 47 reproductive and vegetative characters were investigated. Results indicated that the plants belonging to mineral veins were different from control plants in morphological characters.

Keywords: Morphology, Hamekasi, resistant, reproductive, vegetative

مقایسه ریخت شناختی گونه Verbascum speciosum معرف فلزات سنگین آهن و مس با گونه شاهد در منطقه معدن همه کسی همدان

مرضیه موسایی

استادیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه یاسوج

m.mousaei82@gmail.com *

چکیده

هدف از این پژوهش شناسایی گیاهان معرف حضور فلزات سنگین آهن، روی و همچنین بررسی اثر فلزات سنگین بر مورفولوژی گیاه *Verbascum speciosum* می باشد. منطقه مورد بررسی، معدن همه کسی می باشد که در ۳۵ کیلومتری شمال غرب همدان واقع شده است. در این پژوهش ۱۲ گونه گیاهی مقاوم و رایج متعلق به رگه های فلزی (گیاه کامل) و خاک مربوط به محل رشد آنها به منظور تعیین غلظت فلزات مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج نشان داد که گیاه *V. speciosum* به عنوان یکی از فراوان‌ترین و مقاوم‌ترین گیاهان موجود در منطقه می تواند به عنوان اندیکاتور مس و آهن مورد بررسی قرار گیرد و برای مطالعات ریخت شناختی انتخاب شد. در مطالعات ریخت شناسی با بررسی ۴۷ صفت رویشی و زایشی تفاوتهای مورفولوژیکی بین گیاه متعلق به رگه معدنی و گیاه شاهد مشخص گردید.

واژگان کلیدی: همه کسی، مقاوم، مورفولوژی، رویشی، زایشی.

۱.مقدمه

۱-۱ -فلزات سنگین و گیاهان معرف آنها

در علم شیمی فلزات سنگین را شامل ۶۵ عنصر فلزی با چگالی بیشتر از ۵ گرم بر سانتیمتر مکعب معرفی می کنند که برای رشد جانداران ضروری بوده و جزو ترکیب اساسی آنزیم ها، پروتئین های خاص و یا عناصر ساختاری ویژه در جانداران محسوب می شوند (Gadd, 2001). تجمع فلزات در گیاه نوعی مکانیسم مقاومت در برابر افزایش غلظت این فلزات در خاک است که همچنین می تواند ایجاد کننده اللوپانی عنصری و یا عامل ایجاد دفاع در برابر پاتوژنها و علف خواران باشد (Lasat, 2000, Loeffler *et al.*, 2005). در گیاهان معرف فلزات سنگین مقدار فلز جذب شده نشانگر تجمع فلز در محیط ریزوسفر است و می تواند در اکتشاف رگه های فلزی کاربرد داشته باشد(Baker, 1981). فزونی و یا کمبود عناصر در خاکهایی که روی آنها گیاهان رشد می کنند می تواند سبب تغییرات مورفولوژیکی و جهشی شود. به علاوه اثرات فیزیولوژیکی، بویژه کاهش و یا افزایش رشد ممکن است پدیدار گردد. تغییرات مورفولوژیکی که با افزایش مقدار عناصر معینی در خاک در ارتباط است عبارتند از : تغییر شکل بعضی از اندام ها -تغییر رنگ گلها و برگها، خصلت بلوغ گیاه، تراکم و یا فراوانی ساقه ها و شاخه ها و ویژگی های برگ ها. زیاد بودن بعضی از عناصر در محیط ممکن است حتی موجب پیدایش امراض گوناگون یا جلوگیری از رشد گیاهان شود. برای مثال می توان از وجود گونه های گیاهی کوتاه قد در مناطق سرپانتینی نام برد. تغییرات مورفولوژیکی در ارتباط با کانی سازی می تواند شامل رنگی شدن برگ ها، کوتاه قدی و غول پیکری ، میوه هایی با شکل غیرعادی، تغییرات در رنگ گل

و غیره گردد. رنگی شدن غیر عادی برگ ها و یا گل ها نتیجه افزایش غلظت فلزات بسیاری مانند Cr, Ni, Cu, Zn Mn, در محیط است، که با متابولیسم آهن گیاه تداخل کرده و تولید رنگ در برگ می نمایند. در موارد خاصی فراوانی عناصر منگنز، نیکل و کبالت موجب پیدایش شاخ و برگ کم رنگ تر می شود. از طرف دیگر فراوانی عنصر بور ممکن است موجب پیدایش شاخ و برگ تیره تر گردد (Levinson, 1974).

۲-۱ -معرفی گونه انتخاب شده برای مطالعه مورفومتری

گونه انتخاب شده در این پژوهش *Verbascum speciosum* از تیره گل میمون (Schrophulariaceae) می باشد. خانواده گل میمون دارای متجاوز از ۳۰۰۰ گونه در ۲۰۰ جنس است که ۲۷ جنس آن در ایران موجود می باشد. خصوصیات گونه به شرح زیر می باشد: گیاه دوساله به ارتفاع ۵۰ تا ۲۰۰ سانتیمتر، خاکستری با کرکهای بسیار، بدون غده، کرکها فشرده متشکل از تارهای ستاره ای پرشاخه کوتاه، ساقه ها راست، قوی و محکم، گوشه دار و به طرف بالا گرد و زاویه دار، منشعب به هم فشرده و برگدار. برگ کامل اما بدون دمبرگ و گاهی به طور غیر متداول دارای کناره های موجدار است. برگ از محل دمبرگ ۷-۲ سانتیمتر طول دارد که تدریج کاهش می یابد و پهنک برگ تخم مرغی نوک کند تا تیز است و ۴۵-۱۰ سانتیمتر طول و ۱۰-۳ سانتیمتر عرض دارد. برگهای ساقه ای زیر محل دمبرگ همشکل اما کوچک و بی دمبرگ. بدون و یا دارای گوشوارک و در قسمت فوقانی به شدت تحلیل رفته، قلبی تا تخم مرغی یا تقریباً دایره ای، تند نوکدار، حاشیه چین دار یا بدون چین، طول گل آذین ۵۰- ۳۰ سانتیمتر، تخم مرغی ، خوشه ای، فشرده، ۲ تا چند گل، نامحدود یا محدود. براکته های تخم مرغی نوکدار یا فقط نوک تیز و بلندتر از گلها نیستند. دمگل ها به صورت دسته های اولیه ۱۵-۳ میلیمتر طول دارند. براکتئول دو عدد، قاعده ای کوچک، نوک تیز و دمگل ها کمی کوتاهترند. کاسبرگها ۵-۳ میلیمتر ، قطر گل ۳۰-۲۰ میلیمتر، گلبرگها زرد، خالدار و شفاف نیستند، در خارج درای کرکهای ستاره ای منشعب و در داخل صاف. پرچم ها ۵ عدد، میله ها همگی به طور مداوم به سمت بساک دارای کرکهای سفید متراکم با نوک گرزی پوشیده از موهای نرم مخملی، بساکها کلیوی شکل، میان چسب. کپسول مستطیلی تخم مرغی، به طول ۷-۴ میلیمتر و به عرض ۴-۳ میلیمتر با کرکهای ستاره ای و منشعب (Rechinger, 1963).

۲.مواد و روش‌ها

معدن همه کسی در دامنه شمالی کوه آلماقولاغ در ۳۵ کیلومتری شمال غرب همدان واقع در بخش صالح آباد شهرستان بهار می باشد و ارتفاع محل از سطح دریاهای آزاد برابر ۲۱۶۴ متر است. شهرهای اطراف بهار همدان، قروه، اسدآباد و صالح آباد می باشد. فاصله معدن تا نزدیک ترین شهر یعنی بهار ۵ کیلومتر و تا مرکز استان همدان ۱۵ کیلومتر، تا نزدیک ترین روستا یعنی همه کسی ۲ کیلومتر است . موقعیت معدن با استفاده از نقشه های توپوگرافی و دستگاه GPS ´ شرقی عرض ۳۴ ´ 57 º شمالی و طول ۴۸´ 8 º شرقی تعیین گردید. طبق آمار سازمان هواشناسی کشور منطقه همه کسی در زیر گروه سرد و خشک قرار دارد. متوسط بارندگی کمتر از ۳۰۰ میلی متر در سال بوده و حداقل دما در ماه هایی از سال به زیر صفر هم میرسد. استخراج معدن از ۲۵ سال قبل (۱۳۶۱) آغاز شده است . نوع معدن سنگ آهن است اما نوع ماده معدنی غیر فلزی می باشد . (براتی، ۱۳۸۲).

۲-1 نمونه برداری و آماده سازی نمونه های گیاهی

جمع آوری نمونه های گیاهی به روش کودرات انجام شد . در مرحله اول گیاهان موجود در محل رگه اصلی، با ریشه، ساقه، برگ، میوه و گل جمع آوری شده، در داخل کیسه بزرگی قرار داده شده و پس از انتقال به هرباریوم دانشگاه پرس شدند . پس از پرس شدن برروی کارت های مقوایی ویژه چسبانده شده و در کنار آن ویژگی های نمونه از قبیل ارتفاع، محل جمع آوری،

موقعیت محل، ویژگی های ظاهری گیاه و تاریخ جمع آوری و یادداشت گردید . سپس گونه های گیاهی با استفاده از منابع موجود شامل فلورا ایرانیکا (Rechinger ,۱۹۶۳-۲۰۱۲) و فلور ایران (احمد قهرمان، ۱۳۵۷) شناسایی شدند .

۲-۲ بررسی‌های مورفولوژیکی

بخشهای رویشی و زایشی گونه جمع آوری شده ***Verbascum speciosum*** Schard از دیدگاه‌های مختلف مورد مطالعه ریخت شناختی قرار گرفت و ۵۵ ویژگی کمی و کیفی در این گونه بررسی شد (جدول ۲-۱). در بررسی ریختارهای فوق از ذره بین و لوپ استفاده شد. جهت انجام مطالعات عددی، اندازه گیری‌های ماکروسکوپی با استفاده از خط کش و کاغذ میلیمتری انجام شد که در نهایت ۴۷ ویژگی شامل ویژگیهای رویشی و زایشی انتخاب شدند و مورد مقایسه قرار گرفتند. به کمک جدول کای ۲ و محاسبه تفاضل میانگین‌ها و انحراف معیار داده های مربوطه سطح معنی‌دار شدن داده ها مشخص گردید.

جدول ۲-۱: صفات کمی و کیفی مورد بررسی در **Verbascum speciosum**

صفات کیفی	صفات کمی
تراکم کرک برگ(سطح زبرین)	طول گیاه(cm)
تراکم کرک برگ(سطح زیرین)	طول گل آذین(cm)
تراکم کرک میوه	طول میوه(mm)
تراکم کرک ساقه	عرض میوه(mm)
تراکم کرک شاخه	قطر گل(mm)
تراکم کرک کاسبرگ	طول پرچم(mm)
تراکم کرک گلبرگ(سطح خارجی)	طول کاسبرگ(mm)
تراکم کرک گلبرگ(سطح داخلی)	تعداد پرچم
تمکن تخمدان	طول کرک میوه(mm)
شکل ساقه	طول کرک برگ(mm)
رنگ ساقه	طول خامه(mm)
شکل بذر	طول کرک ساقه(mm)
رنگ بذر	طول بذر(mm)
رنگ گل	تعداد بذر در هر میوه
رنگ بذر	طول بذر(mm)
رنگ گل	تعداد بذر در هر میوه
شکل بساک	تعداد ریشه های فرعی
شکل کرک پرچم	طول برگ
رنگ کرک پرچم	عرض برگ
نوع ریشه	طول دمگل

شکل کلاله	وزن بذر
شکل کرک برگ	
شکل کرک ساقه	
شکل کرک میوه	
شکل برگ	

۳. نتایج و بحث

۳-۱- نتایج مربوط به آنالیز نمونه های گیاهی

۳-۱-۱- آنالیز نمونه های گیاهی منطقه رگه معدنی و شاهد

از میان گونه های گیاهی شناسایی شده که در جدول ۳-۱ آورده شده است، تعدادی از گونه هایی که حضور قابل توجهی داشتند برای آنالیز فلزات سنگین انتخاب شدند شامل Verbascum speciosum, Astragalus verus, Cousinia bijarensis, , Tanacetum polycephalum, Cirsium lappaceum, Scariola orientalis, Stipa barbata, Cousinia sp., Achanthophylum caespitosum, Gypsophylla pallida, Melica persicaCenturea virgata,

بالاترین میزان آهن در گونه Verbascum speciosum به میزان۱۵۳۹۰ ppm، بالاترین میزان مس در Verbascum speciosum مشاهده گردید. این گیاهان توانایی بسیار بالایی برای جذب فلزات مورد نظر از خاک داشته و به میزان زیادی این فلزات را در خود انباشته می کنند.

۳-۲- اثر فلزات سنگین بر ویژگیهای مورفولوژیکی گیاه Verbascum speciosum

برای بررسی اثر فلزات سنگین بر ویژگیهای مورفولوژیکی ، ۴۷ صفت در گیاه مورد نظر از دو منطقه رگه معدنی (P) و منطقه شاهد (C) مطالعه شدند. نتیجه این مطالعات در جدول ۳-۱۱آمده است. میانگین اعداد بدست آمده محاسبه و به کمک جدول مربع کای معنی دار بودن یا نبودن آن محاسبه شد که دو جمعیت گیاهی متعلق به دو منطقه رگه معدنی(P) و منطقه غیر رگه (C) در ۱۶ صفت کمی با هم تفاوت داشتند اما در بقیه صفات تفاوت قابل ملاحظه ای مشاهده نشد.

جدول ۳-۱۱ : مقایسه میانگین ویژگیهای مورفولوژیکی گل ماهور در دو منطقه رگه معدنی (P) و منطقه شاهد (C)

گیاه شاهد (T)	گیاه متعلق به رگه معدنی(P)	صفت
۱۲۵	۱۵۱/۶	طول گیاه(cm)
۷۸	۱۰۳/۷	طول گل آذین(cm)
۵/۶	۶/۱	طول میوه(mm)
۲/۶ -۳/۴	۳-۳/۹	عرض میوه(mm)
۱۹/۳	۲۶	قطر گل(mm)

طول پرچم(mm)	۷/۷	۵/۷
طول کاسبرگ(mm)	۳/۲	۲/۷
تعداد پرچم	۵	۵
طول کرک میوه(mm)	۰/۱۵	۰/۱
شکل کرک میوه	ستاره ای ساده	ستاره ای ساده
طول کرک ساقه(mm)	۰/۶	۰/۶
شکل کرک ساقه	ستاره ای ساده	ستاره ای ساده
طول کرک برگ(mm)	۰/۷	۰/۷
شکل کرک برگ	ستاره ای مطبق	ستاره ای مطبق
شکل برگ	تخم مرغی نوک تیز	تخم مرغی نوک تیز
رنگ میله	قرمز	قرمز
رنگ بساک	نارنجی تا نارنجی روشن	نارنجی روشن تا سفید
شکل بساک	کلیوی	کلیوی
شکل کرک پرچم	ساده	ساده
رنگ کرک پرچم	سفید	سفید
شکل کلاله	مورب	مورب
طول خامه(mm)	۱/۹	۱/۸۶
طول برگ(cm)	۹-۴۵	۴۲- ۸/۵
عرض برگ(cm)	۵-۳/۱۰	۹/۱ -۲/۷
رنگ ساقه	خاکستری	خاکستری
شکل ساقه	راست شیاردار	راست شیاردار
رنگ گل	زرد	زرد
طول کرک ساقه(mm)	۰/۳۸	۰/۴۴
طول دمگل(mm)	۶/۸	۶/۵
رنگ بذر	سیاه	سیاه
شکل بذر	نامتقارن	نامتقارن
طول بذر(mm)	۱/۰۳	۰/۸
تعداد بذر در هر میوه	۵۳	۴۰
وزن بذر(g)	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
تمکن تخمدان	محوری دوخانه	محوری دوخانه
نوع ریشه	راست	راست
طول ریشه	۲۵	۳۳
تعداد ریشه های فرعی	۱۰	۴
تراکم کرک برگ(سطح زبرین)	D_1	D_1
تراکم کرک برگ(سطح زیرین)	D_2	D_2

تراکم کرک میوه	S_3	S_3
تراکم کرک ساقه	S_1	S_1
تراکم کرک کاسبرگ	D_2	D_2
تراکم کرک گلبرگ(سطح خارجی)	S_2	S_2
تراکم کرک گلبرگ(سطح داخلی)	G	G
وزن خشک(g)	۴۶۱	۴۱۸
تراکم کرک شاخه	S_2	S_2

صاف =G ,پراکندگی زیاد =S_3 ,پراکندگی متوسط =S_2 ,پراکندگی کم =S_1 ,کم تراکم =D_3 ,تراکم متوسط =D_2 ,بسیار متراکم =D_1

(m_1-m_2) تفاضل میانگین صفات مورد بررسی در دو جمعیت گیاهی مورد نظر می باشد که هر چه قدر مطلق مقدار عددی آن از هر یک از اعداد زیر سطوح اطمینان بیشتر باشد تفاوت بین دو جمعیت گیاهی بارزتر است در غیر این صورت شباهت دو جمعیت به هم بیشتر است. با توجه به جدول ۳-۱۲- از بین صفات مورد اختلاف در دو جمعیت گیاهان مورد نظر، تفاوت در صفاتی مانند طول میوه، طول کاسبرگ، طول خامه، طول دمگل، طول بذر، کرک برگ و کرک میوه در هیچ سطح اطمینانی معنی دار نشدند. صفت طول پرچم در سطح اطمینان ۹۰٪ معنی دار شد یعنی ۵٪ > P. .صفات طول گل آذین، تعداد بذر در هر میوه و وزن خشک و قطر گل در سطح ۹۵٪ معنی دار شدند. صفات طول گیاه و طول کرک ساقه در سطح ۹۹٪ معنی دار شدند یعنی ۵٪ > P. صفات طول ریشه و تعداد ریشه فرعی در سطح ۹۹/۹٪ معنی دار شدند یعنی ۱٪ > P.

۴. نتیجه‌گیری

بررسی اثر فلزات سنگین بر ویژگیهای مورفولوژیکی گونه *Verbascum speciosum*، نشان داد که گونه متعلق به رگه معدنی و همین گونه متعلق به منطقه شاهد در ۱۸ ویژگی با هم متفاوت شدندکه عبارتند از طول گیاه، طول گل آذین، طول میوه، عرض میوه، قطر گل، طول پرچم، طول کاسبرگ، طول کرک میوه، طول خامه، طول برگ، عرض برگ، طول کرک ساقه، طول دمگل، طول بذر، تعداد بذر در هر میوه، طول ریشه، تعداد ریشه های فرعی و وزن خشک. به طور کلی در اکثر ویژگیها گیاه متعلق به منطقه رگه معدنی اندازه ها و مقادیر بیشتری را نشان داد که ممکن است در اثر تداخل اثرات فلز مس و عوامل دیگر موجود در خاک مانند قیرهای طبیعی سبب ایجاد چنین حالاتی در گیاه شده باشد. اما طول ریشه در گیاه متعلق به رگه معدنی کمتر از طول ریشه گیاه شاهد بود. تعداد ریشه های فرعی در گیاه متعلق به رگه معدنی نیز بیشتر از گیاه شاهد بود که این به دلیل وفور مس در خاک می باشد که از طویل شدن ریشه جلوگیری کرده و تعداد ریشه های فرعی را افزایش داده است و این موضوع، نظر Marschner (۱۹۸۸) و احمدی (۱۳۸۳) مبنی بر این که فراوانی بیش از حد مس در خاک را سبب افزایش ریشه های فرعی می گردد و از طرفی هم از طویل شدن ریشه جلوگیری می کند را تأیید می نماید.

منابع

۱. -ابراهیم زاده طاران، ا. ۱۳۶۸. انتشار فلزات سنگین در آب و خاک و گیاهان مزارع جنوب زنجان. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم بهداشتی. دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۱۲۳ ص.

۲. -احمدی، ع.، احسان زاده، پ. و جباری، ف. ۱۳۸۳ . مقدمه ای بر فیزیولوژی گیاهی(جلد اول)(ترجمه). مؤلف: هاپکینز. انتشارات دانشگاه تهران. ص ۱۶۹- ۱۵۸ .
- براتي، م. ۱۳۸۱. مطالعه بافتي و كاني شناسي (مينرالوژي)كانسار آهن همه كسي. گزارش نهايي طرح پژوهشي.دانشگاه بوعلي سينا همدان .گروه زمين شناسي. ۱۱۴ص.
- بنیادی مغوان. ح. ۱۳۸۳. بررسی ساز و کارهای تحمل سمیت مس در چند گونه زراعی و وحشی. پایان نامه کارشناسی ارشد زیست گیاهی. دانشگاه تبریز. ۹۲ ص.
۳. -حسني پاک، الف. ۱۳۷۳. اصول اکتشافات ژئوشيميايي. انتشارات دانشگاه تهران. ۶۱۵ ص.
۴. -زرگري، ع. ۱۳۷۵. گیاهان دارويي. جلد سوم . مؤسسه چاپ و انتشارات دانشگاه تهران. ۹۲۵ ص.
- عطری، م. ۱۳۸۴. اکولوژی پوشش های گیاهی (جزوه درسی). برگرفته ازکتاب Ecologie do la vegetation terrestre. 1984. مؤلف: میشل گودرون. ص ۸۷ و ۸۸.
۵. -مظفریان، و. ۱۳۷۹. اصول رده بندی گیاهان. مؤسسه انتشارات امیر کبیر. تهران. جلد دوم. ۱۲۵ ص.
6. Kolkovski S., Tandler A. and Izquierdo M.S. 1997. Effects of love food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for Seabass *(Dicentrarchus labrax*) larvae. Aquaculture, 148(1): 313-322.
7. Arianoutsou, M., Rundel, P. W., & Berry, W. L. 1993. Serpentin endemics as biological Indicators of soil elemental concentration In: Plants as biomanitors B. Market (ed). VCH Weinheim, New York, 179- 189.
8. Baker,A. J. M. 1981. Accumulators and excluders strategies in the response of plants to heavy metales. Journal of plant nutrition. New York, Vol. 3, 1- 4
9. Brooks, R. R. 1998. Plants that hyperaccumulate heavy metals. CAB international , New york. P 380.
10. Brune, A., Urbach, W., Dietz, K. J. 1994. Compartmentation and transport of Zinc in Barley primary leaves as basic mechanisms involved in Zinc tolerance. Plant cell invironment . Vol. 17, pp.153- 162.
11. Gadd, G. M. 1993. Intraction of fungi with toxic metals.New phytologist. Vol. 124, pp.25- 60.
12. Gadd, G. M. 2001. Accumulation and transformation of metals in biotechnology. Wiley VCHvarlag Gmblt, New york, pp.225- 264.
13. Kabata- Pendias, Alina. 2001. Trace elements in soils and plants. p.413
14. Lasat, M. M., 2000. Phytoextraction of Metals from contaminated soil: A review of Plant/soil/Metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. Journal of Hazardous Substance Research. Vol. 2, pp. 1-5.
15. Levinson, A. A., 1974. Introduction of Exploration Geochemistry . Calgary: applied Publishing company. p. 608.
16. Loeffler, Miriam L. Klamper, J. Freeman, J. Pilon-Smits, E. A. 2005. Selenium hyperaccumulation protects Astragalus bisulcatus and Stanley pinnata from herbivory in the field. American Society of Plant Biology. Colorado State University; Department of Biology.
17. Macfie, S. M. & Taylor, G. J. 1992. The effect of excess manganese on Photosyntheticrate and concentration of chlorophyll in Triticum aestivum grown in solution culture. Plant Physiology. Vol. 85, pp. 467- 475.
18. Marschner, H. 1988. Mineral nutrition of higher plants. Academic press London. p. 674.
19. Mirghaffari, N. 2005. Lead concentration in some natural plant species around Irankouh lead and zinc mine in Isfahan. Iranian Journal of Natural Resources.. Vol. 58, p. 635.
20. Narasima vara,majeti. 2001. Metal in the invironment: Analysis by biodiversity. p. 487.
21. Nimis, P.L., Scheidegger, C.,Wolseley,A. P., 2002. Monitoring with Lichens. NATO science series.
22. Pernas M, Sanchez-Monge R, Salcedo G. 2000. Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut. FEBS Lett Vol.467, pp. 206–210
23. Prasad, M. N. V. 2004. Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems. Published by: Springer. p. 462.
24. Rechinger, K.H., 1963-1988 . Flora Iranica, 1-171 - Akademisch Druck- U. Verlagsanstalt, Gruz. Austria.
25. Say, R. Denizli, A. Arolca, M. Y. 2000. Biosorption of cadmium, Lead and copper with the filamentous fungus phanerochaete Chrysosporium. Bioresouce technology.. Vol. 76, pp. 67-70.
26. Sottnikova, A., Lunackova, L., Masarovicova, E., Lux, A., Stresko, V., 2003. Change in the rooting and growth of poplars induced by Cadmium. Bio. Plantarum.Vol. 46, pp. 129-131.
27. Tarker AU, Camper ND, Gurel E. 2001. In vitro culture of common mullein (Verbascum thapsus L.). In Vitro Cell Dev Biol-Plant, Vol.37, pp: 40-43.

Evaluation of water use efficiency in rapeseed cultivar 401 in different levels of irrigation water and nitrogen fertilizer

Abolamir Yousefi[1*]; Mehdi Sadeghi[1]

1and 2- Health and Organic Products Production Technology Research Center, Dezful Branch, Islamic Azad University, Dezful, Iran

** Email: Abdolamiryousefi@yahoo.com*

Abstract

Overcome water shortage, management and saving of agricultural water consumption is essential. Productivity of water and fertilizer consumption in agriculture is one of the most important issues that should always be considered in agricultural planning. This factorial experiment was performed in a randomized complete block design with 3 replications in a silty soil. In this study, four different levels of irrigation water including 100 (control treatment), 80, 60 and 40% of irrigation water requirements and three different levels of nitrogen fertilizer including 200, 150 and 100 kg / ha of pure nitrogen were considered as experimental treatments. In terms of nitrogen fertilizer treatments, the highest yield related to N200 treatment with a rate of 3.12 tons per hectare, in the case of irrigation water treatments showed the highest yield related to I100 treatment with a rate of 2.98 tons per hectare. At the end, I40 treatment was 1.62 tons per hectare. While the maximum water use efficiency related to the interaction of fertilizer and irrigation related to I80 N150 treatment was 0.69.

Keywords: Rapeseed, irrigation need, nitrogen

بررسی عملکرد راندمان مصرف آب در کلزا رقم ۴۰۱ در سطوح مختلف آب آبیاری و کود نیتروژن

عبدالامیر یوسفی *[۱] ،- مهدی صادقی[۲]

۱و ۲- مرکز تحقیقات فناوری تولید محصولات سالم و ارگانیک، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران

Email: Abdolamiryousefi@yahoo.com

چکیده

برای غلبه بر کمبود آب، مدیریت و صرفه جویی در مصرف آب کشاورزی ضروری است. بهره‌وری مصرف آب و کود در کشاورزی یکی از موضوعات بسیار مهمی است که در همواره باید در برنامه ریزی های کشاورزی مورد توجه قرار گیرد. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار در در یک خاک سیلتی اجرا گردید. در این تحقیق، چهار سطح مختلف آب آبیاری شامل ۱۰۰ (تیمار شاهد)، ۸۰، ۶۰ و ۴۰ درصد نیاز آب آبیاری و سه سطح مختلف کود نیتروژن شامل ۲۰۰، ۱۵۰ و ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن خالص به عنوان تیمارهای آزمایشی در نظر گرفته شد. از نظر تیمارهای کود ازت، بیشترین عملکرد مربوط به تیمار N_{200} با میزان ۳/۱۲ تن در هکتار ، در مورد تیمارهای آب آبیاری بیشترین عملکرد مربوط به تیمار I_{100} با میزان ۲/۹۸ تن در هکتار را نشان داد. در انتها نیز تیمار I_{40} با میزان ۱/۶۲ تن در هکتار قرار داشت. در حالیکه حداکثر راندمان مصرف آب مربوط به اثر متقابل کود و آبیاری مربوط به تیمار I_{80} N_{150} به مقدار ۰/۶۹ بدست آمد.

واژگان کلیدی: کلزا، نیاز آبیاری، نیتروژن

۱.مقدمه

یکی از شاخص هایی که برای ارزیابی مدیریت آبیاری مورد استفاده قرار می گیرد، کارایی مصرف آب میباشد. کارایی مصرف آب، محصول تولید شده به ازای تبخیرو تعرق صورت گرفته است. با توجه به خطر کمبود آب در دنیا امروزه کارایی مصرف آب اهمیت زیادی یافته است. دانشمندان به دنبال راه هایی هستند که آن را بهبود بخشند یا سیستم کشت را به صورتی تغییر دهند که به صورت بهینه ازآب استفاده شود (دهشیری و همکاران، ۱۳۸۰). آب و حاصلخیزی خاک در تولید محصولات کشاورزی نقش بنیادین دارند و کمیت و کیفیت محصول وابستگی زیادی به آنها دارند. وجود میزان کافی از عناصر غذایی در خاک از شمار مهمترین شاخص‌های حاصلخیزی خاک است. هر عنصر غذایی اثری مستقیم و مستقل در رشد گیاه دارد ولی این اثر تحت تاثیر آب، کم و زیاد می‌شود. از آنجایی که درجهان، بخش کشاورزی با مصرف بیش از ۹۰ درصد از منابع آب، عمده‌ترین مصرف کننده آب بشمار می‌آید، هرگونه صرفه‌جویی در این بخش کمک مؤثری به صرفه‌جویی در مصرف منابع آب تلقی می‌شود. نیتروژن به عنوان یک ماده حاصلخیز کننده، نقش چشمگیری را در تولید فراورده‌های کشاورزی ایفا می‌نماید. گزینش صحیح مقدار کود حاوی این عنصر برای رسیدن به بالاترین سطح تولید الزامی است. پیامد استفاده کافی و به هنگام نیتروژن، نه تنها بیشترین درآمد را تولید، بلکه از تجمع زیاد نیترات در نیمرخ خاک نیز جلوگیری می‌نماید و تلفات آبشویی را به کمترین اندازه ممکن رسانده و در نهایت مانع از آلوده شدن آبهای زیرزمینی می‌شود. نورالـه خـان و همکـاران (۲۰۰۲) بررسـ ی اثـر سـطوح

نیتروژن (صفر، ۴۰ ،۸۰ و ۱۲۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار) و سولفور صفر تا ۹۰ کیلوگرم در هکتار اظهار نمودند که اثر نیتروژن روی تعداد شاخه، تعداد غلاف، وزن هزار دانه و عملکرد دانه مثبت بود. در آزمایش اسلام و همکاران (۲۰۰۵) بر روی خصوصیات گیاه کلزا ملاحظه شد که به کارگیری ۴۰۰ کیلوگرم در هکتار کود نیتروژن در مقایسه با ۲۰۰ کیلوگرم کود نیتروژن در هکتار، باعث کاهش در تعداد غلاف در مترمربع، تعـ داد دانه در غلاف، وزن خشک دانه ها و کاهش درصد روغن دانه شد . طاهرخانی و همکاران (۲۰۰۶) در یک آزمایش تیمارهای کودی نیتروژن عملکرد کلزا نشان دادند که منابع کودی اوره و نیترات آمونیوم در مقایسه با سایر منابع کودی در افزایش عملکرد دانه مؤثرتر بودند. در تحقیق آنها بالاترین عملکرد دانه کلزا با مصرف ۲۴۰ کیلوگرم کود نیتروژن در هکتار حاصل گردید و با کاهش مصرف میزان نیتروژن، عملکرد دانه به طور معنی داری کاهش یافت.

هدف از این تحقیق مطالعه اثرات سطوح مختلف آب آبیاری و کود نیتروژن بر عملکرد کارایی مصرف آب آبیاری در کلزا رقم هایولا ۴۰۱ در منطقه کشاورزی دزفول در شمال خوزستان می‌باشد.

۲.مواد و روش‌ها

این تحقیق به منظور مطالعه اثرات سطوح مختلف آب آبیاری و کود نیتروژن بر کارایی مصرف آب آبیاری هایولا ۴۰۱ در شمال خوزستان انجام گردید. این طرح به صورت اسپلیت فاکتوریل بر پایه بلوکهای کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. به همین منظور فاکتورهای آزمایش شامل تیمارهای آبیاری (۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ درصد نیاز آبی گیاه) به عنوان کرت اصلی و سطوح مختلف کود نیتروژن (۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ کیلوگرم نیتروژن خالص) به عنوان فاکتور دوم در کرتهای فرعی بود. بنابراین کل قطعات آزمایشی ۴۸ عدد بود. ابعاد هر پلات به صورت ۴ * ۵ متری (۲۰ متر مربع) در نظر گرفته شد. فاصله بین بوته‌ها روی هر ردیف حدود ۱۰ تا ۱۵ سانتیمتر و جهت جلوگیری از نشت رطوبت، فاصله بین کرتها ۲ و فاصله بین تکرارها ۴ متر در نظر گرفته شد. کارآیی مصرف آب آبیاری(بر حسب کیلوگرم بر متر مکعب) از تقسیم عملکرد دانه به حجم آب مصرفی برای هر تیمار محاسبه شد. حجم آب مصرفی در هر کرت با استفاده از کنتور حجمی اندازه گیری شد. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SAS انجام گرفت. برای مقایسه میانگین داده ها از آزمون دانکن و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده گردید.

۳. نتایج و بحث

نتایج مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف کود ازت و آب آبیاری بر کارایی مصرف آب در جدول ۱ ارائه شده است نتایج این جدول نشان می‌دهد که بین تیمارهای آزمایشی از نظر عملکرد دانه و کارایی مصرف آب آبیاری در سطح احتمال یک درصد معنی دار شد در حالیکه بر مقدار روغن اثر معنی داری مشاهده نگردید. بیشترین عملکرد مربوط به تیمار N_{200} با میزان ۳/۱۲ تن در هکتار و بعد از آن تیمار N_{150} با میزان ۲/۹۸ تن در هکتار که البته اختلاف کمی با تیمار N_{100} را نشان می دهد و از نظر آماری اختلاف معنی داری بین این دو سطح در عملکرد دانه مشاهده نگردید. با افزایش مقدار کود مصرفی کارایی مصرف آب نیز افزایش یافت بطوریکه حداکثر کارایی مصرف آب مربوط به تیمار N_{200} بود. نوریانی (۱۳۹۴) در آزمایشی چهار سطح کود نیترژن (صفر، ۸۰ ،۱۶۰ و ۲۴۰ کیلوگرم در هکتار) از منبع کود اوره به عنوان فاکتور اصلی و دو رقم کلزا ها یولا ۳۰۸ و هایولا ۴۰۱ به عنوان فاکتور فرعی در نظر گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین تعداد غلاف در بوته و تعداد دانه در غلاف متعلق به سطح کودی ۲۴۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار بود. بیشترین درصد روغن به سطح کودی صفر کیلوگرم نیتروژن در هکتار تعلق داشت. نتایج تحقیقات دیگر محققان نیز مؤید این مطلب است که افزایش مصرف نیتروژن باعث افزایش تعداد غلاف در بوته و تعداد دانه در غلاف شده که این امر منجر به افزایش عملکرد دانه در واحد سطح میگردد (کاظمی و همکاران ۲۰۱۰)

نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل سطوح مختلف آب آبیاری و کود ازت بر عملکرد دانه، مقدار روغن و کارایی مصرف آب را نشان می دهد.در جدول ۲ ارائه شده است. با افزایش مقدار کود ازت کارایی مصرف آب افزایش یافته و حداکثر کارایی مصرف آب آبیاری از تیمار I_{80} N_{150} به مقدار ۰/۶۹ بدست آمد. صادق دوست (۱۳۹۲) نشان دادن با افزایش قابلیت دسترسی عناصر غذایی در طی دوره رشد، کارآیی مصرف کود، عملکرد دانه و در نتیجه کارآیی مصرف آب بیشتر می شود. همچنین دانشمند و همکاران (۱۳۸۶) نشان دادند با افزایش مصرف کود نیتروژن و افزایش میزان رطوبت خاک، کارایی مصرف آب دانه و ماده خشک کل افزایش می یابد.

جدول ۱: مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف کود ازت و سطح آب آبیاری بر خصوصیات عملکردی کلزا

سطح کود مصرفی (کیلوگرم در هکتار)	**۰**	**۱۰۰**	**۱۵۰**	**۲۰۰**	**اختلاف آماری**
کارایی مصرف آب آبیاری	۰/۴۵c	۰/۶۶b	۰/۷۱a	۰/۷۲a	P≤0.01
درصد روغن	۴۰/۱a	۳۹/۴a	۴۲/۳a	۴۰/۹a	ns
عملکرد کل دانه (تن در هکتار)	۰/۷۲c	۲/۴۱b	۲/۹۸a	۳/۱۲a	P≤0.01
سطح آب آبیاری	**۱۰۰٪**	**۸۰٪**	**۶۰٪**	**۴۰٪**	
کارایی مصرف آب آبیاری	c۰/۳۳	b۰/۳۷	a۰/۵۵	a۰/۷۸	P≤0.01
درصد روغن	a۳۸/۱	a۳۷/۱	a۳۸/۹	a۳۹/۱	ns
عملکرد کل دانه (تن در هکتار)	c۱/۶۲	b۲/۲۵	a۲/۶۵	a۲/۹۸	P≤0.01

جدول۲: اثر متقابل آب آبیاری و کود ازت بر عملکرد و اجزا عملکرد کلزا

تیمار	کارایی مصرف آب آبیاری		عملکرد دانه (تن در هکتار)
I_{40} N_0	d۰/۳۳	a۳۸/۸	d۱/۳۱
I_{40} N_{100}	bc۰/۳۷	a۳۷/۷	c۲/۰۹
I_{40} N_{150}	b۰/۴۲	a۴۰/۲	b۲/۳۷
I_{40} N_{200}	b۰/۴۳	a۳۹/۶	b۲/۴
I_{60} N_0	b۰/۳۸	a۴۰/۱	d۱/۵۶
I_{60} N_{100}	bc۰/۳۹	a۴۱/۳	c۲/۳۳
I_{60} N_{150}	b۰/۴۰	a۴۰/۲	b۲/۶۲
I_{60} N_{200}	b۰/۴۲	a۳۹/۶	b۲/۶۹
I_{80} N_0	b۰/۴۱	a۳۸	bd۱/۷۶
I_{80} N_{100}	a۰/۶۶	a۳۸/۸	b۲/۵۳
I_{80} N_{150}	a۰/۶۹	a۳۹/۷	b۲/۸۲
I_{80} N_{200}	a۰/۶۷	a۴۱/۱	a۲/۸۵
I_{100} N_0	۰/۴۴	a۴۰/۴	a۱/۹۲
I_{100} N_{100}	a۰/۶۹	a۴۱/۳	ab۲/۷
I_{100} N_{150}	a۰/۶۳	a۴۰/۹	a۲/۹۸
I_{100} N_{200}	a۰/۶۶	a۴۰/۸	a۳/۰۱
مقایسه آماری	P≤0.01	Ns	P≤0.01

۴. نتیجه‌گیری

بیشـــترین عملکرد مربوط به تیمار N_{200} با میزان ۳/۱۲ تن در هکتار و بعد از آن تیمار N_{150} با میزان ۲/۹۸ تن در هکتار که البته اختلاف کمی با تیمار N_{100} را نشـــان می دهد و از نظر آماری اختلاف معنی داری بین این دو ســـطح در عملکرد دانه مشاهده نگردید. همچنین با افزایش مصرف کود ازته کارایی مصرف آب افزایش یافت.

منابع

۱. دانشـمند، ع.، و شـیرانی راد، ا.، و نورمحمدی، ق.، و زارعی، ق.، و دانشـیان، ج. (۱۳۸۶). تعیین کارایی مصـرف آب و تجمع و جذب نیتروژن در دو رقم کلزا. علوم کشاورزی, ۱۳(۲ (ویژه نامه)), ۴۷۳-۴۸۹.

۲. دهشیری، ع. م. ر. احمدی و ز. طهماسبی سروستانی ۱۳۸۰ .عملکرد ارقام کلزا به تنش آب مجله علوم کشاورزی ایران جلد 649صفحه. ۳ شماره ۳۲

۳. صـادق دوسـت، فاطمه،۱۳۹۲،کارایی مصـرف آب در جذب و انتقال نیتروژن توسـط گیاه کلزا،اولین همایش ملی بحران آب، اصفهان

4. Islam, N. and E. J. Evans. 2005. Attributes of oilseed rape (Brassica napus L.). Journal of Plant Research 88(5): 530- 534.
5. Kazemeini, S.A., M. Edalat, A. Shekoofa, and R. Hamidi. 2010. Effects of nitrogen and plant density on rapeseed (Brassica napus L.) yield and yield components in southern Iranian. Journal of Applied Science. 10(14): 1461-1465.
6. Noorullakhan, K., J. Amanullah, I. A. Ihsanullah and T. Naeem. 2002. Response of canola to nitrogen and sulfur nutrition. Asian Journal of Plant Sciences 34: 127-133
7. Taherkhani, M., A. Golchin and G. A. Noormohammadi. 2006. Evaluate the efficiency and effectiveness of different levels of sulfur coated urea and other nitrogen fertilizers yield and quality of canola. Agriculture Science 11(2): 179-191

Investigation of performance components of new lines of blue-eyed beans in northern Khuzestan

Abolamir Yousefi[1*]; Mehdi Sadeghi[1]

1and 2- Health and Organic Products Production Technology Research Center, Dezful Branch, Islamic Azad University, Dezful, Iran

** Email: Abdolamiryousefi@yahoo.com*

Abstract

Adaptation of cultivars to different environmental conditions is one of the most important issues in breeding programs. In order to compare the yield and yield components of new lines of blue-eyed beans in northern Khuzestan, an experiment with 20 genotypes was conducted in a randomized complete block design with three replications in Shamsabad, Dezful in 1399. Each plot consisted of 2 planting lines at intervals of 75 cm and a length of six meters. The area of each plot was 9 square meters. Sowing the seeds of the first of August was done manually, one row on each stack and at a distance of 20 cm on the line. Irrigation, weed control, pests and diseases were based on the needs of the plant and the field. For the final harvest and measurement and sampling from the middle of each plot with an area of two square meters was used and based on the relevant measurements, the following traits were measured. The results showed that the effect of genotypes on plant height, pod length, number of seeds per pod, number of seeds per pod and 100-seed weight were significant at the level of 1% probability.

Keywords: Beans, line, yield

بررسی اجزای عملکرد لاین های جدید لوبیا چشم بلبلی در شمال خوزستان

عبدالامیر یوسفی *[۱]، - مهدی صادقی[۲]

۱و ۲- مرکز تحقیقات فناوری تولید محصولات سالم و ارگانیک، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران

Email: Abdolamiryousefi@yahoo.com

چکیده

سازگاری ارقام به شرایط متفاوت محیطی از مهمترین مسائلی است که در برنامه های به نژادی مورد توجه به نژادگران می‌باشد. به منظور بررسی مقایسه عملکرد و اجزای عملکرد لاین های جدید لوبیا چشم بلبلی در شمال خوزستان آزمایشی با ۲۰ ژنوتیپ در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار در شمس آباد دزفول در سال ۱۳۹۹ اجرا شد. هر کرت شامل ۲ خط کاشت به فواصل ۷۵ سانتیمتر و به طول شش متر، بود مساحت هر کرت ۹ متر مربع بود. کاشت بذور اول مرداد به صورت دستی، یک ردیف روی هر پشته و به فاصله ۲۰ سانتیمتر روی خط انجام شد. آبیاری، مبارزه با علف‌های هرز و آفات و بیماری‌هابر اساس نیاز گیاه و مزرعه صورت گرفت. برای برداشت نهایی و اندازه گیری و نمونه برداری از وسط هر کرت به مساحت دو متر مربع استفاده شد و بر اساس اندازه‌گیری‌های مربوطه صفات زیر مورد اندازه گیری قرار گرفت. نتایج نشان داد که اثر ژنوتیپ ها بر ارتفاع بوته، طول غلاف، تعداد دانه در غلاف، تعداد دانه در غلاف و وزن صد دانه در سطح احتمال یک درصد معنی دار بودند.

واژگان کلیدی: خط کاشت، وزن صد دانه، ارتفاع بوته

۱.مقدمه

دانه حبوبات از مهمترین منابع تامین کننده پروتئین در رژیم غذایی انسانها به شمار می آید. محتوای پروتئین حبوبات در حدود دو برابر غلات بوده که می تواند به عنوان مکمل پروتئین غلات در رژیم غذایی جای گیرد. در بین حبوبات، لوبیا از نظر سطح زیر کشت و تولید مقام اول را در جهان دارا است (دوری ، ۲۰۰۸). لوبیا را می توان یک گیاه چند منظوره محسوب نمود زیرا هم برای تازه خوری غلاف سبز آن بصورت یک سبزی و هم برای دانه و همچنین برای مصرف آن به عنوان علوفه مورد توجه کشاورزان می باشد (فری و سینگ ، ۲۰۱۲). عملکردهای ثابت در مکان‌های مختلف یا سال‌های مختلف به عنوان پایداری ذکر می‌گردد. معنی‌دار بودن اثر متقابل ژنوتیپ و محیط، ناشی از تغییر در میزان اختلاف بین ژنوتیپ‌ها در محیط‌های متفاوت و یا تغییر در رتبه‌بندی نسبی ژنوتیپ‌ها می‌باشد. معمولاً محققان از اثر متقابل ژنوتیپ و محیط به ویژه در آزمایش های مقایسه‌ای عملکرد کوتاه مدت صرف نظر کرده و پایه گزینش ژنوتیپ‌ها را فقط بر اساس متوسط عملکرد قرار می‌دهند. بنابراین به نژادگران احتیاج به یک روش کاربردی گزینش داشته که از اثر متقابل ژنوتیپ و محیط بهره‌برداری کنند (کایلا،۲۰۱۰). یکی از روش های کاهش اثرات متقابل محیط و ژنوتیپ، انتخاب ژنوتیپ های پایدار است. منظور از ژنوتیپ‌های پایدار آن دسته از ژنوتیپ‌های هستند که دارای اثرات متقابل کمتری با محیط باشند. انتخاب ژنوتیپ‌های پایدار هنگامی موفقیت‌آمیز خواهد بود که پایداری، یک صفت ژنتیکی باشد (فرشادفر، ۱۳۷۷). یکی از روش‌های کاهش اثرات متقابل محیط و ژنوتیپ، انتخاب ژنوتیپ‌های پایدار است. منظور از ژنوتیپ‌های پایدار آن دسته از ژنوتیپ‌هایی هستند که دارای اثرات متقابل کمتری با محیط باشند .انتخاب

ژنوتیپ‌های پایدار هنگامی موفقیت آمیز خواهد بود که پایداری، یک صفت ژنتیک پایداری عملکرد فنوتیپی ، یک صفت خاص و مورد علاقه ا صلاح کنندگان نبات باشد (کانگ و فام، ۲۰۱۰).
هدف از این تحقیق بررسی ۲۰ واریته گیاه لوبیا و تاثیر شرلیط محیطی بر خصوصیات رشدی گیاه بود.

۲.مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال زراعی ۱۳۹۹ در شمس آباد دزفول اجرا گردید. این منطقه با طول جغرافیایی ۴۸ درجه و ۳۲ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۲ درجه و ۲۲دقیقه شمالی و ارتفاع ۸۲ متر از سطح دریا در فاصله ۱۲۰ کیلومتری از مرکز استان، در شمال غرب خوزستان واقع شده است. آزمایش در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی در سه تکرار و با ۲۰ ژنوتیپ لوبیا چشم بلبلی انجام گردید. کودهای شیمیایی پایه بر اساس آزمون خاک شامل سوپر فسفات تریپل به میزان ۱۱۰ کیلوگرم در هکتار و کود سولفات پتاسیم به میزان ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار و کود اوره به میزان ۵۰ کیلوگرم در هکتار در مزرعه توزیع و به زیر خاک برده شد. هر کرت شامل ۲ ردیف کشت با پشته‌هایی با فاصله ۷۵ سانتی متر و طول ۶ متر و فاصله هر دو بوته روی خط کاشت ۲۰ سانتی متر در نظر گرفته شد. فواصل بین تکرارها دو متر در نظر گرفته شد. عملیات کاشت به طوری که در هر کپه ۳ بذر با دست کشت گردید و در مرحله ۴-۲ برگی نسبت به تنک کردن بوته‌ها اقدام شد. برداشت نهایی با رعایت حاشیه از خط مربوط به عملکرد نهایی به میزان سه مترمربع برداشت شد. صفات اندازه گیری شده شامل ارتفاع بوته، طول غلاف، تعداد دانه در غلاف، تعداد غلاف در بوته و وزن صد دانه بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS انجام گرفت. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون دانکن و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده گردید.

۳. نتایج و بحث

نتایج مقایسه میانگین نشان داد ژنوتیپ ها بر ارتفاع بوته، طول غلاف، تعدادغلاف در بوته، تعداد دانه در غلاف و وزن صد دانه در سطح احتمال یک درصد معنی دار بودند (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد بلندترین ارتفاع بوته مربوط به ژنوتیپ های ۶، ۷ ، ۱۸ و ۱۹ بود و کوتاهترین ارتفاع بوته با ۴۱/۶ سانتیمتر به ژنوتیپ های ۴۱۲ متعلق بودند (جدول ۲). همانطور که ملاحظه شد ارتفاع گیاه علاوه بر اینکه یک خصوصیت ژنتیکی است قویا تحت تاثیر عوامل محیطی مانند نور، درجه حرارت و عوامل مدیریتی در مزرعه می‌باشد. با توجه به نتایج آزمایشات چنین نتیجه گیری می شود که بین لاین ها از لحاظ ارتفاع بوته، اختلاف وجود دارد ضمن اینکه این اختلاف بسته به اقلیم هر منطقه متغییر می باشد. نتایج مقایسه میانگین نشان داد بیشترین طول غلاف با ۲۰/۲ سانتیمتر به ژنوتیپ ۱۰ و کمترین طول غلاف با ۷/۸ سانتیمتر به ژنوتیپ ۳ متعلق بودند (جدول ۲). مفاخری و همکاران ،۲۰۱۷ نیز گزارش کردند که صفت طول غلاف و اندازه دانه بر روی پتانسیل عملکرد لوبیا تاثیر گذار بوده و اساسا به عنوان مارکر قابل استفاده هستند. (گان و همکاران ،۲۰۱۳) نیز گزارش نمودند طول غلاف و عملکرد دانه از جمله صفاتی هستند که بیشترین درصد تنوع بین نمونه ها را توجیه می نمایند. (آلیو و ماکایند ،۲۰۱۶). .نتایج مقایسه میانگین نشان داد بیشترین تعداد غلاف در بوته با ۱۹۲ غلاف در بوته به ژنوتیپ ۱۰ و کمترین تعداد غلاف در بوته با ۱۷ غلاف در بوته به ژنوتیپ ۱۹ متعلق بودند (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین نشان داد بیشترین تعداد دانه در غلاف با ۱۳ دانه در غلاف به ژنوتیپ های ۵، ۹ و ۱۰ و کمترین تعداد دانه در غلاف با ۳ دانه در غلاف به ژنوتیپ های ۳، ۷ و۱۹ متعلق بودند (جدول ۲). از آنجایی که تعداد غلاف در بوته یکی از اجزای اصلی عملکرد دانه محسوب می‌گردد لذا با در نظر گرفتن این موضوع می‌توان از تنوع ژنتیکی موجود برای این صفت در بهبود عملکرد دانه از طریق انتخاب همبسته بهره گیری کرد. تعداد غلاف در بوته یک معیار انتخاب مفید در آزمایشات چند مکلنه با هدف انتخاب ثبات عملکرد معرفی شده است (اوماهارانت و همکاران ، ۱۹۹۷). تعداد غلاف در بوته در عملکرد دانه موثر است و هر چه تعداد این صفت افزایش یابد به طور مستقیم بر عملکرد دانه افزوده می شود. نتایج مقایسه میانگین نشان داد بیشترین تعداد دانه در غلاف با ۱۳ دانه در غلاف به

ژنوتیپ های ۵، ۹ و ۱۰ و کمترین تعداد دانه در غلاف با ۳ دانه در غلاف به ژنوتیپ های ۳، ۷ و۱۹ متعلق بودند (جدول ۲). طول غلاف بیشتر و تعداد دانه در غلاف بالاتر نشان دهنده کارایی استفاده و تخصیص منابع رشد در یک ژنوتیپ است (نخوما و همکاران ، ۲۰۲۰). مطالعات ژنتیکی در گیاه لوبیا چشم بلبلی وراثت پذیری برای تعداد بذر در غلاف را ۲۱ - ۸۲٪ گزارش نمودند. صفات تعداد غلاف در گیاه، طول غلاف، تعداد دانه در غلاف برای تشخیص تنوع ژنتیکی بسیار اهمیت دارد و منجر به طبقه بندی بهتر ژنوتیپ های لوبیا چشم بلبلی می شود .نتایج مقایسه میانگین نشان داد بیشترین وزن صد دانه مربوطبه ژنوتیپ های ۹،۶ و ۱۰ و کمترین وزن صد دانه مربوط به ژنوتیپ ۳ متعلق بودند (جدول ۲). سایز دانه (وزن صد دانه) صفتی هستند که در گیاه لوبیا چشم بلبلی مورد توجه کشاورزان و به نژادگران است. وزن بذر ارتباط مستقیمی با اندازه بذر دارد و توصیه شده است به عنوان معیار انتخاب غیر مستقیم برای به حداکثر رساندن عملکرد دانه در لوبیا چشم بلبلی استفاده شود . بر این اساس ژنوتیپ های لوبیا چشم بلبلی به سه گروه ریز دانه (وزن صد دانه زیر ۱۲ گرم)، دانه متوسط (وزن صد دانه بین۱۲- ۱۸گرم) و دانه درشت (وزن صد دانه بیش از ۱۸ گرم) تقسیم بندی می شوند. اندازه دانه به تعداد روز تا گلدهی و زمان تشکیل غلاف بستگی داشته و هر چه گلدهی و تشکیل غلاف زودتر اتفاق بیفتد اندازه دانه درشت تر است . مطالعات ژنتیکی در گیاه لوبیا چشم بلبلی وراثت پذیری برای اندازه بذر را بین ۴۸٪ تا ۹۰٪ گزارش نمودند. وراثت پذیری بالا معیار قابل اعتمادی برای پیش بینی ثبات و اثربخشی انتخاب خواهد بود. در این حالت ، اندازه دانه در بین اجزای عملکرد دانه در لوبیای چشم بلبلی پایدارترین (یعنی با تأثیر محیطی کمتر) است که می تواند به طور موثر و سیستماتیک در یک برنامه اصلاحی برای بهبود اندازه دانه و عملکرد دانه وارد شود.

جدول۱ :نتایج تجزیه واریانس اجزا عملکرد گیاه لوبیا

منابع تغییرات	درجه آزادی	ارتفاع بوته	طول غلاف	تعداد دانه در غلاف	تعداد غلاف در بوته	وزن صد دانه
تکرار	۲	۲۳/۱۴^{ns}	۳۱/۵*	۱/۱^{ns}	۵/۳**	۶/۱۲**
ژنوتیپ	۱۹	۵۱۲**	۹/۱۴**	۱۰۲**	۹/۷**	۱۹/۷۹**
خطا	۳۸	۸۹	۲/۱	۶/۷	۱/۱	۲/۴۱
CV%		۱۰/۱۴	۶/۲	۵/۹	۶/۵۷	۹/۹

جدول ۲: نتایج مقایسه میانگین های خصوصیات رشدی گیاه لوبیا

انواع ژنوتیپ	ارتفاع بونه (سانتیمتر)	طول غلاف (سانتیمتر)	تعداد غلاف در بوته	تعداد دانه در غلاف	وزن صد دانه
N1	۵۵/۴b	۱۶/۱c	۸۱f	۱۱b	۲۲/۵b
N2	۵۰/۲c	۱۴/۳d	۷۶g	۸cd	۱۷/۲f
N3	۵۴/۸b	۷/۸d	۳۰i	۳f	۱۴/۳g

N4	۴۱/۶e	۱۵/۲cd	۹۶e	۱۱b	۲۳b
N5	۵۱/۷c	۱۷/۶bc	۱۳۷d	۱۳a	۲۰/۶d
N6	۶۱a	۱۸b	۱۵۱c	۱۱b	۲۷/۲a
N7	۶۰/۸a	۱۱/۸e	۵۱gh	۳f	۱۷/۹ef
N8	۴۵/۳d	۱۴/۹cd	۸۷ef	۱۰bc	۲۰/۷c
N9	۵۱c	۱۹/۱ab	۱۷۹b	۱۳a	۲۷/۶a
N10	۵۵/۱b	۲۰/۲a	۱۹۲a	۱۳a	۲۷/۲a
N11	۴۸/۲c	۱۵/۱cd	۸۴ef	۹c	۲۲/۸b
N12	۳۹/۷e	۱۴/۹cd	۷۹f	۱۰bc	۲۲/۶b
N13	۵۶/۱b	۱۳/۶d	۴۰h	۸cd	۲۰/۸c
N14	۴۹/۸c	۱۰/۷f	۶۶g	۵e	۱۸/۵e
N15	۵۴/۳b	۱۲/۶e	۷۳fg	۸cd	۲۰/۴cd
N16	۵۱c	۱۳de	۷۹f	۹c	۲۱/۷bc
N17	۴۶/۳d	۱۴/۲d	۵۱gh	۱۰bc	۲۱/۷bc
N18	۶۲/۲a	۱۲/۹de	۶۸fg	۹c	۲۰d
N19	۶۱/۵a	۱۷/۲bc	۱۷j	۳f	۱۶/۹f
N20	۴۳/۹d	۱۴/۳d	۷۷f	۷d	۲۱/۷bc

۴. نتیجه‌گیری

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که انواع ژنوتیپ ها بر کلیه خصوصیات رشدی اندازه گیری شده در سطح احتمال یک درصد اثر معنی دار داشت. ارتفاع بوته، طول غلاف، تعدادغلاف در بوته، تعداد دانه در غلاف و وزن صد دانه در سطح احتمال یک درصد معنی دار بودند. از نظر وزن صد دانه ژنوتیپ N9 و N10 بدست آمد.

۵. منابع

۱. فرشادفر، عزت اله ، ۱۳۷۷. کاربرد ژنتیک کمی در اصلاح نباتات. چاپ اول، انتشارات طاق بستان، ۹۳۴ صفحه.
2. Dorri, H.R, 2008. Bean Agronomy. Publication Series of Research Center of Bean, Khomein. 46 PP.
3. Fery, R L , Singh , B. B , 2012. Cowpea genetics: a review of recent literature. IITA-JIRCAS, Ibadan, Nigeria.
4. Kalia, P. , Sood , S , 2010. Genetic variation and association analysis for pod yield and other agronomic and quality characters in an Indian himalyan collection of broad bean (Vicia faba L.). SABRAO Journal of Breeding and Genetics, 36(2): 55- 61.
5. Mafakheri, Kh., Bihamta, M. R. , Abbasi , A. R. 2017. Assessment of genetic diversity in cowpea (Vignaunguiculata L.) germplasm using morphological and molecular characterisation, Cogent Food and Agriculture, 3:1, 1327092
6. Gonné , S , LendzemoVenasius ,W., Laminou , A , 2013. Characterization of some traditional cowpea varieties grown by farmers in the soudano-sahelian zone of cameroon. International Journal of Agriculture and Forestry .3 (4): 170-177.
7. Aliyu O. M., Makinde B. O , 2016 , Phenotypic analysis of seed yield and yield components in cowpea (Vignaunguiculata L., Walp). Plant Breed. Biotech.
8. Umaharan, P., Ariyanayagam, R.P. , Haque, S.Q.1997. Genetic analysis of yield and its components in vegetable cowpea (Vignaunguiculata L. Walp). Euphytica. 96: 207–213.
9. Nkhoma, N., Shimelis, H., Laing, M.D.2020. Assessing the genetic diversity of cowpea [Vignaunguiculata (L.) Walp.] germplasm collections using phenotypic traits and SNP markers. BMC Genet .21: 110. https://doi.org/10.1186/s12863-020-00914-7

Background and Taxonomic Status of *Ralstonia solanacearum* The Agent of Potato Bacterial Wilt

Hossein Moradi

Higher Education Complex of Saravan

Hossmor@gmail.com

Abstract

The bacterium *Ralstonia solanacearum* is caused disease on more than a few hundred plant species belonging to more than 50 families. Its hosts is included potato, peanut, tomato, tobacco, banana and a number of other economically important shrubs and trees. This bacterium is able to attack various hosts on a global scale. This study was examined the classification situation and some of its signs on potato.

Keywords: Race, Biovar, Bacterial Wilt, *Ralstonia solanacearum*

پیشینه و موقعیت تاکسونومیکی باکتری Ralstonia solanacearum عامل بیماری پژمردگی باکتریایی سیب زمینی

حسین مرادی

مجتمع آموزش عالی سراوان

ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: (Hossmor@gmail.com)

چکیده

باکتری Ralstonia solanacearum بر روی بیش از چند صد گونه ی گیاهی متعلق به بیش از ۵۰ خانواده بیماری زا می باشد. میزبان های آن شامل سیب زمینی، بادام زمینی، گوجه فرنگی، توتون، موز و تعدادی دیگر از بوته ها و درختان مهم اقتصادی می باشد. این باکتری قادر است میزبان های مختلف در مقیاس جهانی را مورد هجمه قرار دهد. این مطالعه به بررسی موقعیت طبقه بندی و برخی علائم آن روی سیب زمینی پرداخته است.

واژگان کلیدی: نژاد، بیوار، پژمردگی باکتریایی، *رالستونیا سولاناسئاروم*

۱.مقدمه

این بیماری اولین بار در سال ۱۸۹۶ توسط Smith از ایالات متحده گزارش شده و همچنین برروی سیب زمینی، توتون، گوجه فرنگی و بادام زمینی در آسیا، آمریکای جنوبی و آمریکای شمالی نیز گزارش گردیده است(بهداد، ۱۳۸۵؛ Anonymous, 2004). برای اولین بار نام *Bacillus solanacearum* توسط Smith در سال ۱۸۹۶ به عامل آن داده شد.تغییرات ایجاد شده در نامگذاری[۳۹۹] باکتری عامل بیماری به صورت زیر می باشد (Anonymous, 2004):

Bacillus solanacearum (Smith, 1896), Pseudomonas solanacearum (Smith, 1896) Smith 1914, Burkholderia solanacearum (Smith, 1896) Yabuuchi et al. 1992, Ralstonia solanacearum (Smith, 1896) Yabuuchi et al. 1995

باکتری R. solanacearum بر روی بیش از چند صد گونه ی گیاهی متعلق به بیش از ۵۰ خانواده بیماری زا می باشد. میزبان های آن شامل سیب زمینی، بادام زمینی، گوجه فرنگی، توتون، موز و تعدادی دیگر از بوته ها و درختان مهم اقتصادی می باشد. این باکتری بالغ بر دویست میزبان در مقیاس جهانی را مورد هجمه قرار می دهد (Li *et al*, 2021). این باکتری به طور معمول خاکزاد بوده و میزبان را از طریق ریشه آلوده می کند،پس از آن به صورت سیستمیک در طول آوندهای چوبی حرکت نموده، باعث ایجاد پژمردگی شده که اغلب منجر به مرگ میزبان می شود. تعدادی از جدایه ها توسط حشرات بر روی موز منتقل می شوند و اغلب از طریق محور خوشه ی گل، میزبان را مورد حمله قرار می دهند. این باکتری بر روی رقم Bugtok (نوعی موز) در فیلیپین باعث ایجاد علایم موضعی و تغییر رنگ آوندها می شود. آلودگی های پنهان نیز برای این باکتری گزارش شده است به طوری که منبع مهمی برای انتشار آن می باشد. برای مثال انتقال غده های بذری سیب زمینی

[1]- Nomenclature

آلوده و فاقد علایم در داخل اروپا منجر به شیوع بیماری پژمردگی باکتریایی در روی سیب زمینی در اواسط دهه ۱۹۹۰ شده است. پیش از این *R. solanacearum* جزء *سودوموناس* های غیر فلورسنت طبقه بندی می شد و مدارک و مستنداتی به طور کامل آن را از *سودوموناس* های فلورسنت جدا می نمود. برای مثال این باکتری در گروه دوم همولوژی RNA ریبوزومی[۴۰۰] قرار داشت در حالی که سودوموناس های فلورسنت کننده در گروه یک همولوژی RNA ریبوزومی قرار دارند. هیبریدیزاسیون DNA- DNA نیز بین جدایه های این گروه های همولوژی صفر می باشد (Schaad *et al*, 2001).

یابوچی و همکارانش در سال ۱۹۹۲تعداد هفت گونه از گروه دوم همولوژی RNA ریبوزومی را به جنس Burkholderiaمنتقل کردند که گونه ی Pseudomonas solanacearum نیز جزء آنها بود (Yabuuchi *et al*, 1992). در گروه دوم همولوژی RNA ریبوزومی، باکتری *B. cepacia* و شاخه ی باکتری های وابسته به آن از *B.* solanacearum و *B.* pickettiiجدا شدند. این زیر شاخه ی مجزا توسط آزمایشات بعدی همچون بررسی ترادف ژن 16S rRNA نیز تأیید شد. بر اساس این یافته ها و اطلاعات کموتاکسونومی ، Yabuuchi و همکارانش در سال ۱۹۹۵ جنس Ralstonia را بنا نهادند و گونه های *B.* solanacearum ، *B.* pickettii و *B.* eutropha را به آن منتقل نمودند(Yabuuchi *et al*, 1995). از نظر Schaad گونه *R.* solanacearum به خاطر انجام تحقیقات زیاد در این زمینه پذیرفته شده است اما گونه های دیگر به تحقیقات بیشتری نیاز دارد(Schaad *et al*, 2001). با وجود تشابه در خصوصیات فیلوژنی و بیوشیمیایی، گونه های جنس Ralstonia از لحاظ بیماری زایی، ارتباطات میزبانی و دیگر خصوصیات فنوتیپی متفاوت می باشند. گونه *R.* pickettii از محیط های بیمارستانی و منابع محیطی چون محلول های درمانی تنفسی، آب دیونیزه و محلول های شوینده جدا شده و توانایی رشد بین سلولی در آمیب های آزاد جنس Acanthamoeba را دارد. به خاطر این کهpickettii *R.* از خاک و مواد گیاهی جدا شده است و از لحاظ فنوتیپی شبیه بیووار ۳ باکتری solanacearam. *R* می باشد به آن اشاره شده است. دو انگل گیاهی دیگر نیز وابسته به جنس Ralstonia می باشند. عامل بیماری سوماترا بر روی میخک که *R.* syzygii می باشد ، از لحاظ آزمون های بیوشیمیایی، آنالیز اسیدهای چرب، سرولوژی و هیبریدیزاسیون DNA مشابه *R.* solanacearum است. عامل بیماری زای بعدی *P.* celebensis می باشد که باعث ایجاد بیماری خونی[۴۰۱] در موزمی شود. این بیماری باعث پژمردگی اندام های هوایی موز شده و میوه نیز دچار تغییر رنگ به سمت قرمز می شود. این عامل نیز ارتباط نزدیکی با *R.* solanacearam دارد. ارتباط سرولوژیکی و سطوح بالای هیبریداسیون DNA- DNA بین solanacearam. *R* و *R.* syzygii وBD bacterium وجود دارد که این ارتباط بین *R* solanacearum. و *R. pickettii* نیز مشاهده می شود.مقایسه ترادف ژن 16S rRNA نشان داد که باکتری *P. syzygii* و BD bacterium به طور فیلوژنتیکی داخل ترکیب گونه ی *R.* solanacearum قرار دارند. اختلافات فنوتیپی و ژنوتیپی در گونه R solanacearam. ممکن است ناشی از تنوع زیاد میزبان های گیاهی این پاتوژن باشد. این میزبان ها در دامنه ی وسیع

۲-rRNA II homology
۳-(Blood disease bacterium (BD bacterium))

جغرافیایی و شرایط محیطی گوناگون قرار گرفته اند. براساس دامنه میزبانی، این گونه را به نژادهای مختلفی تقسیم بندی می کنند. اختلاف در فعالیت های متابولیسمی نیز باعث تقسیم بندی این گونه به بیووارهای مختلفی می شود. ارتباط مشخصی بین نژاد و بیووار وجود ندارد، اما نژاد ۳ در بیووار ۲ قرار می گیرد (Schaad *et al*, 2001). بررسی RFLP[۴۰۲] دو شاخه را برای *R .solanacearum* مشخص نمود که در داخل این دو شاخه نیز گروه هایی وجود دارد. این دو شاخه بعداً با مطالعات مربوط به ترادف ژن 16S rRNA نیز مطابقت داشت. علاوه بر این بین این دو شاخه و بیوارها نیز ارتباطی وجود دارد (جدول ۱). بیوارهای ۱ و ۲ که از لحاظ متابولیسمی تغییر کمتری دارند در شاخه II (Americanum)قرار می گیرند و بیوارهای ۳ و ۴ و۵ که از لحاظ متابولیسمی تغییر بیشتری دارند در شاخه I (Asiaticum)جای می گیرند. جدایه های این باکتری با دامنه ی وسیع میزبانی در هر دو شاخه وجود دارند (Schaad *et al*, 2001; Poussier *et al*, 2000; Thwaites *et al*, 1999).

جدول ۱:مشخصات نژادها و ارتباط شان با دیگر زیرگروه های باکتری *Ralstonia solanacearum*

شاخه RFLP	بیووار	پخش جغرافیایی	دامنه میزبان	نژاد
I	۳، ۴	آسیا و استرالیا	وسیع	۱
II	۱	آمریکا	وسیع	۱
II	۱	برزیل، فیلیپین، Caribean	موز و دیگر گونه های جنس *Musa*	۲
II	۲	جهانی	خانواده سولاناسه	۳
I	۳، ۴	آسیا	فلفل	۴
I	۵	چین	توت	۵

۱-۱-مشخصات گونه ی R. solanacearum

باکتری میله ای شکل گرم منفی به ابعاد ۰/۵ تا ۰/۷ میکرومتر در ۱/۵ تا ۲/۵ میکرومتر، اکسیداز وکاتالازمثبت، دارای اندوخته ی پلی بتاهیدروکسی بوتیرات، احیا نیترات، عدم رشد در دمای ۴۰ درجه ی سانتی گراد، عدم رشد یا رشد کم در محیط کشت حاوی ۲ درصد نمک طعام، آرژنین دی هیدرولاز منفی، هیدرولیز ژلاتین ، نشاسته و اسکولین منفی، پرگنه های غیر فلورسنت و دارای هاله قهوه ای در محیط های پیچیده می باشد و بر خلاف گونه های جنس Burkholderia، اسید های چرب سلولی گونه های جنس Ralstonia فاقد لیپیدهای ارنی تین OL-1 و OL-2 بوده و کمتر از یک درصد از اسید های چرب آن C19: Ocyclopropanoic acid می باشد. دو نوع پرگنه اغلب بر روی محیط کشت حاوی ۰/۵ دزصد گلوکز یا سوکروز مشاهده می شود. یک نوع آن روان و حاوی پلی ساکاریدهای خارج سلولی بوده، در حالی که دیگری پرگنه های خشک و فاقد پلی ساکارید خارج سلولی می باشد. تاژک آن در صورت وجود قطبی می باشد و تحرک جدایه ها بستگی به نوع پرگنه و سن کشت دارد. در محیط کشت مایع جدایه ی نوع روان دارای بیشترین درصد سلول های فعال می باشد، البته این مورد در شرایط ۱۰[۸] سلول در هر میلی لیتر محیط کشت می باشد. محیط های کشت در مرحله فاز توقف رشد باکتری دارای تعداد

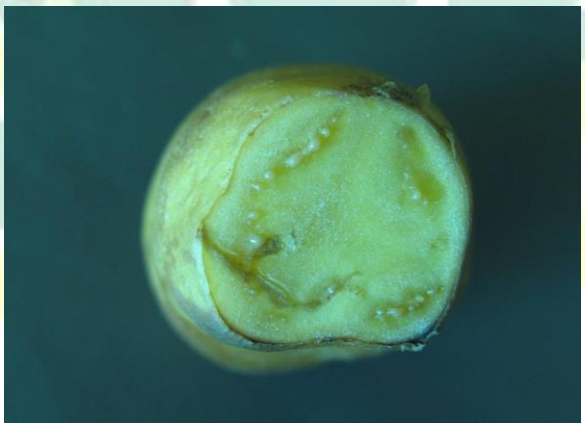
[402] Restriction fragment length polymorphism

بسیار کم از سلول های متحرک می باشد سلول هایی که باعث پژمردگی گیاهان می شوند، در آغاز غیر متحرک هستند، اما سلول های متحرک بطور معمول ۴ تا ۶ ساعت در محیط تازه ایجاد می شوند(Schaad *et al*, 2001).

۱-۲-علایم ایجاد شده روی سیب زمینی

علایم قسمت های هوایی شامل پژمردگی سریع برگ ها و ساقه بوده که به طور معمول در ساعات گرم روز قابل مشاهده است. به تدریج گیاهان زرد و قهوه ای از بین می روند. هنگام توسعه ی بیماری ممکن است یک سری خطوط قهوه ای در بالای سطح خاک بر روی ساقه مشاهده شود و برگ ها نیز ممکن است دارای رنگ برنزه شوند. روخمشی برگچه ها ممکن است ایجاد شود و هنگامی که ساقه شکسته یا بریده می شود، توده ی سفید رنگ لعاب دار باکتری از محل دستجات آوندی خارج می شود. چنانچه ساقه ی بریده شده در آب قرار گیرد این توده به صورت نخ مانند در آب پخش می شود. این حالت نخی شکل برای هیچ کدام از باکتری های انگل سیب زمینی تشکیل نمی شود. این روش از کارهای تشخیص بیماری در مزرعه می باشد. در تحت شرایط خنک، پژمردگی و دیگر علایم ظاهری ممکن است ایجاد نشوند. ایجاد علایم خارجی روی غده وابسته به مرحله ی توسعه ی آلودگی بوده، ممکن است علایم خارجی مشهود باشند یا نباشند. علایم این باکتری ممکن است با پوسیدگی حلقوی حاصل از باکتری *C. michinganensis subsp. sepedonicus* اشتباه شود.باکتری *R. solanacearum* می تواند از روی ترشحات باکتریایی که گاهی از محل چشم های غده یا محل اتصال استولون به غده بیرون می زند و یا چسبیدن خاک مزرعه به چشم های غده های سیب زمینی قابل تشخیص باشد (مرادی، ۱۳۹۵). با برش غده های سیب زمینی، حلقه ی آوندی قهوه ای و نکروز شده نمایان می شود. دقایقی پس از برش غده در محل آوند ها ، ترشحات آبکی ، لزج و لعاب دار باکتری خارج می شود (شکل ۱). حتی اگر در محل این حلقه به سیب زمینی فشار وارد نیاید، ترشحات باکتری از آن خارج می شود(Anonymous, 2004).

شکل ۱: خروج ترشحات باکتریایی از محل برش غده سیب زمینی



منابع

۱- بهداد، ا. ۱۳۸۵. فیتوپاتولوژی وبیماری های مهم گیاهی ایران. انتشارات عطر عترت. صفحه ۳۱۹-۳۱۷.
۲- مرادی، حسین. (۱۳۹۵). استفاده از نشانگر مولکولی rep-PCR در بررسی تنوع ژنتیکی باکتری *Ralstonia solanacearum* مولد پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی در استان کرمان. دوفصلنامه فن آوری زیستی در کشاورزی(علمی-پژوهشی)، ۷(۲)، ۵۳-۵۸.
3- Anonymous. 2004. *Ralstonia solanacearum*. Bull. OEPP/EPPO Bull. 34:173-178.

4- Li, M., Pommier, T., Yin, Y., Wang, J., Gu, S., Jousset, A., and Kowalchuk, G. A. (2021). Indirect reduction of *Ralstonia solanacearum* via pathogen helper inhibition. *The ISME Journal*, 1-8.
5- Poussier, S., Trigalet-Demery, D., Vandewalle, P., Goffinet, B., Luisetti, J., and Trigalet, A. 2000. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region, AFLP and 16s rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. Microbiology 146:1679-1692.
6- Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W., eds. 2001. Gram negative bacteria (*Ralstonia*). Pages 151-174 in: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
7- Thwaites, R., Mansfield, J., Eden-Green, S., and Seal, S. 1999. RAPD and rep-PCR-based fingerprinting of vascular bacterial pathogens of *Musa* spp. Plant Pathol. 48:121-128.
8- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., and Arakawa, M. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni & Holmes, 1981) comb. nov. Microbiol. Immunol. 36:1251-1275.
Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H., and Nishiuchi, Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia picketii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. Microbiol. Immunol. 39:897-904.

A review of biosystematic studies of several species of *Tamarix* in Iran

* Mozhgan Veisi[1], Masoud Sheidai[2], Fahimeh Koohdar[3]

1_Study Master of Systematic Plant Ecology, Shahid Beheshti University

2_ Professor, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University

3_ Assistant Professor, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University

*Corresponding Author Email address: mozhgan_veisi@yahoo.com

Abstract

The genus Tamarix is the largest genus of the genus Tamaricaceae, a plant and shrub or 54 to 90 species.

The natural geographical distribution of this genus is in southern Europe, North Africa, Central Asia, India, Pakistan and China. In the United States and Australia, these plants are invasive. They are found in arid and desert areas, along rivers, and in temperate and coastal areas.

With their deep roots, they are able to absorb large amounts of water and salt from the soil. These plants have medicinal properties (in the treatment of malaria, skin and eye diseases) and economic value (wood industry) and are used to stabilize the soil and prevent soil erosion. The species of this genus are also rich in polyphenols and antioxidants.

In this study, 10 species of the genus Tamarix were studied descriptively, morphologically and molecularly, and using statistical analysis of PCA biplot, UPGMA, PCOA, PCA, species boundaries, affinity and gene flow were examined. Morphological and molecular studies with SCoT markers showed the species boundary and species proximity. Also in the present study, descriptive studies were able to separate the boundary between the 5 species well.

Keywords: Analysis, Molecular marker, Morphology, Anatomy, Species

مروری بر مطالعات بیوسیستماتیکی چند گونه گز وحشی ایران

*مژگان ویسی[۱]، مسعود شیدایی[۲]، فهیمه کوه دار[۳]

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد سیستماتیک اکولوژی گیاهی دانشگاه شهید بهشتی

۲-استاد دانشکده علوم زیستی و بیوتکنولوژی دانشگاه شهید بهشتی

۳-استادیار دانشکده علوم زیستی و بیوتکنولوژی دانشگاه شهید بهشتی

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: *mozhgan_veisi@yahoo.com*

چکیده

سرده *Tamarix* گیاهان درختی و درختچه ای یا ۵۴ تا ۹۰ گونه بزرگترین سرده از تیره ی Tamaricaceae است.

پراکندگی جغرافیایی طبیعی این سرده در جنوب اروپا، شمال آفریقا، آسیای مرکزی، هند، پاکستان و چین است. در آمریکا واسترالیا این گیاهان مهاجم می باشند. در نواحی خشک و بیابانی، کنار رودخانه ها و در نواحی معتدل و ساحلی گسترش یافته اند. با ریشه های عمیق خود قابلیت جذب مقدار فراوانی آب و نمک از خاک را دارا می باشند. این گیاهان دارای خواص دارویی (دردرمان مالاریا، بیماریهای پوستی و چشم) و ارزش اقتصادی (صنایع چوب) هستند و در تثبیت خاک و جلوگیری از فرسایش خاک کاربرد دارند. هم چنین گونه های این سرده غنی از ترکیبات پلی فنول و آنتی اکسیدان هستند.

در این پژوهش ۱۰ گونه از سرده *Tamarix* از نظر تشریحی و ریخت شناسی و مولکولی بررسی شدند و با استفاده از آنالیزهای آماری PCA biplot ، UPGMA ، PCOA، PCA مرز گونه ها، قرابت و جریان ژنی مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات ریختی و مولکولی با نشانگر SCoT مرز گونه ها و قرابت گونه ها را نشان داده شد، هم‌چنین در مطالعه حاضر مطالعات تشریحی توانست مرز بین ۵ گونه را به خوبی از هم جدا کند.

واژگان کلیدی: آنالیز، نشانگر مولکولی، ریخت شناسی، تشریحی، گونه

۱.مقدمه

تیره گزیان (Tamaricaceae) شامل ۳ تا ۵ سرده و حدود ۱۰۰ گونه درجهان است که در مناطق معتدل و نیمه گرمسیری آفریقا، اروپا و آسیا و در مناطق شور، خشک، بیابانی، استپی و در امتداد رودخانه‌ها پراکنده‌اند (Crins, 1989; Olson et al., 2003).

محدوده پراکنش سرده های *Tamarix*, *Myricari* و *Reaumuria* در ایران در مناطق ایرانی-تورانی وصحارا-سندی است (Gaskin, 2003; Baum, 1967). بر اساس فلور ایرانیکا این تیره دارای ۳ سرده .*Reaumuria* L ،*Tamarix* L. و *Myricaria* Desv می باشد که بیشتر در کنار جریان های آب رودخانه ها، شوره زارها، حاشیه کویرها و اماکن نظیر آنها می‌رویند (Gaskin, 2003; Baum, 1967; Schiman, 1964) سهم عمده پراکنش این تیره در ایران در استان های سیستان و بلوچستان و کرمان است (اسدی، ۱۳۶۷).

سرده .*Tamarix* L حدود ۵۴ گونه دارد که عمدتا در مناطق شور بیابان ها و نیمه بیابان ها در آسیا ، اروپا ، شمال شرقی و جنوب غربی آفریقا رشد می‌کند (Sheidai et al., 2018). گستره‌ی جغرافیایی طبیعی این سرده در جنوب اروپا و از مسیر خاورمیانه به شمال آفریقا و از سوی دیگر به هند، پاکستان و چین می‌رسد (Daoyuan, 2002).

لازم به ذکر است که گز سرده ای قدیمی بوده و هیچ گونه‌ای از آن بومی دنیای جدید نمی‌باشد. از مراکز اصلی گونه زایی این سرده می توان به پاکستان، افغانستان، ایران، ترکمنستان، جنوب ترکمنستان، شرق چین و نواحی شرقی مدیترانه اشاره کرد. با توجه به درجه متفاوت جریان ژن در بین گونه های *Tamarix* ، گیاهانی با خصوصیات ریخت شناسی متغیر در همان منطقه رخ می دهند، بنابراین، جریان بالای ژن در گونه‌های *Tamarix* ناشی از هیبریداسیون بین گونه ای که منجر به تغییرات فنوتیپی می شود، طبقه بندی تاکسونومیکی این سرده را با مشکل مواجه می سازد (Baum 1978; Ijbari et al., 2014).

وجود دورگه ها یک دلیل محکم برای سردرگمی های تاکسونومی در سرده گز است. به طوریکه Gaskin و Kazmer در سال ۲۰۰۹ عنوان نمودند که "رویکرد مناسب برای مطالعه هیبریدها در بین گونه های *Tamarix* با استفاده از نشانگرهای مولکولی چند هسته ای می باشد.

تنوع ژنتیکی درون گونه ای ممکن است برای سازگاری مورد استفاده قرار گیرد و همچنین از همزیستی و انقراض ژنتیکی گونه های *Tamarix* مورد مطالعه جلوگیری می کند (Ijbari et al., 2014).

از مهم ترین عوامل استقرار سرده *Tamarix* در زیستگاه های جدید به عنوان یک گیاه غیربومی، توانایی رشد گیاه در خاک های قلیایی و شور (15000ppm)، توانایی بالا در تحمل دیگر تنش های محیطی ازجمله گرما، سرما، خشکی، سیل، آتش سوزی و غلظت بالایی مواد غیر محلول در خاک می باشد. سرده گز برای اولین بار در سال ۱۸۲۳ در آمریکا به عنوان گیاه زینتی و مقاوم در برابر باد و نیز به منظور تثبیت خاک کاشته شد (Brotherson and Winkel, 1986).

این سرده به دلیل داشتن سیستم ریشه ای گسترده از نمونه های موثر تثبیت خاک در مناطق بیابانی و تپه های ماسه ای می باشد و برای تولید گرما از آن استفاده می شود (Gaskin, 2003).

مارکرهای مولکولی ابزار قدرتمندی در ارزیابی تنوع ژنتیکی هم درون و هم در بین جمعیت‌ها توسط آنالیز تعداد وسیعی از لوکوس‌های پراکنده در ژنوم است (Powell et al., 1996). تکنیک‌های مربوط به مارکرهای ژنتیک مولکولی نقش بسیار زیادی در تخمین و ارزیابی تنوع ژنتیکی در مجموعه‌های ژنتیکی و بانک ژنومی دارند (Bretting and Widrlechner, 1995; Brown and Kresovich, 1996).

به دلیل پیشرفت در زمینه‌های گوناگون ژنتیک مولکولی طی چند دهه اخیر طیف وسیعی از تکنیک‌های مولکولی جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی ایجاد شده است. اخیراً نشانگر جدیدی به نام نشانگر Start Codon Targeted (SCoT) برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و تعیین مرز گونه‌ها و فرم های پایین تر از سطح گونه ایجاد شده است (Collard and Mackill, 2009). نشانگر SCoT عموماً مبتنی بر نواحی حفاظت شده ژنوم گیاه است که توسط کدون شروع ATG احاطه شده است (Sawant et al., 1999). این نشانگر در گونه‌های مختلف گیاهی مانند برنج، انگور، سیب‌زمینی، پرتقال، بادام زمینی و نیشکر و هم‌چنین نخل خرما استفاده شده است (Al-Qurainy et al., 2015).

با توجه به مطالعاتی که تاکنون در این سرده صورت گرفته، مشکلات تاکسونومی بسیاری در آن مطرح نموده اند. به علت پیچیدگی‌های موجود به دلیل هیبریدهای این گونه، رده بندی سرده گز چندین بار تغییر یافته است. براساس منابع موجود محدوده ی این سرده و تعداد گونه های آن در دنیا و همچنین در ایران مورد بحث است، به طوری که در منابع مختلف گونه های متفاوتی را در این سرده قرار داده اند. اسدی و همکاران (۱۳۶۷) حدود ۲۲ گونه از این سرده را در فلور ایران گزارش کرده اند. مظفریان (۱۳۱۳) حدود ۳۵ گونه از این سرده را در کتاب درختان و درختچه‌های ایران گزارش کرده است. به دلیل وجود کمپلکس های گونه ای، تنوع بالایی موجود بین جمعیت‌ها و حتی تنوع بین افراد یک گونه و نبودن توافق کلی بر سر درجه هیبریداسیون بین گونه‌ای، مطالعه تاکسونومیکی این سرده براساس داده های گوناگون از جمله داده های ریختی و مولکولی برای شناخت بیشتر این سرده، بازنگری نام گذاری علمی تاکسون ها و کمک به مرزبندی صحیح گونه های آن ضروری است. در این پژوهش ضمن جمع آوری نمونه های گیاهی از رویشگاه های طبیعی، ویژگی های ریخت شناسی، تشریحی و مولکولی ۱۰ گونه از این سرده بررسی شدند و روابط تاکسون ها براساس اطلاعات مولکولی و ریخت شناسی و تشریحی آن‌ها ارزیابی شدند.

۲.مواد روش ها

۲_۱_مطالعات ریخت‌شناسی

بررسی صفات ریخت شناسی در ۱۰ گونه از سرده *Tamarix* صورت پذیرفت.جدول (۱-۲). از هر گونه تعداد ۴ فرد از نظر ۹صفت کیفی و کمی ریخت شناسی از برگ و ساقه سرده *Tamarix* بررسی شدند. نمونه‌ها در هرباریوم دانشگاه شهید بهشتی نگه‌داری می‌شوند.

جدول (۱-۲) :گونه های مورد مطالعه در بخش ریخت شناسی

ردیف	گونه
۱	*T. arceothoides*
۲	*T. karakalensis*
۳	*T. mascatensis*

T. aucheriana	۴
T. ramosissma	۵
T. teragyna	۶
T. stricta	۷
T. kotschyi	۸
T. korolkowii	۹
T. kermanensis	۱۰

صفات به صورت دو حالته و چند حالته کد گذاری شده است. آنالیز ANOVA (تجزیه و تحلیل) برای نشان دادن تفاوت ریخت-شناسی بین نماینده واریته‌ها انجام شد. در حالی‌که PCA biplot برای شناسایی متغیرترین صفات ریخت‌شناسی میان افراد مورد مطالعه رسم شد (Podani, 2000). برای بررسی جدایی مرز بین واریته‌ها از آنالیز خوشه‌ای Ward استفاده شد (Podani, 2000). تجزیه و تحلیل آماری چند متغیره داده‌ها با استفاده از برنامه PAST 2.17 انجام شد (Hammer et al., 2012).

۲_۲_مطالعات تشریحی

در بررسی صفات تشریحی ساختار ساقه و برگ جهت بررسی روابط گونه ها استفاده شد. تعداد ۱۵ صفت کیفی وکمی تشریحی ساقه و برگ ۱۰گونه از سرده *Tamarix L.* مورد بررسی قرارگرفت.

نمونه‌های گیاه بالغ جداشده و بلافاصله در فرمالین-استیک اسید-الکل(FAA) (فرمالین ٪۵: اسید استیک ٪۵ و ٪۵۰ اتانول ٪۹۰) تثبیت گردید (Jensen, 1962). نمونه‌ها تا زمان برش در الکل ۷۰ درصد و ۴ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شدند. پس از تهیه مقاطع عرضی از نمونه‌های برگ و ساقه، با آب مقطر شستشو داده و در محلول ٪۵ هیپوکلریت سدیم به مدت ۲۰ دقیقه برای پاکسازی قرار داده شده و با آب مقطر شستشو داده شدند. این برش‌ها با متیل بلو و کارمین رنگ آمیزی و با استفاده از چسب کانادا بالزام بر روی اسلایدها نصب می‌شود. برش‌های نازک زیر میکروسکوپ مدل OLYMPUS مشاهده شدند (Sheidai et al., 2006). در مطالعات تشریحی برای گروه‌بندی نمونه‌ها از آنالیز UPGMA استفاده شد. آنالیز ANOVA (تجزیه و تحلیل) برای نشان دادن تفاوت‌های تشریحی بین افراد یک گونه انجام شد. در حالی که PCA biplot برای شناسایی متغیرترین صفات تشریحی در افراد مورد مطالعه استفاده شد (Podani, 2000). ورژن PAST 2.17 برای تجزیه و تحلیل آماری چند متغیره داده‌ها استفاده شد (Hammer et al., 2012).

۲_۳_مطالعات مولکولی

در مطالعه مولکولی با نشانگر SCoT روابط بین گونه ها و جدایی مرز آن ها بررسی شد. در این مطالعه ۵۰ فرد متعلق به ۱۰ گونه از این سرده صورت گرفت. برگ‌ها در پودر ژل سیلیکاژل خشک شدند، *استخراج DNA ژنومی با استفاده* از *پروتکل CTAB دغال فعال* انجام شد (Sheidai et al., 2013). کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از ژل آگارز ۰/۸٪ و طیف سنج Nano Drop ارزیابی شد (Križman et al., 2006). چهار آغازگر SCoT (SCoT1، SCoT2، SCoT36، SCoT41) انتخاب شدند (Collard and Mackill, 2009).

واکنش‌های PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۰ میلی‌مولار بافر Tris-HClدر pH 8 ؛ ۵۰ میلی‌مولار KCl ؛ ۱/۵ میلی‌مولار MgCl2؛ ۰/۲ میلی‌مولار از هر dNTP (Bioron, Germany)؛ ۰/۲ میکرومولار آغازگر منفرد؛ ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی و ۳ U تک DNA پلی‌مراز انجام شد. برنامه دمایی SCoT-PCR که در آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفت.
محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ با رنگ آمیزی پاور لود مشاهده شدند. اندازه قطعه با استفاده از نردبان اندازه مولکولی ۱۰۰ جفت باز (Lader) تخمین زده شد (Fermentas, Germany).

۳.نتایج و بحث

۳_۱_مطالعات ریخت شناسی

در نمودار PCA رسم شده بر اساس صفات ریخت شناسی دو مولفه اصی بیشترین واریاتس را نشان دادند. مولفه ی اول با داشتن ۶۱.۱ درصد میانگین واریانس کل، شامل صفات تعداد گلبرگ، تعداد کاسبرگ، محل اتصال پرچم به لوب، اندازه برگه نسبت به کاسه گل و تعداد پرچم و مولفه ی دوم با ۲۹.۸۷درصد واریانس دارای صفات تعداد کاسبرگ و شکل کاسبرگ خارجی بودند. نمودار شاخه بندی حاصل از مطالعات ریخت شناسی دوشاخه اصلی نشان داد ، شاخه اصلی اول شامل گونه های*T. arceuthoides*، *T. kermanensis*، *T. kotschyi*، *T. aucheriana*، *T. strickta*، *T. mascatensis* می باشد که مرز گونه ها کاملا از هم جدا قرار گرفت. نتایج این نمودار با نتایج حاصل از نمودار PCA مطابقت دارد.

۳_۲_مطالعات تشریحی

در نمودار PCA رسم شده بر اساس صفات تشریحی دو مولفه اصلی بیشترین واریاتس را نشان دادند. مولفه ی اول با داشتن ۴۸ درصد میانگین واریانس کل، شامل صفات حاشیه مقطع ساقه، تعداد لایه اپیدرم، طول اپیدرم ساقه به کل ساقه، وجود یا عدم وجود اپیدرم، وجود یا عدم وجود اسکلرانشیم وحاشیه مقطع برگ ومولفه ی دوم با ۳۰درصد واریانس شامل صفات تعداد دستجات اوندی برگ و طول اپیدرم برگ به کل برگ بودند. برای بررسی روابط بین گونه ها و جدایی مرز بین گونه ها توسط اطلاعات تشریحی برگ و ساقه در ۱۰ گونه از سرده *Tamarix* ابتدا آنالیز PCA انجام گرفت. بر اساس این آنالیز مرز بین این ۱۰ گونه به جز گونه‌ی *T.stricta* به دلیل تنوع بسیار بالا در گونه های *T.korlkowii*، *T. karkalensis* ، *T. tetragyna* از هم تفکیک نشدند، گونه ها با تنوع بالا حذف شدند وسپس نمودار PCA دیگری رسم شد که مرز بین ۵ گونه *T.mascatensis*، *T.kermanensis*، *T.aucheriana*، *T.stricta* ، *T.arceuthoides* کاملا از یکدیگر جدا شدند بنابراین می توان به این نتیجه رسید که مطالعات تشریحی می تواند موثر در جدایی برخی از گونه ها باشد.

۳_۳_مطالعات مولکولی

جهت بررسی روابط بین گونه ها و جدایی مرز آن ها از نشانگر مولکولی SCoT استفاده شد. در این مطالعه ۵۰ فرد متعلق به ۱۰ گونه از این سرده صورت گرفت و از چهار پرایمر استفاده شد بعضی از گونه ها برای این نشانگر دارای باند اختصاصی بودند(private bands). این باندهای اختصاصی نشان می دهند که این نشانگر SCoT می تواند در تمایز بین گونه های *Tamarix* نقش داشته باشد.

پارامتر های تنوع ژنتیکی در گونه های سرده *Tamarix* نشان دادکه کمترین درصد پلی مورفیسم از مقدار۲ ۶/۵درصد در *T. mascatensis* و همین گونه کمترین مقدار ضریب شانون (I) و تنوع ژنتیکی نای (Nei') را دارد بالاترین مقدار پلی مورفیسم ۵۶ درصد در *T. kermanenesis* است و همین گونه بالاترین مقدار ضریب شانون(I) و تنوع ژنتیکی نای (Nei') را دارد .بنابراین میتوان به این نتیجه رسید که تنوع ژنتیکی در این گونه ها در *Tamarix* کم می باشد.

آنالیز واریانس مولکولی AMOVA تفاوت ژنتیکی معنا داری را با مقدار (P. = 0.001) در بین گونه های مطالعه شده نشان داد. بر اساس این نتایج مشخص شد که ۵۱ درصد از تنوع ژنتیکی در بین گونه ها و۴۹ درصد در درون گونه ها می باشد، که این نتیجه نشان دهنده این است که مارکر SCoT می تواند در جدایی مرز بین گونه ها در سرده *Tamarix* مناسب باشد. تفاوت ژنتیکی بالا در بین گونه ها می تواند به دلیل گرده افشانی باز یا دگرلقاحی یا تفاوت جغرافیای بالا باشد.

نمودار PCA بر اساس مطالعات مولکولی با مارکر SCoT رسم شد که بر این اساس مشخص شد مرز بین گونه ها ی مورد مطالعه در سرده *Tamarix* از یکدیگر تفکیک شدند و به دلیل تنوع بالای گونه‌های *T. karakalensis*، *T. ramosissima* با هم هم پوشانی داشتند، که این موضوع مورد تایید مطالعات تشریحی و ریخت شناسی می باشد

۴.نتیجه گیری

شناسایی و تعیین مرز گونه ها در علوم زیستی ازجمله بیوجغرافی، اکولوژی، ژنتیک جمعیت، سیستماتیک فیلوژنی، زیست شناسی حفاظتی و تنوع زیستی از اهمیت بالایی برخوردار است، این کار در گونه هایی که گسترش جغرافیایی زیاد و شرایط اکولوژیکی بسیار متفاوت را دارا هستند بسیار مشکل است، زیرا چنین گونه هایی قادر به ایجاد سازش های محیطی از طریق نرمش پذیری فنوتیپی هستند. همین توانایی سبب بوجود آمدن صفات ریختی متنوع در گیاهان می شود و در نتیجه مشکلات شناسایی و تاکسونومی بسیاری را بوجود می آورد. همچنین شناسایی گونه ها و تعیین مرز آنها در گروه های گیاهی پیچیده که تمایل بالایی در ایجاد دورگه ها دارند نیز مشاهده می شود (Ijbari et al., 2014).

وجود جریان ژنی میان گونه های مشابه و نزدیک به هم باعث به وجود آمدن طیف متنوعی از گیاهان با صفات ریختی دو والد می شود که شناسایی و تاکسونومی گیاهان را دشوار کرده و ممکن است سبب اشتباهاتی در شناسایی و تاکسونومی شود. سرده *Tamarix* نیز دارای این مشکلات می باشند که شناسایی آنها را پیچیده کرده است.

تعداد گونه های گز در ایران در فلور ایراتیکا ۳۵ گونه و در فلور ایران (اسدی و همکاران، ۱۳۶۷) ۲۲گونه و در کتاب درختان ودرخچه های ایران (مظفریان، ۱۳۸۳) ۳۹ گونه گزارش شده است. در سایر نقاط جهان نیز تعداد گونه های گزارش شده متنوع می باشد، خصوصا در گونه های مهاجم مشکلات سیستماتیکی دیده می شود. بنابراین مشخص نمودن تعداد گونه ها در مناطق

مختلف در ایران میتواند حائز اهمیت باشد و هم چنین با استفاده از صفات ریختی و مولکولی با هم می تواند در شناسایی بهتر و تعیین مرز گونه ها در سرده گز و همچنین شناسایی دورگه ها و جریان ژنی میان گونه ها، روشی مناسب و کارآمد باشد .

مطالعه حاضر نشان داد که خصوصیات ریخت شناسی صفات ریختی مناسبی برای تفکیک گونه های *Tamarix* هستند و توانستند قرابت و جدایی مرز بین گونه ها رانشان دهد و در بخش مطالعات تشریحی توانستند مرز بین ۵ گونه را به طور کامل از هم جداکنند. در تحقیقات مولکولی انجام شده مرز بین گونه ها از هم جدا قرار گرفت بنابراین این داده ها در این سرده دارای ارزش تاکسونومیک هستند. این نشانگرهای مولکولی همچنین تقریبا با داده های ریختی و تشریحی سازگار هستند و گروه بندی مشابهی را از گونه های مورد مطالعه ایجاد کردند.

گونه هایی با پراکنش وسیع جغرافیایی، مانند گونه های سرده *Tamarix* ، ممکن است به دلیل سازش با شرایط محیطی دارای تنوع ریخت شناسی وسیعی باشند که اگر این تنوع باعث واگرایی ژنتیکی و مرفولوژیکی میان جمعیت های درون یک گونه شود، ممکن است باعث ایجاد فرم های تاکسونومیکی پایین تر از سطح گونه شود (Sheidai et al., 2014). بسته به درجه واگرایی ریخت شناسی، ممکن است ما اکوتیپ ها، واریته ها، و یا زیرگونه هایی را درون یک گونه واحد داشته باشیم. در مورد، درخت رسم شده براساس داده های تشریحی نشان داد که برخی از این گونه ها در خصوصیات تشریحی و ژنتیکی واگرایی پیدا کرده اند.

منابع

۱. اسدی، مصطفی.(۱۳۶۷) فلور ایران ، انتشارات وزارت کشاورزی، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، ش.۱.
۲. مظفریان، ولی الله.(۱۳۸۳) درختان و درختچه های ایران، فرهنگ معاصر، ص.۸۸۰.
3. Al-Qurainy, F., Khan, S., Nadeem, M. and Tarroum, M. 2015. SCoT marker for the assessment of genetic diversity in Saudi Arabian date palm cultivars. Pakistan Journal of Botany 47: 637-643.
4. Brotherson, J.D. and Winkel, V. 1986. Habitat relationships of saltcedar (Tamarix ramosissima) in central Utah. The Great Basin Naturalist 46: 535-541.
5. Baum, B. 1978. The genus *Tamarix*. Jerusalem, The Israel Academy of Sciences and Humanities p 209.
6. Baum, B.R. 1967. Introduced and naturalized tamarisks in the United States and Canada (Tamaricaceae). Baileya 15: 19-25.
7. Bretting, P.K. and Widrlechner, M.P. 1995. Genetic markers and horticultural germplasm management. HortScience 30: 1349-1356.
8. Brown, S.M., Hopkins, M.S., Mitchell, S.E., Senior, M.L., Wang, T.Y., Duncan, R.R., Gonzalez-Candelas, F. and Kresovich, S. 1996. Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum [Sorghum bicolor (L.) Moench]. Theoretical and Applied Genetics 93: 190-198.
9. Crins, W.J. 1989. The Tamaricaceae in the southeastern United States. Journal of the Arnold Arboretum 70: 403-425.
10. Collard, B.C. and Mackill, D.J. 2009. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. Plant Molecular Biology Reporter 27: 86-93.
11. Daoyuan, Z., Dunyan, T., Juan, Z. & Borong, P. 2003. Comparative anatomy of young branches of 16 species of Tamarix from China with reference to their ecological significance. Acta Botanica Yunnanica 25: 653-662.
12. Gaskin, J.F. 2003. Tamaricaceae. In flowering plants. Dicotyledons 5: 363-368.
13. Gaskin, J.F. & Kazmer, D.J. 2009. Introgression between invasive saltcedars (*Tamarix chinensis* and *T. ramosissima*) in the USA. Biological Invasions 11: 1121-1130.
14. Gaskin, J.F., and Schaal, B.A. 2003. Molecular phylogenetic investigation of US invasive *Tamarix*. Systematic Botany 28: 86-95
15. Ijbari, H., Sheidai, M., Mehrabian, A.R., Noormohammadi, Z. and Ghasemzadeh-Baraki, S. 2014. K-means clustering and structure analyses of genetic diversity in *Tamarix* L. accessions. Turkish Journal of Botany 38: 1080-1094.

16. Jensen, W.A. 1962. Botanical histochemistry. W.H.H. Freeman and Company, San Francisco and London.
17. Križman, M., Jakše, J., Baričevič, D., Javornik, B. and Prošek, M. 2006. Robust CTAB-activated charcoal protocol for plant DNA extraction. Acta Agriculturae Slovenica 87: 427-433.
18. Olson, M.E., Gaskin, J.F. and Ghahremaninejad, F. 2003. Stem anatomy is congruent with molecular phylogenies placing *Hypericopsis persica* in *Frankenia* (Frankeniaceae), comments on vasicentric tracheids. Taxon 52: 525-533.
19. Podani, J. 2000. Introduction to the exploration of multivariate biological data. Backhuys Publishers.
20. Hammer, O., Harper, D. and Ryan, P.D. 2012. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica 4: 1-9.
21. Schiman and Czeika, H. 1964. Tamaricaceae, *in* Rechinger, K.H. (editor). Flora Iranica vol. 4. Akademische Druck- u. Verlagsanstalt, Graz-Austria, pp 1-17.
22. Sheidai, M., Teymoori, H., Noormohammadi, Z., Mehrabian, A.R., Koohdar, F. and Ghasemzadeh-Baraki, S. 2018. Species delimitation in the genus *Tamarix*: morphological and molecular data. Phytotaxa 343: 101-115.
23. Sheidai, M., Noormohamadi, Z. and Sotodeh, M. 2006. Cytogenetic variability in several canola (*Brassica napus*) cultivar. Caryologia 59: 267-276.

How to supply medicinal plants and study the situation of perfumers in the east of Golestan province

Saadaty Razieh[1] *, Sattarian Ali[2], Daneshvar Abolfazl[3], Amini Elham[4]

1*-Corresponding author, Masters Student Systematic discipline and Ecology, Gonbad Kavous University, Gonbad, Golestan.
2- Associate Professor of Biology of Sciences, Gonbad Kavous University, Gonbad, Golestan,
3- Assistant Professor of Biology of Sciences, Gonbad Kavous University,Gonbad, Golestan.
4- PhD graduate, Systematic Molecular Education, Tarbiat Modares University, Tehran, Tehran.

** Email: Razieh.saadaty@gmail.com*

Abstract

Plants are part of the natural resources of any country. This part of natural resources has a long history with human beings and has been one of the most important sources of human food and medicine for generations. With the spread of human experience in the use of plants, a branch of medicine was formed that used plants to treat many diseases. Golestan province is one of the provinces in the country that is very rich in vegetation due to its suitable geographical location. The people of this region have used the distant past of the surrounding plants for various purposes, including food and medicine. Medicinal plants include parts of the plant that, after drying, are sold in shops and perfumeries without any changes. Since in Iran, perfumeries are the most important centers in the supply of medicinal plants; In this study, by referring to perfumeries in four eastern cities of Golestan province, including Gonbad Kavous, Galikesh, Minoodasht and Kalaleh, information about people working in perfumeries, clients, and reasons for referring to perfumeries were recorded. and it turned out that 56% of perfumers in these cities are between 10 and 30 years old. The average age of people working in perfumeries was estimated at 20 to 50 years, 86 percent of whom died, and 41 percent of whom were employed without any relevant education and only through family experience or taking courses related to medicinal plants. The most common reason for people in the region to refer to perfumers was related to liver and gastrointestinal diseases.

Keywords: Traditional medicine, Gonbad Kavous, Gastrointestinal system, Ancestral occupation, Vegetation

نحوه عرضه گیاهان دارویی و بررسی وضعیت عطاری‌های شرق استان گلستان

راضیه سعادتی [۱*]؛ علی ستاریان[۲]؛ ابوالفضل دانشور[۳]؛ الهام امینی[۴]

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد سیستماتیک و اکولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه کنبدکاووس

۲-دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه کنبدکاووس

۳- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گنبدکاووس

۴- دکتری سیستماتیک گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

razieh.saadaty@gmail.com *

چکیده

گیاهان جزء ذخایر و منابع طبیعی هر کشور محسوب می‌شوند. این بخش از منابع طبیعی قدمتی همپای بشر دارد و یکی از مهم‌ترین منابع تأمین غذایی و دارویی بشر در طول نسل‌ها بوده است. با گسترش تجربیات بشر در استفاده از گیاهان، شاخه‌ای از علم پزشکی شکل گرفت که برای درمان بسیاری از بیماری‌ها از گیاهان استفاده می‌کردند. استان گلستان از جمله استان‌هایی در کشور است که، به دلیل موقعیت جغرافیایی مناسب از نظر پوشش گیاهی بسیار غنی می‌باشد. مردم این منطقه از گذشته‌های دور از گیاهان اطراف خود برای اهداف مختلف، از جمله غذا و دارو استفاده کرده‌اند. گیاهان دارویی شامل بخش‌هایی از گیاه است که بعد از خشک کردن، بدون هیچ گونه تغییری در مغازه‌ها و عطاری‌ها به فروش می‌رسد. از آنجایی که در ایران، عطاری‌ها مهمترین مراکز در عرضه‌ی گیاهان دارویی هستند؛ در این تحقیق با مراجعه به عطاری‌های چهار شهرستان شرق استان گلستان، شامل گنبدکاووس، گالیکش، مینودشت و کلاله، اطلاعات مربوط به افراد مشغول در عطاری، مراجعین، علل مراجعه به عطاری‌ها ثبت گردید. و مشخص شد که، ۵۶ درصد از عطاری‌ها در شهرستان‌های مذکور، دارای قدمتی بین ۱۰ تا ۳۰ سال هستند. میانگین سن افراد مشغول در عطاری‌ها، ۲۰ تا ۵۰ سال تخمین زده شد که ۸۶ درصد آنها مرد، و ۴۱ درصد این افراد بدون داشتن تحصیلات مرتبط و تنها از طریق تجارب خانوادگی یا گذراندن دوره‌های مرتبط با گیاهان دارویی به این شغل مشغول شده‌اند. بیشترین علل مراجعه‌ی مردم منطقه به عطاری‌ها نیز، مربوط به بیماری‌های کبد و دستگاه گوارشی گزارش شد.

واژگان کلیدی: طب سنتی، گنبدکاووس، دستگاه گوارش، شغل اجدادی، پوشش گیاهی

۱.مقدمه

گیاه دارویی به گروهی از گیاهان گفته می‌شود که اندام‌های آن‌ها دارای ترکیباتی با خواص دارویی است، و به واسطه اثرات درمانی برای انسان یا دام، در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرند (درویژه و همکاران، ۱۳۹۵). این گیاهان جزء ذخایر و منابع طبیعی هر کشور محسوب می‌شوند. این بخش از منابع طبیعی قدمتی همپای بشر دارد و یکی از مهم‌ترین منابع تأمین غذایی و دارویی بشر در طول نسل‌ها بوده است (علبدی و همکاران، ۱۳۹۵). حمایت سازمان بهداشت جهانی از مصرف فرآورده‌های طبیعی، به نوبه خود باعث شده است که تولید و تجارت این محصول در جهان، رونق قابل توجهی یابد. سازمان

بهداشت جهانی تخمین زده است که حدود ۶۰ درصد از جمعیت جهان در کشورهای در حال توسعه به علت کمبود امکانات بهداشتی مدرن، برای درمان بیماری‌ها بر گیاهان متکی هستند؛ (پولات و همکاران، ۲۰۱۸).

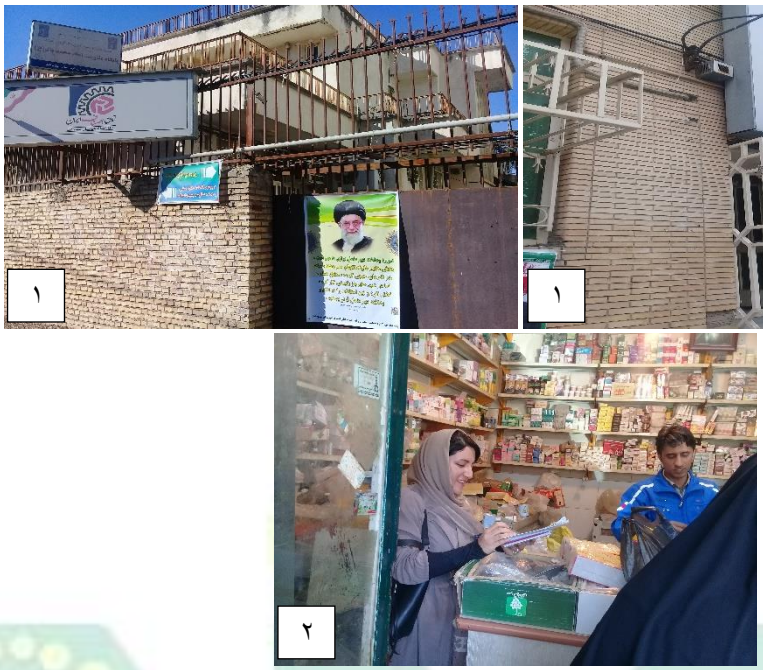
ایران از نظر تنوع زیستی گیاهی، یکی ازغنی‌ترین مناطق جنوب غربی آسیا می‌باشد. تنوع پوشش گیاهان دارویی در کشور باعث شده، بومیان مناطق مختلف کشور برای درمان بسیاری از بیماری‌ها، از آن‌ها بهره ببرند. استان گلستان، به جهت موقعیت جغرافیایی و تنوع اقلیمی از نظر فلور بسیار غنی است، به طوری که بیش از ۱۷۰۴ گونه گیاهی در این استان شناسایی شده است (حسینی و همکاران، ۱۳۸۷). گیاهان دارویی شامل بخش‌هایی از گیاه است که بعد از خشک کردن، بدون هیچ گونه تغییری در مغازه‌ها و عطاری‌ها به فروش می‌رسد (حسینی همکاران، ۱۳۹۶).

حدود ۶۰۰۰ عطاری در ایران وجود دارد، که به خرید و فروش گیاهان دارویی می‌پردازند، که به عنوان پتانسیل جدید مطرح است، و می‌تواند زمینه‌ی خوبی برای شناسایی گونه‌های بومی و امکان شناسایی کاربردهای گیاهان را فراهم نماید. در ایران گیاهان دارویی توسط عطاری‌ها بدست مردم می‌رسد و یا در بسته‌بندی‌های مدرن که از طریق شرکت‌های مختلف تهیه و توزیع می‌شود (نادری و همکاران، ۱۳۸۸). در کشور ما عطاری‌ها به شکل رسمی، رابطه‌ی خاص و مشخصی با وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی ندارند؛ و تنها به‌عنوان یک گروه صنفی تحت نظارت وزارت بازرگانی هستند، در حال حاضر برای تاسیس یک عطاری، داشتن شرایط خاصی به جز آنچه در تاسیس هر مغازه یا مرکز تجاری دیگر مورد نیاز است، ضرورتی ندارد (حسینی و همکاران، ۱۳۹۶). امروزه، با توجه به گرایش مردم به طب سنتی، شناخت سلیقه و رویکرد جوامع به مصرف گیاهان دارویی، می‌تواند راهنمای مناسبی برای سیاست‌گزاران صنعت دارویی کشور باشد تا با برنامه‌ریزی علمی مناسب شاهد افزایش فرهنگ استفاده از گیاهان دارویی باشیم؛ لذا بررسی جزئیات مربوط به عطاری‌ها، همچنین موارد عمده مراجعه افراد به عطاری‌ها و گیاهانی که برای درمان به آن‌ها توصیه می‌شود، لازم به نظر می‌رسد.

۲.مواد و روش ها

این مطالعه به صورت مقطعی انجام پذیرفت، و از روش پیمایشی برای انجام مطالعه استفاده شد. برای شروع این مرحله از تحقیق، ابتدا شهرهای هدف مشخص شدند، که شامل گنبدکاووس، مینودشت، گالیکش و کلاله بود؛ سپس به اتاق اصناف شهرستان‌ها مراجعه، و مجوز و معرفی‌نامه و همچنین لیست عطاری‌های دارای مجوز، جهت مراجعه به آن‌ها، دریافت شد؛ سپس به عطاری‌ها مراجعه و مصاحبه‌ی حضوری با افراد مشغول در عطاری صورت پذیرفت.

برای جمع‌آوری اطلاعات، از روش تبیین پرسش‌نامه استفاده شد؛ برای این کار، قبل از شروع مصاحبه، لیستی از سوالات مورد نظر، از جمله اطلاعات شخصی افراد مشغول و صاحب مجوز عطاری، شامل: سن، میزان تحصیلات، رشته‌ی تحصیلی، نحوه‌ی انتخاب شغل عطاری و سوالاتی از این دست؛ همچنین سن و جنسیت اکثر مراجعین به عطاری، علت مراجعه و بیشترین گیاهان مورد استفاده در فصول مختلف سال مورد پرسش قرار گرفت. پرسش‌نامه‌ی مورد نظر تهیه شد و در اختیار افراد قرار گرفت، و در نهایت پاسخ‌های آن‌ها جمع‌آوری و ثبت گردید. در این بررسی به تمام عطاری‌های دارای مجوز در شهرستان‌های کلاله، گالیکش و مینودشت مراجعه شد، ولی به علت بالا بودن تعداد عطاری‌ها در شهرستان گنبدکاووس، همچنین کمبود وقت، امکان مراجعه به تمام عطاری‌های این شهرستان وجود نداشت و به ۵۰ درصد آن‌ها مراجعه شد .



شکل ۱- ۱- :مراجعه به اتاق اصناف شهرستان‌ها ۲-مراجعه‌ی حضوری به عطاری‌ها

۳.نتایج و بحث

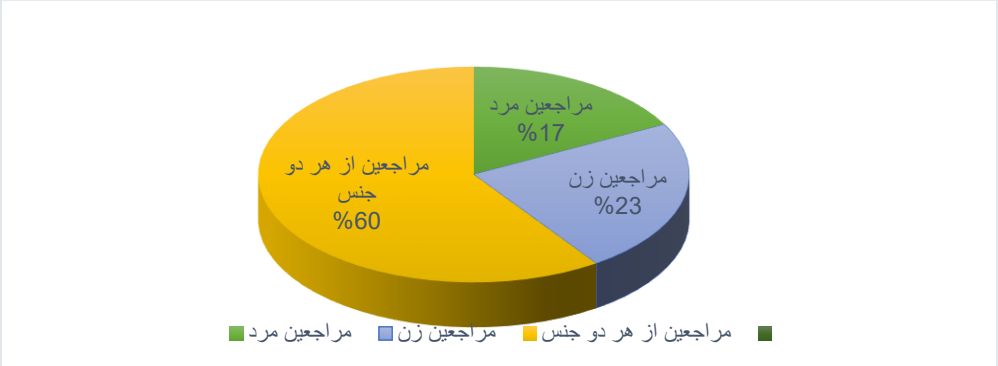
در مجموع از بین ۶۷ عطاری دارای مجوز در چهار شهرستان مورد بررسی، به ۷۸٪ مراجعه‌ی حضوری صورت گرفت. طبق بررسی انجام شده در سطح این عطاری‌ها، مشخص شد که افراد مشغول در عطاری‌ها، بین ۲۰ تا ۵۰ سال، سن دارند، ۸۵ درصد از این افراد، دارای تحصیلات دیپلم و بالاتر هستند، و ۱۵ درصد آن‌ها تحصیلات زیر دیپلم دارند. ۲۱ درصد از این افراد دارای تحصیلات مرتبط هستند، و ۴۱ درصد آن‌ها بدون داشتن تحصیلات مرتبط و با کسب تجربه از طریق استاد و شاگردی، یا گذرلندن دوره‌های مرتبط با گیاهان دارویی و از روی علاقه، به این شغل روی آورده‌لند. لازم به ذکر است که تعدادی از عطاران، این شغل را به‌عنوان شغل اجدادی خود معرفی کردند و اطلاعات خود را از طریق نسل قبل و مطالعات شخصی بدست آورده‌اند، که با بررسی‌های انجام شده مشخص شد، مردم به عطاری‌هایی که دارای سابقه‌ی بیشتری هستند، نسبت به سایر عطاری‌ها، علی‌رغم نداشتن تحصیلات مرتبط با گیاهان دارویی، جهت گرفتن مشاوره و استفاده از این گیاهان، اعتماد بیشتری دارند. ۵۶ درصد از عطاری‌ها در شهرستان‌های مذکور، دارای سابقه‌ی بین ۱۰ تا ۳۰ سال هستند. ۴۴ درصد از آن‌ها کمتر از ۱۰ سال سابقه‌ی کاری دارند و در عطاری‌ها، بسته به بزرگی و کوچکی و همچنین تعداد مراجعین، یک تا سه نفر مشغول به کار بودند و تعداد کمی از آن‌ها کار در عطاری را به عنوان شغل اصلی خود معرفی کردند. ۲۳ درصد از عطاران، بیشترین مراجعین خود را زن، ۱۷ درصد مرد، و ۵۹ درصد اعلام کردند که به نسبت مساوی از هر دو جنس، مراجعه‌کننده دارند. رده‌ی سنی مراجعین اکثرا افراد میانسال را شامل می‌شوند و بیشترین مراجعین به عطاری‌ها را قشر ضعیف و متوسط جامعه تشکیل می‌دهند .

در عطاری‌های مراجعه شده، علاوه بر گیاهان دارویی خشک شده و عرقیات گیاهی، انواع محصولات گیاهی شرکتی نیز به چشم می‌خورد که بنا به گفته‌ی افراد مشغول در عطاری، امروزه این محصولات به خصوص محصولات مربوط به چاقی و لاغری، طرفداران زیادی را به خود اختصاص داده‌اند. این محصولات در عطاری‌هایی که سابقه‌ی بیش از ۱۵ سال دارند، کمتر دیده می‌شود، و این به عدم اعتماد عطاران و البته مراجعین آن‌ها (که افراد ثابت و مشخصی را تشکیل می‌دهند) به محصولات

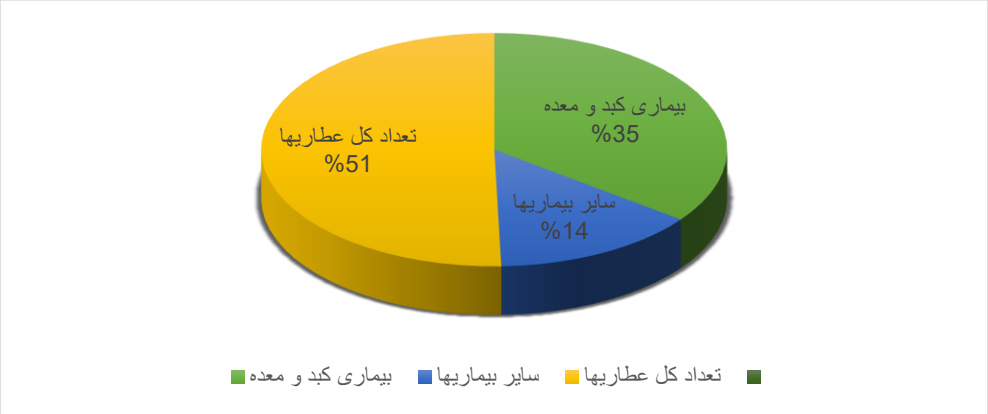
شرکتی مربوط می‌شود. لازم به ذکر است که اولویت و ترجیح همه‌ی عطاران برای مراجعین خود، توصیه به استفاده از گیاهان دارویی بود و نه داروهای گیاهی. تعداد محدودی از عطاران، قادر بودند که با توجه به مشکل مراجعین برای آن‌ها، نسخه‌های دارویی تجویز کنند، ولی اکثر آن‌ها از این کار خودداری می‌کردند. مجموع اطلاعات جمع‌آوری شده، در جدول ۱ و شکل ۲ و ۳ ذکر شده است .

جدول ۱: اطلاعات مربوط به افراد مشغول به کار در عطاری‌ها

اطلاعات مربوط به عطارها	فراوانی	درصد
تعداد کل عطاری‌های مراجعه شده	۵۲	٪۷۸
جنسیت فروشنده: مرد	۴۵	۸۶٪
جنسیت فروشنده: زن	۷	۱۳٪
تحصیلات فروشنده: مرتبط	۱۱	۲۱٪
تحصیلات فروشنده: غیر مرتبط	۴۱	۷۹٪
میزان تحصیلات: دیپلم وبالاتر	۴۴	۶۵٪
میزان تحصیلات: زیر دیپلم	۸	۱۵٪
سابقه شغل عطاری: بیشتر از ۱۰ سال	۲۹	۵۶٪
سابقه شغل عطاری: کمتر از ۱۰ سال	۲۳	۴۴٪
میزان خرید گیاه از افراد بومی	۲۱	۴۰٪
عدم خرید گیاه از افراد بومی	۳۱	۶۰٪



شکل ۲:جنسیت مراجعین به عطاری‌ها



شکل۳:دلایل مراجعه‌ی مردم به عطاری‌ها

همان‌گونه که از نتایج بدست آمد، بیشترین علل مراجعه، به عطاری‌ها، بیماری‌های کبدی و گوارشی از جمله معده، می‌باشد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مردم منطقه، از این بیماری‌ها بیشتر رنج می‌برند، که این ممکن است بدلیل، الگوی زندگی، و یا رژیم غذایی نادرست و نامناسب مردم منطقه باشد، بنابراین بنظر می‌رسد که متخصصین طب سنتی و مدرن، با توجه و بررسی این شواهد، از شیوع انواع بیماری‌های خطرناک و لاعلاج، از جمله انواع سرطان سیستم گوارش، که روز به روز در منطقه در حال افزایش است، با ارائه‌ی راهکارهایی، از جمله ارائه‌ی رژیم غذایی مناسب، پیشگیری کنند. در درجه‌ی بعدی علل مراجعه به عطاری‌ها، درد مفاصل بود که این مورد نیز ممکن است بدلیل رطوبتی بودن منطقه، و یا بدلیل نوع شغل مردم منطقه که، اکثرا از طریق کارگری، کشاورزی و دامپروری امرار معاش می‌کنند باشد، چرا که بسیاری از افراد در چنین مشاغلی، نکات ایمنی و لازم برای سلامتی ستون فقرات را رعایت نمی‌کنند. بنظر می‌رسد که با آموزش‌ها و ارائه‌ی پوشش بیمه‌ای مناسب برای این قشر از جامعه، بتوان از بروز چنین مشکلاتی که باعث ناکارآمدی افراد جامعه، از نظر جسمی و البته روحی، برای اجتماع می‌گردند، پیشگیری کرد.

همه‌ی افراد مشغول در عطاری‌ها معتقد بودند که مردم به استفاده از گیاهان دارویی و فرآورده‌های آن‌ها، نسبت به گذشته تمایل بیشتری پیدا کرده‌اند. ولی بنا به دلایلی مانند بیمه‌ی تکمیلی که به آن اشاره شد، همچنین طولانی بودن پروسه‌ی درمان بوسیله‌ی گیاهان و با توجه به مدرن شدن زندگی مردم و افزایش مشغله و کمبود وقت در بین اقشار مختلف جامعه، افراد اکثرا ابتدا به طب مدرن مراجعه می‌کنند، و در صورت نگرفتن جواب از داروهای شیمیایی، به طب سنتی و عطاری‌ها روی می‌آورند. همچنین عطاران بیان داشتند که افزایش قیمت گیاهان دارویی طی یک سال اخیر و کاهش قدرت خرید مردم، نیز یکی از دلایل کاهش تقاضا بوده است. در تحقیقی، کمبود طبیب و پزشک متخصص در زمینه داروهای گیاهی، عدم حمایت‌های بیمه‌ای از داروهای گیاهی و عدم دسترسی آسان به داروهای گیاهی، برخلاف داروهای شیمیایی، را از جمله عواملی بیان کرده است که در کاهش انگیزه‌ی مردم در استفاده از داروهای گیاهی نقش دارند (رشیدی و همکاران، ۱۳۹۰) .

در سطح کشور مطالعات مشابهی در حوزه‌ی فعالیت عطاری‌ها انجام گرفته است که در زیر به تعدادی از آنها اشاره می‌شود:

رحیمی و همکاران (۱۳۸۹)، وضعیت گیاهان دارویی را در عطاری‌های شهر کرمان بررسی کردند. این کار از طریق مصاحبه‌ی حضوری با ۲۵ عطاری معروف شهر کرمان صورت پذیرفت، نتایج نشان داد که ۳۳/۳ درصد از عطاران دارای تحصیلات زیر دیپلم هستند و هیچیک از آن‌ها دارای تحصیلات مرتبط با گیاهان دارویی نبودند. ۶۶/۶ درصد از عطاران سن بالای ۳۰ سال داشتند، ۳۲/۲ درصد علت عطار شدن را شغل پدری اعلام کردند و ۶۷/۸ درصد به علاقه شخصی و جنبه‌های اقتصادی اشاره کردند. عشایری و همکاران (۱۳۹۱)، در سال ۱۳۸۷، مطالعه‌ای با عنوان شایع‌ترین گیاهان دارویی خریداری شده از عطاری‌ها

در شهر تهران را انجام دادند؛ در این مطالعه اطلاعات مربوط به مصرف گیاهان دارویی در شهر تهران بدست آمده است. طبق نتایج، میانگین سنی عطاران، ۴۰/۰۸، و تجربه‌ی کاری آن‌ها، ۱۶/۷۷ سال برآورد شده است؛ همچنین شایع‌ترین گیاهان مورد استفاده در فصول مختلف نیز ثبت گردیده است. حسینی و همکاران (۱۳۹۶)، طی تحقیقی، عرضه و مصرف گیاهان دارویی در عطاری‌های شهر شیراز را بررسی کردند؛ نتایج نشان داد که میانگین سنی افراد مشغول در عطاری‌ها حدود ۳۹ سال بوده و تنها حدود ۷ درصد از این افراد تحصیلات مرتبط با گیاهان دارویی دارند؛ همچنین اینکه اکثر افرادی که به عطاری‌ها مراجعه می‌کنند از طبقه‌ی ضعیف جامعه هستند.

طبق بررسی‌های انجام شده مشخص شد که، عطاری‌ها اکثر محصولات شرکتی خود را از سایر استان‌های کشور از جمله اصفهان، شیراز، تبریز و تهران تهیه می‌کنند. درصد بالای گیاهان دارویی از استان‌هایی شامل تهران، خراسان (مشهد) و زاهدان و مقدار کمی از آن‌ها از شهرستان گرگان تهیه می‌شوند. ۴۰ درصد از عطاران عنوان کردند که بین ۱۰-۵ درصد از گیاهان دارویی را از مردم بومی منطقه تهیه می‌کنند، درصد بالای این گیاهان بومی را گل گاوزبان، کاسنی، اسپند، به لیمو، گل محمدی، زرشک، بومادران تشکیل می‌دهد؛ ولی ۶۰ درصد از آن‌ها هیچ خریدی از مردم بومی و محصولات بومی نداشتند. در فصول مختلف سال گیاهان متفاوتی توسط مردم مورد استفاده قرار می‌گیرد، به طور مثال، در فصول سرد سال، بیشترین فروش مربوط به گیاهانی با طبع گرم، شامل آویشن، دارچین، میخک، پونه، زنجفیل می‌باشد و در فصول گرم سال، بیشترین تقاضا مربوط به تخم شربتی، خاکشیر، شاهتره، کاسنی بوده است، که دارای طبعی سرد، جهت تعدیل مزاج افراد هستند، این اطلاعات در تحقیق دیگری نیز عنوان گشته است (عشایری و همکاران، ۱۳۹۱). ۷۱ درصد دلیل مراجعه‌ی مردم به عطاری‌ها، مشکلات گوارشی، شامل مشکل معده، کبد چرب و در درجه‌ی بعدی، درد مفاصل ثبت گردید، البته در فصولی از سال، مشکلات تنفسی، حساسیت‌های فصلی و سرماخوردگی، در درجات بعدی علل مراجعه به عطاری‌ها مطرح شدند.

۴.نتیجه‌گیری

امروزه، با توجه به گرایش مردم به طب سنتی، شناخت سلیقه و رویکرد جوامع به مصرف گیاهان دارویی، می‌تواند راهنمای مناسبی برای سیاست‌گزاران صنعت دارویی کشور باشد تا با برنامه‌ریزی علمی مناسب شاهد افزایش فرهنگ استفاده از گیاهان دارویی باشیم؛ لذا بررسی جزئیات مربوط به عطاری‌ها، همچنین موارد عمده مراجعه افراد به عطاری‌ها و گیاهانی که برای درمان به آن‌ها توصیه می‌شود، لازم به نظر می‌رسد. در آخر، با عنایت به اینکه عطاری‌ها، نقش مهمی در عرضه‌ی گیاهان و فرآورده‌های آن‌ها دارند، بررسی‌هایی در سطح عطاری‌های چهار شهرستان شرقی استان، که به نظر می‌رسید، نقش موثرتری در عرضه‌ی گیاهان دارویی در منطقه دارند انجام گرفت، و اطلاعات اولیه‌ای در خصوص مراجعین و عطاران، همچنین کالاهایی که در این عطاری‌ها عرضه می‌شود، جمع‌آوری شد و بنظر می‌رسد مهمترین نتیجه‌ای که از این بررسی بدست آمد، این بود که مهمترین علل مراجعه‌ی مردم به عطاری‌ها که بیماری‌های کبدی و گوارشی می‌باشد. همچنین مشخص شد که بیشتر عطاران، اطلاعات مربوط به گیاهان دارویی را بصورت اجدادی و با تجربه‌ی شخصی بدست آورده‌اند، و تعداد معدودی از آن‌ها دارای تحصیلات مرتبط با این موضوع بوده‌اند.

طی انجام این بررسی، مشخص شد که در شهرستان گنبدکاووس، که یکی از شهرستان‌های بزرگ و پرجمعیت استان گلستان محسوب می‌شود، نسبت به سه شهرستان مورد بررسی دیگر، مردم تمایل کمتری به استفاده از گیاهان دارویی دارند. برخی از عطاران معتقد بودند که اکثر ساکنان شهرستان گنبدکاووس کارمند و دارای بیمه‌ی تکمیلی هستند، بنابراین تمایل بیشتری به استفاده از تسهیلات بیمه‌ای را دارند، ولی شغل اکثر مردم در سه شهرستان، کلاله، گالیکش و مینودشت کشاورزی و دامپروری است، و همچنین چون گونه‌های گیاهی دارویی زیادی در این مناطق رویش دارند، رغبت بیشتری به تهیه و استفاده از گیاهان دارویی، از طریق برداشت از مناطق رویش گیاهان و یا از طرق مراجعه به عطاری‌ها و استفاده از گیاهان دارویی را دارند. تعداد

زیادی از عطاران دلیل عدم خرید محصولات از افراد بومی را عدم اطمینان از بهداشتی بودن و یا نحوه‌ی خشک کردن گیاهان عنوان کردند، همچنین معتقد بودند که چون این منطقه دارای رطوبت بالا است، گیاهان نیز آبدار و مرطوب هستند، بنابراین برای نگهداری در عطاری‌ها برای طولانی مدت مناسب نیستند. اما در مقابل، عطارانی که از افراد بومی خرید داشتند، همین دلایل، یعنی آبدار بودن و مناسب بودن شرایط آب و هوایی رشد گیاهان را برای استفاده‌ی مردم منطقه از این گیاهان، مناسب‌تر می‌دانستند و تمایل داشتند که گیاهان دارویی که در منطقه رویش دارند را از مردم بومی تهیه و خریداری کنند .

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از مسیولین محترم دانشکده‌ی علوم دانشگاه گنبدکاووس جهت انجام هماهنگی‌ها برای مراجعات حضوری، همچنین از ادارات اصناف شهرستان‌ها و عطاران زحمت کش شهرستان‌های مورد مطالعه، جهت همکاری‌هایی که برای کسب اطلاعات لازم داشته‌اند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

۱- حسینی، س ع(ر). ابرسجی، ق. حسینی، س ع(ح).. گیاهان دارویی استان گلستان. فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، جلد ۲۴، شمارهٔ ۴. ۱۳۸۷.

۲- حسینی، ز. فیضی، ح. مرادی، ر،ا. بررسی عرضه و مصرف گییاهان دارویی در عطاری‌های شهر شیراز، مجله طب سنتی اسلام و ایران، سال هشتم، شماره‌ی اول، بهار ۱۳۹۶.

۳- درویژه، ح. زاهدی، م. عباس زاده، ب. دومانی، ا. اهمیت کشت و تولید گیاهان دارویی در اقتصاد و صنعت کشور با مطالعه موردی گیاه سرخارگل. نخستین همایش ملی گیاهان داروی معطر و ادویه ای. دانشگاه گنبد کاووس، ۱ اردیبهشت ۱۳۹۵

۴- رشیدی، ش. فرجی، ه. جهانبین، د. میرفردی، ا. ازریابی میزان آگاهی، اعتقاد و عملکرد مردم شهر یاسوج، نسبت به گیاهان دارویی. فصلنامه گیاهان دارویی، سال یازدهم، دوره اول، ویژه‌نامه شماره هشت، زمستان ۱۳۹۰.

۵- رحیمی، م. پورمیرزایی، ا. بررسی وضعیت گیاهان دارویی در عطاری‌های شهر کرمان، همایش ملی گیاهان دارویی، ۱۳۸۹.

۶- عابدی، م. پناهی، ج. ستاریان، ع. حبیبی، م. بررسی اتنوبوتانی گیاهان دارویی قرق گوی نیک شهرستان جرگلان استان خراسان شمالی، نخستین همایش ملی گیاهان دارویی معطر و ادویه ای، دانشگاه گنبد کاووس، ۱ اردیبهشت ۱۳۹۵.

۷- عشایری، ن. عباسیان، ع. جهانخش، س. شیبانی، س. سوداگریری، ف. مینایی، ب. شایعترین گیاهان خریداری شده از عطاری‌ها، در شهر تهران در سال ۱۳۸۷. مجله طب سنتی اسلام و ایران، سال سوم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۱.

۸- نادری، ف. نژاد سبزی، پ. رسولیان، ب. بررسی عرضه و مصرف گیاهان دارویی موجود در عطاری‌های استان لرستان در سال ۱۳۸۷، فصلنامه علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دوره یازدهم، شماره ۵. زمستان ۱۳۸۸.

9- Ridvan Polat, Ugur Cakilcioglu. R. Çakilcioglu, U. Ethnobotanical study on Medicinal Plants in Bingul (turkey), Herbal Medicin, S2210-8033(18)30008-3. 28/1/2018.

The effect of supplementary irrigation, foliar application of amino acids and on farm priming seed chlorophyll and carotenoid concentrations of a rainfed wheat cuitivar (Triticum aestivum L.)

Narjes Hojati Fahim [1] *, Mohammad Ali Aboutalebian [2], Mehrdad Chaichi [3]

1 PhD student in Crop Ecology, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University, Hamedan
2 Associate Professor, Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University, Hamedan
3 Assistant Professor of Seed and Plant Breeding Research Department, Agricultural Research and Training Center and Natural Resources of Hamedan Province

narjes.hojati@yahoo.com

Abstract

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is considered as a staple food of about 35% of the world's population in their daily diet (Shustro et al., 2009). Drought is one of the most important factors limiting crop production in many parts of the world. About one third of the world's arable land is significantly short of water (Rahbarian et al., 2011). Complementary irrigation is the use of rainwater with irrigation application (Ovis and Hachum, 2013). Due to the lack of proper and timely rainfall in rainfed lands, the use of supplementary irrigation can play an effective role in increasing yield and improving the crop, and also the use of amino acids in addition to reducing drought stress is effective in improving yield. this experiment as a three-factor factorial with three replications was conducted at the field of research Ekbatan Station center of Agriculture and Natural Resources Research Hamedan during 2020-2021. The first factor was supplementary irrigation including four levels of planting, flowering, seed filling and without supplementary irrigation (rainfed), the second factor was on-farm priming of seeds and the third factor was foliar application of amino acids. Priming agent in two levels of on-farm priming (soaking in water for 10 hours before planting and surface drying of seeds) and without primer and amino acid foliar agent in three levels of the amino acid methionine, lysine at a concentration of 50 each Mg / L and pure water (control) spraying was performed. Foliar application time was in the clustering stage. The results of analysis of variance showed The triple effect of priming and irrigation and application of amino acids on carotenoids was significant at the level of 0.01%. In the case of chlorophyll a, and total chlorophyll, the dual effect of supplementary irrigation and foliar application of amino acids was significant at the level of 0.05 %.and for chlorophyll b, the dual effect of supplementary irrigation and foliar application of amino acids was significant at the level of 1%. In the case of chlorophyll a and total chlorophyll, the dual effect of treatment without irrigation * lysine amino acid has the highest level, In a way that lysine compared to methionine chlorophyll increased a by 1.4 % and total chlorophyll by 1.3 %. The results showed that the application of solutions at the time of grain filling, especially compared to the flowering stage, had the least effect on chlorophylls.

In the case of chlorophyll b, the lowest amount of irrigation occurred in the filling with pure water, and irrigation in the flowering stage, regardless of the type of foliar application, had a good effect on this type of chlorophyll and increased the chlorophyll b content by 7%.

Keywords: lysine, methionine, Carotenoids, chlorophyll a, chlorophyll b

تاثیر آبیاری تکمیلی، محلولپاشی اسیدهای آمینه و پرایمینگ مزرعهای بذر بر غلظتهای کلروفیل یک رقم گندم دیم

نرجس حجتی فهیم[1*]، محمد علی ابوطالبیان[2]، مهرداد چائیچی[3]

۱ دانشجوی دکتری اکولوژی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

۲دانشیارگروه زراعت، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان

۳ استادیار بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان

narjes.hojati@yahoo.com

چکیده

با توجه به عدم بارندگی مناسب و بهنگام در اراضی دیم استفاده از آبیاری تکمیلی میتواند در افزایش عملکرد و بهبود محصول نقش موثری داشته باشد و همچنین کاربرد اسیدهای آمینه نیز علاوه بر کاهش تنش خشکی در بهبود عملکرد موثر میباشد، استفاده از پرایمینگ مزرعهای نیز میتواند سبب جوانهزنی و استقرار بهتر گیاه شود. این آزمایش در سال زراعی ۱۴۰۰-۱۳۹۹ در مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات کشاورزی استان همدان و بصورت فاکتوریل سه عاملی در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. عامل اول آبیاری تکمیلی شامل چهار سطح کاشت، گلدهی، پر شدن دانه و بدون آبیاری تکمیلی (دیم) عامل دوم پرایمینگ مزرعه ای بذر و عامل سوم محلولپاشی آمینو اسید در نظر گرفته شد. عامل پرایمینگ در دو سطح پرایمینگ مزرعهای (خیساندن در آب به مدت ۱۰ ساعت قبل از کاشت و خشک کردن سطحی بذر) و بدون پرایم و عامل محلولپاشی آمینواسید در سه سطح اسید آمینه متیونین ، اسید آمینه لیزین هر کدام به غلظت ۵۰ میلیگرم در لیتر در مرحله خوشهدهی و پاشش آب خالص انجام شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر دو گانه آبیاری تکمیلی و مصرف امینو اسیدها در سطح پنج درصد بر روی کلروفیل a، کلروفیل کل و کلروفیل b، در سطح یک درصد معنیدار گردید. اثر سه گانه پرایمینگ وآبیاری تکمیلی و مصرف آمینو اسیدها بر مقدار کارتنوئید درسطح یک درصد معنیدار شد. در مورد کلروفیل a و کل اثر دو گانه تیمار بدون آبیاری در اسید آمینه لیزین دارای بیشترین سطح میباشد به نحوی که لیزین در مقایسه با متیونین کلروفیل a را به میزان ۱.۴ درصد و کلروفیل کل را ۱.۳ درصد افزایش داده است. نتایج نشان داد کاربرد محلولها در زمان پر شدن دانه به ویژه نسبت به مرحله گلدهی کمترین اثر بر کلروفیلها داشته است. در مورد کلروفیل b کمترین میزان در تیماردو گانه آبیاری در پرشدن با آب خالص حادث شده است و آبیاری در مرحله گلدهی بدون توجه به نوع محلولپاشی تاثیر خوبی بر این نوع کلروفیل داشته است و باعث افزایش ۷ درصدی میزان کلروفیل b شده است.

واژه های کلیدی: کارتنوئید، کلروفیلa، کلروفیل b، لیزین، متیونین

۱.مقدمه

گندم (Triticum aestivum L.) از غذاهای اصلی بشر محسوب شده نزدیک به ۳۵ درصد از جمعیت جهانی در جیره روزانه خود از آن استفاده میکنند (شوسترو همکاران، ۲۰۰۹.). پیش بینی میشود، بیشترین میزان تولید جهانی غلات در آسیا، آمریکای لاتین، آفریقا و اروپای شرقی رخ دهد (فائو و او ای سیدی، ۲۰۱۹). با افزایش سریع جمعیت تقاضا برای منابع زمین و آب در دسترس افزایش یافته و این احتمال وجود دارد که تغییرات اقلیمی باعث افزایش میزان و شدت وقوع خشکسالی در مناطق کشت گندم میشود (ترنبرد و همکاران، ۲۰۱۴). یکی از مهمترین فاکتورهای محدودکنندهی تولید محصول در بسیاری از مناطق دنیا خشکی است (پسیورا، ۲۰۰۷). شیوههای کشاورزی در مناطق خشک و نیمه خشک به سیستم آبیاری متکی است که کمبود آب را تکمیل میکند و در طول سال تولید مواد غذایی را حفظ میکند (رضوان و همکاران، ۲۰۱۷). آبیاری تکمیلی استفاده از آب باران به همراه کاربرد آبیاری میباشد (اویس و هاچوم، ۲۰۱۳). اویس و همکاران(۲۰۰۴) نشان دادند که در آبیاری تکمیلی با مصرف یک مترمکعب آب در هکتار عملکرد گندم ممکن است به طور متوسط ۲-۳ کیلوگرم بیشتر از شرایط دیم باشد. آمینواسیدها معمولا به صورت محلولپاشی در گیاهان مورد استفاده قرار میگیرند و موجب افزایش عملکرد میشوند (سوزا و همکاران، ۲۰۱۸). اخیراً کاربرد آمینواسیدها به عنوان محرک رشد گیاه توجه بسیاری از کشاورزان جهان را به خود جلب کرده است (الغمدی و همکاران، ۲۰۰۹). کلروفیلها از رنگیزههای مهم سیستم فتوسنتزی گیاه هستند و افزایش آنها میتواند موجب افزایش رشد گیاه شود. مطالعات نشان دادند که تحت تاثیر عوامل مختلف همچون تنشهای غیر زیستی که میزان کلروفیل کاهش پیدا میکند، رشد گیاهان نیز کاهش شدیدی نشان میدهد (حیدری و همکاران، ۲۰۱۲). لذا، کمبود آب باعث تجزیه کلروفیل گردیده و گلوتامات که پیش ماده کلروفیل و پرولین است در اثر این تنش به پرولین تبدیل شده و در نتیجه از محتوی کلروفیل کاسته میشود (لاولور و کورنیک، ۲۰۰۲).

کارتنوئیدها مولکول‌های ایزوپرونوئیدی هستند که از جمله آن‌ها می‌توان به لیکوپن، گزانتوفیل و بتاکاروتن اشاره نمود. در شرایط تنش خشکی این رنگیزه‌ها افزایش می‌یابند و به دلیل دارا بودن خاصیت آنتی اکسیدانی موجب حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن و در نتیجه مقاومت گیاه بر علیه تنش می‌شوند (جلیل و همکاران، ۲۰۰۹). کاروتنوئیدها از طریق فروکش کردن سریع وضعیت برانگیخته کلروفیل، حفاظت از فتوسیستم‌ها را در بافت‌های فتوسنتزی به عهده دارند. حفظ ساختار کاروتنوئید در شرایط تنش، به توانایی بخش غیرآنزیمی گیاه در حذف رادیکال‌های فعال اکسیژن اشاره می‌کند (باندی‌وپدهیای و بنرجی ، ۱۹۹۹).

سانچز- راینوز و همکاران (۲۰۱۸) بیان کردند تحت تیمارهای مختلف کمبود آب، میزان فتوسنتز، هدایت روزنه و فلورسانس کلروفیل بطور چشمگیری کاهش می‌یابد. بر همین اساس محققان بسیاری اثر منفی و کاهنده تنش خشکی را بر عملکرد و اجزای عملکرد، کلروفیل b و a، پروتئین و پرولین به اثبات رسانده‌اند (یدالهی و همکاران، ۱۳۹۳). دلوندی و همکاران(۲۰۱۳) نشان دادند، در مقایسه تنش خشکی بین مرحله آبستنی و مرحله گرده افشانی، تنش آب در مرحله گردهافشانی باعث کاهش عملکرد محصول به میزان زیادی شده است. اسیدهای آمینه القاکننده تشکیل بافت گیاهی و بیوسنتز کلروفیل بوده، پیشساز برخی از هورمونهای گیاهی میباشند و از طریق افزایش غلظت کلروفیل در گیاه و بهبود فرآیند فتوسنتز باعث افزایش رشد گیاه میشوند (امین و همکاران، ۲۰۱۱) و در نهایت افزایش رشد گیاه میشوند (ال قمری و همکاران، ۲۰۰۹). اکرم و همکاران(۲۰۲۰) نشان دادند، استفاده از محلولپاشی اسید امینه ال-متیونین تاثیر معنی‌داری بر روی رنگدانه‌های کلروفیل در

کدوی تلخ نداشت همچنین روند مشابهی در رنگدانه‌های کلروفیل در گیاهان پیاز توسط الووادی و الواهد (۲۰۱۲) و امین و همکاران(۲۰۱۱) و در کلم بروکلی توسط شکاری وجوانمردی (۲۰۱۷)نشان داده شد.آمینواسیدها با نقشی که در افزایش غلظت کلروفیل و بهبود فرایند فتوسنتز دارند، مقدار کربوهیدراتها که به عنوان مخازن انرژی گیاه شناخته میشوند را افزایش میدهند (ریو و همکاران، ۲۰۰۸). ما در این آزمایش برانیم تا تاثیر آبیاری تکمیلی و پرایمینگ مزرعهای بذر به همراه محلولپاشی اسیدهای آمینه را بر روی غلظتهای کلروفیل و عملکرد یک رقم گندم دیم مورد بررسی قرار دهیم.

۲.مواد و روشها

به منظور بررسی تاثیر آبیاری تکمیلی و پرایمینگ مزرعهای به همراه محلولپاشی اسیدهای آمینه بر غلظت کلروفیلها و عملکرد محصول آزمایشی در سال زراعی ۱۴۰۰-۱۳۹۹ در مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات کشاورزی استان همدان و بصورت فاکتوریل سه عاملی در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. عامل اول آبیاری تکمیلی شامل چهار سطح کاشت، گلدهی، پر شدن دانه و بدون آبیاری تکمیلی (دیم) عامل دوم پرایمینگ مزرعهای بذر و عامل سوم محلولپاشی آمینو اسید در نظر گرفته شد. عامل پرایمینگ در دو سطح پرایمینگ مزرعهای (خیساندن در آب به مدت ۱۰ ساعت قبل از کاشت و خشک کردن سطحی بذر) و بدون پرایم و عامل محلولپاشی آمینواسید در سه سطح اسید آمینه متیونین، اسید آمینه لیزین هر کدام به غلظت ۵۰ میلیگرم در لیتر در مرحله خوشهدهی و پاشش آب خالص انجام شد. در زمان پر شدن دانه، با استفاده از برگ و بیوماس هوایی ۱۰ بوته از هر کرت میزان کلروفیل a و bو کارتنوئید طبق روش آرنون (۱۹۶۷)، با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موجهای ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر اندازهگیری شد. پس از جمعآوری دادهها تجزیه آماری لازم با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد.

۳.بحث و نتایج

نتایج تجزیه واریانس(جدول ۱) نشان داد که در میان سه عامل مورد بررسی، تنها اثر اصلی آبیاری تکمیلی بر روی میزان کلروفیلها موثر شد. همچنین اثر دو گانه آبیاری تکمیلی و مصرف امینوآسیدها در سطح پنج درصد بر روی کلروفیل a، کلروفیل کل و کلروفیل b، در سطح یک درصد معنیدار گردید. اثر سه گانه پرایمینگ وآبیاری تکمیلی و مصرف آمینواسیدها بر مقدار کارتنوئید درسطح یک درصد معنیدار شد.

جدول۱: تجزیه واریانس تاثیرتیمارهای آبیاری تکمیلی، اسیدهای آمینه و پرایمینگ

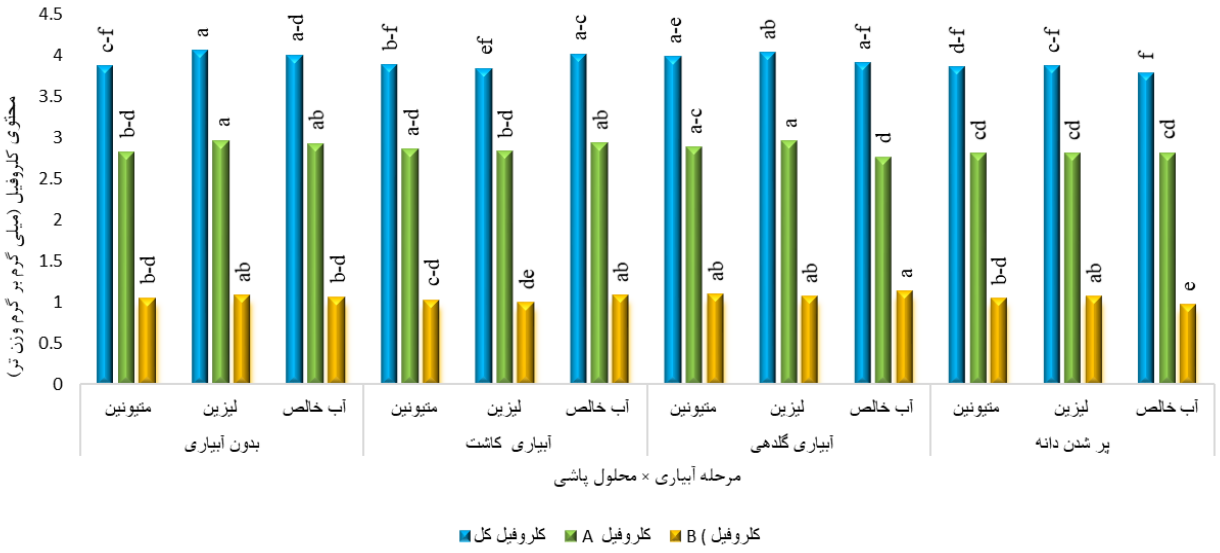
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		کلروفیل A	کلروفیل B	کلروفیل کل	کارتنوئید
بلوک	۲	۰/۰۱۹ ns	۰/۰۱۷ **	۰/۰۷ *	۰/۰۶ ns

پرایمینگ	۱	۰/۰۱۲^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۳ ^{ns}	۰/۰۱۱ ^{ns}	۰/۰۶۹^{ns}
آبیاری تکمیلی	۳	۰/۰۳۱*	۰/۰۲۳**	۰/۰۸**	۰/۰۷^{ns}
آمینواسید	۲	۰/۰۱۳ ^{ns}	۰/۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۱۵ ^{ns}	۰/۱۶ ^{ns}
پرایمینگ× آبیاری تکمیلی	۳	۰/۰۱ ^{ns}	۰/۰۰۲^{ns}	۰/۰۱۸ ^{ns}	۰/۲۷ ^{ns}
پرایمینگ× مصرف آمینو اسید	۲	۰/۰۰۲ ^{ns}	۰/۰۰۵^{ns}	۰/۰۰۷ ^{ns}	۰/۲۴^{ns}
آبیاری تکمیلی × مصرف آمینو اسید	۶	۰/۰۲۸*	۰/۰۱۲**	۰/۰۴۳ *	۰/۲۸*
پرایمینگ× آبیاری تکمیلی× مصرف آمینواسید	۶	۰/۰۱۸ ^{ns}	۰/۰۰۵ ^{ns}	۰/۰۳۹ ^{ns}	۰/۳۶**
خطا	۴۶	۰/۰۱	۰/۰۰۳	۰/۰۱۸	۰/۱۱
ضریب تغییرات(درصد)	-	۳/۴	۴/۸	۳/۵	۱۵/۱۱

ns، **، *: به ترتیب بیانگر عدم اختلاف معنیدار و اختلاف معنیدار در سطوح احتمال پنج و یک درصد میباشند.

در مورد کلروفیل a ترکیب تیماری آبیاری گلدهی× اسپری آب خالص، میزان کمتری نسبت به آبیاری در زمان گلدهی× لیزین و همچنین ترکیب بدون آبیاری× لیزین و بدون آبیاری× آب خالص ایجاد کرده است که نشان دهنده این است که لیزین در ساخت کلروفیل تاثیر گذار است. نتایج نشان داد کاربرد محلولها در زمان پر شدن دانه به ویژه نسبت به مرحله گلدهی کمترین اثر بر کلروفیلها داشته است. در مورد کلروفیل b کمترین میزان در تیماردو گانه آبیاری درمرحله پرشدن با آب خالص حادث شده است و آبیاری در مرحله گلدهی بدون توجه به نوع محلولپاشی تاثیر خوبی بر این نوع کلروفیل داشته است.

اما آبیاری در زمان کاشت × اسپری با آب خالص کلروفیل b و کلروفیل کل را بطور معنیداری نسبت به آبیاری در زمان کاشت با دو اسیدآمینه دیگر لیزین و متیونین زیاد کرده است، به نظر میرسد آبیاری در هنگام کاشت، سبب استقرار سریعتر بوته شده است و احیانا کاربرد لیزین و متیونین در مرحله خوشهدهی سبب تغییر مسیر مواد فتوسنتزی به سمت خوشه شده و لذا ترکیبات برگی و کلروفیلها کاهش بیشتری یافته است. در مورد تفاوت بین متیونین و لیزین تنها در شرایط بدون آبیاری دیده شد که کلروفیل a و کلروفیل کل با محلول پاشی لیزین بیشتر از محلولپاشی متیونین شده است که حاکی از سودمندتر بودن لیزین است. سونگ و همکاران (۲۰۰۴) نیز بیان داشتند، لیزین در تنظیم باز شدن روزنههای برگ، ساخت کلروفیل و جوانهزنی دانه گرده نقش دارد که این موارد میتواند نقش مهمی را در تحمل به تنش درگیاهان ایفا کند. محلولهای اسیدآمینه خود به عنوان ترکیبات آنتیاکسیدانی و یا القا سیستم آنتیاکسیدانی گیاه از شدت تخریب کلروفیل a میکاهند. برخی مطالعات نیز نشان داده اند که آمینواسیدها از طریق افزایش فعالیت آنزیمهای آنتیاکسیدانت و حذف گونههای فعال اکسیژن باعث حفظ استحکام غشای سلولی از خسارت اکسیداتیو ناشی از تنش میشوند (ری، ۲۰۰۲).



شکل۱: مقایسه میانگین اثرات مرحله آبیاری تکمیلی * محلولپاشی اسیدهای آمینه بر کلروفیلها

سانچز- راینوز و همکاران (۲۰۱۸) بیان کردند تحت تیمارهای مختلف کمبود آب، میزان فتوسنتز، هدایت روزنه و فلورسانس کلروفیل بطور چشمگیری کاهش می‌یابد. اکرم و همکاران (۲۰۲۰)نشان دادند، محلول پاشی ال-متیونین تاثیر معنیداری بر روی رنگدانههای کلروفیل در کدوی تلخ نداشت. روند مشابهی در رنگدانههای کلروفیل در گیاهان پیاز توسط الووادی و الواهد (۲۰۱۲) و امین و همکاران (۲۰۱۱) و در کلم بروکلی توسط شکاری وجوانمردی (۲۰۱۷). مشاهده شد. افزایش در میزان رنگیزههای فتوسنتزی (کلروفیل a، b و کارتنوئید) باعث فتوسنتز بیشتر در گیاه میشود در نتیجه گیاهان از رشد بهتر و ماده خشک بالاتری برخوردار میشوند. افزایش مواد فنولی و میزان کارتنوئیدها بطور قابل ملاحظهای فعالیت آنتیاکسیدانی را افزایش دادند. فعالیت آنتیاکسیدانی موثر در گیاه از صدمه به ساختارهای سلولی جلوگیری میکند و موجب انجام موثر فرایندی شیمیایی در سلول میشود.

بیشترین میزان کارتنوئید (جدول ۲) در تیمار ترکیبی عدم پرایمینگ مزرعه ای × آبیاری هنگام کاشت × عدم آبیاری و عدم کاربرد محلولهای لیزین و متیونین حاصل شد که نشان دهنده تنش بالا در این تیمارها میباشد. به عبارت دیگر پرایمینگ مزرعهای در کنار محلولپاشی هر دو اسید آمینه سبب کاهش احساس تنش در گیاه و در نتیجه کاهش مقدار کارتنوئید شده است.گروپا و بین ویدس (۲۰۰۸) بیان نمودند که در ابتدای تنش‌های محیطی میزان سنتز کاروتنوئید در برگ گیاهان به علت نقش آن در حفاظت در مقابل رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد. اما با گذشت زمان و تطابق گیاه با تنش از میزان آن کاسته می‌شود. که دلیل پایین بودن مقدار کارتنوئید در ترکیب تیماری بدون پرایم، آبیاری در زمان پر شدن دانه و عدم کاربرد اسید آمینه (اسپری آب خالص) میتواند مطرح باشد. گروپا و بین ویدس (۲۰۰۸) نیز گزارش کردند که همزمان با اعمال تنش شدید خشکی میزان رنگدانه‌های کلروفیلی و کاروتنوئیدها کاهش یافت.

۴.نتیجهگیری

نتایج بدست آمده نشان داد، اسیدآمینه لیزین در ساخت کلروفیل تاثیر گذارتر است. کاربرد محلولها در زمان پر شدن دانه به ویژه نسبت به مرحله گلدهی کمترین اثر بر کلروفیلها را داشته است. همچنین آبیاری در مرحله گلدهی بدون توجه به نوع محلولپاشی تاثیر خوبی بر کلروفیل b داشته است. اما در آبیاری زمان کاشت، اسپری با آب خالص کلروفیل b و کلروفیل کل را بطور معنیداری نسبت به دو محلول لیزین و متیونین زیاد کرده است، به نظر میرسد آبیاری در هنگام کاشت، سبب استقرار

تیمارهای بکار رفته	بدون آبیاری			آبیاری در زمان کاشت			آبیاری در زمان گلدهی			آبیاری در زمان پر شدن دانه		
	متیونین	لیزین	آب خالص	متیونین	لیزین	آب خالص	متیونین	لیزین	آب خالص	متیونین	لیزین	آب خالص
پرایم شده	۲/۱۲$^{b-e}$	۲/۱۲$^{b-e}$	۲/۱۲$^{b-e}$	۲/۱۸$^{a-d}$	۲/۰۳$^{c-e}$	۲/۲۴$^{a-d}$	۲/۲۲$^{a-d}$	۲/۲۲$^{a-d}$	۲/۲۲$^{a-d}$	۲/۱۵$^{b-e}$	۲/۱۵$^{b-e}$	۲/۱۵$^{b-e}$
پرایم نشده	۱/۹۸^{de}	۱/۹۸^{de}	۱/۹۸^{de}	۲/۷۳^{a}	۲/۷۳^{a}	۲/۷۳^{a}	۱/۹۲^{de}	۱/۹۲^{de}	۱/۹۲^{de}	۱/۹۲^{de}	۱/۹۲^{de}	۱/۹۲^{de}

سریعتر بوته شده است. همچنین پرایمینگ مزرعهای در کنار محلولپاشی هر دو اسید آمینه سبب کاهش احساس تنش در گیاه و در نتیجه کاهش مقدار کارتنوئید شده است.

جدول۲:مقایسه میانگین اثرات پرایمینگ×آبیاری تکمیلی × اسیدهای آمینه برکارتنوئیدها

منابع

۱. یدالهی ده چشمه، پ.، اصغری پور، م.ر.، خیری، ن. و قادری، ا. ۱۳۹۳ (الف). اثر تنش خشکی و کودهای آلی بر. عملکرد روغن و ویژگی های بیوشیمیایی گلرنگ. نشریه تولید گیاهان روغنی ۱ (۲): ۲۷-۴۰.

2. Akram, N, A. Hania, U. Ashrafa, M. Ashrafb, M. Sadiqa, M. 2020. Exogenous application of L-methionine mitigates the drought-induced oddities in biochemical and anatomical responses of bitter gourd (*Momordica charantia* L.). Scientia Horticulturae. 10.1016
3. Al-Ghamdi, A.A. 2009. Evaluation of oxidative stress tolerance in two wheat (*Triticum aestivum*) cultivars in response to drought. Int. J. Agric. Biol. 11 (1), 7–12.
4. Amin A. A., A. E. F. Gharib, M. El-Awadia, and E. S. M. Rashad. 2011. Physiological response of onion plants to foliar application of putrescine and glutamine. Sci. Hortic. 129: 353–360.
5. Bandyopadhyay, U., Das, D., Banerjee, R.K. 1999. Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. Current Science India, 77: 658-666.

6. Costa A, Bakhtiari B, Schuster S, Paris J. 2009. Integration of absorption heat pumps in a Kraft pulp process for enhanced energy efficiency. Energy 34(3):254–260
7. Dalvandi, G., Ghanbari-Odivi, A., Farnia, A., Khaliltahmasebi, B., Nabati, E. 2013. Effects of drought stress on the growth, yield and yield components of four wheat populations in different growth stages. Adv. Environ. Biol. 19, 277–281
8. El-Awadi, E.M., El-wahed, S.A., 2012. Improvement the growth and quality of green onion (*Allium cepa* L.) plants by some bio-regulators in the new reclaimed area at Nobaria region, Egypt. N. Y. Sci. J. 5 (9), 114–120.
9. El-Ghamry, A. M., K.M. Abd El-Hai and K. M. Ghoneem. 2009. Amino and humic acids promote growth, yield and disease resistance of faba bean cultivated in clay soil. Aust. J. Basic Appl. Sci. 3:731–739.
10. Groppa, M.D., Benavides, M.P. 2008. Polyamines and abiotic stress: recent advances. Amino Acids, 34:35–45.
11. Heidari, M. and Golpayegani, A. 2012. Effects of water stress and inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on antioxidant status and photosynthetic pigments in basil (*Ocimum basilicum* L.). Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences 11, 57-61.
12. Jalili, F., Khavazi, K., Pazira, E., Nejati, A., Asadi- Rahmani, H., Rasuli Safaghiani, H., Miransari, M. 2009. Isolation and characterization of ACC deaminase- producing fluorescent pseudomonads, to alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus* L.) growth. *Journal Plant Physiology*,166: 667- 674.
13. Lawlor, D.W. and Cornic, C. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. Plant Cell Environment 25, 275–291.
14. OECD-FAO AGRICULTURAL OUTLOOK 2019-2028 © OECD/FAO 2019
15. Oweis, T., A. Hachum. 2013. Water harvesting and supplemental irrigation For improvedwater use efficiency in dry areas. SWIM. Paper NO 7.
16. Oweis, T. and A. Hachum. 2004. Water harvesting and supplemental irrigation for improved water productivity fordry farming systems in West Asia and North Africa. ICARDA. Aleppo. Syria for Presentation at the 4thInternational Crop Science Congress 26 Sept. to 1 Oct.
17. Passioura J.B. 2007. The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives. Journal of Experimental Botany, 58(2): 113-117.
18. Rahbarian, R., R. Khavari-nejad, A. Ganjeali, A. R. Bagheri, and F. Najafi. 2011. Drought stress effects on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and water. Acta Biological Cracoviensa Botanica. 53: 47-56
19. Rai, V. K. 2002. Role of amino acids in plant responses to stresses. Biol. Plantarum. 45: 481-487.
20. Reeve, J. R., J. L. Smith, L. Carpenter-Boggs and J. P. Reganold. 2008. Soil based cycling and differential uptake of amino acids by three species of strawberry (Fragaria spp.) plants. Soil. Biol. Biochem. 40:2547-2522.
21. Rizwan, M., Ali, S., Hussain, A., Ali, Q., Shakoor, M.B., Zia-ur-Rehman, M., Farid, M., Asma, M. 2017b. Effect of zinc-lysine on growth, yield and cadmium uptake in wheat (*Triticum aestivum* L.) and health risk assessment. Chemosphere 187, 35-42.
22. Sanchez-reinoso, A.D., Ligarreto-Moreno, G.A., Restrepo-Diaz, H. 2018. Physiological and biochemical expressions of a determinated growth common bean genotype (*Phaseolus vulgaris* L.) to water deficit stress periods. Journal. Anim. Plant Science. 28 (1), 119–127.
23. Schuster,. M , and Greenberg., EP. 2006. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in Pseudomonas aeruginosa. Int J Med Microbiol 296:73–81
24. Shekari, G., and Javanmardi, J. 2017. Effects of foliar application pure amino acid and amino acid containing fertilizer on broccoli (*Brassica oleracea* L. var. italica) transplants. Adv. Crop Sci. Technol. 3 (5), 1–4.
25. Song, J. Lu, T., H. and Greenberg., J. T. 2004. Divergent roles in Arabidopsis thaliana development and defense of two homologous genes, aberrant growth and death2 and AGD2-LIK DEFENSE RESPONSE PROTEIN1, encoding novel aminotransferases. Plant Cell.16: 353-366.
26. Souzaa., J.A. Fratonia ., M. M. J. Moraesb ., L. A. C and Moreirab., A. 2018. Boron and Amino Acid Foliar Application on Wheat-Soybean Intercropping in a Non-Tillage System. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 0010-3624.
27. Trenberth KE, Dai AG, van der Schrier G, Jones PD, Barichivich J, Briffa KR, Sheffield J. 2014. Global warming and changes in drought. Nature Climate Change 4, 17–22.
28. Yan, H., L. Z. Gang, C. Y. Zhao, and W. Y. Guo. 2000. Effects of exogenous proline on the physiology of soyabean plantlets regenerated from embryos in vitro and on the ultrastructure of their mitochondria under NaCl stress. Soybean Sci. 19: 314–319.

New technologies for the use of plants in the manufacture of oral vaccines

Zeinab Chaghakaboodi[1*], Leila Akbari[2]

1,2- Assistant Professor, Department of Plant Production Engineering and Plant Genetic, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah.

Corresponding author Email: Z.chaghakaboodi@razi.ac.ir

Abstract

Subunit vaccines are commercially produced in bacteria, yeast, or stem cells. With advances in genetic engineering in higher plants, efforts have been made to add transgenic plants to this list. The production of protein antigens in plants is cheaper and safer than their production in bacteria, fungi, insect cell cultures, and mammalian cell cultures and plant-produced proteins are similar in action to conventional vaccines and can induce the production of neutralizing antibodies in mammalian hosts. In all protein subunit vaccines, the prerequisite for vaccine production is the identification of an appropriate antigen with a specific ability to produce immunity. This protein must be present at an appropriate level in selected plants to provide an adequate dose of the antigen orally to stimulate the immune system. Therefore, in order to produce recombinant protein as a bioreactor, it is necessary to select a plant that has a high level of antigen expression and can be manipulated in a practical and practical way for oral delivery of the vaccine. In the next stage, the vaccine should be evaluated in clinical phases and on model animals and humans, and on the other hand, the long-term stability of the antigen during the storage and supply of the vaccine should be evaluated.

Keywords: Antigen, Vegetable protein, Molecular farming

فناوری های نوین استفاده گیاهان در ساخت واکسن های خوراکی

زینب چقاکبودی [۱*]، لیلا اکبری [۲]

۱و ۲-استادیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی، کرمانشاه

Email: z.chaghakaboodi@razi.ac.ir

چکیده

واکسن‌های زیرواحدی بصورت تجاری در باکتری‌ها، مخمر یا سلول‌های مادری تولید می‌شوند. با پیشرفت مهندسی ژنتیک در گیاهان عالی تلاش‌هایی برای اضافه کردن گیاهان تراریخته به این فهرست انجام شده است. تولید آنتی‌ژن‌های پروتئینی در گیاهان نسبت به تولید آنها در باکتریها، قارچها، کشت‌های سلولی حشرات و کشت‌های سلولی پستانداران ارزانتر و ایمن‌تر بوده و پروتئین تولید شده در گیاهان از نظر عمل مشابه واکسنهای مرسوم می‌باشند و می توانند تولید آنتی بادیهای خنثی کننده را در میزبانهای پستاندار القاء کنند. در همه واکسن‌های زیرواحدی پروتئینی، پیش نیاز تولید واکسن، شناسایی یک آنتی ژن مناسب با توانایی ویژه برای ایجاد ایمنی می‌باشد. این پروتئین باید در گیاهان منتخب در سطح مناسبی تظاهر یابد، تا انتقال دوز مناسب و کافی از آنتی‌ژن را بصورت خوراکی برای تحریک سیستم ایمنی فراهم کند. بنابراین، برای تولید پروتئین نوترکیب به عنوان بیوراکتور لازم است گیاهی انتخاب شود که تظاهر آنتی‌ژن در آن در حد بالا باشد و بتواند بصورت کاربردی و عملی برای تحویل خوراکی واکسن دست ورزی شود. در مرحله بعد واکسن باید در فازهای کلینیکی و بر روی حیوانات مدل و انسان مورد ارزیابی قرار گرفته و از سوی دیگر پایداری طولانی مدت آنتی‌ژن در مدت ذخیره و عرضه واکسن نیز باید بررسی شود.

کلمات کلیدی: آنتی ژن، پروتئین گیاهی، زراعت مولکولی

۱.مقدمه

۱-۱-کشاورزی مولکولی

تولید پروتئین نوترکیب از طریق گیاهان را زراعت مولکولی می‌گویند. گیاهان از گزینه‌های رایج در تولید آنتی‌ژن و پروتئین‌های نوترکیب هستند. زراعت مولکولی با دارا بودن توان تولید پروتئین‌های مهم نوترکیب و دارویی در گیاهان، پتانسیل زیادی در تولید پروتئین‌های مختلف نوترکیب، واکسن‌ها، فاکتورهای رشد و آنزیم‌ها دارد (Shanmugaraj et al., 2020). همچنین می‌توان بافت یا اندام خاصی از گیاه را که حاوی پروتئین نوترکیب مورد نظر است، به صورت خوراکی مصرف کرد. برخی از پروتئین های تولید شده در گیاهان در جدول (۱) اورده شده است.

جدول ۱: برخی پروتئین های تولید شده در گیاهان (Park and Wi, 2016).

پروتئین نوترکیب	کاربرد	گیاه میزبان	مرحله تولیدی	شرکت تولید کننده
واکسنH5N1	واکسن آنفلوانزاH5N1	توتون	فازI	Medicago, USA
آنتی بادی علیه هپاتیتB	تخلیص واکسن	توتون	تجاری شده	CIGB
اینترفرون آلفا	درمان هپاتیت B وC	عدس آبی	فازII	Biolex
انسولین	درمان دیابت	گلرنگ	تکمیل فازIII	SemBioSys
فاکتورهای رشد	مکمل محیط کشت سلولی	جو	تجاری شده	ORF
آلفا آمیلاز	آنزیم صنعتی	ذرت	تجاری شده	Syngenta
کلاژن	معرف تحقیقاتی	توتون	تجاری شده	CollPlant
تریپسین و آویدین	آنزیم صنعتی	ذرت	تجاری شده	ProdiGene
لاکتوفرین و لیزوزیم	ضد عفونت و ضد التهاب	برنج	تجاری شده	Ventria
فیتاز	افزودنی غذایی	ذرت	تجاری شده	Origin Agritech

به کمک تولید انبوه در گیاهان، خطرات ناشی از آلودگی با عوامل بیماریزای انسان به خصوص بیماری‌های مشترک نیز کاهش می‌یابد (Daniell et al., 2001). با وجود همه مزایایی که استفاده از گیاهان به عنوان میزبان در جهت تولید پروتئین نوترکیب دارد، اما میزان کم بیان پروتئین نوترکیب به خصوص در بیان هسته‌ای سبب شده است که برای غلبه بر این محدودیت تولید کلروپلاستی پروتئین نوترکیب در نظر گرفته شود (Gorantala et al., 2014) و با توجه به اینکه استفاده از سیستم گیاهی مزایایی نسبت به سایر میزبان‌ها دارد، می‌توان پروتئین‌های نوترکیب را در گیاهان به نحوی تولید کرد که پروتئین‌های سنتز شده به اندامک‌های سلولی هدایت و یا حتی مستقیماً در اندامک‌های خاصی (مانند کلروپلاست) بیان شوند (Daniell et al., 2001).

۱-۲-سیستم‌های زراعت مولکولی

سه روش رایج برای تولید پروتئین‌ها در گیاهان عبارتند از: ۱) تراریزش پایدار هسته‌ای گونه‌های زراعی که در مزرعه و یا گلخانه کشت داده خواهند شد، ۲) تراریزش پایدار پلاستیدی، ۳) تراریزش گذرای یک محصول زراعی.

۱-۳-تراریزش پایدار ژنوم هسته‌ای

عمده تحقیقات مهندسی ژنتیک بر روی انتقال پایدار به ژنوم هسته‌ای متمرکز شده و محصولات موجود در بازار از این طریق تولید شده‌اند. این سیستم نیازمند روشی برای انتقال ژن‌های خارجی به درون سلول‌های گیاهی است که عمدتا از طریق *Agrobacterium tomefasiance* و یا بمباران ذره‌ای[۴۰۳] انجام می پذیرد (Daniell et al, 2002). برای انتقال ژن به گیاه، ژن مورد نظر در یک ناقل دوگانه[۴۰۴] کلون می‌شود که می‌تواند در اشرشیاکلای[۴۰۵] و آگروباکتری استفاده شود. آگروباکتری تراریخت ژن هدف را به ژنوم سلول میزبان وارد می‌کند و پس از انتقال ژن، سلول‌هایی که نسخه‌هایی از ژن هدف در آنها وارد شده است با کمک ژن نشانگر انتخاب می‌شوند (Daniell et al, 2002). با استفاده از این روش چنانچه یک محصول دانه دار تحت تراریزش قرار بگیرد محصول بصورت طبیعی در بذر انباشته می‌شود که می‌توان آن را برداشت کرده و تا زمان استفاده در شرایط خشک نگهداری کرد. به عنوان مثال، بذر خشک ذرت رطوبتی حدود ۱۵-۱۱٪ دارد و در آن سطح از رطوبت بذر از لحاظ متابولیکی خنثی است. بنابراین با نگهداری طولانی مدت در شرایط غیر یخچالی، پروتئین‌ها بدون تخریب تا حدود دو سال باقی می مانند. این بذرها بدون نیاز به یخچال می‌توانند به مقصدهای مختلف فرستاده شوند. مزیت دیگر استفاده از این روش این است که مزارع بزرگ با کمترین قیمت می‌توانند مورد استفاده قرار بگیرند. از آنجاییکه محصولاتی مانند برنج و ذرت در سراسر جهان کشت می‌شوند، بنابراین چنانچه برای تولید پروتئین‌ها مورد تراریزش قرار بگیرند، در سطح تجاری می‌توانند مطرح شوند (Daniell et al, 2001).

اما این روش معایبی نیز دارد به عنوان مثال محصولاتی مانند ذرت، قابلیت آمیزش با گونه‌های بومی و خویشاوند را دارند. فن آوری‌هایی وجود دارند که با استفاده از آنها می‌توان از این آمیزش جلوگیری کرد مانند نرعقیمی ژنتیکی. اما چنین تکنولوژی‌هایی عمدتا منجر به افزایش هزینه‌ها می‌شود و در مواردی نیز نا کارآمد هستند.

۱-۴-راریزش پلاستیدی

ژن مورد نظر را می‌توان به ژنوم پلاستیدها نیز منتقل کرد. در یک سلول بالغ برگی بیش از ۱۰۰ نسخه کلروپلاست وجود دارد و هر کلروپلاست در حدود ۱۰۰ نسخه ژنوم دارد، پس در هر سلول بیش از ۱۰۰۰۰ نسخه ژنوم وجود خواهد داشت که این امر سبب می‌گردد که ژن‌های کلروپلاستی بیانی تا ۳۵٪ کل پروتئین‌های محلول برگ را داشته باشند. بنابراین چنانچه DNA نوترکیب در ژنوم کلروپلاست درج گردد، پتانسیل تولید مقادیر بالایی از پروتئین‌های محلول را خواهد داشت و درضمن به دلیل وراثت مادری کلروپلاست‌ها، ژن‌های موجود در آنها در دانه گرده وجود نداشته و در نتیجه نگرانی‌های مرتبط با دگر گرده افشانی و ایمنی زیستی از بین می‌رود. این ویژگی آینده این فن‌آوری را بسیار درخشان نموده است. اما با این حال به دلیل محدودیت این اندامک برخی از تغییرات پس از ترجمه مثل قنددار شدن به خوبی صورت نمی‌گیرد و یا اینکه مثل باکتری‌ها تولید اجسام پروتئینی می‌کند که البته طی خالص سازی ممکن است دوباره شکل مناسب خود را پیدا کنند. با این حال این روش نیز برای تولید مقادیر کم پروتئین در حد زیر گرم در اولین بار به زمانی در حدود ۱۲ تا ۱۸ ماه نیاز دارد (Daniell et al, 2001).

[403] Particle bombardment
[404] Binary Vector
[405] Eschershia Coli

۱-۵- تراریزش گذرا[۴۰۶]

در کنار دو روش انتقال پایدار که امروزه به طور متداولی اســتفاده می‌شــود روش انتقال موقت با واســطه اگروباکتری، ناقلین ویروسی و تفنگ ژنی نیز وجود دارد. در هر سه مورد انتقال بصورت موقت توسط ناقل (ویروس یا باکتری) و یا به طور مستقیم انجام می‌شود و نیازی به ایجاد گیاه کامل تراریخت نیز وجود ندارد.

بیان گذرای ژن در گیاهان نسبت به تولید یک گیاه تراریخت که بطور پایدار ترانسفرم شده، چندین مزیت دارد. تراریزش گذرا سریع است و در نتیجه بیان وتولید پروتئین را می‌توان ظرف چند روز مشاهده کرد بنابراین به نظر می‌رسد این نوع بیان برای زمانی مناسب است که بخواهیم ثابت کنیم محصول ژن کاربردی و با ثبات است. قبل از این که روی تولید انبوه این محصول از طریق کشت گیاه تراریخت کار کنیم. تولید گیاه تراریخت که بطور پایدار تراریخت شده باشد، نیاز به امکانات و تجهیزات قابل ملاحظه‌ای دارد و زمان زیادی هم قبل از امکان آنالیز پروتئین بیان شده صرف می‌شود. در عوض، سیستم‌های بیان گذرای ژن سریع و انعطاف پذیرند و از اثرات موقعیتی[۴۰۷] که به طور بالقوه روی سطح بیان ژن اثر می‌گذارند، تاثیر نمی‌پذیرد (Fischer et al, 2004).

در انتقال موقت ژن درج کروموزومی پایداری وجود ندارد و بیان پروتئین طی چند روز امکان پذیر است. سه رویکرد کلی برای بیان گذرا وجود دارد:

۱) انتقال DNA عریان از طریق بمباران ذره‌ای.
۲) تلقیح با ناقلین ویروسی تغییر یافته.
۳) نفوذ اگروباکتری نوترکیب به بافتهای گیاهی (اگرو اینفیلتراسیون)[۴۰۸].

۱-۶- بمباران ذره‌ای

در بمباران ذره‌ای معمولا DNA به تعداد اندکی سلول منتقل می‌شود و DNA برای رونویسی در هسته جایابی می‌شود. روش تفنگ ژنی برای بررسی پایداری پروتئین نوترکیب قبل از انتقال ژن پایدار گیاه استفاده می‌شود ولی روش مناسبی برای بیان مقادیر زیاد پروتئین خارجی نیست.

۱-۷-تلقیح با ناقلین ویروسی تغییر یافته

یک ناقل ویروسی به طور سیستمیک اغلب سلول‌های موجود در یک گیاه را آلوده می‌کند و رونویسی ژن داخل شده در RNA ویروس همزمان با رونویسی RNA ویروسی در سیتوپلاسم صورت می‌گیرد و بصورت مقطعی و گذرا تعداد بسیار زیادی رونوشت از ژن مورد نظر تولید می‌شود. در روش استفاده از وکتورهای ویروسی محصولی در حدود یک تا سه گرم درهر یک کیلوگرم برگ گیاه است.

۱-۸-آگرو اینفیلتریشن

406 Transient expression
407 Positional effect
408 Agroinfiltration

اگروواینفیلتریشن در واقع وارد کردن اگروباکتریوم حاوی ناقل مورد نظر به بافت برگ سالم از طریق نفوذ تدریجی تحت خلأ است. با ورود باکتری به سلول برگ پروتئین‌های باکتریایی انتقال ژن مورد نظر به سلول‌های میزبان را امکانپذیر می‌کنند و بیان پروتئین را تقریبا سه روز بعد از نفوذ می‌توان تشخیص داد. همانند روش‌های متداول تولید گیاه تراریخت، ژن مورد نظر در یک ناقل دوگانه کلون می‌شود و این ناقل به سویه مناسب اگروباکتریوم انتقال می‌یابد. در این روش در واقع اگروباکتریوم‌ها از محصولات ژنی باکتریایی برای انتقال مؤثر DNA به سلول گیاه استفاده می‌کنند برخلاف تولید گیاهان تراریخت، هیچ روش انتخاب و غربالگری[۴۰۹] برای تشخیص سلول‌های انتقال یافته مورد نیاز نیست زیرا تنها بافت برگ برای تولید پروتئین به کار می‌روند این امر موجب می‌شود که بتوان از ناقل‌های پلاسمیدی کوچکتر هم استفاده نمود. اعتقاد بر این است که تی دان آی[۴۱۰] انتقال یافته به سلول گیاه نمی‌تواند به کروموزوم میزبان وارد شود اما در هسته قرار می‌گیرد جایی که باید رونویسی شود و این منجر به بیان گذرای ژن مورد نظر می‌شود. یک مزیت عمده این تکنیک این است که ژن‌های چندگانه می‌توانند در جمعیت‌های مختلف اگروباکتری بیان شوند. بنابراین جفت و جور شدن[۴۱۱] پروتئین‌های پیچیده چند واحدی را می‌توان درگیاه بررسی نمود. در مورد گیاهان تراریخت این امر فقط از طریق آزمایشات بسیار وقت‌گیر آمیزش رده‌های تراریخت منفرد با یکدیگر که هر کدام ترکیب خاصی از زیرواحدها را بیان می‌نمایند، امکان پذیر است. در اگروواینفیلتریشن تعداد بسیار بیشتری سلول در مقایسه با روش بمباران ذره‌ای مورد هدف قرار می گیرند و ناحیه تی DNAی که ژن مورد نظر را در بردارد، به طور فعال و به کمک چندین پروتئین وارد هسته سلول می‌شود (Fischer et al, 2004).

یکی از ویژگی‌های بارز انتقال موقت، سرعت بالای تولید در این سیستم است به گونه ای که طی تقریبا سه تا چهار روز در برگ‌های اینفیلتره و ۱۰ تا ۱۴ روز در برگهای آلوده شده با ویروس تظاهر پروتئین به وقوع خواهد پیوست.

۱-۹-مقایسه سه روش انتقال موقت

سطح انتقال ژن در این سه نوع سیستم با هم متفاوت است. در روش بمباران با تفنگ ژنی معمولاً تعداد کمی سلول مورد هدف قرار می‌گیرند و برای رونویسی DNA مورد نظر باید حتما به هسته سلول وارد شده باشد. روش آگروواینفیلتریشن نسبت به تفنگ ژنی تعداد بسیار بیشتری سلول را مورد هدف قرار می‌دهد و تی DNAی حاوی ژن موردنظر به طور فعالی توسط پروتئین‌های باکتریایی به هسته سلول منتقل می‌شوند. یک ناقل ویروسی به طور سیستمیک اغلب سلول‌های موجود در یک گیاه را آلوده می‌کند و رونویسی ژن داخل شده در RNA ویروس همزمان با رونویسی RNA ویروسی در سیتوپلاسم صورت می‌گیرد و بصورت مقطعی و گذرا تعداد بسیار زیادی رونوشت از ژن مورد نظر تولید می‌شود. در روش استفاده از وکتورهای ویروسی محصولی در حدود یک تا سه گرم درهر یک کیلوگرم برگ گیاه است. در روش بمباران ذره‌ای به دلیل تعداد کم سلول‌های هدف، بازده خیلی پایین است (پایین‌ترین حالت) و روش آگروواینفیلتریشن چون آگروباکتریوم به تعداد سلول بیشتری نفوذ می‌کند بازده حدود ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم خواهد بود. ولی بالاترین سطح تولید وقتی است که ناقل ویروسی به طور سیستمیک کل گیاه تلقیح شده را آلوده کند. هر چند روش تفنگ ژنی برای بررسی پایداری پروتئین نوترکیب قبل از انتقال ژن پایدار گیاه استفاده می‌شود ولی روش مناسبی برای بیان تجاری مقادیر زیاد پروتئین خارجی نیست. این تکنیک بیشتر برای تولید کردن[۴۱۲] غلات تراریخت مورد توجه قرارگرفته است. روش آگروواینفیلتریشن یک روش مناسب برای تست آنتی بادی‌ها قبل از ایجاد گیاه تراریخت است. همانطور که گفته شد در هر دو روش اگروواینفیلتریشن و تفنگ ژنی تولید پروتئین مورد نظر طی سه تا پنج روز پس از تیمار امکان پذیر است. اما یکی از مزایای اگروواینفیلتریشن این است که میزان پروتئین تولیدی در این روش برای تعیین ویژگی‌ها،

[409] Screening
[410] T-DNA
[411] Assembly
[412] Regeneration

پایداری و کارکرد پروتئین نیز کفایت می‌کند و به پروتئین‌های کوچک نیز محدود نمی‌شود و حتی توان جور کردن و تطبیق پروتئین‌های پیچیده مانند آنتی‌بادی‌ها را نیز دارد. اگروواینفیلتریشن بر اساس بیان مونتاگو و فیشر می‌تواند چندین میلی گرم پروتئین نوترکیب را به ازای هر کیلو گرم برگ توتون تولید کند (Fischer et al, 2004).

۱-۱۰-تولید آنتی‌ژن‌های نوترکیب در گیاهان:

کاربرد گیاهان به عنوان سیستم‌های تولید پروتئین، اولین بار در سال ۱۹۹۰، با بیان آنتی‌ژن پروتئین سطحی استرپتوکوکوس موتانسدر تنباکو صورت گرفت و با بیان آنتی‌ژن هپاتیت ب[۴۱۳]، توکسین ناپایدار حرارتی ای کلای[۴۱۴]، پروتئین کپسید ویروس نوروالک[۴۱۵] و گلیکوپروتئین ویروس‌هاری[۴۱۶] دنبال شد.

پروتئین‌های تولیدی در این گیاهان زمانیکه بصورت خوراکی به موش یا انسان داده می‌شوند منجر به سنتز ایمنوگلوبولین مخاطی آ و سرمی جی ویژه، علیه آنتی‌ژن مورد نظر می‌شود. تولید آنتی‌ژن‌های خودی در گیاهان برای درمان تحمل دهانی بیماری‌های اتوایمیون نیز قابل انجام است. بعلاوه تولید اپی‌توپ‌ها در گیاهان که فعالیت سیتوتوکسیک در برابر تومورها دارند نیز، مورد توجه قرار گرفته است.

سوالی که در اینجا مطرح است این است که آیا اساسا نیازی به واکسن‌های گیاهی هست؟ قطعا جواب مثبت است. در جدول۲ نشان داده شده است که تولید واکسن‌های نوترکیب در گیاهان ممکن است به برخی مسائل اساسی که در رابطه با واکسن‌های زیرواحدی و سنتی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه وجود دارد غلبه کند. در کشورهای در حال توسعه مسائلی نظیر کارایی واکسن، نیاز به زنجیره سرد از تولید به محل مصرف واکسن و لزوم تزریق وجود دارد در حالیکه در واکسن‌های گیاهی این مسائل وجود ندارد. همچنین در کشورهای توسعه یافته استفاده از واکسن‌های گیاهی ایمنی بیشتر، قیمت پایین تر برای واکسیناسیون انبوه و استفاده وسیع تر برای مصارف دامی را به دنبال دارد (Dalsgaard et al, 1997).

جدول۲:مزایای تکنیکی و اجتماعی مورد انتظار برای واکسن‌های خوراکی گیاهی (Sala et al., 2003).

مزیت	ویژگی‌ها
انتقال دهانی	دیواره سلول گیاهی حاوی سلولز و قندهاست که باعث حفاظت آنتی‌ژن در معده و آزادسازی تدریجی آنتی‌ژن در دستگاه گوارش می‌شود.
استفاده بصورت خام یا پودر خشک	بافت‌های گیاهی می‌توانند بصورت خام خشک شده و یا بصورت جزئی و یا کامل خالص سازی شده و در فرم کپسول بکار روند.
عدم نیاز به زنجیره سرد	امکان نگهداری بافت‌های گیاهی و انتقال آن‌ها در دمای اتاق

[413] Hepatitis B surface Antigene (Hbs Ag)
[414] Escherichia coli Heat-labile enterotoxin (LTB)
[415] Norwalk Virus Capsid protein (NVCP)
[416] Rabies Virus Glycoprotein

پاسخ ایمنی سرمی و مخاطی	طراحی به منظور تحریک سیستم ایمنی مخاطی و جلوگیری از ورود پاتوژن در سطح مخاطی و همچنین برانگیختن پاسخ‌های سرمی و سیتوتوکسیک.
مقرون به صرفه بودن	کاهش هزینه ۱۰۰۰-۱۰۰ برابر نسبت به واکسن‌های سنتی
سیستم بیانی بهینه شده	گیاهان می‌توانند برای ذخیره سازی آنتی‌ژن در بخش‌های درون سلولی نظیر شبکه آندوپلاسمی و کلروپلاست مهندسی شوند.
سهولت دست ورزی ژنتیکی	پروتکل‌های دست ورزی ژنتیکی آنها در کشورهای در حال توسعه هم اکنون در دست هستند.
سهولت تولید در مقیاس وسیع	امکان ذخیره سازی گیاهان تراریخته در بذر، تولید مقادیر نامحدودی از واکسن در زمان کوتاه، مناسب بودن تولید و مدیریت آن برای کشورهای در حال توسعه.
ایمن تر نسبت به واکسنهای سنتی	فاقد آلودگی با پاتوژن‌های پستانداران.
ایده آل برای مواجه با سلاح‌های زیستی	ایمنی و مقرون به صرفه بودن واکسن‌های گیاهی را ابزار ایده آلی برای مواجه با بیوتروریسم می سازد.
استفاده برای مصارف دامی	آماده مصرف بودن به عنوان مکمل غذایی و هزینه مناسب.

۱-۱۱-محصولات برگی به عنوان یک سیستم بیانی

همانند سایر یوکاریوت ها، سیستم بیان ژن گیاهان نیز قادر به پردازش پروتئین های پیچیده می باشند و می توانند تغییرات پس از ترجمه پروتئین ها همانند گلیکوزیلاسیون و برش سیگنال پپتید را به خوبی انجام دهند (فیشر وهمکاران، ۲۰۰۴). به دلیل زی توده فراوان گیاهی و سطوح بالای بیان ژن و نیز استفاده به صورت واکسن های خوراکی برگ ها بهترین هدف برای تولید پروتئین های نوترکیب هستند (Twyman et al., 2003).

۱-۱۲-گونه های گیاهی که بیشترین استفاده را دارند

۱-۱۲-۱-تنباکو

تنباکو پرمصرف ترین گونه برای تولید پروتئین های نوترکیب در آزمایشگاه است (Ma et al., 2003). از مزایای استفاده از تنباکو می توان به بازده زیست توده بالا (بیش از ۱۰۰۰۰۰ کیلوگرم در هکتار) و همچنین ظرفیت عظیم تولید بذر اشاره کرد. ذخیره پروتئین در برگها پایدار نیست و محصول در برابر تخریب آسیب پذیر است، بنابراین برگها باید برای ذخیره سازی منجمد یا خشک شوند یا پروتئین بلافاصله پس از بیان استخراج شود. بافت‌های تنباکو معمولاً حاوی فنل‌ها و آلکالوئیدهای سمی هستند که پیامدهایی برای پردازش پایین دست دارند.

۱-۱۲-۲-غلات

دانه‌های غلات دستگاه‌های ذخیره‌سازی پروتئین عالی هستند که مجهز به وزیکول‌های ذخیره‌سازی پروتئین و یک محیط خشک بین سلولی هستند که فعالیت پروتئاز و سرعت هیدرولیز غیر آنزیمی را کاهش می‌دهند. ذرت دارای بالاترین عملکرد زیست توده در بین محصولات غذایی است (Obembe et al., 2011) و قبلاً در تولید آویدین استفاده شده است (Hood et al., 1997). تریپسین گاوی و چند نوع آنتی بادی های نوترکیب. دانه‌های غلات خشک مانند دانه‌های برنج و گندم دارای مزیت پایداری پروتئین بالا هستند و اجازه می‌دهند که دانه ها چندیدن ماه بدون از دست دادن فعالیت قابل توجه در دمای اتاق نگهداری شوند (Stöger et al., 2000).

۱-۱۲-۳-حبوبات

تولید پروتئین های درمانی در حبوباتی مانند سویا، نخود و یونجه ثبت شده است. حبوبات دارای مزیت تثبیت نیتروژن اتمسفر، حذف نیتروژن مورد نیاز در کود خود و در نتیجه کاهش هزینه کشت هستند. با این حال، این گیاهان نسبت به تنباکو دارای بیوماس برگ کمتری هستند. حبوبات دانه ای مانند نخود دارای محتوای پروتئین بالایی در دانه های خود هستند و به عنوان سیستم بیان در حال توسعه هستند (Perrin et al., 2000).

۱-۱۲-۴-میوه ها و سبزیجات

تعدادی از محصولات میوه و سبزیجات برای تولید پروتئین های نوترکیب درمانی از جمله کاهو، گوجه فرنگی و اغلب سیب زمینی استفاده شده است. مانند غلات، مزیت بزرگ این سیستم ها این است که پروتئین می تواند به صورت خوراکی با حداقل پردازش تحویل داده شود (Daniell et al., 2019; Marsian and Lomonossoff, 2016).

۲.نتیجه گیری

با توجه به اینکه آمار مرگ و میر ناشی از بیماری ها در کشورهای در حال توسعه زیاد است و تنها راه ایمن سازی جوامع از طریق واکسیناسیون است، واکسن های موجود دارای محدودیت هایی از قبیل فناوری گران و پیچیده می باشند. امروزه تولید واکسن ها در گیاهان در حال توسعه می باشد. از جمله مزایای این روش می توان به سالم بودن فراورده های حاصل و کاهش هزینه اشاره کرد. به کمک تولید انبوه در گیاهان، خطرات ناشی از آلودگی با عوامل بیماریزای انسان به خصوص بیماری‌های مشترک نیز کاهش می‌یابد. از میان روش هایی که برای تولید پروتئین در گیاهان استفاده می شود می توان به ترازیزش گذرا اشاره کرد که این روش سریع است و در نتیجه بیان وتولید پروتئین را می‌توان ظرف چند روز مشاهده کرد بنابراین به نظر

می‌رسد این نوع بیان برای زمانی مناسب است که بخواهیم ثابت کنیم محصول ژن کاربردی و با ثبات است. سیستم‌های بیان گذرای ژن سریع و انعطاف پذیرند و از اثرات موقعیتی که به طور بالقوه روی سطح بیان ژن اثر می‌گذارند، تاثیر نمی‌پذیرد.

منابع

1-Dalsgaard K., Uttenthal A. and Jones T.D. 1997. Plant derived vaccines protects target animals against a viral disease. Nat Biotechnol, 15: 248-252.
2-Daniell H., Streatfield S.J. and Wycoff K. 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. Trends in plant science, 6(5): 219-226.
3-Daniell H., Kulis M. and Herzog R. 2019. Plant cell-made protein antigents for induction of Oral tolerance. Biotechnology Advances, 15:37(7). 1-33.

4-Fischer R., Stoger E. Stefan Schillberg S. Christou P. and Twyman R.M. 2004. Plant-based production of biopharmaceuticals, 7(2): 152-158.

5-Gorantala J., Grover S. Rahi A. Chaudhary P. Rajwanshi R. Sarin N.B. and Bhatnagar P. 2014. Generation of protective immune response against anthrax by oral immunization with protective antigen plant-based vaccine. Journal of Biotechnology, 176: 1–10.

6-Hood E., Witcher E. Maddock D.R. Meyer S. Baszczynski T. C. Bailey M. and Howard J. A. 1997. Commercial production of avidin from transgenic maize: Characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. Molecular Breeding, 3: 291– 306.

7-Ma J.K.C., Drake P. M. W. and Christou P. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. Nature Reviews Genetics, 4(10). 794– 805.

8-Marsian J., and Lomonossoff G. P. 2016. Molecular pharming – VLPs made in plants. Current Opinion in Biotechnology, 37. 201– 206.

9-McGarvey P.B., Hammond J. Dienelt M.M. Hooper D.C. Fu Z.F. Dietzschold B. Koprowski H. and Michaels F.H.1995. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. Nature Biotechnology, 13: 1484-1487.

10-Obembe O.O., Popoola J. O. Leelavathi S. and Reddy S. V. 2011. Advances in plant molecular farming. Biotechnology Advances, 29(2). 210– 222.

11-Park K Y., and Wi S.J. 2016. Potential of plants to produce recombinant protein products. Journal Plant Biology, 59: 559-568.

12-Perrin Y., Vaquero C. Gerrard I. Sack M. Drossard J. Stöger E. and Fischer R. 2000. Transgenic pea seeds as bioreactors for the production of a single-chain Fv fragment (scFV) antibody used in cancer diagnosis and therapy. Molecular Breeding, 6(4). 345– 352.

13-Sala F., Rigano M.M. Barbante A. Basso B. Walmsley A.M. and Castiglione S. 2003. Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. Vaccine, 21(7): 803-808.

14-Schillberg S., Emans N. and Fischer R. 2002. Antibody molecular farming in plants and plant cells. Phytochemistry Reviews, 1: 45-54.

15-Shanmugaraj B., Christine Joy I.B. and Phoolcharoen W.2020. Plant Molecular Farming: A Viable Platform for Recombinant Biopharmaceutical Production, 9: 842: 1-19.

16-Stöger E., Vaquero C. Torres E. Sack M. Nicholson L. Drossard J. and Fisher R. 2000. Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. Plant Molecular Biology, 42(4): 583– 590.

17-Streatfield S.J., Lane J.R. Brooks C.A. Barker D.K. Poage M.L. Mayor J.M. Lamphear B.J. Drees C.F. Jilka J.M. Hood E.E. and Howard J.A. 2003. Corn as a production system for human and animal vaccines. Vaccine, 21: 812-815.
18-Twyman R.M., Stoger E. Schillberg S. Christou P. and Fischer R. 2003. Molecular farming in plants: Host systems and expression technology. Trends Biotechnol, 21: 570– 578.

The effect of 24-epibrasinolide on growth indices of okra in the presence of different salinity levels

Kazhal Yousefi*[1], Rashid Jamei [2], Reza Darvishzadeh[3]

1. Ph.D student in Plant Physiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University
2. Professor in Plant Physiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University
3. Professor in Plant Biotechnology, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University

* *kazhalyousefi98@yahoo.com*

Abstract

Today, plants are exposed to a variety of abiotic stresses, including drought, salinity, ultraviolet radiation, heavy metal toxicity, and extreme temperature fluctuations. These stresses directly affect plant growth and yield and reduce productivity and yield. In arid and semi-arid regions, salinity stress is one of the main environmental stresses. Okra, which belongs to the genus Cheese, acts as one of the glycophytes in response to salinity stress. In soil salinity, which is mostly attributed to the presence of sodium and chloride ions, this plant shows reduced growth and yield. In addition to their role in plant growth and development, the steroid hormone 24-epiracinolide protects plants against a variety of abiotic stresses. These natural plant steroids have extensive biological activity and are effective in very low concentrations (nanomolar and micromolar). For this purpose, in order to evaluate the possible beneficial effects of the plant hormone 24-epibrasinolide on some morphological parameters of okra (*Ablemoschus esculentus* L), a factorial experiment in a completely randomized design with two factors, salinity including sodium chloride at three levels of 0, 75 and 150 mM. 24-epibrassinolide (0.1 µM) with four replications was performed in the educational culture room of the Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University. At the end of the experiment, various parameters including plant height, weight and dry weight of the stem, weight and dryness of the root, and root length were measured. The results showed that this plant growth regulator increased growth parameters including fresh and dry weight of roots and shoots. The increase in biomass due to the use of brassinosteroids is due to the increase in invertase acid activity, which converts sucrose to fructose and glucose. The results showed that the plant hormone 24-epicracinolide is a good candidate for mitigating the effects of salinity stress and as a biostimulant can improve the growth and productivity of horticultural crops

Keywords: Green Okra, Brassinosteroids ,Salt stress, Growth regulator

بررسی اثر هورمون ۲۴-اپی براسینولید بر شاخص‌های رشدی گیاه بامیه در حضور سطوح مختلف شوری

کژال یوسفی*[۱]، رشید جامعی[۲]، رضا درویش زاده[۳]

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه
۲. استاد فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه
۳.استاد بیوتکنولوژی گیاهی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی ،دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: kazhalyousefi98@yahoo.com

چکیده

امروزه گیاهان در معرض انواع تنش‌های غیرزیستی از جمله: خشکی، شوری، اشعه ماوراءبنفش، سمیت فلزات سنگین و نوسانات شدید دمایی قرار دارند. این تنش‌ها مستقیما بر رشد و عملکرد گیاه تاثیر می‌گذارد و باعث کاهش بهره وری و محصول می‌شود. در مناطق خشک و نیمه خشک تنش شوری یکی از اصلی‌ترین تنش‌های زیست محیطی محسوب می‌شود. گیاه بامیه که از تیره پنیرکیان است بعنوان یکی از گلیکوفیت‌ها در پاسخ به تنش شوری بسیار متفاوت عمل می‌کند. در شوری خاک که بیشتر آن را به حضور یون‌های سدیم و کلرید نسبت می‌دهند این گیاه کاهش رشد و عملکرد نشان می‌دهد. هورمون استروئیدی ۲۴-اپی براسینولید علاوه بر نقشی که در رشد و توسعه گیاه دارد، گیاهان را در برابر انواع تنش‌های غیرزیستی هم محافظت می‌کند. این استروئید طبیعی گیاهی دارای فعالیت گسترده بیولوژیکی می‌باشد و در غلظت‌های بسیار کم (نانومولار و میکرومولار) موثر است. بدین منظور جهت ارزیابی اثرات سودمند احتمالی هورمون گیاهی ۲۴-اپی براسینولید، بر برخی پارامترهای مورفولوژیکی گیاه بامیه (Ablemoschus esculentus L)آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با دو فاکتور، شوری شامل کلرید سدیم در سه سطح ۰، ۷۵و ۱۵۰ میلی‌مولار و ۲۴-اپی براسینولید (۰/۱ میکرومولار) با چهار تکرار در اتاق کشت آموزشی گروه زیست شناسی دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه انجام شد. در پایان آزمایش پارامترهای مختلف شامل ارتفاع گیاه، وزن‌تر و خشک ساقه، وزن‌تر و خشک ریشه، طول ریشه اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که این تنظیم کننده رشد گیاهی موجب افزایش پارامترهای رشد از جمله وزن‌تر و خشک ریشه و اندام هوایی شد. افزایش بیومس در نتیجه استفاده از براسینواستروئیدها بعلت افزایش فعالیت اسید اینورتاز است که باعث تبدیل ساکارز به فروکتوز و گلوکز می‌شود این افزایش فعالیت در برگ‌های جوان اتفاق می‌افتد و باعث ایجاد اسیمیلاسیون بیشتر گیاهان و درنتیجه افزایش اندازه بزرگتر ریشه گیاهان می‌شود. نتایج نشان داد که هورمون گیاهی ۲۴-اپی براسینولید یک کاندیدای مناسب برای تخفیف اثرات تنش شوری است و بعنوان یک محرک زیستی می‌تواند رشد و بهره وری محصولات باغی را بهبود بخشد.

واژگان کلیدی: بامیه سبز، براسینواستروئید، تنش نمکی، تنظیم کننده رشد

۱.مقدمه

شوری خاک یک مشکل عمده در کشاورزی است و باعث کاهش قابل توجهی در رشد و بهره وری محصول گیاهان می‌شود. با این حال، استفاده از آب شور در کشاورزی به دلیل کمبود آب شیرین به تدریج در حال افزایش است. در نتیجه از یکسو مناطق آسیب دیده توسط نمک به طور مداوم در حال افزایش است و از سوی دیگر، هر ساله مقادیر بسیار زیادی از زمین‌های کشاورزی به دلیل شوری رها می‌شوند. آب شور با برهم زدن سیستم تبخیر و تعرق سرعت تعرق گیاهان را کاهش می‌دهد و در نتیجه عملکرد محصول را کاهش می‌دهد درصد بالایی از نمک در ناحیه ریشه بر فشار تورژسانس ریشه و جذب آب تأثیر می‌گذارد که در نهایت بر رشد و نمو گیاه تأثیر می‌گذارد.(Habib et al.,2016). گیاه بامیه به شوری به ویژه در مراحل اولیه رشد خود حساس است که در آن شوری بر جذب آب و مواد مغذی گیاه تأثیر می‌گذارد و تنش یونی باعث کاهش انبساط برگ می‌شود. اخیرا یک روش مقرون به صرفه و پایدار برای کاهش تنش شوری در محصولات اقتصادی استفاده از آندوفیت‌های مهم مانند بامیه (*Ablemoschus esculentus* L) می‌باشد. بامیه یک سبزی تابستانی مهم از نظر تغذیه است که متعلق به خانواده Malvaceae است. تنش شوری اثرات منفی بر رشد و تولید محصول بامیه دارد.(Bibi et al.,2019). استفاده از عوامل تنظیم کننده رشد گیاه مانند براسینواستروئیدها یک روش عملی برای کاهش آسیب‌های ناشی از تنش‌های غیرزنده است. ۲۴-اپی براسینولید یک براسینواستروئید مهم است که در تنش‌های غیر زیستی نقش دارد. این ترکیب پلی هیدروکسیله در مجموعه‌ای از فرایندهای فیزیولوژیکی و تکاملی مثل جوانه‌زنی، تحریک رشد، تولید مثل و پیری نقش دارد (Shahzad et al., 2018).

مطالعه پیشنهادی با هدف بررسی اثرات نامطلوب تنش شوری بر رشد گیاه بامیه و نقش هورمون ۲۴-اپی براسینولید در تخفیف اثرات تنش و بهبود وضعیت رشد گیاه انجام شد.

۲.مواد و روش‌ها

بذر بامیه سبز رقم کلمسون اسپاینلس (Clemson Spineless) انتخاب گردید. ضدعفونی بذرها با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت۵ دقیقه انجام شد و با آب مقطر شست و شو داده شد. گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ۱۵ سانتی متر وارتفاع ۱۴ که حاوی پرلیت بود بعنوان محیط کشت انتخاب شد. آبیاری گیاه با آب مقطر و محلول هوگلند انجام شد. بعد از رسیدن به مرحله ۴ برگ حقیقی کامل گسترش یافته تیمار با هورمون ۲۴-اپی براسینولید در سطح ۰/۱ میکرومولار، تیمار بدون تنش (شاهد)، تنش شوری ۷۵ میلی‌مولار و ۱۵۰ میلی‌مولار اعمال گردید. به منظور اندازه گیری شاخص های رشدی ، پس از برداشت نمونه‌های گروه شاهد و تیمار، با استفاده از خط‌کش، طول ریشه و اندام هوایی هرکدام از آن‌ها اندازه‌گیری شد. وزن تر نمونه‌های ریشه و اندام هوایی با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ اندازه گیری شد. سپس نمونه ها در آون با دمای ۸۰ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شد. پس از مدت زمان ذکر شده وزن خشک نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. برای کاهش خطا، نمونه برداری و آزمایش‌ها با ۴ تکرار انجام شد. پس از اتمام آزمایش‌ها، برای آنالیز داده‌های آماری از نرم‌افزار SAS 9.4 استفاده شد. آزمایش به صورت فاکتوریل با طرح پایه کاملاتصادفی انجام گرفت.

۳. نتایج وبحث

بررسی نتایج حاصل از اثر هورمون ۲۴-اپی براسینولید در سطح ۰/۱ میکرومولار و تنش شوری ۷۵ و ۱۵۰ میلی مولار بر شاخص‌های مورفولوژیکی نشان داد که تنش شوری باعث کاهش معنی داری در صفات وزن تر، خشک و طول اندام هوایی و ریشه نسبت به گروه کنترل شد (شکل۱).



شکل ۱: اثر تنش شوری بر گیاه بامیه

کاربرد هورمون ۲۴-اپی براسینولید موجب افزایش وزن‌تر و خشک ریشه واندام هوایی در گیاه بامیه شد. اثر هورمون ۲۴-اپی براسینولید موجب افزایش معنی داری در وزن تر و خشک اندام هوایی وکاهش طول اندام هوایی و ریشه نسبت به گروه کنترل شد. میزان پارامترهای رشد که به صورت فاکتوریل با طرح کاملا تصادفی بررسی شد نشان داد که کاربرد توامان هورمون ۲۴-اپی براسینولید و تنش شوری در مقایسه با تنش شوری یک روند افزایشی را خواهیم داشت (جدول۱). بنابراین براساس نتایج تیمارهای هورمون ۲۴-اپی براسینولید سبب افزایش شاخص‌های مورفولوژی به ویژه در سطوح پایین‌تر نمک در مقایسه با نمونه‌های تنش شوری می‌شوند و هرچه سطوح نمک بیشتر شود میزان اثر بخشی کمتر شده است.

جدول۱: جدول تجزیه واریانس بررسی اثر شوری بر روی صفات مورفولوژیک گیاه بامیه در حضور هورمون ۲۴-اپی براسینولید

منابع تغییرات	df	اندام هوایی			ریشه		
		وزن تر	وزن خشک	طول	وزن تر	وزن خشک	طول
تنش شوری	2	5679.4**	56.79**	729.5**	103.2**	1.03**	80.22**
هورمون ۲۴-اپی براسینولید	5	450.3**	4.503**	45.51**	25.79**	0.26**	41.29**
شوری*هورمون۲۴-اپی براسینولید	10	257.9**	2.579**	25.88**	8.153**	0.08**	24.98*
اشتباه آزمایشی	36	12.905	0.129	5.17	1.328	0.013	10.07

برش‌دهی اثرمتقابل شوری × هورمون ۲۴-اپی براسینولید در سطوح مختلف شوری

سطوح تنش شوری	df	اندام هوایی			ریشه		
		وزن تر	وزن خشک	طول	وزن تر	وزن خشک	طول
سطح ۰ میلی‌مولار	5	687.9**	6.879**	16.32*	24.96**	0.250**	49.16**
سطح ۷۵ میلی‌مولار	5	85.88**	0.859**	75.66**	9.53**	0.095**	24.22ns
سطح۱۵۰ میلی مولار	5	192.5**	1.925**	5.29ns	7.61**	0.076**	17.87ns

ns، * و ** به‌ترتیب غیرمعنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال اشتباه یک و پنج درصد می‌باشد.

۴. نتیجه گیری

گیاه بامیه (*Abelmoschus esculentus* L) با قرار گرفتن در محیط شور کاهش چشمگیر عملکرد در هکتار گیاه را نشان می‌دهد. در مراحل اولیه رشد، بامیه بیشتر مستعد آسیب در برابر تنش شوری است، زیرا روابط آبی و جذب مواد مغذی گیاه را تغییر می‌دهد. استفاده از هورمون‌ها روش مؤثری برای بهبود سوء اثرات ناشی از تنش نمک است. ۲۴-اپی براسینولید (EBL)، یک محصول جانبی فعال از بیوسنتز براسینولید، تحمل تنش شوری قابل توجهی را در گیاهان ایجاد می‌کند. استفاده از EBL، فرآیندهای متابولیکی و فیزیولوژیکی مختلف و رشد و نمو گیاه را تحت تنش نمکی بهبود می‌بخشد. علاوه بر این، EBL سرعت فتوسنتز را افزایش و تولید ROS را کاهش می‌دهد و نقش مهمی در هموستاز یونی ایفا می‌کند. در بررسی تحمل تنش شوری ناشی از EBL روشن شده است که برنامه‌ریزی پیچیده رونویسی و ترجمه ای در پاسخ به EBL و تنش نمکی رخ می‌دهد، بنابراین تغییرات رونویسی و ترجمه‌ای در پاسخ به کاربرد EBL بسیار مورد توجه قرار می‌گیرند. EBL با فعال کردن آنزیم‌های مهار کننده ROS، تولید گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش می‌دهد. EBL از زیرساخت رنگدانه دستگاه فتوسنتزی در برابر تخریب محافظت می‌کند، بنابراین فتوسنتز و سایر صفات تبادل گاز برگ را افزایش می‌دهد. کاربرد EBL تجمع املاح مختلف سازگار به ویژه پرولین را برای تنظیم وضعیت اسمزی گیاه تحت تنش نمکی افزایش می‌دهد و موجب افزایش زیست توده گیاهی می‌شود (Tanveer et al., 2018). در مطالعه‌ای هورمون گیاهی ۲۴-اپی براسینولید (EBL) برای ارزیابی کارایی فتوسنتز در *Brassica juncea* تحت تنش شوری و ارتباط آن با سیستم پاداکسندگی به صورت برونزا مورد بررسی قرار گرفت. گیاهچه‌های ۱۵ روزه در معرض تنش شوری از منبع سدیم کلرید قرار داده شدند. میزان فتوسنتز خالص و رسانایی روزنه‌ها در حضور NaCl به میزان قابل توجهی کاهش یافت. اسپری EBL به تنهایی یا ترکیب با سیلیکون به طور قابل توجهی رشد و صفات فتوسنتزی را در حضور/عدم حضور تنش NaCl تغییر داد. فعالیت پاداکسندگی (کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز) و محتوای پرولین تحت تنش شوری افزایش یافت. اثر ترکیبی Si و EBL آسیب‌های ناشی از تنش نمکی را برطرف کرد (Siddiqui et al., 2018). ارزیابی اثرات EBL بر شرایط فیزیولوژیکی دانه‌های گوجه‌فرنگی تحت شرایط شوری نشان داد وقتی که دو غلظت EBL صفر و ۱ میکرومولار و پنج سطح شوری (کنترل؛ ۱/۵ ؛ ۳؛ ۴/۵ و ۶ dS m-1) اعمال گردید؛ تنش نمکی درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی را از چهار تا ۱۴ روز کاهش، و EBL، درصد جوانه‌زنی، شاخص سرعت جوانه زنی، طول نهال و ماده خشک ریشه را افزایش داد (Júnior et al., 2021). مطالعه‌ای به منظور بررسی نقش ۲۴- اپی براسینولید در ایجاد تحمل به نمک گیاه فلفل انجام شد. در این مطالعه طیف وسیعی از پارامترهای فیزیولوژیکی مانند شاخص رشد، محتوای کلروفیل و نشت الکترولیت اندازه گیری شد. نهال‌های فلفل در حضور یا عدم وجود NaCl با ۲۴ -اپی براسینولید اسپری شدند و ۲۸ روز پس از تیمار نمونه برداری شدند. نتیجه تجزیه و تحلیل نمونه‌های تحت تنش شوری مشخص نمود که زیست توده و محتوای کلروفیل به میزان قابل توجهی کاهش، در حالی که نشت الکترولیت و غلظت پرولین افزایش یافت. با این حال، استفاده از ۲۴ -اپی براسینولید اثرات نامطلوب شوری را بر پارامترهای مورد بررسی به طور قابل توجهی بهبود بخشید و نشان داد که استفاده بیرونی از ۲۴ - اپی براسینولید می‌تواند رشد را افزایش دهد و از یکپارچگی غشای سلولی در گیاهان تحت تنش محافظت کند (Houimli et al.,2010). در این مطالعه به بررسی اثر شوری و هورمون ۲۴-اپی براسینولید پرداخته شد. نتایج حاصل از این بررسی نشان دادکه تنش شوری، یکی از مهم‌ترین عوامل کاهش دهنده رشد و عملکرد درگیاه بامیه می‌باشد. هورمون گیاهی ۲۴-اپی

براسینولید باعث بهبود رشد و افزایش زیست توده در شرایط سمیت نمک می‌شود. این هورمون استروئیدی را می‌توان بعنوان کاندیدای مناسبی برای تخفیف اثر سمیت نمک معرفی کرد.

منابع

1. Bibi N., Jan G., Jan F.G., Hamayun M., Iqbal A., Hussain A., Rehman H., Tawab A. and Khushdil, F. 2019. *Cochliobolus sp*. acts as a biochemical modulator to alleviate salinity stress in Okra plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 139:459-469.

2. Habib S.H., Kausar H. and Saud H.M. 2016. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in Okra through ROS-scavenging enzymes. *BioMed Research International*, 2016:1-10.

3. Houimli S. I. M., Denden M., and Mouhandes B. D. 2010. Effects of 24-epibrassinolide on growth, chlorophyll, electrolyte leakage and proline by pepper plants under NaCl-stress. *EurAsian Journal of BioSciences*, 4(1):96-104.

4. Júnior S. D. O. M., de Andrade J. R., de Lima R. F., Guimarães R. F. B., de Souza A. R., and do Nascimento R. 2021. Effects of 24-epibrassinolide on germination and growth of tomato seedlings under salt stress. *Revista de Agricultura Neotropical*, 8(1): 4842.

5. Shahzad B., Tanveer M., Che Z., Rehman A., CheemaS. A., Sharma A., Song H., Rehman H.U. and Zhaorong D. 2018. Role of 24-epibrassinolide (EBL) in mediating heavy metal and pesticide induced oxidative stress in plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147: 935-944.

6. Siddiqui H., Yusuf M., Faraz A., Faizan M., Sami F., and Hayat S. 2018. 24-Epibrassinolide supplemented with silicon enhances the photosynthetic efficiency of *Brassica juncea* under salt stress. *South African Journal of Botany*, 118: 120-128.

7. Tanveer M., Shahzad B., Sharma A., Biju S., and Bhardwaj, R. 2018. 24-Epibrassinolide; an active brassinolide and its role in salt stress tolerance in plants: a review. *Plant Physiology and Biochemistry*, 130:69-79.

The situation of Caucasian false walnut (*Pterocarya fraxinifolia* Spach.) after the Construction of Concrete Canal in forests area (Case Study: Vatana Forest Management Plan, Golestan Province)

Seyed Morteza Mousavi Nokande[1]*, Shaaban Qalandarayeshi[2]

[1]Assistant Professor, Department of Forestry, Faculty of Natural Resources, University of Gonbad Kavous, Golestan
[2]Assistant Professor, Department of Statistic, Faculty of Sciences, University of Gonbad Kavous, Golestan

*Corresponding author: mousavimorteza@gonbad.ac.ir**

Abstract

In forest areas, the construction of concrete canal prevents water from penetrating into the soil and also prevents the access of plant and animal organisms, especially Caucasian false walnut (Pterocarya fraxinifolia Spach.) to water along the canal route. In order to evaluate the freshness of larch species and their survival as a ranking variable in a strip 25 meters wide, both sides of the concrete canal and natural creek, various variables such as diameter at chest, total height, health status and survival of all larch trees In this study, they were measured and evaluated. All statistical analyzes and model fit were performed for sequential logistic regression analysis using R statistical software. Based on the results, it was found that the probability of having trees with a higher degree of freshness (grade 1) near the natural creek is higher and the number of trees is reduced by moving away from its axis up to 25 meters. The odd ratio of placing trees in higher category of vitality (less vitality) in the Caucasian false walnut located on the edge of the concrete canal is 16.48 times higher than those trees located on the sides of the natural creek. Comparison of dead trees (grade three) on the sides of the natural canal and concrete canal showed that the probability of observing dead trees increases with the distance from the natural creek axis, but it is independent of the distance from central axis of concrete canal, which indicates the effect of water flow cut off after the construction of concrete canal.

Keywords: Survival, Natural creek, Drought, Regression

وضعیت درختان لرگ پس از احداث کانال بتنی انتقال آب در عرصه های جنگلی (مطالعه موردی: طرح جنگلداری وطنا، استان گلستان)

سیدمرتضی موسوی نوکنده[1*]؛ شعبان قلندرآیشی[2]

۱-استادیار گروه چوب و جنگل، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس ،

۲- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، دانشگاه گنبدکاووس

*Email: mousavimorteza@gonbad.ac.ir

چکیده

در عرصه های جنگلی احداث کانال های بتنی مانع نفوذ آب به داخل خاک و همچنین جلوگیری از دسترسی موجودات زنده گیاهی و جانوری بخصوص درختان لرگ به آب در طول مسیر کانال می شوند. با هدف بررسی شادابی گونه های لرگ و زنده مانی آنها، به عنوان متغیر رتبه ای، در نواری به عرض ۲۵ متر، دو طرف کلنال بتنی و همچنین نهر طبیعی، متغیرهای مختلف مانند قطر برابر سینه، ارتفاع کل، وضعیت سلامتی و زنده مانی تمامی درختان لرگ در این تحقیق اندازه گیری و بررسی شدند. برای تجزیه و تحلیل از روش رگرسیون لجستیک ترتیبی و به کمک نرم افزار آماری R تمامی آنالیز های آماری و برازش مدل ها انجام شد. بر اساس نتایج مشخص شد احتمال وجود درختان با درجه شادابی بیشتر (درجه ۱) در نزدیکی نهر طبیعی بیشتر است و با فاصله گرفتن از محور آن تا ۲۵ متر از تعداد درختان کاسته می شود. شانس قرار گرفتن درختان در طبقات بالاتر شادابی (شادابی کمتر)، در درختان لرگی که در حاشیه کانال بتنی قرار دارند، نسبت به درختان لرگ واقع در حاشیه نهر طبیعی ۱۶/۴۸ برابر است. مقایسه درختان خشکیده (درجه سه) در طرفین کانال بتنی و آبراهه طبیعی نشان داد که خشکیدگی درختان با فاصله از محور نهر طبیعی بیشتر ولی احتمال مشاهده درختان خشکیده در فاصله مختلف از کانال بتنی نسبتا یکسان است که نشان دهنده قطع جریان آب در پای درختان لرگ پس از احداث کانال بتنی است.

واژگان کلیدی: زنده مانی، نهر طبیعی، خشکیدگی، رگرسیون

۱.مقدمه

جنگل ها یکی از منابع مهم طبیعی و بستر تامین آب برای نیازهای کشاورزی و مصارف حیاتی انسان به شمار می روند. نیاز روزافزون به محصولات کشاورزی موجب افزایش مصرف آب در این بخش مهم تولیدی شد. تلاش برای استفاده کامل از آب های سطحی جاری و به حداقل رساندن اتلاف آن از سرچشمه ها و داخل عرصه های جنگلی تا محل مصرف در اراضی کشاورزی، سبب روی آوردن به راهکارهای جدید گردید، نهرها و جوی های طبیعی آب های جاری سطحی در بعضی از عرصه های جنگلی شمال کشور توسط کشاورزان با هدف حفظ دبی آب تبدیل به کانال های مصنوعی با ساختار بتنی شدند. این کانال ها با عمر زیاد غیرقابل نفوذ آب به داخل خاک هستند و مانع دسترسی پوشش های گیاهی و مخصوصا درختان مسیر مانند لرگ و تمامی موجودات زنده به آب می شوند (موسوی نوکنده و قلندرآیشی، ۱۳۹۷). لرگ با نام علمی Pterocarya fraxinifolia Spach. (pior) از تیره Fagales ، خانواده Juglandaceae و جنس Pterocarya (خلیلی قادیکلایی، ۱۳۸۸) درختی متوسط با تاجی گسترده و تا ارتفاع ۲۰ متر است که در شرایط مساعد جست های زیاد تولید می کند (کامل شیخ

رجه، ۱۳۸۱). در ایران مطالعات معدودی از گونه لرگ در شمال کشور انجام شده است. مشاهدات نگارنده از جنگلهای یاسوج در سال ۱۳۷۱ مبین این مطلب است که پایه هایی از درخت لرگ در جنگلهای زاگرس استقرار دارند. خانلری (۱۳۷۸) در نگرش به جنگلهای شمال و ارزیابی گونه های با ارزش، به این گونه و خاصیت جست دهی آن اشاره کرد. در بررسی رویشگاه لرگ در رشته کوههای زاگرس به ویژه در منطقه شول آباد استان لرستان توسط سهرابی و مهدیفر (۱۳۸۱) اعلام شد این گونه از لحاظ جنبه های زیست محیطی در زمره ذخایر ژنتیکی منطقه قرار می گیرد. خاک منطقه دارای بافت سنگی تا متوسط سنگریزه دار و با عمق کم تا متوسط و عمده ترین روش زادآوری لرگ از طریق غیر جنسی و بیش از ۶۴ درصد درختان لرگ سالم و علایم خشکیدگی و پوسیدگی از قطر ۶۰ سانتیمتر به بالا ظاهر شده و قطورترین پایه موجود در آن منطقه ۱۲۴ سانتیمتر قطر داشته است. نتایج تحقیق توسط پیری و همکاران (۱۳۹۳) در منطقه حفاظت شده کبیرکوه واقع در پشته لارت ایلام با وسعتی معادل ۲۰ هزار هکتار به عنوان یکی از مناطق حفاظت شده جنگلی نشان داد که "لرگ" یکی از این گونه های درختی است که حداقل و حداکثر قطر پایه ها به ترتیب ۷ و ۹۱ سانتی متر و حداقل و حداکثر ارتفاع درختان به ترتیب ۲/۰۵ و ۲۰ متر است. میانگین ارتفاع درختان لرگ به روش لوری برابر ۳۴/۱۴ متر محاسبه شد. تجدید حیات درختان لرگ به طور متوسط برابر با ۵/۷۰۷ اصله در هکتار به صورت شاخه زاد بوده است. میزان تاج پوشش توده یاد شده نیز ۲۸/۴۰ درصد تعیین شد.. ابراهیمی (۱۳۸۳) مطالعاتی در مورد نیازهای رویشگاهی لرگ در مناطق مرکزی مازندران انجام داده و برخی خصوصیات کمی و کیفی آن را ارائه نمود که بر اساس آن محدوده رویشگاهی آن حداکثر به ارتفاعی در حدود ۱۳۳۰ متر از سطح دریا در حوضه آبخیز «واز» در جنگل های نور می رسد. نتایج بررسی اعلام شده توسط موسوی نوکنده و قلندرآیشی (۱۳۹۷) نشان داد از یک طرف در نزدیکی نهر طبیعی درختان لرگ با درجه شادابی یک بیشتر بوده و با فاصله گرفتن از محور آن تا ۲۵ متر از تعداد این درختان کم شده است و مشاهده درختان لرگ با درجه شادابی سه با افزایش فاصله از نهر طبیعی افزایش می یابد از طرف دیگر در اطراف کانال بتنی احتمال مشاهده درختان با درجه شادابی دو بسیار بیشتر از درجات دیگر است.

ظهور آثار تغییر در اکوسیستم منطقه و تنش های وارد شده به گونه های درختی مانند لرگ در این تحقیق به عنوان گونه رطوبت پسند و آبدوست از اثرات دخالت های غیر اصولی در عرصه های جنگلی است. بررسی اثر احداث کانال بتنی انتقال آب در داخل طرح جنگلداری وطنا از نظر زنده مانی و سرخشکیدگی و یا پژمردگی تاج از اهداف مهم در این تحقیق بوده است.

۲.مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه نواری به عرض ۲۵ متر در دو طرف مسیر نهر طبیعی و کانال بتنی انتقال آب می باشد که در حوزه ۸۴ جنگلهای شمال ایران، غرب استان گلستان، طرح جنگلداری وطنا واقع شده است. مسیر آب شامل قطعه اول کانال بتنی از محل انحراف آب از رودخانه در بالادست در عمق سه کیلومتری جنگل است که در سال ۷۷- ۱۳۷۶ به طول حدود ۴۵۰ متر احداث شد، سپس بعد از حدود ۱۵۰۰ متر امتداد نهر طبیعی، قطعه دوم کانال بتنی به طول حدود ۱۵۰۰ متر احداث که در ادامه وارد مزارع کشاورزی می شود. تمام طول کانال بتنی و نهر طبیعی از داخل عرصه جنگلی می گذرد.

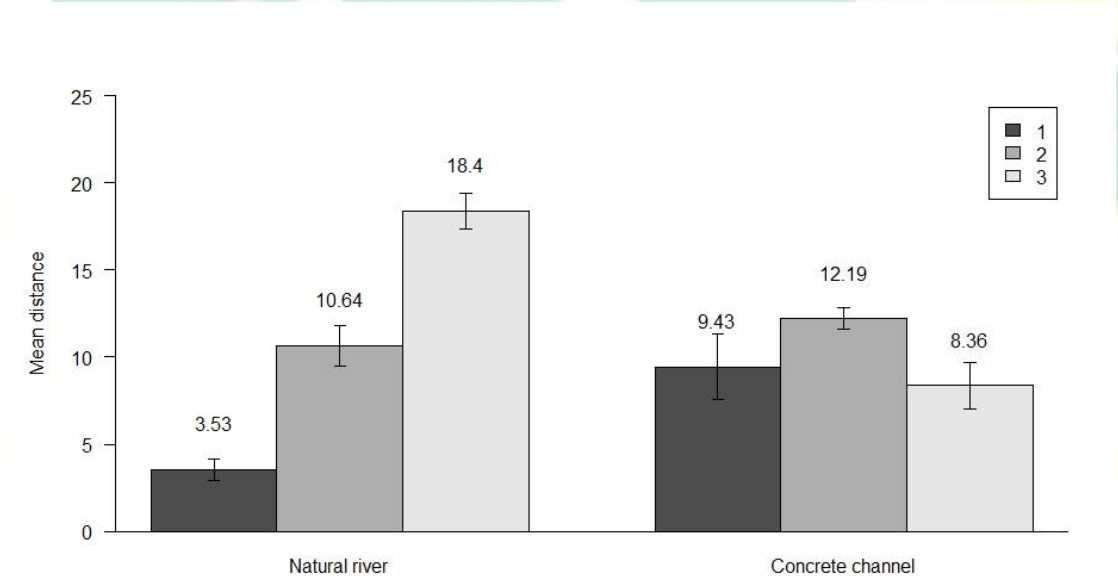
متغیرهای مختلف شامل قطر برابر سینه، ارتفاع کل، فاصله از محور نهر طبیعی یا کانال بتنی و وضعیت سلامتی و زنده مانی تمامی درختان لرگ دو طرف مسیر نهر طبیعی و کلنال بتنی انتقال آب به عرض نواری ۵۰ متری، ۲۵ متر از هر طرف محور اصلی، اندازه گیری و بررسی شد. از روشهای آمار توصیفی برای خلاصه سازی و نمایش نموداری داده های جمع آوری شده استفاده شد. با توجه به اینکه هدف این مطالعه بررسی اثرات احداث کانال بتنی بر شادابی گونه های لرگ و زنده مانی آنها بوده است که یک متغیر رتبه ای می باشد، از روش رگرسیون لجستیک ترتیبی برای تجزیه و تحلیل عوامل موثر بر شادابی درختان لرگ استفاده گردید (Agresti, 2002; McCullagh, 1980). تمامی آنالیز های آماری و برازش مدل ها با استفاده از نرم افزار آماری R انجام شد.

مدلهای رگرسیون لجستیک ترتیبی بر اساس احتمال های تجمعی به دست می آیند. ساده ترین نوع مدل رگرسیون لجستیک ترتیبی مدل شانس متناسب (Proportional odds model) است. این مدل احتمال پاسخ کمتر یا مساوی طبقه داده شده را با احتمال پاسخ بزرگتر از این طبقه مقایسه می کند. در این نوع مدل لگاریتم نسبت شانس در میان K طبقه متغیر پاسخ یکسان در نظر گرفته می شود. بنابراین ضرایب رگرسیون، به طبقه متغیر پاسخ مورد بررسی بستگی ندارد یعنی رابطه بین متغیر توضیحی Xi و متغیر پاسخ Yi مستقل از طبقه متغیر پاسخ می باشد (McCullagh, 1980). روشهای مختلفی برای بررسی فرضیه شانس متناسب طبقات وجود دارد. در این تحقیق مدل های شانس متناسب جزئی (Partial proportional odds model) نیز به داده ها برازش داده شد (Peterson and Harrel, 1990) و با استفاده از نسبت حداکثر درستنمایی بهترین مدل انتخاب گردید.

بمنظور مدل سازی اثر احداث کانال بتنی ابتدا تمامی متغیر ها به عنوان متغیر های توضیحی در برازش مدل وارد شدند و سپس با استفاده از آزمون معنی داری متغیر های توضیحی و نسبت درستنمایی، متغیر های غیر معنی دار از مدل حذف شدند. در این تحقیق مقدار p-value کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

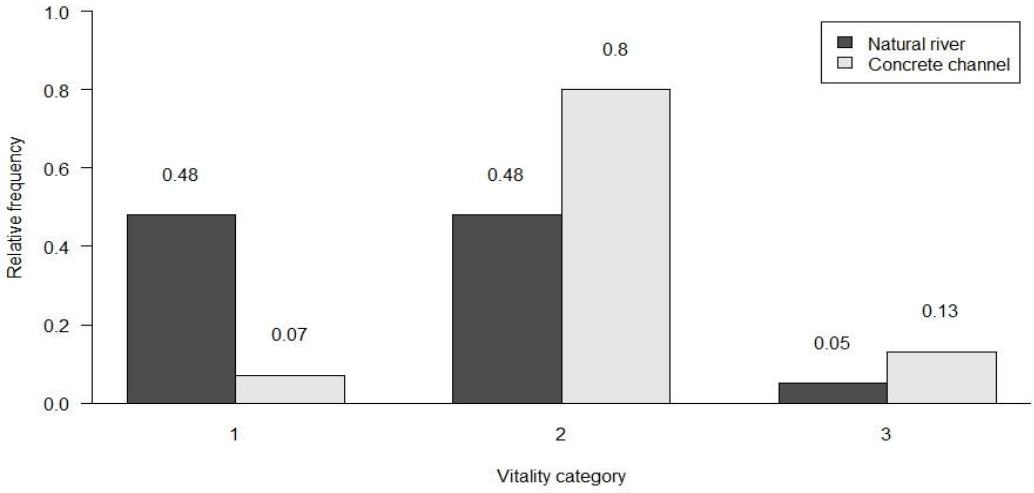
۳. نتایج و بحث

میانگین فاصله برای طبقات مختلف شادابی و زنده مانی بیانگر آن است که اثر فاصله بر شادابی درختان واقع در طرفین آبراهه طبیعی واضح تر است و با افزایش فاصله از درجه شادابی درختان کاسته می شود. در مجموع درختان با درجه شادابی یک کمترین فاصله را از محور رودخانه یا نهر طبیعی دارند. (شکل ۱).



شکل ۱:میانگین فاصله برای درجات مختلف شادابی و زنده مانی درختان لرگ واقع در طرفین نهر طبیعی و کانال بتنی

فراوانی نسبی طبقات مختلف شادابی درختان در طرفین آبراهه طبیعی و کانال بتنی در شکل ۲ نشان داده شده است. بر اساس این نمودار فراوانی درختان با درجه شادابی یک در طرفین کانال بتنی کاهش قابل ملاحظه و درختان با درجه شادابی درجه ۲ افزایش قابل ملاحظه ای را نشان می دهد.



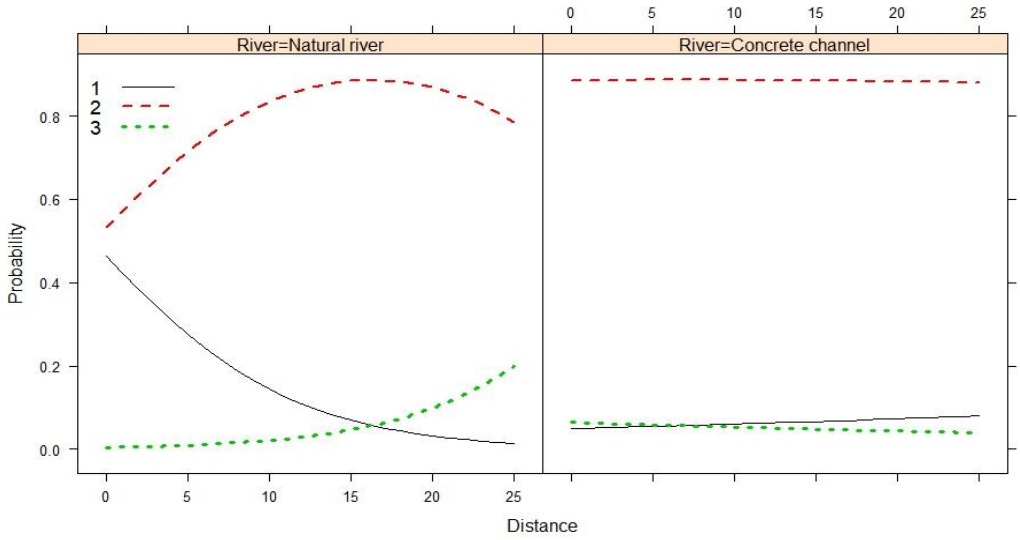
شکل ۲:نمودار توصیفی فراوانی نسبی طبقات مختلف شادابی درختان در طرفین آبراهه طبیعی و کانال بتنی

برآورد پارامتر ها، آزمون معنی داری متغیر های توضیحی و نسبت شانس مدل نهایی رگرسیون لجستیک ترتیبی در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول ۹:پارامتر های مدل نهایی

ضرایب	برآورد	انحراف استاندارد	p-value	شانس
ارتفاع	-۰/۱۷۱۸	۰/۰۲	۰/۰۰۰	۰/۸۴
ضریب لاغری	-۰/۰۴۷۱	۰/۰۰۹	۰/۰۰۰	۰/۹۵
فاصله	۰/۱۶۳۴	۰/۰۳	۰/۰۰۰	۱/۱۸
کانال بتنی	۲/۸۰۲۲	۰/۵۱	۰/۰۰۰	۱۶/۴۸
فاصله:کانال بتنی	-۰/۱۸۳۸	۰/۰۴	۰/۰۰۰	۰/۸۳

نمودار احتمال قرار گرفتن درختان لرگ در طبقات شادابی مختلف و در فواصل صفر تا ۲۵ متر در طرفین محور نهر طبیعی و کانال بتنی در شکل ۳ نشان داده شده است. بر اساس این نمودار احتمال مشاهده درختان با درجه شادابی یک در نزدیکی نهر طبیعی بیشتر است و با فاصله گرفتن از محور آن تا ۲۵ متر از تعداد این درختان نیز کاسته می شود. همچنین احتمال مشاهده درختان لرگ با درجه شادابی سه با افزایش فاصله از نهر طبیعی افزایش می یابد. در مقایسه در اطراف کانال بتنی احتمال مشاهده درختان با درجه شادابی دو بسیار بیشتر از درجات دیگر است و با تغییر فاصله نیز نسبتا ثابت است.



شکل ۳: احتمال قرار گرفتن درختان در درجات شادابی متفاوت و در فواصل مختلف طرفین آبراهه طبیعی و کانال بتنی

حداکثر قطر درختان لرگ در توده شول آباد ۱۲۴ سانتی متر (سهرابی و همکاران، ۱۳۸۷) و در پشته لارت ایلام (پیری و همکاران، ۱۳۹۳) ۹۱ سانتی متر گزارش گردید. درحالی که Browicz (1982) از درختان لرگ با قطر برابر سینه ۱/۵ تا ۲ متر نیز یاد می‌کند و Mitchel (1974) به بزرگترین پایه دست کاشت از نتیجه دورگ گیری لرگ در باغ گیاه شناسی"کیو" لندن با بلندی ۲۲ متر و قطر ۳ متر اشاره می نماید. در بررسی توده های لرگ «واز» در استان مازندران با ۸۴ درصد درختان سالم (ابراهیمی، ۱۳۸۳) و «شول آباد» لرستان (سهرابی و همکاران، ۱۳۸۷) حضور و جریان آب دائمی نقطه اشتراک اصلی و قابل تأکید دو رویشگاه است که با نتایج این تحقیق و اثر منفی احداث کانال بتنی بر زنده مانی و شادابی درختان لرگ نیز همخوانی دارد. در بررسی کیفیت و سلامت تاج درختان در منطقه شول آباد ۷۸ درصد از درختان دارای تاج سالم هستند که این موضوع را می توان مرتبط با باور مردم منطقه درمورد مقدس شمردن درختان این توده دانست، به طوری که به درختان لرگ در منطقه شول آباد "درخت الرحمان" گفته می شود و قطع آنها گناهی نابخشودنی است. حداکثر قطر اندازه گیری شده درختان لرگ در این منطقه ۱۳۷ سانتی متر بوده است. میانگین فاصله برای طبقات مختلف شادابی و زنده مانی بیانگر آن است که در مجموع درختان با درجه شادابی یک کمترین فاصله را از محور رودخانه یا نهر طبیعی دارند. برای مدل سازی اثر احداث کانال بتنی بر شادابی درختان ابتدا فرض شانس متناسب رگرسیون لجستیک ترتیبی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج آزمون درستنمایی، نیازی به برازش مدل شانس متناسب جزیی و مدل شانس نا متناسب وجود نداشت. متغیر های معنی دار در مدل نهایی، با توجه به نتایج آزمون والد و مقایسه آن با سطح معنی داری ۰/۰۵ و همچنین آزمون نسبت درستنمایی، انتخاب شدند. برآورد نسبت شانس محاسبه شده برای هر یک از متغیر های معنی دار را می توان به صورت زیر تفسیر کرد: برای متغیر کمی ارتفاع با فرض ثابت بودن سایر متغیر های موجود در مدل، یک واحد افزایش در ارتفاع کل درخت شانس قرار گرفتن در طبقات شادابی بالاتر (شادابی کمتر) ۰/۸۴ برابر می شود. بطور مشابه با یک واحد افزایش در ضریب لاغری درختان (h/d)، شانس قرار گرفتن درختان در طبقات شادابی بالاتر ۰/۹۵ برابر می شود. به عبارت دیگر درختان بلندتر و با ضریب لاغری بالاتر شادابی بیشتری دارند. با فرض ثابت بودن سایر متغیر های موجود در مدل، شانس قرار گرفتن درختان در طبقات بالاتر شادابی (شادابی کمتر)، در درختان لرگی که در حاشیه کانال بتنی قرار دارند، نسبت به درختان لرگ واقع در حاشیه نهر طبیعی ۱۶/۴۸ برابر است. به عبارت دیگر درختان واقع در طرفین آبراهه طبیعی شادابی بالاتری دارند.

۴. نتیجه‌گیری

اثر متقابل فاصله درختان و وضعیت آبراهه بیانگر آن است که اثر فاصله بر شانس قرار گرفتن درختان لرگ در طبقات بالاتر شادابی (شادابی کمتر) برای درختان واقع در طرفین کانال بتنی ۰/۸۵ اثر فاصله برای درختان واقع در طرفین آبراهه طبیعی است. به عبارت دیگر اثر فاصله بر شادابی درختان واقع در طرفین آبراهه طبیعی بیشتر است. با توجه به معنی دار شدن اثر متقابل فاصله و وضعیت آبراهه (طبیعی یا کانال بتنی) تفسیر اثر فاصله به تنهایی امکان پذیر نیست ولی بطور کلی می توان گفت با افزایش فاصله از شادابی درختان کاسته می شود. نتایج نشان داد که احداث کانال بتنی تاثیر معنی داری بر شادابی درختان داشته است. در حالیکه احتمال یافتن درختان درجه یک در فواصل کم طرفین آبراهه طبیعی بیشتر از فواصل دور است. بنظر می رسد در اثر احداث کانال و تنش خشکی عمده این درختان تبدیل به درختان درجه دو شده اند و به همین دلیل احتمال یافتن درختان درجه یک حتی در فواصل کم در طرفین کلنال بتنی کاهش یافته ولی احتمال یافتن درختان درجه دوم در فواصل کم در طرفین کانال بتنی افزایش یافته است. مقایسه درختان خشکیده (درجه سه) در طرفین کانال بتنی و آبراهه طبیعی نشان می دهد که احتمال یافتن درختان خشکیده در فواصل دورتر از محور آبراهه بیشتر است در حالیکه این احتمال برای کانال بتنی نسبتا ثابت است، به عبارت دیگر خشکیدگی درختان با فاصله از محور آبراهه یا نهر طبیعی بیشتر می شود ولی در فاصله کم با کانال بتنی این درختان خشکیده دیده می شوند که نشان دهنده اثر قطع جریان آب در پای درختان لرگ با احداث کانال بتنی است.

در مدیریت عرصه های جنگلی به اثرات دخالتهای یکجانبه در تامین منافع کوتاه مدت جامعه مانند احداث کلنال بتنی انتقال آب باید با دقت بیشتری توجه نمود و عواقب اثرات مخرب اکوسیستم را برای دراز مدت مد نظر قرار داد. حذف درازمدت درختان لرگ مانند آنچه که در جنگل وطنا اتفاق افتاده جبران ناپذیر است. جلوگیری از چنین تصمیماتی در عرصه های جنگلی مشابه به پایداری اکوسیستم کمک خواهد کرد

منابع

۱. ابراهیمی، ع. ۱۳۸۳. بررسی نیاز رویشگاهی لرگ در جنگل تحقیقاتی «واز»، انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، ۵۰۷- ۴۸۱ :(۴) ۱۲

۲. پیری، س. رستمی، ع. و میرزایی، ج. ۱۳۹۳. بررسی مشخصات کمی و کیفی توده لرگ در ذخیره گاه جنگلی دره لارت در استان ایلام، دومین همایش ملی دانشجویی علوم جنگل، کرج، انجمن علمی دانشجویی جنگلداری دانشگاه تهران

۳. سهرابی، س. ر. ثاقب طالبی، خ. و خادمی، ک. ۱۳۸۷. بررسی خصوصیات رویشگاهی و جنگل شناسی توده لرگ در استان لرستان. فصلنامهٔ علمی- پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، ۳۵۳- ۳۴۳ :(۳) ۱۶

۴. طهماسبی، م. ۱۳۸۷. نیاز رویشگاهی لرگ و محلب در استان ایلام .گزارش نهایی طرح تحقیقاتی (منتشر نشده). مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان ایلام.

۵. خانلری، د. ۱۳۷۸. نگرشی به جنگل های شمال و ارزیابی گونه های با ارزش آن از دیدگاه جنگل شناسی. مجله جنگل و مرتع ۲۸: ۲۴ - ۳۵

۶. خلیلی قادیکلایی، ک. ۱۳۸۸. استخراج و تعیین ماده موثره ضدقارچی (جنس تریکوفیتون) گیاه *Pterocarya fraxinifolia* ، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه گیلان

۷. کامل شیخ رجه، ک. ۱۳۸۱. اندازه گیری ۵- هیدروکسی ۴ و ۱- نفتوکینون (ژوگلون) در برگ و ساقه درخت لرگ به روش Rp- HPLC ، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه مازندران

۸. موسوی نوکنده، س. م. قلندرآیشی، ش. ۱۳۷۹. بررسی اثرات احداث کانال بتنی انتقال آب بر شادابی درختان لرگ در جنگل های شمال ایران (مطالعه موردی: طرح جنگلداری وطنا)، کنفرانس بین المللی جامعه و محیط زیست، دانشگاه تهران

9. Agresti, A. 2002. Categorical Data Analysis, New York: John Wiley & Sons, 752 p.
10. Browicz, K., 1982. Chorology of trees and shurbs in South – West Asia and adjacent regions. Polish Academy of Science. Institute of Dendrology,Warszawa, Vol. 1, 59 p.
11. Harrell, F.E. 2001. Regression Modeling Strategies: With Applications to Linear Models, Logistic Regression, and Survival Analysis. Springer-Verlag, New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4757-3462-1
12. Mitchel, A., 1974. A field Guide to the Trees of Britian and northern Europe. The Quartenary age- Nuorog-bot. Ital .68 (1/2): 109-170.
13. McCullagh, Peter. 1980. Regression Models for Ordinal Data. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological) 42, no. 2: 109-42. http://www.jstor.org/stable/2984952.
14. McCullagh, P., Nelder John A. 1989. Generalized Linear Models, Chapman and Hall/CRC, 532 P.
15. Peterson, B., & Harrell, F. 1990. Partial Proportional Odds Models for Ordinal Response Variables. Journal *of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)*, *39*(2), 205-217. doi:10.2307/2347760

Nutritional and industrial application of gums

Saideh Jahantigh[1]; Gholamhossein Haghayegh[2]; Sediqeh Soleimanifard [3]* Atefe.Rezaei[4]

1- Master student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol
2- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol
3- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol
4-Assistant Professor, Department of Nutrition, School of Nutrition, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan

**Corresponding Author Email address (s.soleimanifard@uoz.ac.ir)*

Abstract

Today, many efforts are made to use natural products in food. Among these, hydrocolloids are the main group of functional agents that have been used in recent years. These compounds have different functional properties, Which can be used to improve the processing and molding properties of the dough, Stability of the product during successive melting and freezing cycles, Improvement of dough stability during fermentation, Delaying staleness and improving quality and increasing life, Storage of baking products noted. The use of hydrocolloids has greatly expanded in recent years due to its special functional properties in the food industry. And obviously the need to search for newer and more cost-effective resources is felt more than ever. And obviously the need to search for newer and more cost-effective resources is felt more than ever. As a result, they stabilize some food systems. In this regard, they are widely used in many foods. In addition, it allows them to be used in some cases That the formulation or components of a food product can be changed to a great extent. For example, using gum, salad dressings are produced Which, while having a high quality, are essentially oil-free And they are nutritionally valuable to a group of people. In fact, gums are widely used In this review article, an attempt has been made to examine their nutritional and industrial applications.

Keywords: Hydrocolloids, Functional properties, Stagnation delay, Stability

کاربرد تغذیه ای و صنعتی صمغ ها

سعیده جهان تیغ[۱]؛ غلامحسین حقایق[۲]؛ صدیقه سلیمانی فرد[۳]*؛ عاطفه رضایی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل
۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل
۳- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل
۴- استادیار، گروه تغذیه، دانشکده تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان

*ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: s.soleimanifard@uoz.ac.ir

چکیده

امروزه تلاش فراوانی برای استفاده از محصولات طبیعی در مواد غذایی می شود. در این میان هیدروکلوئیدها گروه اصلی از عوامل کاربردی هستند که در سالهای گذشته مورد استفاده قرار گرفته اند. این ترکیبات، خواص کاربردی متفاوتی دارند، که می توان به بهبود ویژگی های عمل آوری و فرم دهی خمیر، پایداری فرآورده به هنگام چرخه ذوب و انجماد متوالی، بهبود در پایداری خمیر در طی تخمیر، به تاخیر انداختن بیاتی و بهبود کیفیت و افزایش عمر، نگهداری فرآورده‌های پخت اشاره کرد. استفاده از هیدروکلوئیدها با توجه به خواص عملکردی ویژه در صنایع غذایی در سالهای اخیر به شدت گسترش یافته است و بدیهی است که نیاز به جستجوی منابع جدیدتر و مقرون به صرفه بیش از پیش احساس می شود. صمغ ها قادرند با جذب آب محلول‌هایی با ویسکوزیته بالا در غلظت‌های پایین تولید کنند. در نتیجه باعث پایداری برخی از سیستم های غذایی می شوند. از این نظر کاربرد گسترده ای در بسیاری از مواد غذایی دارند. علاوه بر این، به‌کارگیری آن ها در مواردی اجازه می دهد که بتوان فرمولاسیون یا اجزای تشکیل دهنده یک فراورده غذایی را به میزان بسیار زیادی تغییر داد. به عنوان مثال با به کارگیری صمغ، سس‌های سالادی تولید می شود که در عین برخورداری از کیفیتی بالا، اساسا" فاقد روغن هستند و از نظر تغذیه ای برای گروهی از افراد ارزشمندند. در واقع صمغ ها کاربرد گسترده ای دارند در این مقاله مروری سعی بر این شده که کاربرد تغذیه ای و صنعتی آن ها مورد بررسی قرار گیرد.

واژگان کلیدی: هیدروکلوئیدها، خواص عملکردی، تاخیر بیاتی، پایداری

۱.مقدمه

امروزه تلاش فراوانی برای استفاده از محصولات طبیعی در مواد غذایی می شود. در این میان هیدروکلوئیدها گروه اصلی از عوامل کاربردی هستند که در سالهای گذشته مورد استفاده قرار گرفته اند. هیدروکلوئیدها بیوپلیمرهایی با وزن مولکولی بالا و آبدوست هستند که موجب ایجاد ویژگی هایی از قبیل ایجاد قوام در محلولهای آبی، پایداری کف ها، و امولسیون ها، بهبود احساس دهانی و ایجاد کردن حالتی مشابه یک ساختار چرب و روغنی برای محصولاتی که چربی آنها کاهش یافته است، می شود. استفاده از هیدروکلوئیدها با توجه به خواص عملکردی ویژه در صنایع غذایی در سالهای اخیر به شدت گسترش یافته است و بدیهی است که نیاز به جستجوی منابع جدیدتر و مقرون به صرفه بیش از پیش احساس می شود.(Dickinson, 2003)

صمغ شامل پلی ساکاریدهایی می شود که از گیاهان، جلبک های دریایی، منابع میکروبی و ترشحات گیاهی حاصل شده و به واسطه بیوپلیمرهایی که توسط واکنش شیمیایی سلولز تهیه گردیده اند، اصلاح شده اند. در واقع صمغ ها قادرند با جذب آب محلول‌هایی با ویسکوزیته بالا در غلظت های پایین تولید کنند. در نتیجه باعث پایداری برخی از سیستم های غذایی می شوند. از این نظر کاربرد گسترده ای در بسیاری از مواد غذایی دارند. علاوه بر این، بکارگیری آن ها در مواردی اجازه می دهد که بتوان فرمولاسیون یا اجزای تشکیل دهنده یک فراورده غذایی را به میزان بسیار زیادی تغییر داد. به عنوان مثال با به کارگیری صمغ، سس‌های سالادی تولید می شود که در عین برخورداری از کیفیتی بالا، اساسا" فاقد روغن هستند و از نظر تغذیه ای برای گروهی از افراد ارزشمندند (آقایی، ۱۳۸۷). برخی از صمغ ها دارای اثرات ضدمیکروبی، ضدالتهابی، خواص آنتی اکسیدانی و کاهش دهنده قند خون هستند. در این مقاله مروری سعی بر این شده که کاربرد تغذیه ای و صنعتی صمغ ها مورد بررسی قرار گیرد.

۱-۱-تاثیر صمغ ها در بهینه‌سازی فرمولاسیون نان

با توجه به اینکه در فرایند نان استفاده از هیدروکلوئیدها جهت به تاخیر انداختن فرایند بیاتی و بهبود کیفیت آن مناسب است. مسعود حفیظ و شیخ الاسلامی فرمول نان حجیم حاوی صمغ های فارسی و ریحان را بهینه یابی نمودند. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت صمغ ها در فرمولاسیون نان، میزان رطوبت، سختی، کشش‌پذیری و امتیاز خصوصیات حسی افزایش ولی فعالیت آبی کاهش یافت. در حالی که با افزایش صمغ فارسی ابتدا میزان حجم مخصوص، تخلخل و امتیاز خصوصیات حسی افزایش و سپس کاهش یافت. در این پژوهش به بهینه‌سازی فرمولاسیون نان های تولیدی پرداخته شد و مشخص گردید به منظور رسیدن شرایط بهینه فرمولاسیون نان حجیم، بایستی درصد صمغ دانه ریحان و فارسی به ترتیب ۰/۴۲ و ۰/۳۵ درصد باشد. در نهایت ریز ساختار نمونه بهینه با نمونه فاقد صمغ مقایسه شد که نتایج بیانگر ساختار یکنواخت تر نمونه حاوی ترکیبی از دو صمغ ریحان و فارسی بود(حفیظ محمد، ۱۳۹۹). اصفهانی و فدوی اثر افزودن صمغ های کتیرا و گوار بر ویژگی های فارینوگرافی خمیر و خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی نان تافتون را بررسی کردند. نتایج نشان داد ترکیب ۰/۳ درصد صمغ کتیرا و ۰/۷۵ درصد گوار، بیشترین اثر را روی جذب آب خمیر و رطوبت نان گذاشت و بهترین اثر را روی خصوصیات حسی نان تافتون داشت(حسینی اصفهانی، ۱۳۹۷). هجرانی و همکاران به بررسی خصوصیات نان بربری نیم پخت منجمد با صمغ گوار و زانتان پرداختند. مقایسه تیمارهای مختلف نشان داد که صمغ گوار حجم، تخلخل و رنگ را افزایش و سفتی نان را در مقایسه با نمونه شاهد و نمونه حاوی صمغ زانتان کاهش داد(Toktam Hejrani et al., 2015). تاثیر صمغ بومی بارهنگ کبیر بر کیفیت و خواص حسی کیک روغنی کم چرب ترکیبی (گندم – کینوآ) توسط رحیمی و همکاران بررسی شد. نتایج حاکی از آن بود که تا ۵۰ درصد از روغن موجود در فرمولاسیون کیک قابلیت جایگزینی با صمغ بارهنگ کبیر را دارد(رحیمی و همکاران ۱۳۹۸). عوض صوفیان و همکاران از کنجاله بادام شیرین و صمغ زانتان در تولید کیک بدون گلوتن استفاده کردند. نتایج آنالیز حسی نشان داد که نمونه های حاوی صمغ زانتان و کنجاله بادام نسبت به نمونه شاهد از مطلوبیت بیشتری برخوردار بودند(عوض صوفیان و همکاران ۱۳۹۳).در حقیقت جایگزینی گلوتن، یکی از مسائل چالش برانگیز برای صنعت غذا است. زیرا تهیه مواد غذایی فاقد گلوتن که از کیفیت تغذیه ای و عملکردی مطلوب برخوردار باشند، دشوار است. نتایج نشان داد صمغ زانتان می تواند به عنوان یکی از بهترین جایگزین‌های گلوتن در محصولات فاقد گلوتن استفاده شود.صحرائیان و همکاران عملکرد صمغ دانه شاهی، در مقایسه با گزانتان بر خصوصیات بافتی و تصویری کیک روغنی بدون گلوتن را بررسی کردند. نتایج بدست آمده نشان داد عملکرد مثبت صمغ دانه شاهی بر خصوصیات تکنولوژیکی کیک بدون گلوتن بیش از عملکرد صمغ گزانتان است. مشخص شده است

وقتی حجم و تخلخل معمول مانند کیک اسفنجی، نان های حجیم و نیمه حجیم و باگت فرانسوی، ..... و غیره ، انواع پیراپزشکی و دونات مدنظر باشد، می توان صمغ دانه شاهی را به عنوان یک صمغ بومی در تولید محصولات بدون گلوتن صنایع پخت با عملکردی بهتر از صمغ گزانتان معرفی کرد(صحرائیان و همکاران، ۱۳۹۷).

۱-۲-اثر ضد بیاتی صمغ کتیرا

از آنجایی که افزودن کتیرا و افزایش سطوح آن، به دلیل افزایش جذب و نگهداری آب و بالا بردن رطوبت، کاهش سفتی و به تاخیر افتادن بیاتی را به دنبال دارد، از این رو این صمغ می تواند به عنوان یکی از ترکیبات ضد بیاتی در فراورده های پخت استفاده شود (البته با وجود این ویژگی مثبت، کاهش حجم و تیره شدن رنگ پوسته و مغز نان، از خصوصیات نامطلوب این صمغ در نظر گرفته شد.)(مویدی و همکاران ۱۳۹۲). ساز و کار هیدروکلوئیدها برای تعویق بیاتی شامل حفظ گاز بیشتر در خمیر و در نتیجه کاهش سفتی، به دلیل افزایش قوام خمیر، تشکیل شبکه موقت ژلی و افزایش سفتی دیواره احاطه کننده سلول‌های حاوی گاز، در نان است(Rodge et al., 2012). البته برخی از صمغ ها خواص امولسیفایری نیز دارند و یک لایه سطحی دور حباب های گاز تشکیل می‌دهند(Salt et al., 2018). هیدروکلوئیدها توسط گروه های هیدروکسیل و دیگر گروه های آب دوست نیز باعث جذب و حفظ آب بیشتر شده و از مهاجرت آب، از مغز نان به پوسته و بالطبع از لاستیکی شدن پوسته جلوگیری می کنند. حفظ آب بیشتر، در مغز نان به تازگی و نرمی مغز آن نیز کمک می کنند. در طی نگهداری، هیدروکلوئیدها از ایجاد پیوند گلوتن – نشاسته جلوگیری می‌کنند و با ممانعت از توزیع مجدد آب و انتقال آب از گلوتن به نشاسته باعث کاهش سفتی بافت می شوند(Kondakci, 2015).

جدول۱:خلاصه تاثیر صمغ ها در فراورده نان

پلی ساکاریدهای اصلاح شده	قادر به نگهداری آب، موجب افزایش فعالیت بین سطحی در خمیر در طی تخمیر و تشکیل شبکه های ژلی طی حرارت دهی در فرآیند تهیه نان به علت دارا بودن گروه های هیدروفوبیک، افزایش حجم قرص نان، محتوای رطوبتی، بافت مغز نان و ویژگی هایی از این قبیل با استفاده از مشتقات سلولز در محصولات پخت، عامل ضدبیاتی و به تعویق انداختن سخت شدن مغز نان، جلوگیری از رتروگراداسیون آمیلوپکتین
هیدروکسی پروپیل متیل سلولز	کمک به حفظ یکنواختی خمیر، پایدار ماندن طی فرایند پخت امولسیون
هیدروکسی پروپیل سلولز	کارایی در ایجاد بافت و ساختار ماکارونی
کربوکسی متیل سلولز	موجب حفظ رطوبت در فرآورده های نانوایی، بهبود احساس دهانی محصول، کنترل کریستالیزاسیون یخ و شکر، حفاظت در برابر افت حجم پودر کیک آماده، ورز دادن، بهبود حجم و یکنواختی در محصول پخته شده، افزایش طول مدت نگهداری فرآورده های غلات
صمغ عربی(آکاسیا)	حل شدن سریع در آب، ویسکوز بودن محلول های صمغ در غلظت های بالا
صمغ گوار	کاربرد به عنوان امولسیفایر، تثبیت کننده، پایدارکننده و غلیظ کننده در صنایع پخت، بهبود تحمل به مخلوط شدن، افزایش زمان نگهداری به واسطه نگهداری رطوبت، مانع از آب اندازی در غذای فریز شده

کیتوزان	فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی، نگهدارنده بالقوه مواد غذایی با خواستگاه طبیعی، افزایش سرعت مهاجرت آب از مغز ران به پوسته، مانع تشکیل کمپلکس های آمیلوز- لیپید، افزایش سرعت هیدراسیون نشاسته و گلوتن
آگار	ژل آگار می تواند مقدار زیادی مواد جامد محلول مثل قند را بدون کریستال شدن نگه دارد، کدر می‌شود یا خصوصیات چسبندگی اش را از دست می دهد.

۱-۳-نقش صمغ ها در فراورده های لبنی پروبیوتیک و کم چرب

در سال های اخیر با توجه به افزایش سطح آگاهی مردم، تقاضا برای مصرف غذاهای عملگر (مواد غذایی که علاوه بر داشتن خواص تغذیه ای، حاوی خواص سلامت بخش نیز باشند) از جمله فراورده های لبنی پروبیوتیک و کم چرب بسیار گسترش یافته است(Chiavaro, 2007). مصرف باکتری های پروبیوتیک از طریق محصولات غذایی روش ایده آلی برای برگرداندن توازن فلور میکروبی روده ای است. برای اینکه یک کشت میکروبی در مکمل های رژیمی یا سایر محصولات استفاده شود و اثرات مفید خود را در بدن نشان دهد، بایستی بومی روده انسان باشد، در عبور از لوله گوارش بقای خود را حفظ کند و قادر به پر کردن نیچه اکولوژی باشد. برای حفظ بقاء و سوش ها بایستی مقاوم به نمک های صفراوی حاضر در روده (لیزوزوم ها) و متابولیت های بازدارنده تولید شده طی فرایند هضم باشند. باکتری های معمول مورد استفاده در تولید ماست برخی از این شرایط را ندارند(مظاهری، ۱۳۸۹). پایین بودن قابلیت زنده‌مانی باکتری های پروبیوتیک به دلیل حساسیت به شرایط نامساعد موجود در محصولات غذایی و دستگاه گوارش یکی از معضلات موجود در صنعت فراورده های پروبیوتیک می باشد(FAO/WHO, 2001). علاوه بر آن پایداری محصول در دوره نگهداری طولانی مدت و بافت آن که در احساس دهانی بسیار موثر است، تحت تاثیر رفتار رئولوژیکی محصول قرار دارد(Ibanoglu, 2002). صمغ عربی و صمغ گوار از جمله موادی هستند که بدون هضم به روده بزرگ می رسند و قادر به افزایش انتخابی بیفیدوباکتریوم ها می باشند(Philips, 2008). صمغ عربی همچنین بعنوان یک عامل پوشاننده نیز استفاده می شود که می تواند زنده مانی پروبیوتیک ها را تحت شرایط فیزیولوژیکی روده بهبود بخشد(Desmond, 2002). صمغ عربی به دلیل خاصیت محافظت کنندگی از ترکیباتی است که به طور گسترده ای در میکروانکپسولاسیون پروبیوتیک ها استفاده می شود(McNamee, 2001). دیوید و همکاران گزارش کردند که هیدروکلوئیدهای طبیعی مثل زانتان و گوار سبب افزایش ویسکوزیته می شود(David, 2005). ال صیاد و همکاران گزارش کردند که بکارگیری زانتان در سطح ۰/۰۱ درصد بیشترین ویسکوزیته را نشان داد که ناشی از بر هم کنش زانتان با پروتئین های شیر بود. صمغ زدو تاثیر معنی داری بر زنده مانی پروبیوتیک ها نداشت. ویسکوزیته و سینرزیس نمونه های ماست با افزودن صمغ زدو بهبود یافت(El-Sayed, 2002). عزیز نیا و همکاران (Aziznia, 2008)گزارش کردند که صمغ تراکاگانت ویژگی‌های رئولوژیکی بافت را بهبود می بخشد. تاثیر صمغ هم بیشتر به نوع صمغ تا غلظت صمغ بستگی دارد. بنابراین پیوند شیمیایی بین صمغ و ترکیبات معطر، تاثیر بافت روی آروما را تعیین می کند(Shah, 2000). تاثیر صمغ به میزان چربی ماست هم بستگی دارد. طبق یافته های تانگونیرما و همکاران در ماست کم چرب، افزودن پکتین در کاهش آروما موثر نبود، بیشتر صمغ ها در افزایش ویسکوزیته موثر بودند. به طور کلی می توان گفت تاثیر صمغ در ماست پروبیوتیک بیشتر به نوع صمغ تا غلظت صمغ و همین طور به میزان چربی ماست بستگی دارد(Rezazad, 2009).

ماست از فراورده های تخمیری پر مصرف شیر است که به دلیل ارزش تغذیه ای بالا تاثیر مثبتی در سلامتی دارد. مصرف ماست کم چرب باعث کاهش کلسترول خون می گردد ولی با کاهش چربی استحکام بافت ماست نیز کم می گردد. جهت جلوگیری از این مشکل می توان از هیدروکلوئیدها استفاده نمود. سخاوتی زاده و صادق زاده فر تاثیر صمغ گوار به عنوان جایگزین چربی بر برخی خصوصیات شیمیایی و حسی ماست کم چرب را بررسی کردند. افزودن صمغ گوار به ماست، باعث عدم جذب چربی و کلسترول در خون می شود. صمغ گوار و زانتان می تواند بافت ماست را بهبود و میزان آب انداختگی را کاهش دهد(سخاوتی زاده، ۱۳۹۲).

با توجه به مشکلات به وجود آمده در اثر مصرف محصولات با چربی بالا، امروزه استفاده از جایگزین های چربی در مواد غذایی از جمله ماست افزایش پیدا کرده است. لذا در مطالعه ای تاثیر اینولین و پودر صمغ دانه به بر خواص فیزیکوشیمیایی و کیفی ماست کم چرب بررسی شد. نتایج نشان داد که می توان از اینولین و صمغ دانه به در سطوح بهینه در تهیه ماست کم چرب استفاده نمود(غیبی، ۱۳۹۸). یادملتا و همکاران از صمغ فارسی و صمغ دانه بالنگو شیرازی در غلظت های مختلف در ماست هم زده کم چرب استفاده کرده و ویژگی های فیزیکوشیمیایی آن را در طول مدت ۲۱ روز بررسی کردند. آن ها در تحقیق خود مشاهده کردند که افزودن هر دو صمغ باعث کاهش آب اندازی نمونه ها گشت و پیشنهاد کردند که افزودن صمغ فارسی تا سطح ۱۵٪ درصد باعث بهبود خواص کیفی ماست کم چرب می شود(Yademellat, 2016). نیکوفر و همکاران صمغ دانه به را در سطوح ۰/۰۳ ، ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد ماست کم چرب به کار برده و مشاهده کردند که افزودن صمغ دانه به باعث کاهش میزان آب اندازی و کاهش سفتی و چسبندگی در ماست شد که دلیل آن را برهمکنش بین صمغ دانه به دارای بار مثبت و میسل های کازئین دارای بار منفی اعلام نمودند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد، استفاده از اینولین و صمغ دانه به در ماست کم چرب روی همه فاکتورهای مورد بررسی اثر معنی دار داشت. همچنین اینولین و صمغ دانه به توانستند به عنوان جایگزین چربی نقش قابل توجهی روی بسیاری از خصوصیات کیفی ماست ایفا کنند. اینولین و صمغ دانه به باعث کاهش میزان آب اندازی در ماست کم چرب شدند. از طرفی دیگر قابلیت نگهداری آب در ماست و ویسکوزیته را افزایش داده و قادر بودند در سطوح بالا از سفت شدن بیش از اندازه بافت ماست کم چرب در طول مدت زمان نگهداری بکاهند(Nikoofar, 2013).

محمدزاده و همکاران تاثیر استویا و صمغ گوار بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی ماست منجمد حاوی کنسانتره پرتقال را بررسی کردند. نتایج نشان داد که شیرین کننده استویا جایگزین مناسبی برای شکر و صمغ گوار نیز جایگزین مناسبی برای چربی می باشند و نمونه‌های حاوی ۷۵-۱۰۰ درصد استویا و ۰/۵ درصد گوار به عنوان تیمار بهینه مشخص شدند(محمدزاده، ۱۳۹۹).

لشکری و همکاران امکان تولید پنیر سفید ایرانی کم چربی و بهینه سازی ویژگی های آن با استفاده از صمغ عربی و گوار را بررسی کردند. نتایج کلی نشان داد که با استفاده از بعضی هیدروکلوئیدها مانند صمغ گوار، به عنوان جایگزین چربی، می توان معایب مربوط به بافت پنیر کم چرب را برطرف کرد. در کل این بررسی نشان داد که می توان با کمک گرفتن از بعضی هیدروکلوئیدها مانند صمغ گوار، به عنوان جایگزین چربی، معایب مربوط به بافت پنیر کم چرب را برطرف کرد(لشگری، ۱۳۸۷).

۱-۴-کاربرد صمغ مرو در بستنی کم چرب

میرزایی و محمدی تاثیر کاربرد صمغ دانه مرو بر بهبود خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی بستنی کم چرب را بررسی نمودند. حذف و یا کاهش میزان چربی در بستنی برای تولید یک فراورده رژیمی همانند سایر فراورده های غذایی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در این پژوهش از صمغ دانه مرو به عنوان جایگزین چربی و پایدار کننده بومی در قیاس با ثعلب به عنوان پایدار کننده پرکاربرد رایج در تولید بستنی در دو سطح استفاده شد. نتایج نشان داد صمغ دانه مرو عملکردی مشابه و گاهی بهتر از ثعلب داشته است. از آنجایی که مرو یکی از دانه های بومی ایران است و صمغ آن ویژگی های عملکردی خوبی دارد. همچنین با توجه به اینکه اغلب پایدارکننده‌ها و منابع جایگزین چربی مورد استفاده در صنایع غذایی وارداتی هستند. لذا استخراج و بررسی تاثیر کاربرد آن در سایر فراورده های غذایی نیز حائز اهمیت است و استفاده از این صمغ هم به عنوان جایگزین چربی مفید و هم به عنوان پایدار کننده اقتصادی به نظر می رسد(میرزائی، ۱۳۹۶).

۱-۵-تاثیر صمغ ها بر خصوصیات کیفی سیب زمینی سرخ شده

بالا بودن محتوای روغن ماده غذایی سرخ شده موجب کاهش پذیرش محصول از جانب مصرف کنندگان است. مشکل جذب روغن در ارتباط با محصولات سرخ شده می تواند با استفاده از هیدروکلوئیدها به عنوان پوشش های خوراکی در طول فرایند سرخ کردن کاهش یابد. لذا یادگاری و همکاران اثرات جدا و متقابل صمغ های دانه قدامه شیرازی و متیل سلولز بر خصوصیات کیفی سیب زمینی سرخ شده را بررسی کردند. نتایج حاکی از این بود که پوشش دهی با مواد هیدروکلوئیدی به دلیل خاصیت سدکنندگی این مواد منجر به کاهش افت رطوبت خلال ها در هنگام سرخ کردن شد(یادگاری و همکاران، ۱۳۹۸).

۱-۶-اثرات صمغ حرا و لوکاست بر جذب روغن و بافت خلال سیب زمینی سرخ شده

اسماعیل زاده کناری و همکاران اثرات صمغ حرا و لوکاست بر جذب روغن و بافت خلال سیب زمینی سرخ شده و تاثیر آن ها بر کیفیت روغن مورد استفاده را بررسی نمودند. در این مطالعه از صمغ لوکاست، حرا و ترکیب آن ها در سه غلظت برای پوشش دهی خلال های سیب زمینی استفاده شد. ویژگی های رئولوژیکی صمغ ها در دو نرخ برشی اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت صمغ ویسکوزیته صمغ افزایش یافت و با افزایش نرخ برش ویسکوزیته ظاهری صمغ ها کاهش یافت. افزایش غلظت پوشش همچنین منجر به کاهش جذب روغن و افزایش راندمان سرخ کردن در نمونه های پوشش دار شد. نمونه های پوشش دار بافت داخلی نرم تر و پوسته تردتری داشتند. از نظر کیفیت روغن، روغن مورد استفاده برای نمونه شاهد دچار اکسایش بیشتری شده بود. نتایج این تحقیق پیشنهاد می کند که با استفاده از پوشش حرا ۱/۵٪ و پوشش ترکیبی می توان اکسایش روغن مورد استفاده برای سرخ کردن را کاهش داد و به محصول سرخ شده با جذب روغن کمتر و راندمان سرخ کردن بالاتر دست یافت که از نظر خصوصیات بافتی نزد مصرف کننده مقبولیت بالاتری دارد(اسماعیل زاده کناری و همکاران، ۱۳۹۶).

۱-۷-جایگزینی بخشی از ژلاتین با صمغ فارسی و استفاده از کندر برای تولید پاستیل فراسودمند

عباسی و همکاران جایگزینی بخشی از ژلاتین با صمغ فارسی و استفاده از کندر برای تولید پاستیل فراسودمند را بررسی نمودند. نتایج نشان داد که می توان از صمغ کندر و صمغ فارسی به عنوان موادی با منشاء طبیعی در تولید پاستیل فراسودمند با خواص غذایی-دارویی استفاده کرد و امکان جایگزینی ۴۰ درصد از ژلاتین با صمغ فارسی به ویژه بخش نامحلول آن وجود دارد(عباسی، ۱۳۹۰).

۱-۸- صمغ ها و سلیاک

سلیاک بیماری خودایمن گوارشی است که افراد مبتلا به این بیماری دارای التهاب مزمن روده کوچک بوده که با مسطح و پهن شدن پرزهای روده در اثر مصرف پروتئین های سرشار از پرولین و گلوتامین نظیر پروتئین موجود در گندم، جو و چاودار بروز می‌کند و تنها راه درمان بیماری سلیاک در حال حاضر، اجتناب مادام العمر از مصرف محصولات حاوی گلوتن می باشد. بنابراین استفاده از آرد غلات فاقد گلوتن در تولید فراورده های پختی حائز اهمیت می باشد. از غلات مهم فاقد گلوتن می توان به ذرت و برنج اشاره کرد(Ciccocioppo, 2005). با توجه به اهمیت تولید فراورده های پخت فاقد گلوتن و همچنین با توجه به اینکه فقدان گلوتن سبب تولید فراورده ای با بافت خشک، رنگ ضعیف، حجم و تخلخل کم می شود، استفاده از جایگزین های مناسب گلوتن نظیر هیدروکلوئیدها در تولید فراورده های فاقد گلوتن برای ایجاد خواص ویسکوالاستیک مشابه گلوتن ضروری می باشد. در این راستا گومز و همکاران نشان دادند که استفاده از صمغ های کربوکسی متیل سلولز، گوار و آلژینات در فرمولاسیون کیک باعث بهبود حجم کیک و افزایش ویسکوزیته می‌شود. صمغ‌های مذکور در کاهش سرعت انتشار گازها در خمیر، تورم گرانول های نشاسته، افزایش جذب آب، تاخیر در بیاتی کیک با افزایش زمان ماندگاری و تازگی محصول نیز موثرند(Gomez, 2007). همچنین ترابی و همکاران به بررسی تاثیر افزودن صمغ های زانتان، گوار، دانه لوکاست، کاراگینان و ترکیبی از گوار و زانتان پرداختند و به این نتیجه رسیدند که افزودن انواع صمغ ها به خلل و فرج کیک تاثیر معنی داری داشتند و بیشترین تاثیر آن متعلق به زانتان و ترکیب زانتان و گوار می باشد(Turabi, 2010). خاتمی و همکاران نیز در پژوهش خود به بررسی اثر افزودن آرد سورگوم و صمغ زانتان در تولید کیک فاقد گلوتن بر پایه آرد برنج پرداختند و نمونه حاوی ۲۰ درصد آرد سورگوم و ۰/۱ درصد صمغ زانتان، به دلیل بهبود خصوصیات فیزیکی کیک به عنوان بهترین ترکیب افزودن صمغ و آرد سورگوم پیشنهاد شد(Khatami, 2015). طی مطالعه ای دیگر، سبحانی و همکاران به بررسی تاثیر افزودن آرد بدون چربی دانه کدو به همراه صمغ زانتان بر روی ویژگی های فیزیکوشیمیایی و حسی کیک بدون گلوتن بر پایه آرد برنج پرداختند و نمونه کیک حاوی ۱۰ درصد آرد بدون چربی دانه کدو و ۰/۲ درصد زانتان را به عنوان بهترین فرمولاسیون کیک بدون گلوتن معرفی کردند(Sobhani, 2015). یانپی و همکاران هم تاثیر افزودن آرد ذرت سفید و صمغ زانتان بر ویژگی های فیزیکی و حسی کیک فاقد گلوتن بر پایه آرد برنج را بررسی کردند و نتایج نشان داد نمونه کیک حاوی ۱۰۰ درصد آرد ذرت به همراه صمغ زانتان نمره آزمون حسی را دریافت. در حالی که بیشترین امتیاز به نمونه کیک حاوی ۲۵ درصد آرد ذرت و ۰/۲ درصد صمغ زانتان تعلق گرفت(یانپی، ۱۳۹۶). کشاورزی پور و همکاران فرمولاسیون کیک بدون گلوتن با استفاده از آکارا (محصول جانبی صنعت شیر سویا) به عنوان یک پایه پروتئینی و فیبری مناسب و نشاسته ذرت و اصلاح ویژگی های آن با بکارگیری افزودنی های مناسب را بررسی کردند. نتایج نشان داد استفاده از افزودنی مناسب در سطوح بهینه در بهبود ویژگی های کیفی کیک تهیه شده بر پایه نشاسته و آکارا موثر است. نمونه تهیه شده علاوه بر دارا بودن ارزش غذایی مناسب به واسطه وجود پروتئین و فیبر بالای موجود در آکارا، سرعت بیات شدن کمتری در طی زمان نگهداری در مقایسه با شاهد دارد. این خصوصیات به حفظ رطوبت مواد اولیه و افزودنی های مورد استفاده در فرمولاسیون و کاهش سرعت رتروگراداسیون نشاسته مرتبط است. این نمونه در طی ۱۴ روز نگهداری، به خوبی پیوستگی بافتی خود را حفظ می کند. با افزودن هیدروکلوئیدها به کیک فاقد گلوتن در کمیت های مناسب، با افزایش قوام و ویسکوزیته نسبی خمیر، افزایش قابل توجهی در پیوستگی بافتی محصول ایجاد خواهد شد. با توجه به بالا بودن ارزش غذایی آکارا و از میان رفتن بسیاری از عناصر ضد تغذیه ای آن طی مراحل تولید و البته امکان تولید محصولی با ویژگی های

کیفی مطلوب، توصیه نمودند که از این محصول جانبی که در حال حاضر کاربردی جز مصرف دام ندارد، در صنایع مختلف غذایی از جمله فراورده های غلات استفاده شود(کشاورزی پور، ۲۰۱۸).

۲.نتیجه گیری

استفاده از هیدروکلوئیدها با توجه به خواص عملکردی ویژه در صنایع غذایی، در سالهای اخیر به شدت گسترش یافته است و بدیهی است که نیاز به جستجوی منابع جدیدتر و مقرون به صرفه بیش از پیش احساس می شود. کاربرد این ترکیبات جهت به تاخیر انداختن فرایند بیاتی و بهبود کیفیت نان مناسب است. ساز و کار آن ها برای تعویق بیاتی شامل حفظ گاز بیشتر در خمیر و در نتیجه کاهش سفتی به دلیل افزایش قوام خمیر، تشکیل شبکه موقت ژلی و افزایش سفتی دیواره احاطه کننده سلول‌های حاوی گاز، در نان است.

مصرف باکتری های پروبیوتیک از طریق محصولات غذایی روش ایده آلی برای برگرداندن توازن فلور میکروبی روده ای است. برای اینکه یک کشت میکروبی در مکمل های رژیمی یا سایر محصولات استفاده شود و اثرات مفید خود را در بدن نشان دهد، بایستی بومی روده انسان باشد، در عبور از لوله گوارش بقای خود را حفظ کند و بایستی مقاوم به نمک های صفراوی حاضر در روده (لیزوزوم‌ها) و متابولیت های بازدارنده تولید شده طی فرایند هضم باشند. این در حالی است که باکتری های معمول مورد استفاده برخی از این شرایط را ندارند. با این وجود برخی از صمغ ها بدون هضم به روده بزرگ می رسند و قادر به افزایش انتخابی بیفیدوباکتریوم ها می باشند. همچنین بعنوان یک عامل پوشاننده نیز استفاده می شوند که می تواند زنده مانی پروبیوتیک ها را تحت شرایط فیزیولوژیکی روده بهبود بخشد. از سویی به دلیل خاصیت محافظت کنندگی به طور گسترده ای در میکروانکپسولاسیون پروبیوتیک ها استفاده می شوند. صمغ ها در محصولات لبنی نیز مفید هستند به گونه ای که برخی از آن ها بافت ماست را بهبود و میزان آب انداختگی را کاهش می دهد. در حقیقت می توان گفت تاثیر صمغ در ماست پروبیوتیک بیشتر به نوع صمغ تا غلظت صمغ و همین طور به میزان چربی ماست بستگی دارد. همچنین می توان با کمک گرفتن از بعضی هیدروکلوئیدها به عنوان جایگزین چربی، معایب مربوط به بافت پنیر کم چرب را برطرف کرد. نتایج برخی مطالعات حاکی از آن است که صمغ دانه مرو عملکردی مشابه و گاهی بهتر از ثعلب داشته است. لذا استفاده از این صمغ بومی، هم به عنوان جایگزین چربی مفید و هم به عنوان پایدارکننده اقتصادی به نظر می رسد. استفاده از صمغ ها در غلات نیز سودمند می باشد به گونه ای که با افزودن آن ها به کیک فاقد گلوتن در کمیت های مناسب، با افزایش قوام و ویسکوزیته نسبی خمیر، افزایش قابل توجهی در پیوستگی بافتی محصول ایجاد خواهد شد. در واقع صمغ ها کاربرد گسترده ای دارند که در این مقاله مروری سعی بر این شده بود که کاربرد تغذیه ای و صنعتی آن ها مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

۱. آقایی. مرضیه. ۱۳۸۷. خصوصیات فیزیکوشیمیایی صمغها «GUMS» و اثر بهبود دهندگی آنها در صنایع غذایی، همایش منطقه ای کشاورزی، محور رشد و توسعه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مرودشت.
۲. اسماعیل زاده کناری فاطمه، اسماعیل زاده کناری رضا، خادمی شورمستی داریوش. ۱۳۹۶. اثرات صمغ حرا و لوکاست بر جذب روغن و بافت خلال سیب زمینی سرخ شده و تاثیر آن ها بر کیفیت روغن مورد استفاده. علوم و صنایع غذایی ایران. ۲۸۱-۲۷۳: ۱۴(۷۲).

۳. حسینی اصفهانی مونا، فدوی قاسم. ۱۳۹۷. بررسی اثر افزودن صمغ های کتیرا و گوار بر ویژگی های فارینوگرافی خمیر و خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی نان تافتون. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. ۱۰۵- ۹۷ : (۴)۱۳.

٤. حنفی، ق.، درویشی، ن.، سیدین اردبیلی، م.، میراحمدی، ف. ۱۳۹۱.بررسی خواص ضد باکتریایی اسانس شیره درخت بنه بر روی باکتری های استافیلوکوک اورئوس،اشرشیاکلی و کلستریدیوم اسپوروژنس، مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان، ۱۱، ۱:۹۱

۵. حفیظ محمدمسعود، شیخ الاسلامی زهرا.۱۳۹۹. بهینه یابی فرمول نان حجیم حاوی صمغ های فارسی و ریحان. پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران.۱۶(۴ (پیاپی ۶۴)):۳۹۵-۴۰۸.

٦. دوستی، ب.۱۳۹۵ .مقایسه کمی و کیفی اسانس مرزه در (Satureja Khuzistanica Jamzad) خوزستانی رویشگاههای مختلف غرب و جنوب غرب ایران .مجله پژوهشهای گیاهی ، جلد ۲۹ ، شماره ۲.

۷. دوستی بهروز. ۱۳۹۸.مقایسه اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی صمغ گیاه بنه (Pistacia atlantica) با برخی آنتی بیوتیک های رایج درمانی. پژوهش های سلولی و مولکولی (زیست شناسی ایران).

۸. روزبهانی. احمد، مقتدایی. الهام، نوربخش. مصطفی. ۱۳۹۷. بررسی هیستومورفومتریک تاثیر صمغ درخت کاج بر ترمیم زخم پوستی موش صحرایی نژاد ویستار .مجله گیاهان دارویی،۹(۲:) ۹۹-۱۰۶.

۹. رمضانی مهدی، افشارمنش محسن، طهماسبی رضا، رستمی گوهری الهه. ۱۳۹۶.تاثیر پودر صمغ آنغوزه در مقایسه با آنتی‌بیوتیک بر عملکرد، ریخت‌شناسی و جمعیت میکروبی روده در جوجه‌های گوشتی . پژوهشهای تولیدات دامی. ۸ (۱۷) :۳۳-۲۶.

۱۰. رحیمی شیرین، شیخ الاسلامی زهرا، سیدین اردبیلی سیدمهدی. ۱۳۹۸.بررسی اثر صمغ بومی بارهنگ کبیر (Plantago major L.) بر بافت, ریز ساختار و ویژگی های حسی کیک روغنی کم چرب ترکیبی (گندم-کینوآ). علوم و صنایع غذایی ایران. ۱۳۴- ۱۲۳ : (۸۸)۱۶.

۱۱. سخاوتی زاده سعید، صادق زاده فر شیما. ۱۳۹۲.تاثیر صمغ گوار به عنوان جایگزین چربی بر برخی خصوصیات شیمیایی و حسی ماست کم چرب. نوآوری در علوم و فناوری غذایی (علوم و فناوری غذایی). ۵(۲ (پیاپی ۱۶)):۲۹-۳۸ .

۱۲. صحرائیان بهاره، کریمی مهدی، شیخ الاسلامی زهرا. ۱۳۹۷. بررسی عملکرد صمغ دانه شاهی در مقایسه با زانتان بر خصوصیات بافتی و تصویری کیک روغنی بدون گلوتن (برنج-ذرت). تحقیقات مهندسی صنایع غذایی (مجله تحقیقات مهندسی کشاورزی).;۱۷(۲ (پیاپی ۶۵)):۱-۱۴.

۱۳. عباسی سلیمان، محمدی سودابه، رحیمی سمیه. ۱۳۹۰. جایگزینی بخشی از ژلاتین با صمغ فارسی و استفاده از کندر برای تولید پاستیل فراسودمند. مهندسی بیوسیستم ایران (علوم کشاورزی ایران). ۱۳۱-۱۲۱:(۱)۴۲.

۱٤. عوض صوفیان. عبدالستار، اعلمی. مهران، صادقی ماهونک. علیرضا، قربانی. محمد، ضیائی‌فر. امان محمد. ۱۳۹۳.استفاده از کنجاله بادام شیرین و صمغ زانتان در تولید کیک بدون گلوتن .*پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی* .196-185 :(2)3 ;1393 , doi: 10.22101/jrifst.2014.08.23.327

۱۵. غیبی نسا، اشرفی یورقانلو رقیه. ۱۳۹۸. بررسی تأثیر اینولین و پودر صمغ دانه به بر خواص فیزیکوشیمیایی و کیفی ماست کم چرب. مهندسی بیوسیستم ایران (علوم کشاورزی ایران). ۹۷۵-۹۶۳: (۴)۵۰.

۱٦. کشاورزی پور. مینا، عباسی . هاجر، فاضل. محمد۲۰۱۸. بررسی تأثیر صمغ گوار و زانتان و امولسیفایر سدیم استئاریل لاکتیلات بر ویژگی های کیفی کیک اسفنجی فاقد گلوتن بر پایهٔ نشاسته ذرت و اکارا. علوم غذایی و تغذیه. ۱۵(بهار ۹۷) :ص : ۸۷-۱۰۰

۱۷. کشاورزی پور مینا، عباسی هاجر، فاضل محمد، بررسی تأثیر صمغ گوار و زانتان و امولسیفایر سدیم استئاریل لاکتیلات بر ویژگی های کیفی کیک اسفنجی فاقد گلوتن بر پایهٔ نشاسته ذرت و اکارا. علوم غذایی و تغذیه, ۲۰۱۸. ۱۵(بهار ۹۷) :ص : ۱۰۰-۸۷

۱۸. لشگری .حنان، خسروشاهی اصل .اصغر، گلکاری. حجت اله، اشرفی یورقانلو. رقیه، ظهری مریم. ۱۳۸۷.بررسی امکان تولید پنیر سفید ایرانی کم چربی و بهینه سازی ویژگی های آن با استفاده از صمغ عربی و گوار. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران.۳(۳ (پی در پی ۱۰)):۱-۱۰.

۱۹. مویدی سارا، صادقی ماهونک علیرضا، عزیزی محمدحسین، مقصودلو یحیی.۱۳۹۲. بررسی اثر صمغ کتیرا بر ویژگی های کیفی نان حجیم. علوم و صنایع غذایی ایران.۱۱۲-۱۰۳: (۳۸)۱۰.

۲۰. مظاهری طهرانی، م. یگانه زاد، س. معین فرد، م. واحدی، ن. ۱۳۸۹. عملکرد و کاربرد انواع افزودنی های سلامتی بخش در صنایع لبنی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۱۳۸۹. ص ۹۳.

۲۱. محمدزاده وهاب، آرژه ادریس، معصومی داریوش، خسروشاهی اصل اصغر. ۱۳۹۹. بررسی تأثیر استویا و صمغ گوار بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی ماست منجمد حاوی کنسانتره پرتقال. علوم و صنایع غذایی ایران. ۱۰۱-۹۳: (۱۰۱)۱۷.

۲۲. میرزائی سیده مرضیه، محمدی ثانی علی. ۱۳۹۶. تاثیر کاربرد صمغ دانه مرو بر بهبود خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی بستنی کم چرب. نوآوری در علوم و فناوری غذایی (علوم و فناوری غذایی). ۱۰۳-۹۷ : (۳)۹.

۲۳. یادگاری مژگان، اسماعیل زاده کناری رضا، هاشمی سیدجعفر. ۱۳۹۸. بررسی اثرات جدا و متقابل صمغ های دانه قدومه شیرازی و متیل سلولز بر خصوصیات کیفی سیب زمینی سرخ شده. نوآوری در علوم و فناوری غذایی (علوم و فناوری غذایی). ۱۱(۴ (پیاپی ۴۲)):۸۹-۱۰۱.

۲۴. یانپی منصوره، اعلمی مهران، محمدزاده جلال، صادقی علیرضا، کشیری محبوبه. ۱۳۹۶.تاثیر افزودن آرد ذرت سفید و صمغ زانتان بر ویژگی‌های فیزیکی و حسی کیک فاقد گلوتن بر پایه آرد برنج. مجله علوم و صنایع غذایی ایران. ۱۴ (۷۳) :۳۳۰-۳۱۹.

25. Abdullaev FI, Frenkle GD.2010. Effect of Ferula assa-foetida on cell colony formation and cellular nucleic acid and protein syntheses. Biofactor. 18(3):201-4.
26. Assar,S., Jafarzade, A., Mohagheghi, M. and Bahramabad, R., 2005. Antimicrobial effects of PinusEldarica's Gum and Its Alcoholic Extract on Some Bacteria of Skin Infections. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences, 4(3):186-191.
27. Al- Habbal MJ , Al Habbal Z , Huwez Fu , 1986. A double - blind controlled clinical trial of Mastic and Placebo in the treatment of duodenal Ulcer , clin , EXP , pharmacolphysiol . 1984 sep-oct , 11 (5) : 541 - 4 . Huwez Fu , Al , Habbal MJ , Mastic in treatment of benign gastric ulcers . Gastroentnol Jpn . 21 (3) : 273 – 40.
28. Agrawal AK, Rao CV, Sairam K, Joshi VK and Goel RK.2000. Effect of Piper longum Linn, Zingiber officianalis Linn and Ferula species on gastric ulceration and secretion in rats. *Indian J.Exp. Biol*. 38 (10): 994 - 8.
29. Agrawal AK, Rao CV, Sairam K, Joshi VK, Goel RK. Effect of Piper longum Linn, Zingiber officianalis Linn and Ferula species on gastric ulceration and secretion in rats. Indian J Exp Biol. 2004;38(10):994-8.
30. Aydin, R., M. Karaman, T. Cicek and H. Yardibi. 2008. Black Cumin (Nigella sativa L.) supplementation into the diet of the laying hen positively influences egg yield parameters, shellquality, and decreases egg cholesterol. Poultry Science, 87: 2590-2595.
31. Abu-Zaiton, A.S. 2010. Anti-diabetic activity of Ferula assa-foetida extract in normal andalloxaninduced diabetic rats.Pakistan Journal of Biological Sciences, 4(2): 159-162.
32. Amaral JF, Silva MI, Neto MR, Neto PF, Moura BA, de Melo CT, *et al*.2007. Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-limonene in mice. Biol Pharm Bull 30(7): 1217-20.
33. Aziznia, S., Khosrowshahi, A., Madadlou, A., and Rahimi, J. 2008. Whey Protein Concentrate and Gum Tragacanth as Fat Replacers in Non-fat Yogurt: Chemical, Physical, and Microstructural Properties. Journal of Dairy Science,91, 2545-2552.
34. Bas E, Recio MC, Abdallah M.2007. Inhibition of the proinflammatory mediators production and antiinflammatory effect of Ferula assafoetida. Ethnopharmacol J. 110(5):414-27.
35. Bas E, Recio MC.2007. New insight into the inhibition of the inflammatory response to experimental delayed-type hypersensitivity reaction in mice by Ferula assafoetida L.Eur J Pharmacol. 555(6):199-210.
36. Batista, O., Duarte, A. and Toree, M.C. 1994. Structure and antimicrobial activity of diterpens from the roots of Plectranthushereroensis.Journal of Natural Product, 57(6): 858-861.
37. Bellakhdar J, Claisse R. Fleuretin J and Youno C.1991. Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan Pharmacopoeia. *J. Ethnopharmacol*. 35 (2): 123 – 43.

38. Bhattarai NK. 1992. Folk Anthelmintic drugs of central Nepal. *Int. J. Pharmacol*. 30 (2): 145– 50.
39. Behpour M, Ghoreishi SM, Khayatkashani M, Soltan N.2011. The effect of two oleo-gum resin exudate from Ferula assa-foetida and Dorema ammoniacum on mild steel corrosion in acidic media. Corros Sci. 53(8): 2489-501.
40. Burchfiel JL, Applegate CD, Samoriski GM.1990. Evidence for piriform cortex as a critical substrate for the stepwise progression of kindling. Epilepsia .31: 632.
41. Campbell EL, Chebib M, Johnston GA.2004. The dietary flavonoids apigenin and (-)-epigallocatechin gallate enhance the positive modulation by diazepam of the activation by GABA of recombinant GABAA receptors. Biochem Pharmacol 68(8): 1631-8.
42. Chiavaro, E., Vittadini, E. and Corradini, C., 2007, Physicochemical characterization and stability inulin gels. Europe Food Research Technology,225,85 –94.
43. Ciccocioppo, R., and Corazza, G. R. 2005. Is a life-long gluten-free diet for patients with celiac disease successful? Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology, 2(7), 290-291.
44. Daryaei, M.G., Hoseiny, SK., Taheri, K., Mirzaei, J., and Mzbani, A. 2012.Effect of morphological variables of pistacia atlantica on gum and seed production. Iranian journal of biology.25(2): 303-314.
45. Diaz AM, Abadb MJ.2004. Phenylpropanoid glycosides from Ferula assa-foetida: In vitro anti-inflammatory activity. LifeSci. 74(12):2515-26.
46. Dehpour AA, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM. 2009.Antioxidant activity of the methanol extractof Ferula assafoetida and its essential oil composition. Grass Aceites. 60(4): 405-12.
47. Desmond, C., Ross, R. P., O'Callaghan, E., Fitzgerald, G., & Stanton, C. 2002. Improved survival of Lactobacillus paracasei NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 1003–1011.
48. David, W. E. and Rosalind, E. M., 2005, Interactions of polysaccharide stabilisers with casein aggregates in stirred skim-milk yoghurt. International Dairy Journal, 15, 1175–1183.
49. Dickinson, E. 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. Food Hydrocolloids, 17(1): 25-39.
50. El-Sayed, E.M., Abd El-Gawad, I.A., Murad, H.A. and Salah, S.H.2002. Utilization of laboratory produced xanthan gum in the manufacture of yogurt and soy yogurt. Europe Food Research Technoogyl,215,298 –304.
51. Esmaeili MA, Sonboli A, Kanani MR. 2009. *Salvia sahendica* prevents tissue damages induced by alcohol in oxidative stress conditions: effect on liver and kidney oxidative parameters. J Med Plants . 34: 276-83.
52. Elisabetsky E, Brum LF, Souza DO. 1999.Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models.Phytomedicine 6(2): 107-13.
53. Fisher A, Walker MC, Bowery NG. 2003.Mechanism of action of anti-epileptic drugs. In: Sander JW, Walker MC, Smalls JE, editors. Epilepsy: from synapse to society. A practical guide to epilepsy. Crowborough: Meritus Communications; p. 249-72.
54. Fatehi, M., F. Fariftehand, Z. Fatehi-Hassanabad. 2004. Antispasmodic and hypotensive effects ofFerula asafoetida gum extract. Journal of Ethnopharmacology, 91(2-3): 321-324.
55. Fatehi M, Farifteh F, Fatehi-Hassanabad Z. 2004.Antispasmodic and hypotensive effects of Ferula asafoetida gum extract. J Ethnopharmacol. 91(2-3): 321-4.
56. FAO/WHO Experts' Report, 2001, Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.Ibanoglu, E. 2002. Rheological behaviour of whey protein stabilized emulsions in the presence of gum Arabic. Journal of Food Engineering, 52: 273–277.
57. Gomez,M., Ronda, F., Coballera, P. A., Blanco, C. A., and Rosell, C. M. 2007. Functionality of different hydrocolloids on the quality and shelf-life of yellow layer cakes. Food Hydrocolloid, 21, 167-173.
58. Hall BJ, Chebib M, Hanrahan JR, Johnston GA.2005. 6-Methyl flavanone, a more efficacious positive allosteric modulator of gamma-aminobutyric acid (GABA) action at human recombinant α2β2γ2L than at α1β2γ2L and α1β2 GABAA receptors expressed in xenopus oocytes. Eur J Pharmacol 512(2-3): 97-104.
59. Huwez . Fu , Thirlwell D , Cockayne A , AlaAldeen DA .1998. Mastic gum kills helicobacter pylori . Neg1 J Med , 339 (26) : 1986.
60. Huang RQ, Bell-Horner CL, Dibas MI, Covey DF, Drewe JA, Dillon GH.2001. Pentylenetetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptors: mechanism and site of action. J Pharmacol ExpTher 298(3): 986-95.
61. Ilango K, Chitra V.2010. Wound Healing, anti-oxidant activities and anti-inflammatory of glycoterpenoids fromFerula assafoetida in rats. TJPR. 9(3):223-30.

62. Iranshahy M, Iranshahi M.2012. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of Ferula assa-foetida. JEthnopharmacol. 134(1):10-5.
63. Javadabadi K, Sadoghi M, Tavafi M, Gholami M R. 2017.Effect of apricot tree resin hydroethanolic extract on skin wound healing in rats. yafte. 18 (4) :98-103.
64. John D. 1984. One hundred useful raw drugs of the Kani tribes of Trivandrum forest division, Kerala, India. Int. J. Crude Drug Res. 22 (1): 17 –39.
65. Kavoosi G, Rowshan V. 2013.Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil obtained from Ferula assa-foetida oleo-gum-resin: Effect of collection time. Food Chem. 2013; 138(4): 2180-7.
66. Karimi M, Naseri M, Sayyah M, Kamalinejad M, Amiri S.2014. Evaluation of Anticonvulsive Effect of Methanol Extract of Ferula Asafoetida Gum in Mice. Shefaye Khatam. 2 (1) :46-50.
67. Kawashty SA, Mosharrafa SA, EL-Gibali M, Saleh NA. 2000.The flavonoids of four pistacia species in Egypt. Biochem Syst Ecol 28: 915-7.
68. Kiasalari Z, Khalili M, Roghani M, Heidari H, Azizi Y. 2013.Antiepileptic and Antioxidant Effect of Hydroalcoholic Extract of Ferula Assa Foetida Gum on Pentylentetrazole induced Kindling in Male Mice. BCN. 4(4) : 21-28.
69. Kondakci T, Ang AMY, Zhou W.2015. Impact of sodium alginate and xanthan gum on the quality of steamed bread made from frozen dough. Cereal Chemistry. 92(3):236-45.
70. Khatami. E., Aalami, M., Maghsoudlou, Y., and Kadivar, M. 2015.Application of rice and sorghum flour in the formulation of gluten free cake. A thesis of M.Sc. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.
71. Lee JH, Choi S, Lee Y, Lee HJ, Kim KH, Ahn KS, Bae H, Lee HJ, Lee EO, Ahn KS, Ryu SY, Lü J, Kim SH.2010. Herbal compound farnesiferol C exerts antiangiogenic and antitumor activity and targets multiple aspects of VEGFR1 (Flt1) or VEGFR2 (Flk1) signaling cascades. Mol. Cancer Ther. 9 (2): 389 - 99.
72. Marone P Bonel L , leone E , Bona S , Carretto E , Perversil . 2001.Bactericidal activity of pistacia Lentiscus Mastic gum against Helico bacter pylori .J Chemother . 13 (6) : 611-4.
73. mahdavi charmi M, tehranipour M, mahdavi shahri N.2017. Effect of asafoetida resin hydroalcoholic extract on experimental rheumatoid arthritis in rat. Research in Medicine. 40 (4) :172-177.
74. Mahran GH. El Alfy TSMA and Ansari SMAA. 1973. phytochemical study of volatile oil of Afghanian asafetida. Bull Fac. Pharm. Cairo Univ. 12 (2): 101 – 7.
75. Mallikarjuna GU, Dhanalakshmi S, Raisuddin S, Rao AR. 2003.Chemomodulatory influence of *Ferula asafoetida* on mammary epithelial differentiation, hepatic drug metabolizing enzymes, antioxidant profiles and N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis in rats. *Breast Cancer Res. Treat*. 81 (1): 1 - 10.
76. Marzieh Abizadeh, Narges Hosseinmardi, Shima Ebrahimi, Mahyar Janahmadi, Asie Shojaii, Fereshteh Motamedi.2014. The effect of Dorema ammoniacum pretreatment on the progression of seizures induced by chemical kindling in rats . pajoohande. 19 (5) :228-234.
77. McNamee, B.F., O'Riordan, E.D. and O'Sullivan, M. 2001. Effect of partial replacement of gum arabic with carbohydrates on its microencapsulation properties. Journal of Agriculture and Food Chemistry 49, 3385–3388.
78. Nikoofar, E., Hojjatoleslami, M. & Shariaty, M. 2013 . Surveying the Effect of Quince seed Mucilage as a Fat Replacer on Texture and Physicochemical Properties of Semi Fat Set Yoghurt. International Journal of Farming and Allied Sciences, 2: 861- 865.
79. Noroozi S, Mosaffa F, Soltani F, Iranshahi M, Karimi G, Malekaneh M, Haghighi F, Behravan J. 2009. Antigenotoxic effects of the disulfide compound persicasulfide A (PSA) on rat lymphocytes exposed to oxidative stress. *Planta Med.* 75 (1): 32 - 6.
80. Noroozi S., Khadem Haghighian H., Abbasi M., javadi M., Goodarzi S. 2018. A review of the therapeutic effects of frankincense. journal of inflammatory diseases (the journal of qazvin university of medical sciences). 22(1 (96)):70-81.
81. Parvin, N., validi, M., Naghibi, F., Moazzeni, H., Pirani, A., and Esmaeili, S. 2012. Ethnobotanical survey of herbal remedies traditionally used in kuhghiluyehva Boyer Ahmad province of Iran. J. Ethnopharmacol, 141(1):80-95.
82. Parvardeh S, Niapoor M, Hosseinzadeh H.2002. Hepatoprotective activity of Pistacia vera L. gum extract in rats. J. Med. Plants. 1 (4) :27-34.
83. Philips, G., Ogasawara, T., & ushida, K., 2008, The regulatory and scientific approach to defining gum Arabic as a diatery fiber. *Food Hydrocolloids*, 22, 24-35.
84. Ramadan NI, Al Khadrawy FM. 2003. The in vitro effect of Assafoetida on Trichomonas vaginalis. J.Egypt. Soc. Parasitol. 33 (2): 615 - 30.

85. Ramadan NI, Abdel-Aaty HE, Abdel-Hameed DM, El Deeb HK, Samir NA, Mansy SS, Al Khadrawy FM. Effect of Ferula assafoetida on experimental murine Schistosoma mansoni.
86. Rahbarian R, Sadooghi S D.2014. Investigating the effects of aqueous extract of asafoetida resin on the serum level of insulin and blood glucose in type 1 diabetic rats. J Shahrekord Univ Med Sci. 16 (3) :16-21.
87. Rezazad Bari, M., Ashrafi, R., Alizadeh, M., and Rofehgarineghad, L. 2009. Effects of Different Contents of Yogurt Starter/Probiotic Bacteria, Storage Time and Different Concentrations of Cysteine on the Microflora Characteristics of Bio-Yogurt. Research journal of biological sciences, 4, 137-142.
88. Ross IA.2007. Medicinal plants of the world: Chemical Constituents, traditional and modern medicinal uses. 3nd ed. Humana Press Inc. USA. pp: 223 - 34.
89. Rodge A, Sonkamble S, Salve R, Hashmi S.2012. Effect of hydrocolloid (guar gum) incorporation on the qualitycharacteristics of bread. J Food Process Technol. 3(2):1-7.
90. Sadoughi S.D.2013. Effect of aqueous extract of Ferula assa-foetida's resin on wound healing of streptozotocin induced diabetic rats. Horizon Med Sci. 19 (3) :129-135.
91. Sadoghi S., Q Zafarbalanzhad, Baharara J, Nejad Shahrukhabadi KH., Rahbarian R., Sepehri moghaddam H. 2015.The effect of ethanol extract of assafoetida resin on on angiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. Journalof Medical Science of Razi. 131: 80-85
92. Sayyah M, Moaied S, Kamalinejad M.2005. Anticonvulsant Activity of *Heracleum Persicum* seed. J Ethnopharmacol 8: 209-11.
93. Salt LJ, González-Thuillier I, Chope G, Penson S, Tosi P, Haslam RP, et al.2018. Intrinsic wheat lipid composition effects the interfacial and foaming properties of dough liquor. Food Hydrocolloids. 75:211-22.
94. Shah, N.P. 2000. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. Journal of Dairy Science, 83, 894-907.
95. Stafford GI, Jager AK, Staden JV. 2005.Activity of traditional South African sedative and potentially CNS-acting plants in the GABA-bezodiazepine reseptor assay. J Ethnopharmacol 210-5.
96. Seetharam KA and. Pasricha JS.1987. Condiments and contact dermatitis of the finger-tips. Indian J. Dermatol. Venerol. Leprol. 53 (6): 325 – 8.
97. Sobhani, S., M., Aalami, M., Sadeghi Mahoonak, A., and Kashaninejad, M. 2015. Application of pumpkin seed meal and xanthan gum in formulation of gluten-free cake. A thesis of M.Sc. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.
98. Tam JC, Lau KM, Liu CL, To MH, Kwok HF. 2011.The in vivo and in vitro diabetic wound healing effects of a 2-herb formula and its mechanisms of action. J Ethnopharmacol. 134(3):831-8.
99. Toktam Hejrani AM, Zahra Sheikholeslami , Mahdi Ghiyafe Davoodi. 2015. Effect of Guar gum and amylase enzymes on quality part baked frozen Barbari bread. Iranian Food Science and Technology Research Journa. 11(5):12.
100. Thuille, N., Fille, M. and Nagl, M. 2003. Bactericida activity of herbal extracts. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 206(3): 210-217.
101. Turabi, E., Sumnu, G., and Sahin, S. 2010. Quantitative analysis of macro and microstructure of gluten-free rice cake containing different types of gums baked in different oven. Food Hydrocolloids, 24, 755-76.
102. Venkataraghavan S and Sundareesan TP.1981. A short note on contraceptive in Ayurveda. J. Sci.Res. Pl. Med. 2 (1/2): 39.
103. Vezzani A, Granata T. 2005.Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. Epilepsia 46(11):1724-43.
104. Xu K, Stringer JL. 2008.Antioxidants and free radical scavengers do not consistently delay seizure onset in animal models of acute seizures. Epilepsy Behav 13: 77-82.
105. Xu X, Yu L, Chen G. 2006.Determination of flavonoids Ferula assafoetida L. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. J Pharm Biomed Anal. 41(2):493-9.
106. Yademellat, M., Jooyandeh, H. & Hojjati, M. 2016. Comparison of some physiochemical and sensory properties of low-fat stirred yogurt containing Persian and Balangu-Shirazi gums, Journal of Food Science and Technology, 14: 313-326.

Water Quality Assessment of Atrak River Using NSFWQI Index in Gonbad kavus Urban Area

Mostafa Koose Gharavi[*1], Jamileh Panahi Mirzahasanloo[2], Mojtaba Ghareh Mahmoudlou[3], Arsalan Bahalkeh[4]

[*1]M.Sc. Student of Systematic Biology and Plant Ecology, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran
[3]Assistant Professor, Department of Rangeland and Watershed Management, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran
[4]M.Sc. of Aquatic Ecology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran

[*]*Email: mostafafkgh@gmail.com*

Abstract

Water is a vital resource for every biological and human phenomenon and is one of the most important basic resources for the development of countries and rivers are ecosystems that play a role in the development of human civilization, sustainable economic growth and ecological functions and integration. Awareness of the quality of resources is one of the most important requirements in the planning and development of water resources and their conservation and control. Creating a regular control program will allow appropriate strategies to reduce the pollution of the riverside catchment and, finally, improve the water quality of these resources. The goal of this study was to quality of Atrak River in the Golestan provance. To study the effects of municipal sewage on the quality of Atrak River, after a field visit, according to the sources of pollution in the region, the location of pollutants and the possibility of sampling the river water, 5 stations were selected for sampling along the river. Sampling was done in the fall of 2020 from 5 stations between Maraveh Tappeh and Inchehbrun. NSFWQI quality index was used to evaluate the quality of Atrak River in the study area. Based on the measured factors, the NSFWQI index was calculated for the studied stations. The results showed that the numerical value of this index had the highest value in Maraveh Tappeh city station ($p < 0.05$) and the value of this index had a decreasing trend from Maraveh Tappeh city to Incheh-Burun city. Interpretation of numerical value based on NSFWQI index for the studied stations shows that the water quality of Atrak river in Golestan province is poor and the color of this index is orange. Factors involved in reducing river water quality based on these two indicators of human factors such as discharge of untreated municipal wastewater into the river due to lack of wastewater collection and treatment system, waste disposal and accumulation in the riverbed. To protect water resources and prevent the deterioration of the Atrak River, identify sources of pollution (livestock, poultry farms and fish farms and municipal wastewater inputs), control input pollutants and also promote clean agriculture (without the use of nitrogen and phosphate fertilizers and chemical fertilizers for Prevention of river contamination with nutrients and prevention of river nutrition) and the use of biological and natural control methods to maintain quality is necessary.

keywords: Atrak Rive, NSFWQI index, Water Resources Quality

ارزیابی کیفی آب رودخانه اترک با استفاده از شاخص NSFWQI در استان گلستان

مصطفی کوسه غراوی*[۱]، جمیله پناهی میرزا حسنلو[۲]، مجتبی قره‌محمودلو[۳]، ارسلان بهلکه[۴]

[*۱] دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سیستماتیک و اکولوژی گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس، ایران
[۲] استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس، ایران
[۳] استادیار گروه مرتع و آبخیزداری، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس، ایران
[۴] کارشناس ارشد بوم شناسی آبزیان، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس، ایران

*Email: mostafafkgh@gmail.com

چکیده

آب منبع حیاتی برای هر پدیده زیستی و انسانی می‌باشد و یکی از منابع مهم پایه و اساسی برای توسعه کشورهاست و رودخانه‌ها اکوسیستم‌هایی هستند که به دلیل نقشی که در توسعه تمدن انسانها، رشد اقتصادی پایدار و کارکردها و یکپارچگی اکولوژیکی بازی می‌نمایند. آگاهی از کیفیت منابع یکی از نیازمندی‌های مهم در برنامه‌ریزی و توسعه منابع آب و حفاظت و کنترل آن‌ها می‌باشد. ایجاد یک برنامه کنترلی و منظم این امکان را فراهم می‌کند که راهکارهای مناسب در راستای کاهش آلودگی حوضه آبریز رودخانه‌ها و در نهایت ارتقای وضعیت کیفی آب این منابع اتخاذ گردد. هدف از انجام این تحقیق بررسی کیفیت رودخانه اترک در استان گلستان می‌باشد. جهت مطالعه اثرات ناشی از ورود فاضلاب شهری بر کیفیت رودخانه اترک، پس از بازدید میدانی، با توجه به منابع تولید آلاینده در منطقه، مکان ورود آلاینده‌ها و نیز امکان نمونه‌برداری از آب رودخانه، تعداد ۵ ایستگاه جهت نمونه‌برداری در طول رودخانه تعیین شد و نمونه‌برداری در فصل پاییز ۱۳۹۹ از ۵ ایستگاه در حد فاصل شهر مراوه‌تپه و اینچه‌برون انجام گردید. جهت بررسی کیفیت رودخانه اترک در محدوده مطالعاتی از شاخص کیفی NSFWQI استفاده شد. بر اساس فاکتورهای اندازه‌گیری شده، شاخص NSFWQI برای ایستگاه‌های مورد مطالعه محاسبه شد. نتایج نشان داد مقدار عددی این شاخص در ایستگاه شهر مراوه تپه بالاترین مقدار را داشت ($p < ۰/۰۵$) و مقدار این شاخص از شهر مراوه تپه به سمت شهر اینچه‌برون روند نزولی داشت. تفسیر مقدار عددی بر اساس شاخص NSFWQI برای ایستگاه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد کیفیت آب رودخانه اترک در استان گلستان از نوع بد می‌باشد و رنگ مربوط به این شاخص نیز نارنجی است. عوامل دخیل در کاهش کیفیت آب رودخانه بر اساس این دو شاخص عوامل انسانی نظیر تخلیه فاضلاب‌های شهری تصفیه نشده به رودخانه به دلیل عدم وجود سیستم جمع آوری وتصفیه کننده فاضلاب، دفع و تجمع زباله‌ها در بستر رودخانه می‌باشد. جهت حفاظت منابع آب و جلوگیری از کاهش کیفیت رودخانه اترک، شناسایی منابع آلاینده (خروجی دامداری‌ها، مرغداری‌ها و مزارع پرورش ماهی و منابع ورودی فاضلاب‌های شهری) کنترل آلاینده‌های ورودی و همچنین ترویج کشاورزی پاک (بدون استفاده از سموم و کودهای شیمیایی ازته و فسفاته برای جلوگیری از آلودگی رودخانه به مواد مغذی و جلوگیری از تغذیه‌گرایی رودخانه) و استفاده از روش‌های مبارزه بیولوژیکی و طبیعی جهت حفظ کیفیت لازم و ضروری است.

کلمات کلیدی: رودخانه اترک، شاخص NSFWQI، کیفیت منابع آب

۱.مقدمه

امروزه دسترسی به منابع آب شیرین و سالم از مسایل بسیار مهم در بیشتر کشورها از جمله منطقه خاورمیانه و کشور ایران است. ایران به دلیل قرار گرفتن در کمربند خشک و نیمه خشک جهان در زمره کشورهای با محدودیت منابع آب قلمداد می‌شود. حجم نزولات جوی نسبت به خشکی‌های کره زمین به ازای هر کیلومتر مربع ۸۳۰ هزار متر مکعب می‌باشد در حالی که این میزان نسبت به وسعت خشکی‌های ایران تنها ۲۵۰ هزار مترمکعب است از طرف دیگر کلیه آب‌های موجود در ایران قابل استفاده نیست و درصد بالایی را آب‌های شور تشکیل می‌دهند که روز به روز بر میزان آن‌ها افزوده می‌شود. به همین دلیل میزان این ماده حیاتی در ایران یکی از مهم‌ترین ارکان توسعه کشور است که توسعه سایر بخش‌ها در گروی بهره برداری پایدار آن است (عزتی‌فیض، ۱۳۹۵). در میان منابع آب رودخانه‌ها از مهم‌ترین منابع تامین آب می‌باشند که جهت مصارف شرب، کشاورزی، آبیاری، صنعت و ... مورد استفاده قرار می‌گیرند (Bordalo et al., 2001). رودخانه‌ها اکوسیستم‌هایی هستند که به دلیل نقشی که در توسعه تمدن انسانها، رشد اقتصادی پایدار و کارکردها و یکپارچگی اکولوژیکی بازی می‌نمایند، از منابع طبیعی حائز اهمیتی به شمار می‌روند. لذا می‌توان اینگونه بیان نمود که رودخانه‌ها یکی از مهمترین عوامل توسعه شهرها و تمدن بشری بوده و فراهم کننده آب و انرژی برای طبیعت و انسان‌ها می‌باشند. متأسفانه علیرغم نقش و اهمیت منحصر بفرد این اکوسیستم‌های حیاتی، این منابع طبیعی شگرف و خدادادی تحت تاثیر فشارهای اکولوژیکی انسان‌ها قرار داشته و بر اثر مصارف و فعالیت‌های انسانی به شدت در معرض تهدید و آسیب قرار گرفته‌اند. در نتیجه در طی سالیان اخیر همراه با رشد فزاینده ساخت و سازهای غیر اصولی و توسعه شهرنشینی و با بهره برداری بی رویه از این منابع طبیعی شاهد تغییرات گسترده و چشمگیری در رودخانه‌ها هستیم که این امر موجب تغییرات شگرفی در جنبه‌های گوناگون کمی و کیفی رودخانه‌ها و سرزمین‌های حاشیه آن گردیده است (مجنونیان، ۱۳۷۸). آلودگی رودخانه‌ها یکی از مهم‌ترین مشکلات دنیای امروز و به ویژه در کشورهای در حال توسعه می‌باشد که کشور ایران نیز با این مشکل روبروست (Asadollahfardi, 2009).

رودخانه اترک یکی از سه رودخانه اصلی در استان گلستان می‌باشد که نقش پایه و اساسی در عرضه آب دارد و منبع مهمی برای تامین آب مورد استفاده برای مصارف صنعت، شرب، کشاورزی و دامداری برای مرزنشینان می‌باشد.

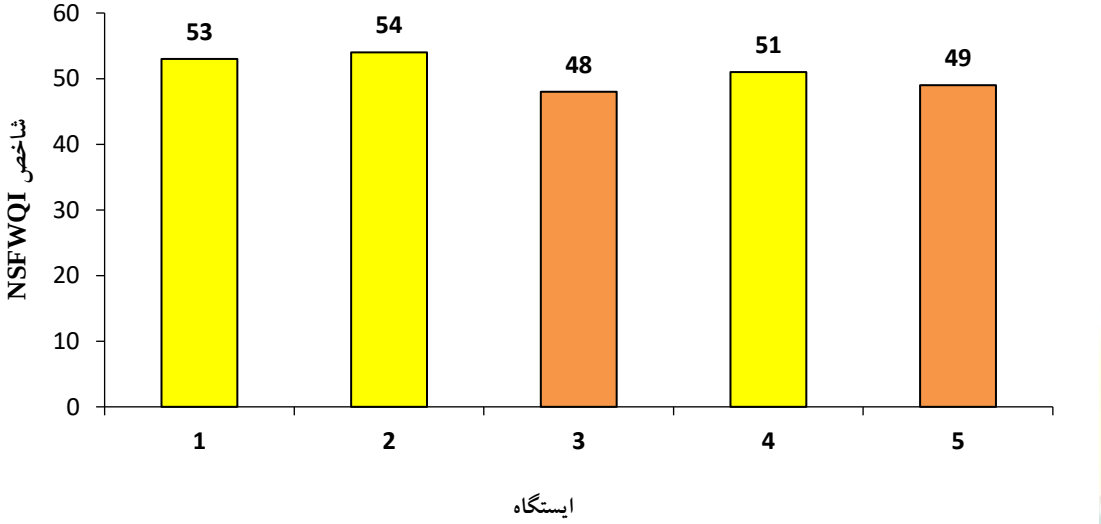
۲.مواد و روش‌ها

جهت مطالعه اثرات ناشی از ورود فاضلاب شهری بر کیفیت رودخانه اترک، پس از بازدید میدانی، با توجه به منابع تولید آلاینده درمنطقه، مکان ورود آلاینده ها ونیز امکان نمونه‌برداری از آب رودخانه، تعداد ۵ ایستگاه جهت نمونه‌برداری در طول رودخانه تعیین شد. نمونه‌برداری از ایستگاه‌های تعیین شده در فصل پاییز ۱۳۹۹ به صورت هر دو ماه یک بار انجام گردید. نمونه‌های برداشت شده بلافاصله جهت اندازه‌گیری پارامتر های مورد مطالعه تحت شرایط استاندارد به آزمایشگاه دانشگاه گنبد کاووس منتقل و در شرایط آزمایشگاهی و طبق روش استاندارد متد (Standard Method) مورد آزمایش قرار گرفتند. پارامترهای مورد آزمایش بر اساس شاخص کیفی NSFWQI ۹ پارامتر بوده که شامل: اکسیژن محلول، کلیفرم مدفوعی، اسیدیته، نرخ مصرف اکسیژن بیولوژیکی، دمای آب، فسفات، نیترات، کدورت و کل جامدات محلول می‌باشد.

برای محاسبه شاخص فوق دو عامل، وزن پارامتر و کیفیت پارامتر دخیل می‌باشد. پس از اندازه‌گیری با استفاده از منحنی‌های تبدیل یا با استفاده ازبرنامه مربوطه، مقدار نهایی هر زیر شاخص از رابطه بدست آورده می‌شود. در این رابطه Ii مقدار مربوط به زیر شاخص (پارامتر کیفی) و Wi ضریب وزنی مربوط به زیر شاخص می‌باشد. سپس با قرار دادن مقدار شاخص در جدول رتبه‌بندی شاخص کیفی آب (جدول ۴) سطح کیفیت آب مورد نظر تعیین می‌شود. برای تهیه نقشه پهنه‌بندی کیفی رودخانه با استفاده از این شاخص از پنج رنگ اشاره شده در جدول استفاده می‌گردد. در این مطالعه از نرم افزار آنلاین شاخص NSFWQI جهت محاسبه شاخص استفاده گردید.

نتایج و بحث

بر اساس فاکتورهای اندازه‌گیری شده، شاخص NSFWQI برای ایستگاه‌های مورد مطالعه بر روی رودخانه اترک محاسبه شد. نتایج نشان داد مقدار عددی این شاخص در ایستگاه اول شهر مراوه تپه و ایستگاه دوم در روستای قره قاشلی بالاترین مقدار را داشت و مقدار این شاخص از ایستگاه سوم شهر کرند روند نزولی داشت و دوباره در ایستگاه چهارم روستای خیرخوجه علیاء مقدار این شاخص بالا رفت اما دوباره در ایستگاه پنجم مقدار این شاخص پایین آمد (شکل ۱). تفسیر مقدار عددی بر اساس شاخص NSFWQI برای ایستگاه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد کیفیت آب رودخانه اترک در ایستگاههای اول، دوم و چهارم از نوع متوسط می‌باشد و رنگ مربوط به این شاخص نیز نارنجی است اما در ایستگاههای سوم و پنجم از نوع بد بدست آمد که رنگ آن نیز نارنجی بود.



شکل ۱: شاخص NSFWQI بر روی ایستگاه‌های مورد مطالعه بر روی رودخانه اترک

نتایج مطالعات بر روی رودخانه‌های بابلرود و رودخانه دو هزار مازندران و رودخانه کارون در خوزستان نشان داد که کیفیت آب این رودخانه‌ها بر اساس این شاخص خوب، متوسط تا بد بدست آمد که نشان می‌دهد کیفیت این رودخانه‌ها به سمت بدتر شدن پیش می‌رود (فرزادکیا و همکاران، ۱۳۹۴؛ شریف‌دینی و همکاران، ۱۳۹۳ و حسینی و همکاران، ۱۳۹۲). در مطالعات حسین‌زاده و همکاران (۱۳۹۲) و نصیر احمدی و همکاران (۱۳۹۲) در بررسی کیفیت آب رودخانه‌های آیدوغموش استان آذربایجان شرقی و هراز مازندران با استفاده از شاخص NSFWQI کیفیت رودخانه‌های مورد مطالعه را متوسط ارزیابی کردند. در مطالعات دیگری توسط کاظمی و همکاران (۱۳۹۷) و طهماسبی و همکاران (۱۳۹۰) در رودخانه‌های لنگرود رودخان و رودخانه گرگر شوشتر کیفیت آب آنها را به وسیله این شاخص متوسط تا بد ارزیابی کردند. در مطالعه حاضر نیز کیفیت آب با شاخص NSFWQI بد ارزیابی شد که در مقایسه با سایر مطالعات وضعیت نامناسبی داشت.

منابع

۱. حسین‌زاده، ا.، خرسندی، ح.، رحیمی، ن.، حسین‌زاده، س.، علیپور، م. ۱۳۹۲. ارزیابی کیفیت آب رودخانه آیدوغموش با استفاده از شاخص NSFWQI و شاخص آلودگی Liou. مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و چهارم، شماره دوم، صفحات ۱۶۲-۱۵۶.
۲. حسینی، پ.، ایلدرومی، ع.ر.، حسینی، ع.ر. ۱۳۹۲. بررسی کیفیت آب رودخانه کارون با استفاده از شاخص NSFWQI در بازه زرگان تا کوت امیر (طی ۵ سال). فصلنامه انسان و محیط زیست، شماره ۲۵، صفحات ۱۱-۱.
۳. شریف دینی، ن.گ.، امیر نژاد، ر.، صائب، ک. ۱۳۹۳. پهنه‌بندی کیفی آب رودخانه دوهزار تنکابن بر اساس شاخص NSFWQI با استفاده از سامانه اطلاعات جغرافیایی GIS. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران. دوره بیست و چهارم، شماره ۱۱۹، صفحات ۲۹-۳۹.

٤. طهماسبی، س.، افخمی، م.، تکدستان، ا. ۱۳۹۴. تحلیل وضعیت فیزیکی، شیمیایی و میکروبی آب رودخانه گرگر با استفاده از شاخص کیفیت آب NSF. فصلنامه علمی-پژوهشی علوم بهداشتی، سال سوم، شماره ۴، صفحات ۶۴-۵۵.
٥. عزتی‌فیض، ج. ۱۳۹۵. هیدروژئولوژی دره زیمکان با تاکید بر میزان آب ورودی به تونل نوسود، استان کرمانشاه. پایان نامه کارشناسی ارشد آب شناسی، دانشکده علوم زمین، دانشگاه شهید بهشتی، ۱۱۱ صفحه.
٦. فرزادکیا، م.، ناصری، س.، رضایی کلانتری، ر.، اصغرنیا، ح.ع.، گوهری، م.ح.، اسرافیلی، ع.، دادبان شهامت، ی.، قنبری، ن.ا. ۱۳۹۴. پهنه‌بندی کیفی آب رودخانه بابلرود بر مبنای شاخص NSFWQI کیفی و نرم افزار GIS. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران. دوره بیست و پنجم، شماره ۱۳۴، صفحات ۳۶۲-۳۵۷.
۷. مجنونیان، ه. ۱۳۷۸. حفاظت رودخانه‌ها (ویژگی‌های بیوفیزیکی، ارزش‌های زیستگاهی و ضوابط بهره‌برداری). سازمان حفاظت محیط زیست، ۱۲۸ صفحه.
۸. نصیر احمدی، ک.، یوسفی، ذ.ا.، ترسلی، ا. ۱۳۹۱. پهنه‌بندی کیفیت آب رودخانه هزار بر اساس شاخص NSFWQI. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران. دوره بیست و دوم، شماره ۹۲، صفحات ۷۱-۶۴.
9. Asadollahfardi, G.H. 2009. Application of water quality indices to define surface water quality in Tehran. International, Journal ofWater, 5 (1): 51-69.
10. Bordalo, A. A., W. Nilsumranchit, and K. Chalermwat. 2001. Water Quality and Uses of the Bangpakongriver (Eastern Thailand): Water Res. 15(35): 3642-3635.

Identification of diatoms in Zav Spring, Golestan Province

Hanieh Yousefiy[1*]; Jamileh Panahy Mirzahasanlou[2] Mojtaba Qara Mahmoudloo[3] Arsalan Behlkeh[4]

1- MSc student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavous University
2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavous University
3- Assistant Professor, Department of Rangeland and Watershed Management, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University
4- Department of Fishery, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University

Email: hanieh.usefi96@gmail.com

Abstract

Diatoms, algae belong to the phylum Bacillariophyta, constitute the dominant algal flora in aquatic ecosystems. Zav Spring is located in western end of the Golestan National Park, in Golestan Province. Due to the importance of spring habitats in biodiversity trend and lacking the algal studies in the region, this study was done in order to identification of diatoms in this spring. For this purpose, sampling was performed during the autumn 2020 to the spring 2021 from rock beds and sediment. In general, during this study, 43 species belonging to 20 genera were identified in the epilithic and epipelic samples. The largest genera are *Nitzchia* with 5 sp. and *Navicula*, *Surirella* and *Cymbella* each with 4 sp. The most abundant species are *Achnanthidium minutissimum*, *Gomphonema pumilum* and *Cymbella excisa*. In general, diatom flora of Zav Spring is combination of cosmopolitan taxa and taxa with narrow distribution.

Keywords: Epilithic, Epipelic, Taxonomy, Flora

شناسایی دیاتوم های چشمه زاو استان گلستان

هانیه یوسفی[1*]؛ دکتر جمیله پناهی میرزاحسنلو[2]؛ دکتر مجتبی قره محمودلو[3]؛ مهندس ارسلان بهلکه[4]

۱- دانشجو کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه گنبدکاووس

۲- استادیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه گنبدکاووس

۳- استادیار گروه مرتع و آبخیزداری دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس

۴- مربی گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس

Email: hanieh.usefi96@gmail.com

چکیده

دیاتوم‌ها جلبک‌های متعلق به شاخه Bacillariophyta بوده و فلور جلبکی غالب را در اکوسیستم‌های آبی تشکیل می دهند. چشمه زاو (پل چشمه) در انتهای غربی پارک ملی گلستان در استان گلستان واقع شده است. با توجه به اینکه چشمه‌ها زیستگاه‌های بسیار مهمی برای روند تنوع زیستی هستند و تاکنون مطالعه ای روی جلبک های چشمه زاو انجام نشده است، این مطالعه با هدف شناسایی دیاتوم های این چشمه انجام گرفت. برای این منظور نمونه برداری طی پاییز ۱۳۹۹ تا بهار ۱۴۰۰ از بستر های سنگی و رسوب انجام گرفت. در این مطالعه بطور کلی در نمونه های اپی لیتیک و اپی پلیک ۴۶ گونه دیاتوم متعلق به ۲۰ جنس شناسایی گردید، بزرگترین جنس ها به ترتیب Nitzchia با ۵ گونه و Navicula ، Surirella و Cymbella هرکدام با ۴ گونه می باشند. بیشترین فراوانی مربوط به گونه های Achnanthidium minutissimum ، Gomphonema pumilum، Cymbella excisa می باشند. بطور کلی فلور دیاتومی چشمه زاو ترکیبی است از گونه های جهان وطنی و گونه هایی با پراکنش محدود.

کلید واژگان : اپی لیت، اپی پل، تاکسونومی، فلور

۱. مقدمه

دیاتوم ها ریز جلبک های تک سلولی فتوسنتز کننده هستند. آنها بخش اعظمی از فیتوپلانکتون ها را تشکیل می دهند که خود پایه اصلی زنجیره غذایی در اکوسیستم های آبی هستند. فراوانی این موجودات به همراه توزیع گسترده آنها در زیست گاه های مختلف کاربرد های گسترده ای را برای آنها ایجاد کرده است. دیاتومه ها میکروارگانیسم هایی یوکاریوت و اتوتروف هستند که هم به صورت منفرد و هم کلنی (به شکل زنجیره‌ای) یافت می شوند. یکی از متخصصان به نام (پاسچر، ۱۹۲۱). اعتقاد داشت که دیاتوم ها با گزانتوفیسه ها و کریزوفیسه ها از نظر تشابه در رنگیزه ها با یکدیگر در تقابل نزدیک هستند، بنابراین او سه خانوادهٔ Bacillariophyceae (دیاتوم ها) و Xanthophyceae و Chrysophyceae را در یک شاخه Chrysophyta باهم قرار داد.

برخی از متخصصان دیگر همچون (موریس، ۱۹۶۸) و (چاپمن و چاپمن، ۱۹۴۳). دیاتوم ها را در یک شاخهٔ مجزا در نظر گرفته اند که دارای تنها یک رده به نام Bacillariophyceae می باشد. آنها به وفور در دریا و آب شیرین وجود دارند. بیشتر دیاتوم ها خاکزی اند، برخی از آنها نیز هوازی هستند. در حدود ۲۰۰ جنس و ۶۰۰۰ گونه دیاتوم وجود دارد (کیانمهر، ۱۳۸۴). بسیاری از آنها تک یاخته هستند که در اطراف خود دیواره های سلولی ظریف ایجاد میکنند که به آنها فراستول می گویند. دیاتومها از اوپال (نوعی سیلیس) ساخته شده اند. و از دو نیمه به نام والو تشکیل می شود. نیمه بالایی را اپی تکا و نیمهٔ پایینی را هیپوتکا می گویند (باسروست و همکاران، ۲۰۱۱؛ باساربی، ۱۹۹۸).

اهمیت زیستگاه چشمه ها ب عنوان نقاط مهم تنوع زیستی و پناهگاهی برای حفاظت از تنوع زیستی (کانتوناتی و همکاران، ۲۰۱۲ ، تاکسباک و همکاران، ۲۰۱۷) ، با توصیف تعداد زیادی از گونه های جلبک نادر و در معرض خطر تاکید شده است (صابر و روکا، ۱۹۹۰، ۱۹۹۲، کانتوناتی، ۱۹۹۸، وروم، ۲۰۰۱، پولیکوا و همکاران، ۲۰۰۵، ناسکیمبن و همکاران، ۲۰۱۱). نتایج حاصل از مطالعه بوم شناسی جلبک در چشمه ها (کانتوناتی و همکاران، ۲۰۱۲) در نظارت بر اکوسیستم های آب شیرین کاربرد دارد. به عنوان یک گروه جلبک مورد مطالعه، دیاتوم ها یک شاخص مفید برای کیفیت آب است و منعکس کننده خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب است (کلی و ویتون، ۱۹۹۵، روت و همکاران، ۱۹۹۹، وروم و لانگ_برتالوت، ۲۰۰۴، وجنال، ۲۰۱۳).

در بررسی دیاتوم های رودخانه بالیخلو، ۱۰۹ تاکسون دیاتوم را شناسایی کردند که از این میان، جنس های Nitzchia ، Gomphonema و Navicula بزرگترین جنس های موجود در رودخانه بودند. در این بررسی ۲۰ گونه برای اولین بار از ایران گزارش گردید (پناهی و همکاران، ۲۰۱۸).با تحقیق در رودخانه زرین گل در استان گلستان ۳۱ گونه دیاتوم متعلق به ۱۳ تیره و ۱۹ جنس شناسایی نمودند که تیره Gomphonemataceae با ۶ گونه و تیره های Cymbellaceae و Naviculaceae هرکدام با ۴ گونه بیشترین فراوانی را داشتند (دادگر، ۱۳۹۶).با بررسی دیاتوم ها در بستر اپی لیتیک و اپی پلیک رودخانه چهل چای ۳۲ گونه متعلق به ۱۸ جنس و ۱۵ تیره و ۲ رده شناسایی نمودند، بزرگترین جنس ها Nitzchia و Gomphonema بودند (لک زایی، ۱۳۹۶). با بررسی دیاتوم ها در دو سطح بستر سنگی (اپی لیت) و رسوبی (اپی پل) رودخانه خرمارود در استان گلستان تعداد ۶۲ گونه دیاتوم متعلق به ۲ رده و ۳۱ جنس و ۲۰ تیره شناسایی نمودند. از این تعداد ۶۱ گونه متعلق به رده *Navicula* و تنها یک گونه متعلق به رده Coscinodiscophyceae بود و بزرگترین Nitzchia جنس با ۱۰ گونه بود (آق آتابای، ۱۳۹۷). با بررسی دیاتوم های اپی لیتیک رودخانه قره چای در استان گلستان بطور کلی در این بررسی ۳۹ گونه متعلق به ۱۹ جنس و ۱۳ تیره شناسایی شد. تمام گونه های شناسایی شده متعلق به ردهٔ باسیلاریوفیسه بودند(بیانی، ۱۳۹۷).

۲.مواد و روش ها

اقلیم پارک ملی گلستان بر اساس طبقه‌بندی آمبرژه از بسیار مرطوب و جنگلی تا قسمت‌های نیمه‌خشک و استپی و شوره‌زار را شامل می‌شود. میانگین سالیانه بارش بین ۱۴۲ تا ۸۶۶ میلی‌متر و دمای متوسط سالیانه حدود ۱۰ درجه سانتی‌گراد است. در این پارک رودخانه‌های متعددی جریان دارد و بیش از ۲۱ دهنه چشمه در آن شناسایی شده است که از مهمترین رودخانه موجـود در پـارک، می‌توان رودخانه‌های مادرسو یا دوغ، زاو، آق سو را نام برد که از سر شاخه‌هـای گرگـان رود اسـت کـه در حدود ۳۵ کیلومتر از مسیر خود را در پارک طی می‌کند (عبـاس‌زاده تهرانی، ۱۳۸۱). رودخانه گرگانرود در جنوب شرقی دریای خزر واقع شده که اغلب انشعابات آن از رشته کوه‌های البرز سرچشمه می‌گیرند. تلاقی رود خانه‌های زاو و مادرسو در غرب پارک ملی گلستان در حوضه آبخیز بزرگ گرگانرود قرار می‌گیرند (کیابی و همکاران، ۱۳۷۸). نمونه برداری از رودخانه زاو (پل چشمه) در طی پاییز ۱۳۹۹ و بهار ۱۴۰۰ انجام شد و همانطور که در (شکل۱) مشاهده میشود نقطه قرمز یک نشان دهنده ایستگاه اول میباشد. در هر ایستگاه، دیاتوم ها ازسطح بسترهای سنگی و رسوب جمع آوری شدند. بسترهای اپیلیتیک یا سنگی را ابتدا جهت پاک شدن از گل و لای با آب شسته و سپس با استفاده از مسواک، نمونه ها از سطح سنگ تراشیده شدند، برای نمونه

برداری جلبک های اپیپل نیز بخشی از رسوب به آرامی به ظرف نمونه برداری منتقل شدند (بلینگر و سیجی، ۲۰۱۰) نمونه های جمع آوری شده با فرمالین ۴ % تثبیت شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. در هر ایستگاه نمونه برداری، همراه با نمونه های جلبکی، نمونه های آب نیز در ظروف یک لیتری برداشته شد و جهت آنالیز میزان نیترات، آمونیوم، فسفات به آزمایشگاه منتقل گردید. میزان اکسیژن محلول، دما، هدایت الکتریکی، شوری، PH و TDS با استفاده از دستگاه پرتابل HQ-40d در محل اندازه گیری شد.



شکل۱: موقعیت رودخانه مورد مطالعه و ایستگاه های نمونه برداری

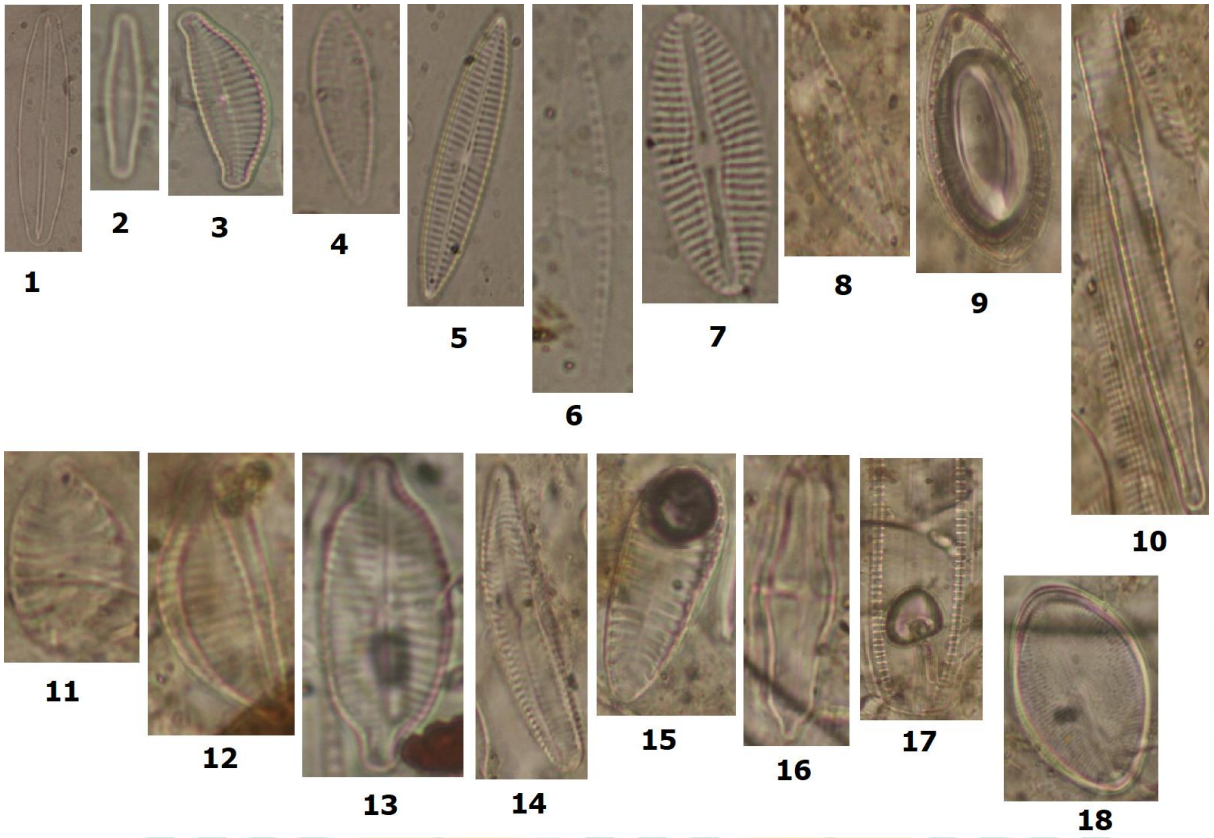
دیاتوم ها قبل از شناسایی و شمارش نیاز به آماده سازی دارند .برای این کار نمونه ها در زیر هود در اسید نیتریک غلیظ جوشانده شدند، سپس اسید اضافی با شستشوی متوالی و آبکشی با آب مقطر حذف شد. سپس با استفاده از چسب Canada Balsamاسلایدهای دائمی تهیه شد. برای شناسایی دیاتومها، نمونه ها در زیر میکروسکوپ نوری دوربیندار بررسی شده، سپس عکس های میکروسکوپی تهیه شد و با استفاده از منابع موجود شناسایی شدند. (کرامر و لانگ برتالوت، ۱۹۹۳b ، ۱۹۹۱a ، ۱۹۹۸ ، ۱۹۸۶ ، کرامر، ۲۰۰۰ ، لانگ برتالوت و کرامر، ۲۰۰۱ ، ۲۰۰۳ ، باهلز، ۲۰۰۶ ، بیشاپ و همکاران، ۲۰۱۷ ، جاتنر و همکاران، ۲۰۱۹) برای شمارش دیاتوم ها نیز ۳۰۰ تا ۴۰۰ والو در زیر میکروسکوپ شمارش گردید و فراوانی نسبی هر کدام از گونه ها بدست آمد.

۳. نتایج

طی دوره مورد مطالعه دامنه نوسانات دما در رودخانه مورد نظر بین ۶/۱۴-۷/۱۳°C، میزان نیترات بین ۳۱-۳۷$mg.l^{-1}$، فسفات بین ۰۰۵/۰-۰۲۶/۰$mg.l^{-1}$، آمونیوم بین ۰۱۳/۰-۰۲۱/۰$mg.l^{-1}$، میزان هدایت الکتریکی بین ۵۰۲/۰-۵۳۵/۰$\mu s.cm^{-1}$، TDS بین ۲۷۱/۰-۲۴۹/۰$mg.l^{-1}$، میزان PH بین ۳۱/۷-۴۶/۷، اکسیژن محلول بین ۶/۱۲-۴/۱۳$mg.l^{-1}$ و میزان شوری بین ۲/۰-۲۵/۰ متغیر بود.

در این مطالعه بطور کلی در نمونه های اپی لیتیک و اپی پلیک ۴۶ گونه دیاتوم متعلق به ۲۰ جنس شناسایی گردید، بزرگترین جنس ها به ترتیب Nitzchia با ۵ گونه و Navicula ، Surirella و Cymbella هرکدام با ۴ گونه می باشند. بیشترین فراوانی مربوط به گونه های Achnanthidium minutissimum ، Gomphonema pumilum، Cymbella excisa ، Achnanthidium

minutissimum، Navicula tripunctata ، Diploneis sp و Amphora pediculus می باشند. ۱۵/۳۵درصد نمونه های دیاتومی چشمه زاو شناسایی شده در هر دو نمونه (اپی پل و اپی لیت) حضور داشتند. ۵۴/۶۵ درصد از نمونه ها تنها در نمونه اپی پل حضور داشتند و ۳۰ درصد فقط در نمونه اپی لیت شناسایی شدند.



شکل۲. تصاویر میکروسکوپ نوری برخی از دیاتوم های شناسایی شده ایستگاه اول در چشمه زاو

1. Frustulia vulgaris 2. Achnanthidium minutissimum 3. cymbella excisa 4. Gomphonema pumilum 5. Navicula tripunctata 6. Nitzschia recta 7. Diploneis sp 8. halamphora sp 9. Surirella ovalis 10. Ulnaria ulna 11. Syrirella brebissonii 12. encyonema minuta 13. Cymbopleura amohicephala 14. Cymbopleura citrus 15. Surirella minuta 16. Stauroneis smithii 17. Nitzschia sigmoidea 18. Cocconeis placentula

جدول۱- فهرست دیاتوم های شناسایی شده در رودخانه گرگان رود به تفکیک رده و تیره

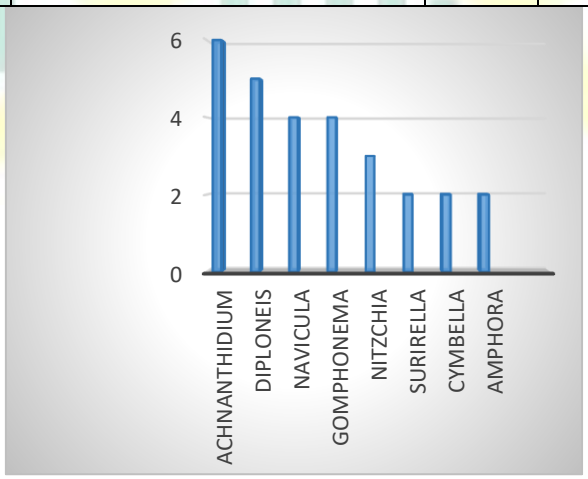
۴. بحث و نتیجه گیری

مطالعه حاضر اولین بررسی و معرفی دیاتوم های چشمه زاو می باشد. بزرگترین جنس ها از نظر تعداد گونه *Nitzchia* و بعد از آن *Navicula* ، *Surirella* و *Cymbella* گزارش شدند. جنس های *Achnanthidium*، *Gomphonema*، *Cymbella* دارای تعداد گونه های زیادی بوده و در اکوسیستم های آبی معمول هستند (*Fourtanier and Kociolek*، ۲۰۰۹).

در مطالعه حاضر دیاتوم های متعلق به دو بستر سنگی و رسوب مورد مطالعه قرار گرفتند. بطور کلی به اعتقاد برخی محققان ترکیب گونه ای و فراوانی دیاتوم های یک ایستگاه می تواند در بسترهای مختلف متفاوت باشد. چون گونه ها به یک بستر بهتر از بستر های دیگر سازگاری پیدا می کنند (*Fisher and Dunbar, 2007;Potapova and Charles, 2005*). نوع بستر می تواند پاسخ جمعیت های دیاتومی به استرسهای انسانی را تحت تاثیر قرار دهد (*Bere, 2010*). در این مطالعه قسمت عمده ی گونه های شناسایی شده در هر دو بستر یافت شدند. تعدادی از آنها تنها در بستر اپی لیت و تنها اندکی منحصرا در بستر اپی پل یافت شدند. البته این نتایج می تواند تحت تاثیر تعداد دفعات و ایستگاه های نمونه برداری قرار گیرد چون گرچه در خیلی از موارد نتایج ما با نتایج (پناهی میرزاحسنلو و همکاران، ۲۰۱۸) در رودخانه شباهت نشان میدهد، اما تفاوتهایی نیز مشاهده می شود، از جمله اینکه در مطالعه ی ما گونه در هر دو بستر سنگی و رسوب مشاهده شد، در حالیکه در مطالعه ذکر شده تنها در بستر رسوب مشاهده شد. (*Salusso and Morana, 2000*) طبقه بندی را بر اساس شاخص شانون پیشنهاد کرده اند که مقادیر شاخص تنوع شانون بالاتر از ۳ نشان دهنده وضعیت آب تمیز، مقادیر ۳-۱ بیانگر وضعیت کمی آلوده و مقادیر کمتر از ۱، نشان دهنده وضعیت شدیدا آلوده می باشد؛ که طبق این تقسیم بندی نیز ایستگاه سوم بر اساس داده های اپی لیت دارای وضعیت شدیدا آلوده و بقیه ایستگاه ها کمی آلوده هستند. همچنین در مطالعه حاضر بطور کلی نمونه های اپی پل در هر ایستگاه تنوع بالایی نسبت به نمونه های اپی لیت داشتند. نتایج بررسی ها نشان داده است که تنوع و ترکیب گونه ای دیاتوم ها در بین سوبستر های نرم و سخت در مقیاس کوچک متفاوت است. همچنین جلبک هایی که در رسوبات رشد می کنند. نسبت به نمونه های اپی لیت بیشتر تحت تاثیر وضعیت شیمیایی رسوب قرار می گیرند (Potapova and Charles, 2005). بطور کلی چشمه زاو با داشتن ۴۶ گونه متعلق به ۲۰ جنس و گونه هایی که در این مطالعه یافت شد. نسبت به رودخانه های همجوار مطالعه شده از تنوع خوبی برخوردار بود. اگرچه نیاز به مطالعات جامع تر با تعداد دفعات نمونه برداری بیشتر برای معرفی دقیق تر فلور دیاتومی این رودخانه و یافتن ارتباط پراکنش دیاتوم ها با پارامتر های محیطی ضروری به نظر می رسد. بررسی نتایج شاخص های تنوع نیز نشان دهنده ی توان خودپالایی رودخانه می باشد.

num	scientific name	EPL	EPP
1	Achnanthidium minutissimum	+	+
2	Amphora pediculus	+	+
3	Amphora sp	+	+
4	Cocconeis placentula	+	+
5	Cocconeis pediculus	+	
6	cymbella excisa	+	
7	Cymbella cymbiphormis		+
8	Cymbella compacta	+	
9	Cymbella tumida	+	
10	Cymbopleura amohicephala		+
11	Cymbopleura citrus		+
12	Delicata montana		+
13	Diploneis sp	+	+
14	Diploneis krammeri	+	
15	Diploneis separanda	+	
16	Diatoma moniliformis	+	
17	Encyonema lang-bertalotti		+
18	Encyonema minuta	+	
19	Frustulia vulgaris		+
20	Fallacia subhamulata	+	
21	Gomphonema parvulum		+
22	Gomphonema pumilum	+	
23	Gomphonema acuminutum		+
24	Gyrosigma sp	+	+
25	Gyrosigma sp		+
26	Halamphora sp		+
27	Halamphora sp		+

28	Navicula criptotenla		+
29	Navicula tripunctata	+	+
30	Navicula menisculus		+
31	Navicula sp		+
32	Nitzchia clausii		+
33	Nitzchia dissipata	+	
34	Nitzchia incognita		+
35	Nitzchia sigmoidea		+
36	Nitzschia recta	+	+
37	Nitzchia sp	+	
38	Rhoicosphenia abbreviate	+	+
39	Stauroneis separanda		+
40	Stauroneis smitti		+
41	Stenopterobia sp		+
42	Surirella ovalis		+
43	Surirella minuta		+
44	Surirella sp		+
45	Syrirella brebissonii		+
46	Ulnaria ulna	+	+



شکل ۳: تعداد گونه ها متعلق به جنس های شناسایی شده در چشمه زاو

منابع

۱. آق آتابای، ع. ۱۳۹۷. بررسی دیاتومه های اپی لیت و اپی پل رودخانه خرمارود شهرستان آزادشهر در استان گلستان. پایان نامه.ص۹۷ کارشناسی ارشد، دانشگاه گنبدکاوس،

۲. لگزایی، ف. ۱۳۹۶. بررسی دیاتوم های اپی لیت و اپی پل رودخانه چهل چای شهرستان مینودشت در استان گلستان. پایان نامه. ص۵۱ کارشناسی ارشد، دانشگاه گنبدکاوس،

۳. دادگر، آ. ۱۳۹۶. بررسی دیاتوم های اپی لیت و اپی پل رودخانه زرین گل شهرستان علی آباد در استان گلستان. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه گنبد کاوس.

٤. بیانی، م. ۱۳۹۷. بررسی دیاتوم های اپی لیتیک رودخانه قره چای شهرستان رامیان در استان گلستان. پایان نامه کارشناسی ارشد، ص۹۷ دانشگاه گنبدکاوس،

٥. عباس زاده تهرانی، ن. ۱۳۸۱. بررسی نقش تغییر کاربری اراضی بر روی میزان دبی سیلاب ها با استفاده از GIS/RS منطقهٔ مور مطالعه: حوزهٔ آبریز رودخانهٔ دوغ. پایان نامهٔ کارشناسی ارشد. دانشکده محیط زیست. انتشارات دانشگاه تهران، ۲۳۴ صفحه.

٦. کیابی، ب.، زهزاد، ب.، فرهنگ دره‌شوری، ب.، مجنونیان، ه.، گشتاسب میگونی، ح. ۱۳۷۲. پارک ملی گلستان. انتشارات سازمان حفاظت محیط زیست، تهران، ۱۲۹ صفحه.

۷. کیابی، ب.، عبدلی، ا.، قائمی، ر. ۱۳۷۸. اکوسیستم های تالابی و رودخانه ای استان گلستان. سازمان حفاظت محیط زیست استان گلستان. ۱۸۲ص.

8. Bahls LL. (2006). Northwest Diatoms, A Photographic Catalogue of Species in The Montana Diatom Collection. Montana Diatom Collection.481 pp.
9. Bellinger, E.G. and Sigee, D.C. 2010. Freshwater Algae, Identification and Use as Bioindicators. Wiley-Blackwell
10. Bellinger, E.G. and Sigee, D.C. 2010. Freshwater Algae, Identification and Use as Bioindicators. Wiley-Blackwell. 271p.
11. Bere, T., 2010. Benthic diatom community structure and habitat preferences along an urban pollution gradient in the Monjolinho River, Sao Carlos, SP, Brazil. Acta Limnologica Brasiliensia 22(1):80-92.
12. Berthon, V. Bouchez, A. & Rimet, F. 2011. Using diatom life-forms and ecological guilds to assess organic pollution and trophic level in rivers: a case study of rivers in south-eastern France. Hydrobiologia, 673:259-271.
13. Bishop IW, Esposito RM, Tyree M, Spaulding SA. (2017). A diatom voucher flora from selected southeast rivers (USA). Phytotaxa. 332(2): 101-140.
14. Cantonati, M. 1998. Diatom communities of springs in the southern alps. Diaom Research 13(2): 201 220.
15. Cantonati M, Angeli N, Bertuzzi E, Lange-Bertalot H. (2012). Diatoms in springs of the Alps: spring types, environmental determinants and substratum. Freshwater Science. 31(2): 499-524.
16. Fisher, J. and Dunbar, M.J., 2007. Towards a representative periphytic diatom sample. Hydrology and Earth Systems Science 11: 399-407.
17. Fourtanier, E. and Kociolek, J.P., 2009. Catalogue of diatom names. San Francisco, California, USA, California Academy of Sciences.
18. Juttner, I., H. Rothfritz and S. J. Ormerod. 1996. Diatoms as indicators of river quality in the Nepalese Middle Hills with consideration of the effects of habitat-specific sampling. Freshwater Biology 36: 475–486.
19. Krammer, K. and Lange-Bertalot, H. 1986. Bacillariophyceae, 1. Naviculaceae. In: Etti, H. Gerloff, J. Heyning, H. Mollenhauer, D. (eds), Susswasserflora von Mitteleuropa, Gustav Fischer Verlag. Jena. Vol. 1, 876 p.
20. Krammer, K. and Lange-Bertalot, H. 1988. Bacillariophyceae, 2. Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. In: Etti, H. Gerloff, J. Heyning, H. Mollenhauer, D. (eds), Susswasserflora von Mitteleuropa, Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. Vol. 2. 596 p.
21. Krammer, K. and Lange-Bertalot, H. 1991 a. Bacillariophyceae, 3. Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. In: Etti, H. Gerloff, J. Heyning, H. Mollenhauer, D. (eds), Susswasserflora von Mitteleuropa, Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. Vol. 3, 576 p.

22. Krammer, K. and Lange-Bertalot, H. 1991 b. Bacillariophyceae, 4. Achnanthaceae. KritischeErganzungenzuNavicula (Lineolatae) und Gomphonema. In: Etti, H. Gerloff, J. Heyning, H. Mollenhauer, D. (eds), Susswasserflora von Mitteleuropa, Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. Vol. 4, 437 p.
23. Krammer K and LangeBertalot H.(1991b). Bacillariophyceae, Achnanthaceae. KritischeErganzungenzuNavicula (Lineolatae) und Gomphonema. In: Etti, H. Gerloff, J. Heyning, H. Mollenhauer, D. (eds), Susswasserflora von Mitteleuropa. Vol. 4.Gustav Fischer Verlag. Stuttgart.
24. Krammer K. (2000). Diatoms of Europe. Diatoms of the European inland waters and comparable habitats 1, the Genus Pinnularia. A.R.G. Gantner Verlag. K.G.
25. Krammer K. (2002). Cymbella. Diatoms of Europe. Diatoms of the European inland waters and comparable habitats 3: 1-584.
26. Krammer K. (2003).Cymbopleura, Delicata, Navicymbula, Gomphocymbellopsis, Afrocymbella. Diatoms of Europe 4: 1-530
27. Lange-Bertalot H. (2001). Naviculasensulato. Diatoms of Europe. Diatoms of European Inland Waters and Comparable Habitats. 2: 1-526. Lange-Bertalot H. (2001).
28. Lange-Bertalot, H., Hofmann, G., Werum, M. and Cantonati, M. 2017. Freshwater Benthic Diatoms of Central Europe: Over 800 Common Species Used in Ecological Assessment. English edition with updated taxonomy and added species. Koeltz Botanical Books, Schmitten-Oberreifenberg, 942 pp.
29. PanahyMirzahasnlou J, Nejadsattari T, Ramezanpour Z, ImanpourNaminJ,Asri Y. (2018). The epilithic and epipelic diatom flora of the Balikhli River, Northwest Iran. Turkish Journal of Botany. 42:518-532.
30. Potapova, M. and Charles, D.F., 2005. Choice of substrate in algae-based water quality assessment. Journal of North American Benthological Society 24: 415-427.
31. Sabater, S., Roca, J. R., 1990: Some factors affecting distribution of diatom assemblages in Pyrenean springs. Freshwater Biology 24, 493–507.
32. Sabater, S., Roca, J. R., 1992: Ecological and biogeographical aspects of diatom distribution in Pyrenean springs. British Phycological Journal 7, 203–213.
33. Salusso, M.M. and Moraňa, L.N., 2000. Caracteristicas fisicas, quimicas y fitoplancton de rios y embalses de la alta Cuenea del Rio Juramento (Salta, Argentina). Natura Neotropicalis 31:29-44.
34. Taxböck L., Linder H. P., Cantonati M. 2017: To what extent are Swiss springs refugial habitats for sensitive and endangered diatom taxa? Water 9, 967. University of Ireland, Galway. http://www.algaebase.org

Evaluation of antioxidant effect of biosynthesized silver nanoparticles from Dracocephalum kotschyi extract on DPPH free radical scavenging

Azam Chahardoli*

Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah, Iran

*Corresponding Author Email address: a.chahardoli@razi.ac.ir

Abstract

Green synthesis of nanoparticles has attracted a lot of attention compared to physical and chemical synthesis, because this method is a clean, non-toxic, and eco-friendly approach. Plant extracts can act as a reducing and stabilizing agent in the synthesis of silver nanoparticles due to their different phytochemical compositions. Numerous phenolic and polyphenolic compounds in plants are found to have effective antioxidant properties. These properties of medicinal plants when combined with nanoparticles can have synergistic effects and are useful for medical science. In the present study, the antioxidant potential of *Dracocephalum kotschyi* Boiss (Dk) leaf extract and silver nanoparticles synthesized by this plant (Dk-AgNPs) in scavenging of DPPH free radical (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) was investigated. Based on the obtained results, the scavenging rate of DPPH by Dk leaf extract was approximately 90% at the tested concentrations of 400 and 500 µg/mL. Biosynthetic Dk-AgNPs with 28% radical scavenging activity at a concentration of 200 µg/mL showed strong antioxidant activity. These results showed that the phytochemical compounds of Dk are absorbed on the surface of nanoparticles and cause the antioxidant properties of Dk-AgNPs. Therefore, biosynthetic Dk-AgNPs with strong antioxidant activity can be a good option in preventing or curing oxidative stress related diseases and play an effective role in the medical industry.

Keywords: Biosynthesis, Dracocephalum kotschyi, DPPH, Free radical, silver nanoparticles

ارزیابی اثر آنتی اکسیدانی نانوذرات نقره بیوسنتزشده از عصاره گیاه Dracocephalum kotschyi در حذف رادیکال آزاد DPPH

*اعظم چهاردولی

استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات:: a.chahardoli@razi.ac.ir

چکیده

سنتز سبز نانوذرات در مقایسه با روش‌های سنتز فیزیکی و شیمیایی توجه زیادی را به خود جلب کرده است، زیرا این روش، یک رویکرد پاک، غیر سمی و سازگار با محیط زیست است. عصاره‌های گیاهی به دلیل دارا بودن ترکیبات فیتوشیمیایی مختلف می توانند به عنوان یک عامل احیاء کننده و تثبیت کننده در سنتز نانوذرات نقره عمل کنند. تعداد بیشماری از ترکیبات فنلی و پلی فنلی موجود در گیاهان دارای خواص آنتی اکسیدانی موثر هستند. این خواص گیاهان دارویی هنگامی که با نانوذرات ادغام شوند، می‌توانند اثرات سینرژیک داشته و برای علم پزشکی نیز مفید باشند. در مطالعه حاضر، پتانسیل آنتی اکسیدانی عصاره برگ‌های گیاه Boiss Dracocephalum kotschyi(Dk) و نانوذرات نقره سنتز شده بواسطه این گیاه (Dk-AgNPs) در حذف رادیکال آزاد DPPH (۱،۱-دیفنیل-۲-پیکریل هیدرازیل) مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل، نرخ حذف رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره برگ گیاه Dk برابر با تقریبا ۹۰٪ در غلظت های تست شده ۴۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم در لیتر بود. نانوذرات Dk-AgNPs بیوسنتزی با توانایی حذف رادیکال مزبور با نرخ ۲۸٪ در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، فعالیت آنتی اکسیدانی قوی را نشان دادند. این نتایج نشان داد که ترکیبات فیتوشیمیایی گیاه Dk بر روی سطح نانوذرات جذب شده و باعث خاصیت آنتی اکسیدانی Dk-AgNPs می‌شود. بنابراین نانوذرات Dk-AgNPs بیوسنتزی با فعالیت آنتی اکسیدانی قوی می‌تواند یک گزینه مناسب در پیشگیری یا بهبود بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو باشد و در صنعت پزشکی نقش موثری ایفا نماید.

واژگان کلیدی: بیوسنتز، گیاه Dracocephalum kotschyi نانوذرات نقره، رادیکال آزاد، DPPH.

۱. مقدمه

اخیرا، سنتز سبز نانوذرات در مقایسه با روش‌های سنتز فیزیکی و شیمیایی توجه زیادی را به خود جلب کرده است، زیرا این روش، یک رویکرد تمیز، غیر سمی و سازگار با محیط زیست است که شامل طراحی و توسعه روش های سنتز با استفاده از مواد تجدید پذیر، محیط های واکنش بی‌خطر و حلال های غیر سمی و غیر خطرناک می‌باشد. در حال حاضر عصاره‌های گیاهی به دلیل دارا بودن ترکیبات فیتوشیمیایی مختلف مانند پلی‌فنل‌ها، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و همچنین آنزیم‌های گیاهی مانند هیدروژنازها، ردوکتازها و کینون‌ها به عنوان یک عامل احیاء کننده و تثبیت کننده در سنتز نانوذرات نقره عمل می کنند (Chahardoli et al., 2018a). تعداد بیشماری از ترکیبات فنلی و پلی فنلی موجود در گیاهان

دارای خواص آنتی اکسیدانی موثر هستند. این خواص گیاهان دارویی هنگامی که با نانوذرات ادغام شوند، می‌توانند اثرات سینرژیک داشته و برای علم پزشکی نیز مفید باشند (Sohal et al., 2019). بنابراین، در مقایسه با نانوذرات فلزی معمولی، نانوذرات بیوسنتز شده با استفاده از گیاهان به دلیل پتانسیل آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجهی که دارند از ارزش بالایی در درمان برخوردار هستند (Chokshi et al., 2016).

پتانسیل آنتی‌اکسیدانی به توانایی هر ترکیبی در کاهش آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو مخرب ناشی از افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن یا نیتروژن اشاره دارد. این استرس اکسیداتیو باعث ایجاد عدم تعادل بین سیستم‌های اکسیداتیو و آنتی اکسیدانی سلول‌ها شده و منجر به آسیب بافتی می‌شود (Vilela et al., 2015). رویکردهای تحلیلی مختلفی مانند تعیین محتوای فنل کل، فعالیت آنتی اکسیدانی معادل ترولوکس، فعالیت مهاری در برابر رادیکال های آزاد پایدار، کاهش یون‌های فلزی و غیره، می تواند برای ارزیابی پتانسیل آنتی اکسیدانی نانوذرات استفاده شود، که به تعیین مناسب بودن آنها برای کاربردهای مختلف درمانی کمک می‌کند (Chokshi et al., 2016). بنابراین باتوجه به اهمیت روش سنتز سبز در تولید نانوذرات و کاربردهای وسیع نانوذرات نقره در زمینه های مختلف، هدف از این مطالعه استفاده از نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز با استفاده از عصار گیاه دارویی D. kotschyi و بررسی خواص آنتی اکسیدانی آنها در برابر رادیکال ازاد DPPH می باشد. گیاه دارویی D. kotschyi (زرین گیاه) متعلق به خانواده نعنائیان از گونه های بومی ایران است (Fattahi et al., 2011). این گیاه منبعی از اسانس، فلاونوئیدهای با ارزش، گلیکوزیدهای مونوترپن و ترپنوئیدهای تریپانوسیدال می‌باشد و دارای خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی و همچنین آنتی اکسیدانی، ضد سرطانی، ضد التهابی، ضد هیپرلیپیدمی و ضد دردی می باشد (Chahardoli et al., 2021).

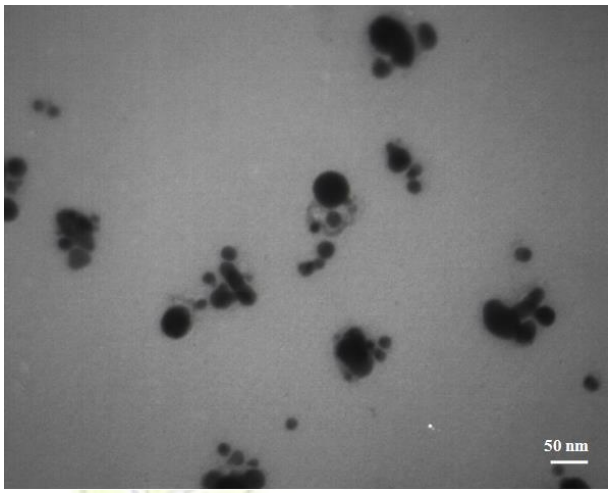
۲. مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

نیترات نقره ($AgNO_3$)، متانول وDPPH از شرکت سیگما ایالات متحده خریداری شد. برگ های گیاه D. kotschyi از گلخانه تحقیقاتی گروه زیست شناسی دانشگاه رازی تهیه گردید.

۲-۲- آماده سازی نانوذرات

همان‌طور که در مقاله قبلی توضیح داده‌ایم، نانوذرات Dk-AgNPs با استفاده از عصاره گیاه *D. kotschyi* (بعنوان عامل احیاء کننده و تثبیت کننده) سنتز شده است (Chahardoli et al., 2021). به منظور سنتز این نانوذرات، ابتدا عصاره‌گیری به روش جوشاندن به مدت ۱۵ دقیقه انجام شده است و بعد با اضافه کردن عصاره حاصل به محلول نیترات نقره (یک میلی‌مولار) و قرار دادن تحت تابش نور آفتاب سنز نانوذرات صورت گرفته است. تغییر رنگ مخلوط واکنش به رنگ قهوه‌ای تیره و انجام آنالیزهای طیف سنجی مرئی-فرابنفش (UV- visible)، طیف سنجی مادون قرمز (Fourier Transform-Infrared Spectroscopy: FTIR)، پراش اشعه ایکس (X-Ray Diffraction: XRD) و عکس‌برداری با میکروسکوپ الکترونی عبوری (Transmission Electron Microscopy: TEM)، شکل-گیری نانوذرات Dk-AgNPs بیوسنتز شده را تایید نموده است. با استفاده از میکروسکوپ الکترونی TEM، تشکیل نانوذرات کروی Dk-AgNPsبا متوسط اندازه ۱۹/۴۱ نانومتر ثابت شده است (شکل ۱). اطلاعات بیشتر در مقاله قبلی ما موجود است.



شکل ۱:تصویر میکروسکوپ الکترونی TEM از نانوذرات Dk-AgNPs با استفاده از عصاره برگ‌های گیاه D. kotschyi.

۲-۳- بررسی خواص آنتی اکسیدانی نانوذرات Dk-AgNPs دربرابر رادیکال آزاد DPPH

برای سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره آبی برگ‌های گیاه *D. kotschyi* و نانوذرات Dk-AgNPs بیوسنتز شده از آن، ابتدا ۵ غلظت از هر کدام تهیه شد (۴۰۰،۳۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر). محلول یک میلی مولار از رادیکال DPPH در متانول نیز فراهم گردید. سپس ۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف نمونه‌های آماده شده، برداشته و هر یک داخل یک لوله آزمایش جداگانه ریخته شدند و پس از آن، ۱ میلی‌لیتر محلول رادیکال DPPH به هر لوله اضافه گردید. لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی اینکوبه شده و سپس جذب آنها در طول موج ۵۱۷ نانومتر در برابر بلانک خوانده شد. در نهایت بر اساس فرمول زیر درصد بازدارندگی رادیکال DPPH و پاک‌سازی آن توسط نانوذرات محاسبه گردید. یک نمونه حاوی متانول و رادیکال DPPH نیز بعنوان کنترل قرار داده شد.

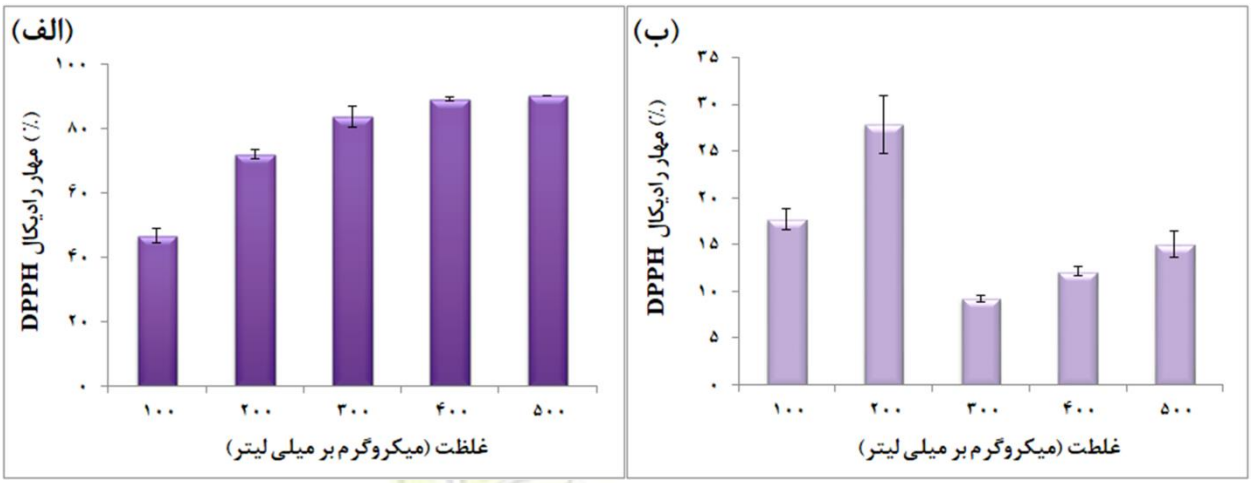
جذب نمونه کنترل = درصد بازدارندگی رادیکال –جذب نمونه/× جذب نمونه کنترل ۱۰۰

۲-۴- آنالیز آماری

داده های حاصل پس از جمع آوری با استفاده از برنامه SPSS نسخه ۱۶ و آنالیز واریانس یک راهه تجزیه تحلیل شدند. همچنین، مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۵ درصد انجام شد.

۳. نتایج و بحث

در سال‌های اخیر، جستجو در مورد ترکیبات طبیعی موثر، غیر سمی و دارای فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش یافته است. نانومواد به دلیل مزایای قابل توجه آن‌ها بخصوص در کاربردهای زیست پزشکی، نقشی اساسی را در زندگی و سلامتی انسان پیدا کرده اند (Zolnik and Sadrieh, 2009). علاوه بر این، خاصیت آنتی اکسیدانی قوی نشان داده شده توسط برخی از نانومواد، پتانسیلی را برای توسعه سیستم ها و رژیم‌های جدید با اقدامات بهبود یافته و هدفمند ایجاد کرده است. به عنوان مثال نشان داده شده است که نانوذرات طلا، نقره و سلنیوم به دلیل داشتن خاصیت حذف کارآمد رادیکال های با فعالیت اکسیداسیونی، نقش موثری در کاهش استرس اکسیداتیو ایفا می‌کنند (Akintola et al., 2020). در مطالعه حاضر، فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره برگ گیاه Dk و نانوذرات Dk-AgNPs سنتز شده بواسطه آن در غلظت‌های مختلف (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) ارزیابی شد (شکل ۲). نسبت به نانوذرات Dk-AgNPs بیوسنتزی، عصاره Dk دارای فعالیت بیشتری در حذف رادیکال DPPH بود (شکل ۲ الف) و فعالیت آنتی اکسیدانی آن با افزایش غلظت عصاره Dk افزایش یافت. بیشترین میزان حذف رادیکال DPPH توسط عصاره گیاه تقریبا ۹۰٪ در غلظت های ۴۰۰ و ۵۰۰ میکرو گرم در لیتر بود. در حالی‌که عملکرد نانوذرات Dk-AgNPs بیوسنتزی وابسته به غلظت نبود (شکل ۲ ب). Oh و همکاران (۲۰۱۷)، نتایج مشابهی را برای نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط *Chaenomeles sinensis*نشان دادند که فعالیت آنتی اکسیدانی وابسته به دوز را در برابر رادیکال DPPH نشان ندادند (Oh et al., 2018). دلیل احتمالی فعالیت آنتی اکسیدانی بالای عصاره *D. kotschyi* ممکن است به وجود ترکیبات فعال زیستی موجود در آن، مانند فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی مرتبط باشد .خواص آنتی اکسیدانی مشابهی برای AgNP های بیوژن، AuNP و عصاره‌های گیاهی سنتز شده از *Plumeria alba*، *Piper longum* و *Nigella arvensis* گزارش شده است (Chahardoli et al., 2018b; Mata et al., 2015; Reddy et al., 2014). ماتا و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که افزایش حذف رادیکال DPPH توسط عصاره گیاه *Plumeria alba* نسبت به نانوذرات نقره بیوسنتز شده بواسطه آن ممکن است به ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در عصاره گیاه نسبت داده شود که نسبت به میزانی از آنها که به نانوذرات می‌چسبند و باعث احیاء و ثبیت آنها می‌شوند، بسیار بیشتر هستند (Mata et al., 2015) .علاوه بر این علت آن می‌تواند با این حقیقت مرتبط باشد که در مقایسه با نانوذرات نقره عامل‌دار شده با ترکیبات آلی موجود درعصاره، عصاره گیاه به عنوان یک عامل کاهنده عالی عمل می‌کند و به آسانی الکترون‌ها را از دست می‌دهد (Kumar et al., 2016; Niraimathi et al., 2013). همان‌طور که در شکل ۲ دیده می‌شود، فعالیت حذف رادیکال DPPH نانوذرات Dk-AgNPs بیوسنتزی در غلظت‌های پایین (۱۰۰و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) نسبت به غلظت‌های بالاتر بیشتر است. بیشترین درصد مهار رادیکال DPPH توسط نانوذرات نقره بیوسنتزی در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۲۸٪ تخمین زده شد. فعالیت کاهش یافته مهار DPPH با افزایش غلظت نانوذرات نقره، احتمالاً می‌تواند با پایداری و بهم چسبندگی نانوذرات Dk-AgNPs بیوسنتزی در غلظت‌های بالاتر مرتبط باشد که باعث رسوب نانوذرات نقره شده و بنابراین نانوذرات کافی در تماس با DPPH قرار نخواهد گرفت (Kumar et al., 2016).



شکل ۲: درصد مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از عصاره برگ‌های گیاه *D. kotschyi* (الف) و نانوذرات Dk-AgNPs حاصل از آنها (ب).

۴. نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر از نانوذرات Dk-AgNPs سنتز شده به روش سبز، ساده و سازگار با محیط زیست تحت تابش نور خورشید با استفاده از عصاره گیاه *D. kotschyi* برای ارزیابی خاصیت آنتی اکسیدانی آنها در حذف رادیکال آزاد DPPH استفاده شد. این نانوذرات بیوسنتزی دارای متوسط اندازه۱ ۱۹/۴۱ نانومتر و با شکل کروی بودند. نانوذرات Dk-AgNPs بیوسنتزی، فعالیت آنتی اکسیدانی قویی را از طریق مهار رادیکال آزاد DPPH نشان دادند. بنابراین می‌توان از نانوذرات سنتز شده Dk-AgNPs با خاصیت آنتی اکسیدانی بالا به عنوان یک عامل درمانی در پیشگیری یا بهبود بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو استفاده کرد.

منابع

[1] Akintola A. O., Kehinde B. D., Ayoola P. B., Adewoyin A. G., Adedosu O. T., Ajayi J. F. and Ogunsona, S. B. 2020. Antioxidant properties of silver nanoparticles biosynthesized from methanolic leaf extract of Blighia sapida. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 805(1): 12004.

[2] Chahardoli A., Karimi N. and Fattahi A. 2018a. *Nigella arvensis* leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles: Their characteristic properties and biological efficacy. Advanced Powder Technology, 29(1): 202–210.

[3] Chahardoli A., Karimi N., Sadeghi F. and Fattahi, A. 2018b. Green approach for synthesis of gold nanoparticles from *Nigella arvensis* leaf extract and evaluation of their antibacterial, antioxidant, cytotoxicity and catalytic activities. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 46(3): 579–588.

[4] Chahardoli A., Qalekhani F., Shokoohinia, Y. and Fattahi A. 2021. Biological and catalytic activities of green synthesized silver nanoparticles from the leaf infusion of *Dracocephalum kotschyi* Boiss. Global Challenges, 5(2): 2000018.

[5] Chokshi K., Pancha I., Ghosh T., Paliwal C., Maurya R., Ghosh A. and Mishra, S. 2016. Green synthesis, characterization and antioxidant potential of silver nanoparticles biosynthesized from de-oiled biomass of

thermotolerant *oleaginous microalgae* Acutodesmus dimorphus. RSC advances, 6(76): 72269–72274.

[6] Fattahi M., Nazeri V., Sefidkon F., Zamani Z. and Palazon, J. 2011. The effect of pre-sowing treatments and light on seed germination of *Dracocephalum kotschyi* Boiss: An endangered medicinal plant in Iran. Horticulture, Environment, and Biotechnology, 52(6): 559–566.

[7] Kumar B., Smita K., Seqqat R., Benalcazar K., Grijalva M. and Cumbal, L. 2016. In vitro evaluation of silver nanoparticles cytotoxicity on Hepatic cancer (Hep-G2) cell line and their antioxidant activity: Green approach for fabrication and application. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 159: 8–13.

[8] Mata R., Nakkala J.R. and Sadras S.R. 2015. Catalytic and biological activities of green silver nanoparticles synthesized from *Plumeria alba* (frangipani) flower extract. Materials science and Engineering: C, 51: 216–225.

[9] Niraimathi K.L., Sudha V., Lavanya R. and Brindha, P. 2013. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Alternanthera sessilis* (Linn.) extract and their antimicrobial, antioxidant activities. Colloids and surfaces B: biointerfaces, 102: 288–291.

[10] Oh K.H., Soshnikova V., Markus J., Kim Y.J., Lee S.C., Singh P., Castro-Aceituno V., Ahn S., Kim D.H. and Shim, Y.J. 2018. Biosynthesized gold and silver nanoparticles by aqueous fruit extract of *Chaenomeles sinensis* and screening of their biomedical activities. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 46(3): 599–606.

[11] Reddy N.J., Vali D.N., Rani M. and Rani S.S. 2014. Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of green synthesized silver nanoparticles by *Piper longum* fruit. Materials Science and Engineering: C, 34: 115–122.

[12] Sohal J.K., Saraf A., Shukla K. and Shrivastava M. 2019. Determination of antioxidant potential of biochemically synthesized silver nanoparticles using *Aloe vera* gel extract. Plant Science Today, 6(2): 208–217.

[13] Vilela, D. González, M.C. and Escarpa, A. 2015. Nanoparticles as analytical tools for in-vitro antioxidant-capacity assessment and beyond. TRAC Trends in Analytical Chemistry, 64: 1–16.

[14] Zolnik B. S. and Sadrieh N. 2009. Regulatory perspective on the importance of ADME assessment of nanoscale material containing drugs. Advanced Drug Delivery Reviews, 61(6): 422.

بررسی تنوع گیاهان دارویی ذخیره‌گاه زربین منطقه زرین‌گل، علی‌آبادکتول استان گلستان

رضی [۲]فهیمه فندرسکی [۱]، ابوالفضل دانشور [۱*]، علی ستاریان [۱]، سیده مینو میرعرب

[۱]گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبدکاووس، گلستان

دانش‌آموخته دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

مسئول مکاتبات:abolfazl.daneshvar@gmail.com*

چکیده

استان گلستان به جهت موقعیت ویژه جغرافیایی، تنوع اقلیمی و ادافیکی از نظر فلور بسیار غنی است، به‌طوری‌که دارای بیش از ۱۷۰۴ گونه گیاهی می‌باشد. این تحقیق به‌منظور بررسی فلور و شناسایی گیاهان دارویی منطقه ذخیره‌گاه زربین زرین‌گل علی‌آبادکتول انجام شده است. نمونه‌های گیاهی در بازه زمانی مهروموم‌های ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹ جمع‌آوری، شناسایی و با رعایت پروتکل‌های مربوطه به مرکز هرباریوم دانشگاه گنبدکاووس تحویل گردید. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که درمجموع تعداد ۳۳ گونه دارویی متعلق به ۲۰ تیره گیاهی در ذخیره‌گاه یادشده حضور دارند. گونه¬های دارویی موجود در منطقه به ترتیب مربوط به تیره Asteraceae با ۴ گونه، Compositae با ۴ گونه، Rosaceae با ۳ گونه، Polygonaceae با ۳ گونه، Apiacae با ۲ گونه، Fagacea با ۲ گونه، Lamiacea با ۲ گونه، Araliaceae، Rubiaceae، Brassicaceae، Cruciferae، Fumariaceae، Violaceae، Laminaceae، Rhamnaceae و Oxalidaceae و Poaceae و Poimulaceae و Pteridaceae و Papilionaceae با یک‌گونه می‌باشند.

واژگان کلیدی: فلور گیاهی، تنوع اقلیمی، مناطق حفاظت‌شده، تنوع زیستی

۱.مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی به‌منظور درمان بیماری‌ها با تاریخ بشر هم‌زمان بوده است. در میان ملل جهان مصریان قدیم را باید نخستین ملتی دانست که از گیاهان دارویی استفاده می‌کردند. امروزه رویکرد گسترده مردم به استفاده از داروهای طبیعی موجب ایجاد دگرگونی قابل‌توجهی در کلیه کشورهای جهان نسبت به شناسایی و تهیه مواد طبیعی و گیاهی و بازگشت به طبیعت گشته به‌طوری‌که در اکثر کشورهای جهان دانش طب گیاه‌درمانی در دستور کار پژوهش‌های مجامع علمی قرارگرفته است. در ایران نیز حکیمان بزرگ کشور درگذشته بهترین داروهای خود را از گیاهان تهیه می‌کردند.

از سوی دیگر کشور پهناور ایران با برخورداری از آب‌وهوای مختلف، دارای فلور بسیار متنوعی بوده و مطابق مطالعه محققان (آخوندزاده ۱۳۷۹، آزادبخت ۱۳۷۸، زرگری۱۳۷۶-۱۳۷۴)، بیشتر گیاهانی که در دنیا می‌رویند در این سرزمین به‌صورت طبیعی رشد می‌کنند و یا اینکه قابلیت کشت دارند. با عنایت به شرایط خاص کشور ما درزمینهٔ اشتغال جوانان و تحریم‌های ظالمانه دشمنان در زمینه دارو و فروش نفت ایران، پرداختن به موضوع گیاهان دارویی دارای اهمیت و اولویت خاصی می‌باشد.

هر چند که می‌توانیم ادعا کنیم؛ از گذشته دور تاکنون زندگی انسان‌ها به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم به گیاهان وابسته بوده (مبین، ۱۳۷۴) ولی امروزه با توجه به افزایش عطاری‌ها و مغازه‌های فروش گیاهان دارویی، تلاش مردم برای در امان ماندن از عوارض داروهای شیمیایی، گیاهان

دارویی در تمام مراحل اعم از تولید، فرآوری و عرضـــه در بازار، جایگاه ویژه‌ای را به خود جلب کرده‌اند. در شـــرایط کنونی که مصـــرف گیاهان دارویی به میزان قابل‌توجهی افزایش‌یافته اسـت آمار ارائه شـده از سـوی کشـورهای پیشـرفته نیز مؤید این نکته اسـت که درصـد قابل‌توجهی از داروهای عرضه‌شده در این کشور منشأ گیاهی دارند، پرورش و تولید گیاهان دارویی می‌تواند ضمن کمک به‌سلامت جامعه در پیشرفت اقتصادی نقش بسزایی داشته باشد (Govil and Singh, 2010).

اســـتان گلســـتان با توجه به تنوع اقلیمی، توپوگرافی و اکولوژیکی خود از پتانســـیل طبیعی بالایی در رابطه با گیاهان دارویی برخوردار اســـت. پیرسحرخیز (۱۳۷۱) در مطالعه خود، ۲۹۸ گونه دارویی متعلق به ۷۰ تیره و حسینی و همکاران (۱۳۸۷)، ۴۰۹ گونه دارویی متعلق به ۹۵ تیره گیاهی را برای اســتان گلســتان معرفی کرده‌اند. در بین رویشــگاه‌های اســتان گلســتان که هر کدام مأمن گونه‌های گیاهی ارزشــمندی اســت؛ ذخیره‌گاه زربین منطقه زرین‌گل علی‌آبادکتول با توجه به پذیرش گونه‌های نادر سوزنی برگ زربین که به‌صورت طبیعی در این رویشگاه مستقر شده‌اند، توجه به فلور زیراشکوب این رویشگاه به‌صورت عام و شناسایی و معرفی گیاهان دارویی این رویشگاه به‌صورت عام، دارای اهمیت ویژه‌ای است. این تحقیق تلاش می‌کند تا با معرفی گونه‌های دارویی رویشـگاه یادشـده، نگاه مدیران اجرایی و محققین مربوطه را به این مهم جلب کند تا با شـیوه‌های مناسـب مدیریتی و هدایت پروژه‌های تحقیقی، ضـمن حفظ پتانسـیل موجود در منطقه از آن به‌عنوان فرصـت اشـتغال و اقتصـادی استفاده گردد.

۲.مواد و روش‌ها

این پژوهش به‌منظور بررسی گیاهان دارویی ذخیره‌گاه زربین زرین‌گل علی‌آبادکتول استان گلستان انجام گرفت. منطقه مورد بررسی در ۱۵ کیلومتری جنوب شرقی شهرستان علی آباد و ۳ کیلومتری شمال غربی روستای چینو و ۵ کیلومتری روستای زرین گل واقع شده است. این رویشگاه دارای یک جبهه شمال شرقی است که رودخانه علم کوه، جبهه جنوب غربی را از جبهه مذکور جدا کرده است. این منطقه در طول جغرافیایی ۵۴ درجه، ۵۸ دقیقه و ۱۵ ثانیه تا ۵۴ درجه، ۵۵ دقیقه و ۵۸ ثانیه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۶ درجه، ۴۹ دقیقه و ۵۵ ثانیه تا ۳۶ درجه، ۵۰ دقیقه و ۳۵ ثانیه شمالی و در ارتفاع ۴۰۸ تا ۸۳۰ متری از سطح دریا واقع شده است. این اراضی در واحد فیزیوگرافی کوهستان با شیب متوسط تا زیاد قرار گرفته و دامنه عمومی آن شرقی (۶۱ درصد) و شمالی (۳۷ درصد) است و پوشش گیاهی عرصه نیز بر این اساس شکل گرفته است. در بخش‌های مرطوبی که دارای خاک‌های عمیق هستند، گونه‌های پهن‌برگ و در قسمت‌های صخره‌ای، یال و شیب‌های تند، گونه‌های کم‌توقع و مقاوم پهن‌برگ وجود دارد و گونه زربین به‌طور عمده در دامنه جنوبی این منطقه دیده می‌شود (هدایتی و همکاران، ۱۳۹۲).
جمع‌آوری نمونه‌ها از اواسط فروردین ماه ۱۳۹۸، با بازه زمانی هر دو هفته یک‌بار به مدت یک سال انجام شد. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده به‌منظور نگه‌داری و شناسایی به مرکز هرباریوم دانشگاه گنبدکاووس، منتقل شد و با استفاده از منابع موجود شناسایی شد. از بین تمام گیاهان جمع‌آوری‌شده، گونه‌هایی که کاربرد دارویی دارند جدا گردید. قسمت‌های مورد استفاده و کاربردهای متداول گونه‌های دارویی نیز از مقالات و کتب مربوطه استخراج شد.
لیست فلور گیاهان دارویی منطقه مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است. در این منطقه - گونه دارویی متعلق به - تیره گیاهی شناسایی شده است. قسمت مورد استفاده و کاربردهای متداول هر گونه گیاه دارویی نیز در جدول درج شده است (جدول ۱).

جدول ۱: فهرست گیاهان دارویی منطقه حفاظت‌شده ذخیره‌گاه زربین منطقه زرین‌گل علی‌آبادکتول به ترتیب حروف الفبا نام تیره

ردیف	تیره	نام علمی	نام فارسی	قسمت مورد استفاده	کاربرد متداول
۱	Apiaceae	*Eryngium aquaticumL*	چوچاخ	ریشه	مدر- مسکن درد - اشتها آور- کاهش آهن‌خون-

خاصیت‌آنتی‌اکسیدان-از بین بردن نفخ وسنگ کلیه					
کاهش فشارخون-درمان سرماخوردگی -درمان روماتیسم-درمان جوش صورتو	ساقه-برگ-دانه	کرفس دریایی	*Apium prostratum*	Apiaceae	۲
پاکسازی سموم از بدن-جلوگیری از التهاب-آرامش بخش معده-افزایش اکسیژن بدن-افزایش سیستم ایمنی-درمان آرتروز-تصفیه خون-پایین آوردنفشارخون	بخش هوایی	پاپیتال-عشقه معمولی	*Hedera helix*	Araliaceae	۳
درمان اگزما-اسهال خونی و خونریزی-درمان بواسیر-کاهش سوزش معده-التهاب-تبخال و سایر بیماری‌های پوستی	برگ	علف بواسیر	*Erechtites hieracifolia*	Asteraceae	۴
تصفیه و پاکسازی خون-ترشح کیسه صفرا-تقویت بینایی-کاهش قند خون-درمان دندان درد	ریشه-برگ-گل	شیر تیغک	*Suchus sp*	Asteraceae	۵
رفع مسمومیت کبد-سرعت ترمیم اندام-کاهش پیشرفت سرطان-درمان عفونت‌های قارچی-کاهش آلزایمر و بیماری قلبی و دیابت	بذر-برگ	خار مریم	*Silybum marianum L*	Asteraceae	۶
تقویت قوای جنسی-یبوست-درمان عفونت‌های قارچی زنان-ضد اسهال	گل-برگ-ساقه-ریشه-بذر	گل گندم خزری-گل گندم جنگلی	*Centaurea hyrcana*	Asteraceae	۷
به‌عنوان آنتی بیوتیک-درمان سرما خوردگی-بهبود سرفه-قندخون-تقویت بینای	ریشه	شلغم وش	*Rapist rum rugosum*	Brassicaceae	۸
قابض-هموستاتیک-ضداسهال خونی-ضدالتهاب-تثبیت پاکسازی عروق خونی-درمان آرتروز و روماتیسم-نقرص	بخش هوایی		*Erigeron canadensis*	Compositae	۹
پاک‌سازی کبد-مبارزه با دیابت-مبارزه با عفونت پوستی	ساقه-ریشه-گل	قاصدک بهاری-پیرگیاه بهاره	*wallet Senecio verualis kit*	Compositea	۱۰
تهوع-اسهال-یبوست-نارسایی کبد-کم خونی-کاهندگی کلسترول-تقویت دستگاه گوارش	برگ و ریشه	کنگر معمولی	*Cirsium vulgare*	Compositae	۱۱

ردیف	تیره	نام علمی	نام فارسی	قسمت مورداستفاده	کاربرد متداول
۱۲	Compositae	*Carduus nutans subsp*	تاتاری ارمنستان	بخش هوایی	تب بر-تصویه کننده خون
۱۳	Cruciferae	*Capsella bursapastoris L*	کیسه کشیش	سرشاخه‌های شکوفه دار	قطع خونریزی داخلی-درمان ناراحتی‌های قلبی-درمان اسهال-درمان التهاب مثانه
۱۴	Fagaceae	*Quercus branton*	بلوط ایرانی	برگ-پوست-میوه	درمان اسهال-درد معده-درمان یرقان-بهداشت پوست
۱۵	Fagaceae	Quercus castaneifolia	بلند مازو	برگ-پوست-میوه	درمان اسهال-بیماری روده کوچک-بیماریهای دهانی-اختلالات دندانی-تومور واژن
۱۶	Fumariaceae	*Fumaria vaillantii Loise L*	شاه‌تره‌ی ایرانی	بخش هوایی	ضدعفونی کننده-تقویت قوای جنسی-کاهش تپش قلب-بالا بردن فشار خون-ادرارآور
۱۷	Laminaceae	*Teucrium chamaedry sub sp-sinuatumy*	مریم نخودی طناز	سرشاخه‌های گل‌دار	اثر نیرو دهنده-مقوی معده-ضد عفونی کننده-تب های مخاطی-حصبه-بیماری های نقرصی
۱۸	Lamiaceae	*Lamium album L*	گزنه سفید کرکی	سرشاخه‌ی گل‌دار	تنیم اعمال روده-التهاب مخاط و دستگاه تنفسی-دفع صفرا-مدر-درمان یبوست
۱۹	Lamiaceae=Labiateae	*Marrubium valgare L.*	فراسیون	بخش هوایی	اشتهاآور-مقوی معده-خلط آور-بهبود زخم‌ها
۲۰	Rosaceae	Cerasus microcarpa	آلبالوی دانه‌ریز	هسته-دم-برگ-ساقه	اشتهاآور-کاهش چربی خون-بیماری قلبی-رماتیسم-نیرو بخش-نارسایی کبد-
۲۱	Rosaceae	*Crataegus melanocarpa*	ولیک سیاه	ریشه-میوه	مقوی قلب-ضد تشنج-مسکن-بالابردن فشارخون-درمان سر گیجه-
۲۲	Rosaceae	*Rubus sp*	تمشک	گل-میوه	ادرارآور-تقویت سیستم ایمنی-جلوگیری از دیابت-کاهش علائم آرتروز-جلوگیری از فشار خون-بیماری قلبی
۲۳	Rhamnaseae	Paliurus spina-christian	سیاه تلو	برگ –ریشه-میوه	قابض-مقوی-مدر-اسهال-پایین آوردن فشار خون-کاهش قند خون و دیابت
۲۴	Rubiaseae	*Gallium aparine*	شیر پنیر	کل گیاه	ضد التهاب-مقوی-مدر

ردیف	تیره	نام علمی	نام فارسی	قسمت مورداستفاده	کاربرد متداول
۲۵	Oxalis coniculata L	*Oxalidaceae*	ترشک شبدری	برگ	درمان اختلالات گوارشی و کبد-درمان اسکوربوت-التیام زخم‌ها
۲۶	Papilionaceae	*Coronilla varial*	شبدرک-یونجه باغی	بذر-برگ-میوه	ملین-تسکین دهنده-اضطراب قلبی و تسکین دهنده-آسم
۲۷	Poaceae	*Synodon dactylon*	گیاه مرغ	ریزومها	کنترل‌کننده قند خون-ادرارآور-دفع کننده سنگ کلیه و مثانه-تقویت کننده معده-درد های عصبی-پایین آوردن فشار خون
۲۸	Polygonaceae	*Rumen patieutial*	ترشک شفادهنده	برگ- دانه	درمان کم خونی-دمل-تصویه خون-ضد عفونی کننده-یبوست
۲۹	Polygonaceae	*Rumen acetosella*	ترشک درشت	برگ-ریشه دانه	جلوگیری از سرطان-ناراحتی پوستی-بهبود شرایط دیابت-بیماری قلبی
۳۰	Polygonaceae	*Polygonum aviculare L*	علف هفت‌بند	بخش هوایی	ادرارآور_عفونت مثانه-بواسیر-التیام جراحات
۳۱	Poimulaceae	*Primula vulgaris*	پامچال	ریشه-غده	ضد سرفه-خلط آور-مدر
۳۲	Pteridaceae	*Adiantum capillus-veneris L*	پرسیاوشان	برگ-دمبرگ و شاخه‌های جوان	سم‌زدایی کبد-کمک به درمان زردی و یرقان-دفع سنگ کلیه
۳۳	Violaceae	*Viola hyrcana*	بنفشه جنگلی	گل-ریشه	خلط‌آور ضعیف-معرق-اثرنرم کننده-رفع جوش

۳. نتایج و بحث

نتایج تحقیق حاضر گویای این است که در فلور زیراشکوب ذخیره‌گاه زربین منطقه زرین‌گل علی‌آبادکتول، تعداد ۳۳ گونه دارویی متعلق به ۲۰ تیره گیاهی حضور دارند. با عنایت به موقعیت ویژه جغرافیایی، تنوع اقلیمی و ادافیکی استان گلستان، انتظار می‌رود رویشگاه‌های این استان، ازنظر فلور گیاهی غنی باشند. در این رابطه تحقیقات حسینی و همکاران (۱۳۸۷)، نشان می‌دهد در فلور گیاهی استان گلستان بیش از ۱۷۰۴ گونه به‌صورت قطعی شناسایی شده‌اند که از این تعداد، ۴۰۹ گونه که به ۹۴ تیره تعلق دارند؛ دارای قابلیت دارویی می‌باشند.

ذخیره‌گاه زربین منطقه زرین گل علی‌آباد کتول با توجه به اینکه در حد بین شرق و غرب گلستان قرار گرفته و دارای شرایط مناسبی به لحاظ با توجه به این اطلاعات منطقه زرین‌گل به دلیل تنوع نسبتاً خوب در سطوح تاکسونومیک و گونه‌های دارویی ارزش حفاظتی دارد و توصیه می‌شود تا مسئولان آگاهی لازم را به همه مردم در زمینه عدم برداشت مستقیم از گیاهان دارویی عرصه‌های منابع طبیعی ارائه دهند.

۴. نتیجه‌گیری

ذخیره‌گاه زربین منطقه زرین گل علی‌آباد کتول با توجه به اینکه در حد بین شـــرق و غرب گلســـتان قرار گرفته و دارای شـــرایط مناســـبی به لحاظ با توجه به این اطلاعات منطقه زرین‌گل به دلیل تنوع نســـبتاً خوب در ســـطوح تاکســـونومیک و گونه‌های دارویی ارزش حفاظتی دارد و توصـیه می‌شـود تا مسـئولان آگاهی لازم را به همه مردم در زمینه عدم برداشـت مسـتقیم از گیاهان دارویی عرصه‌های منابع طبیعی ارائه دهند.

منابع

۱. پیرسحرخیز، م. ۱۳۷۸. جمع‌آوری و شناسایی گیاهان دارویی گرگان و دشت، مرکز تحقیقات جنگل‌ها و مراتع استان گلستان.
۲. حسینی، س. ع. ر.، ابرسجی، ق. و حسینی، س. ع. ح. ۱۳۸۷. گیاهان دارویی استان گلستان، فصل‌نامه علمی پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، جلد۲۴، شماره ۴، صفحه ۴۹۸-۴۷۲.
۳. مبین، ص. (۱۳۷۵-۱۳۷۴)، رستنی‌های ایران، فلور گیاهان آوندی، جلدهای۱تا۴، انتشارات دانشگاه تهران، تهران
۴. آخوندزاده، ش.، ۱۳۷۹. دائره‌المعارف گیاهان دارويي ايران (۱ جلد)، پژوهشکده گیاهان دارويي جهاد دانشگاهي (صفحه ۲۱۸)
۵. آزادبخت، م.، ۱۳۷۸. رده‌بندی گیاهان دارویی. موسسه فرهنگی انتشاراتی تیمور زاده (۴۰۱ صفحه).
۶. زرگری، ع.، ۱۳۷۶-۱۳۷۴ (جلد۵-۱). گیاهان دارویی، دانشگاه تهران (۴۹۷۰ صفحه).
7. Govil, J. N. and Singh, V. K. (2010). Recent progress in medicinal plants. vol 1. Stadium Press. Texas.

Investigation of biochemical diversity of some Iranian tea plants

Arezoo Mehrasa[1*], Hosein Moradi[2], Davood Bakhsi[3], Shahin Jahangirzadeh Khiavi[4]

1- Department of Horticulture, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran;
2- Department of Horticulture, Faculty of Crop Sciences and Research Institute of Biotechnology of Medicinal Plants, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran;
3- Department of Horticultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran;
4- Tea Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Lahijan, Iran

*Corresponding Author Email address: desejo.7mehrasa@gmail.com

Abstract

One of the most important agricultural products in Guilan province is tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). In the final product obtained from this plant, which is a tea drink, having the amount of active ingredients is very important. Many tea plants in Iran are endangered for various reasons, so to design programs, these genetic resources need to be identified and preserved .One of the ways to identify germplasms is to use markers, which can be used for biochemical markers for medicinal plants such as tea, because the final product of these plants must have the appropriate medicinal properties. In the present study, as one of the first studies to investigate the biochemical diversity of tea plant, 16 samples by nine traits, percentage of aqueous extract, percentage of caffeine, percentage of polyphenols, percentage of total ash, percentage of water-soluble ash, percentage of water-insoluble ash The ratio of water-soluble to insoluble ash, the ratio of water-soluble ash to total ash, the ratio of water-insoluble ash to total ash were investigated. In the analysis of sample clusters, based on the obtained data, the samples were divided into two groups at level 8, and the distribution of samples in the two groups was almost uniform. Based on these data, the range of differences between the samples was wide, which indicates the difference between these samples. In general, in the present study, a suitable diversity was found for phytochemical properties, which indicates that there is a desirable diversity in terms of specificity among tea plants in Iran. The results of this and similar studies can be used in the planning of breeding projects and decision-making to select suitable parents in crossbreeding to increase phytochemical traits.

Keywords: Tea, Biochemical properties, Phytochemical diversity, Active substances, Guilan province

بررسی تنوع بیوشیمیایی برخی بوته‌های چای ایران

آرزو مهرآسا[۱*]، حسین مرادی[۲]، داوود بخشی[۳]، شاهین جهانگیرزاده خیاوی[۴]

۱-گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری؛

۲- گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم زراعی و پژوهشکده فناوری های زیستی گیاهان دارویی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- دانشگاه گیلان، دانشکده علوم کشاورزی، گروه علوم باغبانی؛

۴- پژوهشکده چای، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران

ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: desejo.7mehrasa@gmail.com

چکیده

یکی از مهمترین محصولات کشاورزی در استان گیلان گیاه چای (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) می‌باشد. در محصول نهایی بدست آمده از این گیاه که دمنوش چای می‌باشد داشتن میزان مواد موثره بسیار دارای اهمیت است. بسیاری از گیاهان چای موجود در ایران به دلایل متنوعی در حال انقراض می‌باشند لذا برای طراحی برنامه‌های اصلای نیاز است این منابع ژنتیکی شناسایی گردند و حفظ و نگهداری شوند. از راهکارهای شناسایی ژرم‌پلاسم‌ها استفاده از نشانگرها می باشد که برای گیاهان دارویی مانند چای می‌توان از نشانگرهای بیوشیمی استفاده نمود زیرا محصول نهایی این گیاهان باید دارای ویژگی دارویی مناسب باشد. در مطالعه حاضر به عنوان یکی از اولین مطالعات صورت گرفته برای بررسی تنوع بیوشیمیایی گیاه چای تعداد ۱۶ نمونه توسط نه صفت، درصد عصاره آبی، درصد کافئین، درصد پلی‌فنل، درصد خاکستر کل، درصد خاکستر محلول در آب، درصد خاکستر غیر محلول در آب، نسبت خاکستر محلول به غیر محلول در آب، نسبت خاکستر محلول در آب به خاکستر کل، نسبت خاکستر غیر محلول در آب به خاکستر کل بررسی شدند. در تجزیه خوشه‌ای نمونه‌های، بر اساس داده‌های بدست آمده نمونه‌ها در سطح ۸ به دو گروه تقسیم شدند که توزیع نمونه‌ها در در دو گروه تقریبا یکنواخت بود. بر اساس همین داده‌ها دامنه تفاوت بین نمونه‌ها گسترده بود که نشان از تفاوت بین این نمونه‌های می‌باشد. به طور کلی در بررسی حاضر تنوع مناسبی برای خصوصیات فیتوشیمیایی پیدا شد که بیان می‌دارد تنوع مطلوبی از نظر خصوصیا مورد بررسی در بین بوته‌های چای در ایران وجود دارد. نتایج این تحقیق و تحقیقات مشابه می‌توانند در برنامه‌ریزی پروژه‌های اصلاحی و تصمیم گیری برای انتخاب والدین مناسب در دورگه‌گیری برای افزایش صفات فیتوشیمیایی مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: چای، ویژگی‌های بیوشیمیایی، تنوع فیتوشیمیایی، مواد موثره، استان گیلان

۱.مقدمه

گیاه دارویی چای با نام علمی (*Camellia sinensis* .L) از خانواده Theaceace یک گیاه همیشه سبز، چندین ساله و دگر گرده افشان (Selvan et al., 2018)، گونه‌ای درختی است که برگ‌های جوان آن در طی فرآیندی تبدیل به یکی از قدیمی‌ترین نوشیدنی‌های غیر الکلی حاوی کافئین در دنیا به نام دمنوش چای می‌گردد. گیاه چای در ایران یک گیاه وارداتی می‌باشد و اساس و پایه ژنتیکی چای

تحت کشت در ایران از سه واریته بذری با نام‌های Betjan، Dhonjan و Rajghur می‌باشد (Ahmadiyshad et al., 2009). با این وجود بر اساس منابع به علت‌های خود ناسازگاری، آلوگامی و انتخاب مصنوعی گیاه چای ناهمگونی بالا و تنوع ژنتیکی گسترده ای دارد (Kottawa-Arachchi et al., 2019). وجود این تنوع، مخزن ژنتیک مطلوبی را برای بررسی و شناسایی ژنوتیپ‌های برتر از نظر مواد موثره موجود در برگ سبز مهیا می‌کند که در حال حاضر یکی از با ارزش‌ترین و اساسی‌ترین مواد با پتانسیل بالایی برای برنامه‌های اصلاحی و بیوتکنولوژی برای کل صنعت چای در آینده است. تاکنون تحقیقات مختلفی روی ترکیبات بیوشیمیایی چای در دنیا انجام شده است. در مطالعه کاتاوا-آرچچی و همکاران (Kottawa-Arachchi et al., 2013) مواد بیوشیمیایی برای شناسایی ژرم‌پلاسم چای سریلانکا بکار برده شده است. چن و ژوو (Chen and Zhou, 2005) تفاوت ترکیبات کیفی اصلی در ژرم‌پلاسم چای موجود در چین را بررسی نموده‌اند. لی و همکاران (Li et al., 2020) در تحقیقی نشان دادند که اکوتیپ‌های مختلف چای سیاه حاوی مقادیر بیشتری از کاتچین و اسیدهای فنولی نسبت به اوکوتیپ‌های چای سبز بودند، اما مقدار قندهای آزاد و اسیدهای آمینه در چای سبز بیشتر از چای سیاه بود. در تحقیقی دیگر تانگ و همکاران (Tang et al., 2019) خصوصیات آنتی‌اکسیدانی قوی چای در چین را بررسی کردند و گزارش نمودند که اکوتیپ‌ها دارای مقادیر مختلفی از خصوصیات آنتی‌اکسیدانی هستند ولی در کل مقدار آن در تمامی اوکتیپ‌ها قابل توجه است.

با توجه این موارد بدست آمده در مطالعات پیشین و همچنین محدود بودن اطلاعات در رابطه با تنوع موجود از نظر خصوصیات بیوشیمایی گیاه چای در ایران در اولین قدمها سعی شد برخی بوته‌های شاخص موجود در ژرم‌پلاسم پژوهشکده چای با برخی کلون‌ها و ژنوتیپ‌های وارداتی مقایسه گردند تا از این طریق بر دانش موجود در رابطه با این مخزن ژنی افزوده گرددو چراغی باشد برای برنامه‌های اصلاحی آتی با هدف بهبود خصوصیات بیوشیمایی گیاه چای.

۲.مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۱۶ نمونه گیاه چای (شامل پنج رقم وارداتی از سریلانکا، دوژنوتیپ منتسب به گرجستان، سه ژنوتیپ منتسب به آسام و دو رقم و چهار ژنوتیپ ایرانی) موجود در پژوهشکده چای (جدول ۱) برای بررسی تنوع بیوشیمیای مورد مطالعه قرار گرفتند. این بوته‌ها دارای آبیاری و مراقبت‌های معمول زراعی قرار داشتند و نمونه برداری در زمان برداشت تجاری بهار صورت گرفت. شاخصه های بررسی شده در این مطالعه شامل نه ویژگی: درصد عصاره آبی، درصد کافئین، درصد پلی‌فنل، درصد خاکستر کل، درصد خاکستر محلول در آب، درصد خاکستر غیر محلول در آب، نسبت خاکستر محلول به غیر محلول در آب، نسبت خاکستر محلول در آب به خاکستر کل، نسبت خاکستر غیر محلول در آب به خاکستر کل بود. اندازه گیری این شاخصه‌ها بر اساس دستور العمل منتشر شده توسط پژوهشکده چای (چراغی و همکاران، ۱۳۹۸) انجام گرفت. داده‌های بدست آمده توسط برنامه Past4.03 برای مشخص کردن روابط و میزان تنوع مورد بررسی قرار گرفتند.

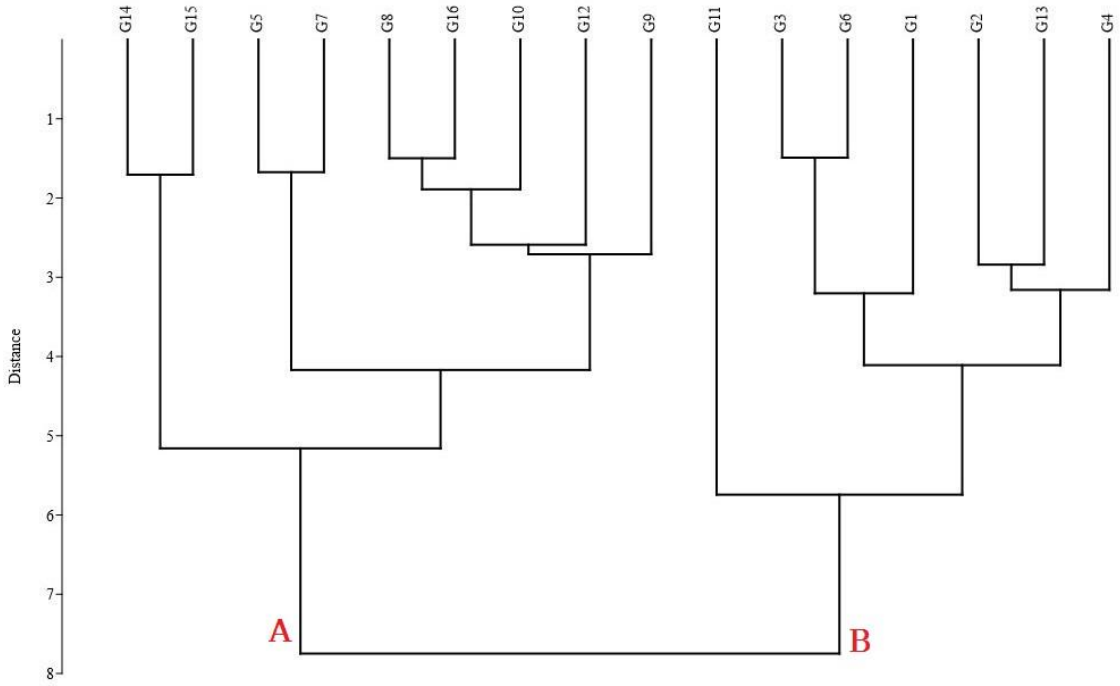
جدول۱: نمونه‌های مورد بررسی

ردیف	کد	نام نمونه	منشا	ردیف	کد	نام نمونه	منشا
۱	G1	DN	سریلانکا	۹	G9	Assam 2	منتسب به آسام
۲	G2	3015	سریلانکا	۱۰	G10	Assam 3	منتسب به آسام
۳	G3	GT7.1	سریلانکا	۱۱	G11	کاشف	ایران
۴	G4	3020	سریلانکا	۱۲	G12	لاهیج	ایران

۵	G5	KEN	سریلانکا	۱۳	G13	2021	ایران
۶	G6	101 Large leaf	منتسب به گرجستان	۱۴	G14	269	ایران
۷	G7	101 small leaf	منتسب به گرجستان	۱۵	G15	279	ایران
۸	G8	Assam 1	منتسب به آسام	۱۶	G16	261	ایران

۳. نتایج و بحث

خوشه بندی شانزده نمونه گیاه چای موجود در ژرم پلاسم چای ایران بر اساس پارامترهای کمی بیوشیمیایی (درصد عصاره آبی، درصد کافئین، درصد پلی‌فنل، درصد خاکستر کل، درصد خاکستر محلول در آب، درصد خاکستر غیر محلول در آب، نسبت خاکستر محلول به غیر محلول در آب، نسبت خاکستر محلول در آب به خاکستر کل، نسبت خاکستر غیر محلول در آب به خاکستر کل)، در شکل ۱ ارائه شده است. با توجه به نتایج تجزیه و تحلیل خوشه بندی نمونه‌های بررسی شده با استفاده از روش اقلیدسی و الگوریتم UPGMA نمونه‌ها در سطح ۸ به دو گروه تفسیم شدند. گروه اول (A) دارای ۹ نمونه (۵۳/۲۵٪ کل نمونه‌ها) و گروه دوم (B) شامل ۷ نمونه (۴۳/۷۵٪ کل نمونه‌ها) بودند که نشان از توزیع یکسان نمونه‌ها در دو گروه بود. با بررسی تک تک بوته‌ها گروه دوم مشخص می‌گردد که اعضای این گروه بر اساس داده‌های مورفولوژی (منتشر نشده توسط همین نویسندگان) دارای اندازه برگ بزرگ‌تری نسبت اعضای گروه اول داشتند. با توجه به آنکه مطالعات صورت گرفته بر روی بوته‌های چای در ایران از نظر بررسی تنوع با وجود محدود بودن، بیشتر بر استفاده از مارکرهای مورفولوژی و مولکولی (RAPD، ISSR) مبتنی بوده است (جهانگیرزاده و همکاران، ۱۳۹۸، Falakro and Khiavi, 2020، بابایی و همکاران، ۱۳۹۸) مطالعاتی مانند ماطلعه حاضر که بررسی روابط بیوشیمایی و تنوع بیوشیمیایی مابین بوته‌های چای می‌پردازند می‌توانند راه گشایی برای برنامه‌های اصلاحی با هدف‌های مانند افزایش خصوصیات بیوشیمیایی باشند.



شکل ۱: کلاستر حاصل از داده‌های بیوشیمیایی برای گروه بندی نمونه‌های مورد بررسی

دامنه بدست آمده در این پژوهش با توجه به آنکه نمونه‌های انتخاب شده دارای منشاهای با فواصل جغرافیایی بودند گسترده بود که نتایج مشابهی توسط منتهایی و همکاران (۱۴۰۰) در بررسی تنوع ژنوتیپ‌های گیاه چای در رویشگاه‌های مختلف ایران ارائه شده است. در مطالعه‌ای دیگر در سریلانکا که به عنوان یکی از مخازن غنی گیاه چای شناخته می‌شود نیز این دامنه گسترده بوده است (Kottawa-Arachchi et al., 2013).

۴. نتیجه‌گیری

در بررسی حاضر تنوع مناسبی برای خصوصیات فیتوشیمیایی پیدا شده در ژنوتیپ‌های چای در این مطالعه نشان دهنده‌ی تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه در ژنوتیپ‌های چای در کشور ایران است. این تنوع راهنمای مفید و ارزشمندی برای استفاده از ترکیبات بیوشیمیایی برگ تازه چای مثل پلی‌فنول و کافئین در تشخیص ژنوتیپ‌های چای ارائه می‌دهد. همچنین شناسایی والدین استفاده شده در برنامه‌های اصلاحی را تسهیل می‌کند و مشکل محدود شدن انتخاب والدین به استفاده از صفات مورفولوژیکی و اقلیمی را حل می‌کند.

منابع

۱. بابایی، ح.، صحرارو، الف.، جهانگیرزاده خیاوی، ش.، بخشی، د. و حسن پور، م. ۱۳۹۸. بررسی تنوع مورفولوژیکی برخی ژنوتیپ‌های چای دارجلینگ در ایران، یازدهمین کنگره علوم باغبانی ایران، ۴-۷ شهریور ۱۳۹۸. ایران، ارومیه (دانشگاه ارومیه)

۲. جهانگیرزاده خیاوی، ش.، فلک‌رو، ک.، چائی‌کار، ص.ص.، رمزی، س. و کهنه، الف. ۱۳۹۸. کاربرد نشانگرهای مورفولوژی و ISSR جهت شناسایی برخی ژنوتیپ‌های چای، نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی، ۲۶ (۴): ۱۳۱-۱۴۷

۳. چراغی، ک.، روفی‌گری‌حقیقت، ش.، متولی جلالی، م.ا. و محبیان اطاقوری، ص. ۱۳۹۸، دستورالعمل فنی روش انجام آزمون‌های کیفی چای: ۱- شیمی. موسسه تحقیقات علوم باغبانی. ۳۶ صفحه

٤. منتهایی درگاه، س.، رضایی، م.ب.، قنبری جهرمی، م.، کلاته جاری، س. و جهانگیرزاده خیاوی، ش. ۱۴۰۰. بررسی تنوع ژنوتیپ‌های گیاه دارویی چای (*Camellia Sinensis* L.) با استفاده از خصوصیات اکوفیتوشیمیایی در رویشگاه‌های مختلف استان گیلان. فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی، ۳۴ (۲): ۱۲۳-۱۳۵

5. Ahmadiyshad, M.A., Kazemi Tabar, S.K., Babaian Jalodar, N.A., Gholami, M. and Kazemi behind, H. 2009. Evaluation of genetic diversity of tea crop clones in Iran using Rapid molecular marker. Journal of Crop Breeding, 1: 65-76.
6. Chen, L. and Zhou Z. 2005. Variations of Main Quality Components of Tea Genetic Resources [Camellia sinensis (L.) O. Kuntze] Preserved in the China National Germplasm Tea Repository. Plant Foods for Human Nutrition, 60: 31-35.
7. Falakro,K. and Khiavi, S.J., 2020. Assessment of genetic diversity and relationships among tea genotypes in Iran based on RAPD and ISSR markers. Journal of Horticulture and Postharvest Research. 3(2), pp.209-220.
8. Kottawa-Arachchi, J. D., Gunasekare, M.K. and Ranatunga, M. A. 2019. Biochemical diversity of global tea [Camellia sinensis (L.) O. Kuntze] germplasm and its exploitation: a review. Genetic Resources and Crop Evolution, 66(1), 259-273.
9. Kottawa-Arachchi, J.D., Gunasekare, M.T.K., Ranatunga, M.A.B., Jayasinghe, L. and Karunagoda, R.P. 2013. Analysis of selected biochemical constituents in black tea (Camellia sinensis) for predicting the quality of tea germplasm in Sri Lanka. Tropical Agricultural Research, 23(1): 30−41.
10. Li, J., Wang, J., Yao, Y., Hua, J., Zhou, Q., Jiang, Y. and Dong, C. 2020. Phytochemical comparison of different tea (Camellia sinensis) cultivars and its association with sensory quality of finished tea. LWT, 117, 108595.
11. Selvan, D.A., Mahendiran, D., Kumar, R.S. and Rahiman, A.K. 2018. Garlic, green tea and turmeric extracts-mediated green synthesis of silver nanoparticles: Phytochemical, antioxidant and in vitro cytotoxicity studies. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 180: 243-252.
12. Tang, G.Y., Zhao, C.N., Xu, X.Y., Gan, R.Y., Cao, S.Y., Liu, Q. and Li, H.B. 2019. Phytochemical composition and antioxidant capacity of 30 Chinese teas. Antioxidants, 8(6): 180-190.

Comparative study of leaf characteristics of two species of *Mentha Longifolia* and *Mentha Aqutica* in the east of Golestan province

Robabeh Vazifeh Shenas Miandeh[1] *, Majid Mohammad Esmaeili[2], Ali Sattarian[2], Abolfazl Tahmasebi[2]

۱- MSc student of Gonbad Kavous University

۲- Members of the faculty of Gonbad Kavous University

*robabehvazifehshenas@yahoo.com

Abstract

Leaf area measurement is necessary for physiological and agronomic studies related to growth and development, so determining leaf area and its relationship with other traits such as flowering and fruit formation can be used as an indicator to predict events that occur during plant growth. In this paper, the morphological characteristics of Mentha leaves in the east of Golestan province were studied on two species of *M. longifolia* and *M.aquatica* in 10 replications. Significance level was assessed $p < 0.05$. The results of analysis of variance showed that between M. Longifolia and M. aquatica species in the east of Golestan province, in terms of leaf length, width of 3.1, 4.1 and 3.2 leaves, fresh weight and dry weight of leaves (at the level of $p < 0.05$) had a significant difference. *M. Longifolia*, harvested from an altitude of 1500 m (east) in the east of the province, is exposed to environmental stressors affecting plant growth, high light intensity, high temperature, dry environment and lack of water availability, in terms of traits Morphologically, it has a smaller appearance with smaller leaves.

Keywords: leaves, *M. longifolia* and *M. aquatica*

بررسی مقایسه‌ای ویژگی‌های برگ دو گونه Mentha Longifolia و Mentha Aqutica در شرق استان گلستان

ربابه وظیفه‌شناس میانده*[۱]، مجید محمد اسمعیلی[۲]، علی ستاریان[۳]، ابوالفضل طهماسبی[۴]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه گنبدکاووس

۲ و ۳ و ۴- اعضای هیئت‌علمی دانشگاه گنبدکاووس

*robabehvazifehshenas@yahoo.com

چکیده

اندازه‌گیری سطح برگ برای مطالعات فیزیولوژی و زراعی مرتبط با رشد و نمو لازم است، بنابراین تعیین سطح برگ و ارتباط آن با دیگر صفات از قبیل شروع گلدهی و تشکیل میوه می‌تواند به‌عنوان شاخصی برای پیش‌بینی وقایعی که در طی رشد گیاه اتفاق می‌افتد به کار رود. در این مقاله بررسی خصوصیات مورفولوژیکی برگ جنس Mentha در شرق استان گلستان بر روی دو گونه M.longifolia و M.aquatica در ۱۰ تکرار صورت گرفت، طول و عرض برگ و وزن تر برگ‌ها و وزن خشک آن‌ها مورد اندازه‌گیری قرار گرفت و نتایج داده‌ها در سطح معنی‌داری $p<0/05$ بررسی گردید. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین دو گونه*M.*longifolia و *M.*aquatica در شرق استان گلستان، از لحاظ طول برگ، عرض$\frac{1}{3}$و$\frac{1}{4}$و$\frac{2}{3}$ برگ، وزن تر و وزن خشک برگ (در سطح$p<0/05$) اختلاف معنی‌داری داشت. گونه‌ی M.longifolia که از ارتفاع (m)۱۵۰۰ در شرق استان برداشت شد، در معرض عوامل تنش‌زای محیطی تأثیرگذار بر رشد و نمو گیاه، شدت نور زیاد، دمای بالا، خشکی محیط و در دسترس نداشتن آب کافی، از نظر صفات مورفولوژیکی، ظاهری کوچک‌تر با برگ‌های ریزتر می باشد.

واژه‌های کلیدی: برگ، *M. longifolia* و *M. aqutica*

۱.مقدمه

جذب تابش خورشید عمدتاً توسط پهنک‌برگ‌ها به‌عنوان اصلی‌ترین اندام فتوسنتز کننده گیاه انجام می‌شود (Maria et al, *2008*) . تغییر در ویژگی‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی برگ‌ها ازجمله تغییرات وزن و سطح برگ و محتوی آب برگ عکس‌العمل گیاه نسبت به خشکی است که این تغییرات بر میزان فتوسنتز و درنهایت بر عملکرد گیاه تأثیر می‌گذارد (Swati, zahoor *et al., 2000*)

برآورد فتوسنتز بر پایه وزن خشک بیشتر با وزن تر محصول به کار می‌رود و به دست آوردن اطلاعات درباره مکانیسم توزیع ماده خشک و نحوه تغییر در تکامل برگ‌ها برای پیگیری روند تولید ضروری است (Marcelis L.M, *2001*). یکی از عواملی که به‌عنوان شاخص در تمام گیاهان به کار می‌رود وزن خشک بوته می‌باشد (Gutierrez colomer *R.P. et al., 2006*). تولید وزن خشک کل بوته

به طول دوره لازم برای رسیدن به حداکثر سطح برگ در گیاه بستگی دارد (Hassan *F*.u. et al., *1999*). بدین‌جهت اندازه‌گیری سطح برگ برای مطالعات فیزیولوژی و زراعی مرتبط با رشد و نمو لازم است (*Blanco F.F.M.V, 2003*)؛ بنابراین تعیین سطح برگ و ارتباط آن با دیگر صفات از قبیل شروع گلدهی و تشکیل میوه می‌تواند به‌عنوان شاخصی برای پیش‌بینی وقایعی که در طی رشد گیاه اتفاق می‌افتد به کار رود (wilsom P.J. etal., *1999*) در این تحقیق با توجه به اهمیت گیاهان دارویی ازجمله گیاه پونه که بسیاری از مطالعه‌های جدید اثرات مختلف دارویی و درمانی این گیاه را نشان می‌دهد (Gulluce et al., *2013*)، مطالعاتی بر روی آن صورت گرفت.

پونه یا پودنه نام علمی Menta از خانواده نعناعیان یا لبیدسانان Lamiaceae است و در جهان ۲۵ گونه و هیبریدهای بسیاری برای آن شناخته‌شده است، این جنس در ایران ۶ گونه علفی، چندساله و معطر دارد (محکمی، ۱۳۹۰). زینلی و همکاران (Zeinali et al., *2004*) گونه‌های مختلف Menta را ازلحاظ خصوصیات مورفولوژیک موردبررسی قرار دادند و تفاوت معنی‌داری بین ویژگی‌های طول و عرض برگ، طول گل‌آذین در شاخه اصلی، تعداد گره در شاخه اصلی و شاخه فرعی، وزن گیاه را در شهرستان‌های کاشان، محلات و اصفهان مورد بررسی قرار دادند.

در این زمینه پژوهش‌های دیگری نیز انجام شده است. میرزایی ندوشن و همکاران (Mirzaie- Nodoshan etal., *2001*) با بررسی گونه‌های مختلف Menta، اختلاف معنی‌داری ازنظر خصوصیاتی مانند ارتفاع گیاه، قطر ساقه، شاخه فرعی، طول و عرض برگ مشاهده نمودند. در این آزمایش ویژگی‌های برگ دو گونه *M*.longifolia و *M*.aqutica ازنظر طول و عرض برگ پرچم و برگ دهم در شرق استان گلستان موردبررسی قرار گرفت.

۲.مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی برخی خصوصیات مورفولوژیکی جنس Menta، در شرق استان گلستان، آزمایشی بر روی دو گونه M.longifolia و M.aqutica انجام شد. نمونه‌های هر باریومی تهیه شد و شناسایی نمونه‌ها توسط افراد متخصص انجام شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در اوایل تابستان ۱۴۰۰، در ۱۰ تکرار انجام شد. گونه M.longifolia از شرق استان گلستان در نزدیکی روستای الهادی که در بخش مرکزی رامیان است و در ۲۰ کیلومتری جنوب رامیان واقع‌شده و ۱۵۰۰ متر از سطح دریا ارتفاع دارد جمع‌آوری شد. گونه M.aqutica در ارتفاع ۳۲۰ متری از سطح دریا در ۴ کیلومتری جنوب رامیان برداشت شد. نمونه‌های گیاهی در مرحله‌ی گلدهی کامل در اوایل تیرماه برداشت شد و هم‌زمان چندین صفت مورفولوژیکی موردبررسی قرار گرفت. پس از بررسی برخی صفات مورفولوژیکی گیاهان جمع‌آوری‌شده و جدا کردن بخش‌هایی هوایی، این گیاه در شرایط دور از نور و رطوبت و در دمای معمولی اتاق (۲۲-۲۵ درجه سانتی‌گراد) تا رسیدن به یک وزن ثابت به مدت ۷ روز خشک و تا زمان استفاده در تاریکی نگهداری شدند. برای تعیین صفات مورفولوژیکی نظیر طول و عرض برگ دهم و برگ پرچم، همچنین اندازه‌گیری وزن تر و وزن خشک برگ‌ها برای هرگونه، ۱۰ تکرار موردبررسی قرار گرفت. برای تعیین طول و عرض$\frac{1}{2}$،$\frac{1}{3}$و$\frac{2}{3}$ برگ دهم و برگ پرچم، از کولیس استفاده شد و اندازه‌گیری برحسب میلی‌متر ثبت شد، سپس وزن تر و وزن خشک برگ‌ها به‌وسیله ترازو برحسب گرم مورداندازه‌گیری قرار گرفت. پس از اندازه‌گیری و ثبت داده‌ها، تجزیه‌ی واریانس و مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار Mini Tab انجام شد.

۳.نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین دو گونه M.longifolia و M. aqutica ازلحاظ طول برگ، عرض$\frac{1}{2}$،$\frac{1}{3}$ و$\frac{2}{3}$ برگ، وزن تر و وزن خشک برگ در سطح p<0/05 اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱).

جدول ۱: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها

ویژگی	وزن خشک برگ‌ها (gr)	وزن تر برگ‌ها (gr)	عرض $\frac{2}{3}$برگ پرچم (cm)	عرض$\frac{1}{2}$ برگ پرچم (cm)	عرض$\frac{1}{3}$ برگ پرچم (cm)	طول برگ پرچم (cm)	عرض $\frac{2}{3}$برگ دهم (cm)	عرض$\frac{1}{2}$ برگ دهم (cm)	عرض$\frac{1}{3}$ برگ دهم (cm)	طول برگ دهم (cm)
p	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰

نتایج مقایسه میانگین صفات موفولوژیکی برگ دو گونه M.longifolia و M. aqutica در (جدول ۲) ثبت‌شده است. مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده نشان داد که اندازه طول برگ دهم، عرض$\frac{1}{2}$،$\frac{1}{3}$،$\frac{2}{3}$ برگ دهم، طول برگ پرچم، عرض$\frac{1}{2}$،$\frac{1}{3}$،$\frac{2}{3}$ برگ پرچم، وزن تر و وزن خشک برگ‌ها در گونه‌ی M. longifolia کمتر از گونه‌ی M. aqutica می‌باشد و اختلاف آماری معنی‌داری ازنظر ویژگی‌های برگ مشاهده شد.

جدول ۲: مقایسه میانگین ویژگی‌های برگ M.longifolia و M. aqutica

ویژگی	*M.longifolia*	*M. aqutica*
طول برگ دهم (cm)	a ۴/۲۵	a ۵/۹۵
عرض$\frac{1}{3}$ برگ دهم (cm)	a ۱/۰۰	a ۱/۹۰
عرض$\frac{1}{2}$ برگ دهم (cm)	a ۱/۱۳	a ۲/۲۷
عرض$\frac{2}{3}$ برگ دهم (cm)	a ۰/۸۳	a ۱/۸۴
طول برگ پرچم (cm)	a ۱/۸۳	a ۳/۰۶
عرض$\frac{1}{3}$ برگ پرچم (cm)	a ۰/۸۳	a ۱/۲۲
عرض$\frac{1}{2}$ برگ پرچم (cm)	a ۰/۹۴	a ۱/۴۳
عرض$\frac{2}{3}$ برگ پرچم (cm)	a ۰/۶۶	a ۱/۰۵
وزن تر برگ‌ها (gr)	a	a

	۳/۰۹	۷/۱۸
وزن خشک برگ‌ها (gr)	a ۱/۵۶	a ۳/۲۳

۴.بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که گونه M.longifolia ازنظر مورفولوژیکی، ظاهر کوچک‌تر با برگ‌های ریزتر دارد. به نظر می‌رسد این‌گونه به دلیل قرار داشتن در ارتفاع (1500(cm در شرق استان گلستان و تجربه‌ی عوامل تنش‌زای نور زیاد، دمای بالا، خشکی محیط و در دسترس نداشتن آب کافی، دارای اندام کوچک‌تر می‌باشد.تنش بیانگر آثار فشار و بار ناشی از تأثیر عوامل خارجی (عامل‌های تنش) روی موجودات زنده است که باعث اختلال در سوخت‌وساز یا کاهش رشد و نمو گیاهان، تنش دماهای بالا است (karami, *2013*). در بین عوامل محیطی تأثیرگذار بر رشد و نمو گیاهان، نور از مهم‌ترین عوامل محیطی است که منبع نامحدودی از انرژی را برای گیاه فراهم می‌کند و شدت و کیفیت آن رشد و نمو گیاهان را به‌شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد (Quail PH, *2002*). شدت نوربالا باعث ایجاد خسارت در دستگاه فتوسنتز می‌شود (Lichtenthaler *JK*& Rinderleu, *2007*). افزایش شدت نور باعث کاهش سطح ویژه برگ شده و سازگاری‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در گیاه برای محافظت گیاه از شدت بالای نور ایجاد می‌شود (Zavala& RavettaD, 2001). کم‌آبی هم روی فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه تأثیر منفی دارد، چون منجر به بسته شدن سریع روزنه‌های برگ می‌شود تا از سرعت از دست دادن آب برگ از طریق تعرق بکاهد (*Chaves M.M. et al, 2002*). از سوی دیگر، گیاه هزینه سنگینی در ازای بسته شدن روزنه‌ها می‌پردازد چون کاهش هدایت روزنه‌ای با کاهش سرعت فتوسنتز برگ همراه است و با توجه به‌شدت استرس و مرحله‌ی رشدی، رشد رویشی و همین‌طور بافت‌های ذخیره‌ای را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Egea G. et al, *2011*)؛ و در بیشتر موارد رشد رویشی حتی از سرعت فتوسنتز برگ به کم‌آبی حساس‌تر بوده و پیش از کاهش فتوسنتز، کاهش می‌یابد (McDowell N.G, 2011) به‌طوری‌که کاهش سطح برگ می‌تواند دلیل اصلی کاهش میزان فتوسنتز باشد.نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها، بین دو گونه *M*.longifolia و M. aqutica نشان داد که نتیجه این آزمایش توسط میرزایی ندوشن و همکاران (Mirzaie Nadoushan etal., 2001) که اختلاف معنی‌داری بین طول و عرض برگ مشاهده کردند تأیید شد. همچنین زینلی و همکاران (*Zeinali etal, 2004*) که گونه‌های مختلف نعناع را ازلحاظ خصوصیات وزن و طول و عرض برگ در شهرستان‌های اصفهان، محلات و کاشان مورد ارزیابی قرار داده بودند و اختلاف معنی‌داری بین مناطق مختلف مشاهده کردند، با توجه به شرایط اقلیمی و توان بسیار خوب کشور در زمینه تنوع گیاهان دارویی، خوب است با شناخت گونه‌های گیاهی و بررسی محل‌های رویش و خصوصیات بوم‌شناختی آن‌ها، گام‌های اساسی برای ترویج شیوه‌های بهره‌برداری صحیح و اصولی از این گیاهان برداشته شود.

سپاسگزاری

این پروژه با حمایت مالی دانشگاه گنبدکاووس انجام شده است که بدین‌وسیله قدردانی می‌شود.

منابع

۱. محکمی ز. ۱۳۹۰. ارزیابی برخی خصوصیات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی توده‌های نعناع بومی استان گلستان پایان‌نامه کارشناسی ارشد در رشته مهندسی کشاورزی - علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

2. Blanco F.F.M.V. 2003. A new method for estimating the leaf area index of cucumber and tomato plant. Horticultura Brasileira, Brasília, 21(4):666-669.
3. Chaves M.M., Pereira J.S., Maroco J., Rodrigues ML., Ricardo C.P.P., Osorio M.L., Carvalho I. Faria T. and Pinheiro C. 2002. How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. Annals of Botany 89: 907-916
4. Egea G., Dodd L. González M. Domingo R. and Baille A. 2011. Partial root zone drying improves almond tree lear-level water use efficiency and afternoon water status compared with regulated deficit irrigation. Functional plant biology, 38: 372–385.
5. Gulluce M. Orhan F, Adiguzel A. Bal T, Guvenalp Z, Dermirezer LO.T.IT Determination of ntimutagenic properties of apigenin-V-O-rutinoside, a flavonoid isolated from Mentha longifolia L)Huds. ssp. longifoliawith yeast DEL assay. Toxicol Ind Health: 74:AF-F.
6. Gutierrez Colomer R.P., Gonzalez-Real M.M. and Baille A. 2006. Dry matter production in rose (Rosa hybrida) flower shoots. Scientia Horticulturae, 107:284-291.١٠
7. Hassan F.U., Leitch M.H., and Ahmad S. 1999. Dry Matter Partitioning in Linseed (Linum usitatissimum L.) J. Agronomy & Crop Science, 183:213-216.
8. Karami, F. (2013). Physiological response of plants to drought stress. Olive Magazine, 128, 34-40.
9. Maria, B. Garcia, F. Xavier, P., and Johan, E 2008. Life span correlates with population dynamics in perennial herbaceous plants. American Journal of Botany 95 (2): 258-262
10. Marcelis L.F.M. 2001. Yield and quality prediction of vegetable: the case of cucumber In: Jijskens, L.M.M., M.L. A. T. M. Hetrog, and B.M. Nicola, Food process modeling CRC Press. Boca Raton Boston New York. Washington, DC
11. McDowell N.G. 2011. Mechanisms linking drought, hydraulics, carbon metabolism, and vegetation mortality.Plant Physiology 155:1051-1059.
12. Mirzaie-Nodoushan. H. Rezaie. M. and Jaimand, K. 2001. Path analysis of essential oil-related characters in Mentha spp. Flavor and Fragrance Journal 16: 340-343.
13. Quail PH (2002) Photochromic photo sensory signaling networks. Nature Reviews Molecular Cell Biology 3(2): 85-93.
14. Swati, zahoor; Ahmad; Imtiaz, Muhammad: Sardar Ali; and Raziuddin, 2000, Potential and relative leaf water content in wheat, Pakistan Journal of Biological Science 3(1): 89-90.
15. Wilson PJ. Thompson K.E.N., and Hodgson J.G. 1999. Specific leaf area and leaf dry matter content as alternative predictors of plant strategies. New Phytologist, 143(11):155-162.
16. Zavala J and Ravetta D (2001) Allocation of photo assimilates to biomass. Resin and carbohydrates in Grindelia chiloensis affected by light intensity Field Crops Research 69(2): 143-149.
17. Zeinali, H., Arzani, A., and Razmjo, K. 2004. Morphological and essential oil content diversity of Iranian mints (Mentha spp). Iranian Journal of Science and Technology. Transaction 28: 1-9. (In Persian with English Summary)

Evaluation of stocking and regeneration of dominant species in three customary areas of Arasbaran

Sajad Ghanbari [1, *]

[1,*] Associate Professor, Department of Forestry, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, Iran

Email: Ghanbarisajad@gmail.com

Abstract

The main purpose of this study is to investigate the quantitative and qualitative characteristics of dominant tree species and their regeneration status in the Arasbaran forests. Data were collected by transect sampling and regeneration was assessed by plot with an area 100 m2. In the sample plots, we recorded information on species type, diameter at breast height, height, quality of seedlings and the presence of cut trees. Three customary areas, Hoosh, Dinehvar, and Aghamirloo villages were selected for study in Arasbaran protected area. The results showed that the number of trees per hectare in the customary areas of Hoosh, Dinehvar and Aghamirloo were 498, 388 and 260 trees per hectare, respectively. The basal area of the trees was 10.77, 7.78 and 5.76 m2 per ha in the Hoosh, Dinehvar and Aghamirloo, respectively. The regeneration status showed that hornbeam (*Carpinus betulus*), oak (*Quercus macranthera*) and maple (*Acer campestre*) had 828, 506 and 360 seedlings per hectare, respectively. The volume of woody debris of hornbeam, oak and maple species were 2.56, 1.28 and 0.19 cubic meters per hectare, respectively. The stand regeneration were in the middle and good classes in terms of vitality. About 27.5% and 72.4% of the seedlings had good and medium quality, respectively. The crown cover percentage were between 50 and 90 percent, so the canopy of these areas was semi-closed. Uncontrolled human interventions and over harvesting in Arasbaran forests have caused significant quantitative and qualitative changes in these forests and the dependence of local communities on these forest have impacted on the species diversity.

Keywords: Arasbaran forests, biodiversity, regeneration, oak, and vitality

وضعیت موجودی و زاداوری گونه های درختی غالب در سه سامان عرفی ارسباران

سجاد قنبری[1*]

۱- دانشیار، گروه جنگلداری، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز، ایران

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: Ghanbarisajad@gmail.com

چکیده

هدف اصلی تحقیق حاضر بررسی ویژگی‌های کمی و کیفی گونه‌های درختی غالب و وضعیت زادآوری آنها در جنگل‌های ارسباران است. ارزیابی گونه‌های درختی در روی خط نمونه‌ها و زادآوری در قطعه نمونه‌های ۱۰۰ مترمربعی انجام شد. در خط نمونه‌ها، اطلاعات نوع گونه‌ها، قطر برابر سینه گونه‌ها، ارتفاع، کیفیت نهال‌ها و وجود درختان کت‌زده برداشت و ثبت شد. نتایج نشان داد که تعداد درختان در هکتار در سامان‌های عرفی هوش، دینه‌ور و آقامیرلو به ترتیب ۴۹۸، ۳۸۸ و ۲۶۰ درخت در هکتار و سطح مقطع درختان به ترتیب ۱۰/۷۷، ۷/۷۸ و ۵/۷۶ متر مربع در هکتار است. نتایج زادآوری‌ها نشان داد که در کل سامان های عرفی مورد مطالعه تراکم گونه‌های ممرز، بلوط و افرا به ترتیب ۸۲۸، ۵۰۶ و ۳۶۰ نهال در هکتار است. حجم ضایعات گونه‌های ممرز، بلوط و افرا در سامان عرفی هوش به ترتیب ۲/۵۶، ۱/۲۸ و ۰/۱۹ مترمکعب در هکتار، در سامان عرفی دینه‌ور به ترتیب ۲/۸۲، ۲/۶۴ و ۲/۶۳ مترمکعب در هکتار و در سامان عرفی آقامیرلو به ترتیب ۳/۳۳، ۴/۶۳ و ۲/۰۴ مترمکعب در هکتار است. نتایج نشان داد که زادآوری‌ها از نظر شادابی در دو طبقه متوسط و خوب قرار دارند که به طور متوسط حدود ۲۷/۵ درصد نهال‌ها از کیفیت خوب و ۷۲/۴ درصد نهال‌ها از کیفیت متوسط برخوردار بودند. دخالت‌های کنترل نشده و برداشت‌های بی‌رویه از توده‌های جنگلی ارسباران تغییرات کمی و کیفی معنی‌داری را در این جنگل‌ها به وجود آورده است و وابستگی جوامع محلی به توده‌های جنگلی در روی تنوع زیستی اثر گذاشته است.

واژگان کلیدی: بلوط، تنوع زیستی، جنگل های ارسباران، زادآوری،شادابی

۱.مقدمه

در حال حاضر بیش از ۱/۶ میلیارد نفر در دنیا برای تامین نیازهای اساسی و معیشت خود به شکل‌های مختلف به کالاهای جنگلی وابسته هستند (World Bank, 2001). در کشور ما جنگل به عنوان چراگاه دام، کمک به تولید دامداری، عرصه‌ای برای تامین زمین کشاورزی، محل تهیه مصالح لازم برای ساخت و ساز خانه‌های روستایی و تهیه و فروش چوب قاچاق برای کسب درآمد بوده است (عواطفی همت و همکاران، ۱۳۹۲)، از طرفی برداشت چوب سوخت به عنوان منبع مهم انرژی از مهمترین شکل وابستگی جنگل‌نشینان کشور به جنگل است (اسحاقی و محمودی، ۱۳۹۸). چوب هیزمی که یکی از تولیدات مهم جنگل برای روستائیان به خصوص در کشورهای در حال توسعه است (Schwarzbauer and Stern, 2010)، به عنوان فعالیت معیشتی در روستاهای مجاور جنگل‌ها از آن استفاده می‌شود (Dovie et al., 2004). به همین دلیل تهیه چوب سوخت از عوامل تخریب جنگل در بسیاری از

کشورهاست (Amacher et al., 1999; Specht et al., 2015). همچنین عرصه‌های جنگلی و مراتع که جهت تعلیف دام‌ها توسط دامداران مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد، باعث صدمه به درخت از طریق سرشاخه‌خواری و لگدکوبی شده و در نهایت تنوع گونه‌های جنگلی را کاهش می‌دهد (جوانمیری پور، ۱۳۸۸؛ توحیدی و همکاران، ۱۳۹۷). چرای دام علاوه بر تغییرات کمی، کیفیت و ترکیب جنگل را نیز تحت تاثیر قرار داده و گونه‌های نامرغوب را جایگزین گونه‌های مرغوب می‌کند (شیخ الاسلامی و همکاران، ۱۳۹۲؛ توحیدی و همکاران، ۱۳۹۷). همچنین عبور و مرور دام باعث فشرده شدن خاک شده و شرایط را برای بذرهایی که به زمین می‌ریزند نامساعد می‌کند و به این ترتیب تجدید حیات جنگل را به مخاطره می‌اندازند (Farris and Filigheddy, 2008).

بنابراین برداشت هیزم را نمی‌توان به عنوان منبع مهم تخریب جنگل در مناظر بسیار پراکنده و پر جمعیت نادیده گرفت. جنگل‌های ارسباران دارای ۱۰۷۲ گونه گیاهی و ۹۷ گونه چوبی بوده (طاهری آبکنار، ۱۳۸۹) و عناصر غالب آن را جنس‌های بلوط و ممرز به ترتیب با ۵۱ درصد و ۳۶ درصد اختلاط با سایر گونه‌ها تشکیل می‌دهند (علیجانپور، ۱۳۸۸). از گونه‌های شاخص این جنگل‌ها می‌توان گونه‌های زغال‌اخته، شفت، فندق، درخت پر، سماق و هفت‌کول را نام برد (مروی مهاجر، ۱۳۹۰). هدف از انجام این تحقیق، مطالعه ویژگی‌های کمی و کیفی گونه‌های درختی غالب، وضعیت زادآوری و همچنین تنوع زیستی آنها در سامان‌های عرفی هوش، دینه‌ور و آقامیرلو واقع در جنگل‌های ارسباران می باشد.

۲.مواد و روش‌ها

جنگل‌های ارسباران در شمال غرب کشور و شمال شرق استان آذربایجان شرقی و در مختصات جغرافیایی ۴۶ درجه و ۳۹ دقیقه تا ۴۷ درجه و ۱ دقیقه شرقی و ۳۹ درجه و ۸ دقیقه تا ۳۸ درجه و ۴۳ دقیقه شمالی واقع شده‌اند. میزان بارندگی سالیانه این منطقه ۲۷۵ میلی‌متر و میانگین درجه حرارت سالیانه آن حدود ۱۱/۶ درجه سانتی‌گراد برآورد شده است (قنبری و همکاران، ۱۳۹۴).

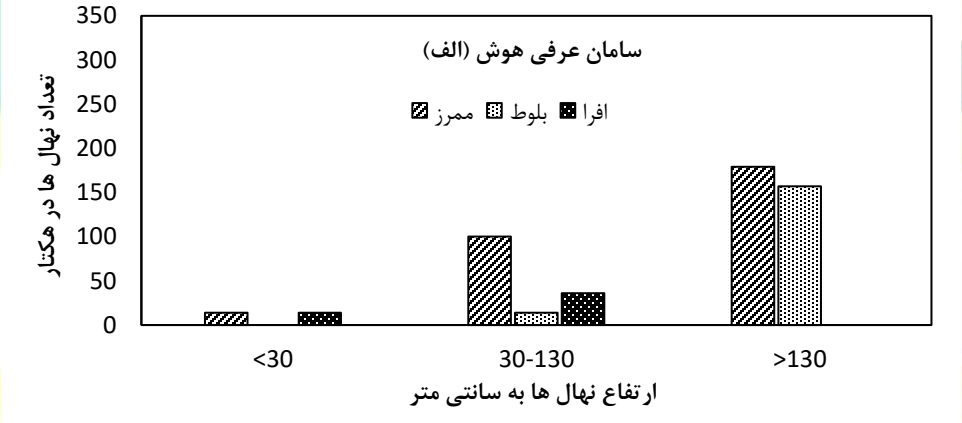
۲-۱-روش کار

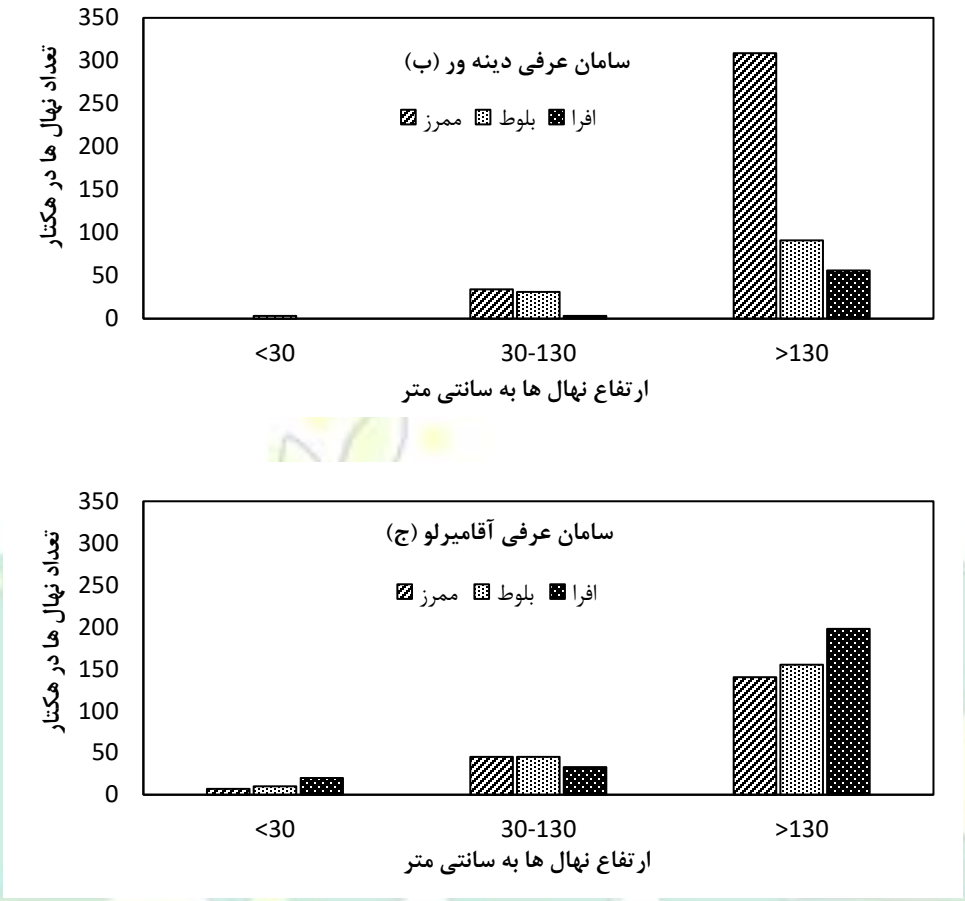
در تحقیق حاضر ابتدا در سامان عرفی روستاهای دینه‌ور، هوش و آقامیرلو به منظور بررسی تعداد درختان در هکتار، سطح مقطع در هکتار، وضعیت تاج پوشش، وضعیت کمی و کیفی زادآوری، حجم ضایعات موجود در کف جنگل و گونه‌های افتاده بر کف جنگل و وجود درختان کت زده آماربرداری زمینی صورت گرفت. ضایعات چوبی درشت در یک توده جنگلی به شاخه‌های به‌جامانده در کف جنگل با قطر میانی بیش از ۱۰ سانتی‌متر و همچنین درختان افتاده و قطعات چوب تکه‌تکه شده و کنده‌های درخت اطلاق می‌گردد. با توجه به بهینه بودن آماربرداری با استفاده از خط نمونه (ترانسکت) از نظر دقت و هزینه در منطقه ارسباران (علیجانپور و همکاران، ۱۳۸۳)، در سامان‌های عرفی مطالعه شده از روش خط نمونه استفاده شد. طول خط نمونه در نمونه برداری به روش خط نمونه با خط نمونه‌های دارای طول ثابت بستگی به تراکم درختان در عرصه جنگل دارد. طول خط نمونه به اندازه‌ای گرفته می‌شود که به طور متوسط تعداد ۱۰-۱۵ اصله درخت در هر خط نمونه قرار گیرند. با جنگل گردشی و بررسی توده جنگلی مورد آماربرداری، طول خط نمونه مشخص می‌گردد (زبیری، ۱۳۸۶). در این تحقیق نیز بعد از جنگل گردشی و با توجه به تراکم درختان، طول خط نمونه‌ها انتخاب گردید. در سامان عرفی هوش، ۱۴ خط نمونه ۵۰ متری، در سامان عرفی دینه‌ور ۳۲ خط نمونه ۵۰ متری و در سامان عرفی آقامیرلو ۴۰ خط نمونه ۷۰ متری پیاده شد. در سامان عرفی هوش ابعاد شبکه آماربرداری ۳۰۰ در ۱۵۰ متری ولی در سامان عرفی دینه‌ور و آقامیرلو ابعاد شبکه به دلیل وسیع نبودن جنگل منطقه ۲۰۰ در ۱۰۰ متری انتخاب شد. در انتهای هر خط نمونه ۵۰ متری نیز یک قطعه‌نمونه زادآوری یک آری (۱۰۰ متر مربع دایره‌ای) برای بررسی وضعیت زادآوری (ارتفاع و تعداد نهال‌ها) پیاده شد. در خط نمونه‌ها نوع گونه‌ها، قطرگونه‌ها، کیفیت نهال‌ها و وجود درختان کت زده برداشت و ثبت شد. ارتفاع

نهال‌ها در سه طبقه کمتر از ۳۰ سانتی متر، بین ۳۰ تا ۱۳۰ سانتی متر و بیشتر از ۱۳۰ سانتی متر طبقه‌بندی شدند. قطر درختان در طبقات قطری پنج سانتی‌متری طبقه بندی شدند. کیفیت نهال‌ها در چهار طبقه شامل طبقه یک یا عالی با تاج پوشش کامل و شاداب، طبقه دو یا خوب با تاج پوشش کامل و شادابی کم، طبقه سه یا متوسط با تاج پوشش و شادابی کم و به‌نسبت ضعیف و طبقه چهار یا ضعیف با تاج پوشش کوچک و دارای نشانه‌های بیماری و شادابی ضعیف بررسی شدند. برای طبقه‌بندی تاج پوشش از معیار طبقه‌بندی Daubenmire استفاده شد که تاج پوشش در طبقه‌های کمتر از ۵ درصد، ۶ تا ۲۵، ۲۶ تا ۵۰، ۵۱ تا ۷۵ و ۷۶ تا ۹۵ و ۹۶ تا ۱۰۰ درصد استفاده شد. همچنین طبقه‌های شیب در سه طبقه کمتر از ۲۵ درصد، بین ۲۶-۴۰ درصد و بین ۴۱ تا ۵۰ درصد طبقه‌بندی شدند.

۳. نتایج و بحث

نتایج بررسی وضعیت زادآوری نشان داد در سامان‌های عرفی هوش، دینه‌ور و آقامیرلو به ترتیب ۵۱۴، ۵۲۸ و ۶۵۲ نهال در هکتار وجود دارد. در سامان‌های عرفی هوش و دینه‌ور، بیشترین و کمترین تعداد نهال در هکتار به ترتیب مربوط به گونه‌های ممرز و افرا بوده در حالیکه در سامان عرفی آقامیرلو بیشترین تعداد نهال مربوط به گونه افرا و کمترین تعداد آن مربوط به گونه ممرز است (شکل ۱). در مجموع سامان‌های عرفی مورد مطالعه گونه‌های ممرز، بلوط و افرا به ترتیب ۸۲۸، ۵۰۶ و ۳۶۰ نهال در هکتار را به خود اختصاص داده‌اند. پراکنش نهال‌ها در طبقه‌های ارتفاعی نیز نشان می‌دهد در طبقه ارتفاعی بیشتر از ۱۳۰ سانتی‌متر نهال‌ها تعداد در هکتار بیشتری داشته و در طبقه ارتفاعی کمتر از ۳۰ سانتی‌متر تعداد در هکتار کمتر است.





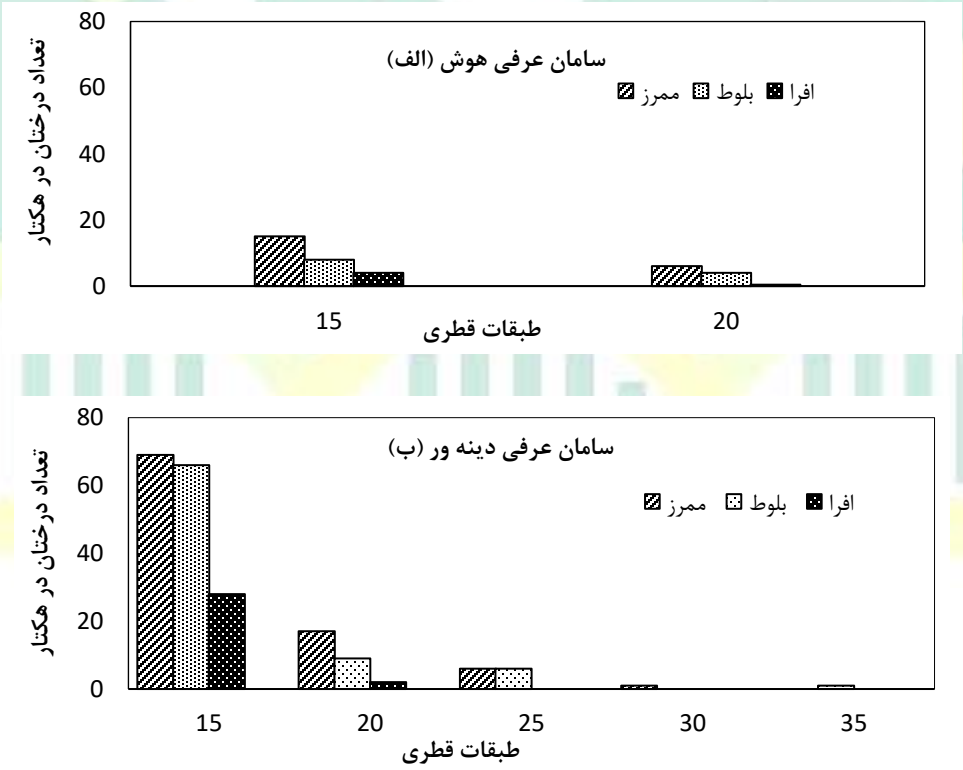
شکل ۱: وضعیت زادآوری در هکتار در سامان‌های عرفی هوش (الف)، دینه‌ور (ب) و آقامیرلو (ج)

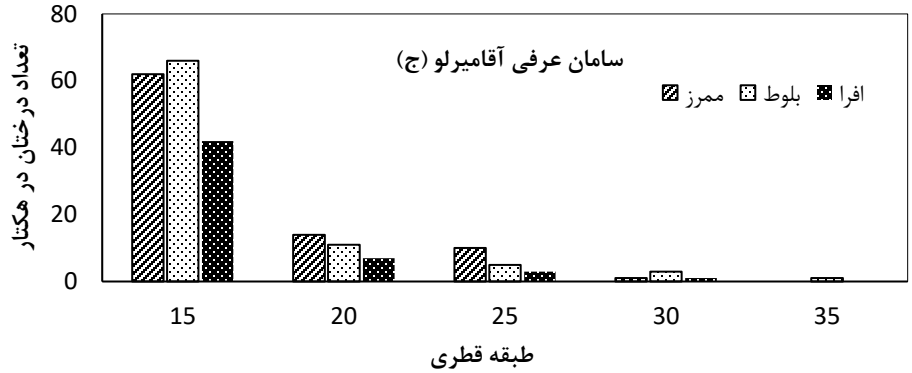
میانگین (± اشتباه استاندارد) تعداد درختان در هکتار، سطح مقطع در هکتار و درصد تاج پوشش در سامان‌های عرفی مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شد. بیشترین و کمترین میانگین تعداد درختان در هکتار و سطح مقطع در هکتار به ترتیب در سامان‌های عرفی هوش و آقامیرلو به دست آمد. در سامان عرفی هوش گونه‌های ممرز، بلوط و افرا به ترتیب ۲۷۴، ۱۶۴ و ۵۹ درخت در هکتار، در سامان عرفی دینه‌ور به ترتیب ۱۸۰، ۱۵۹ و ۵۹ درخت در هکتار و در سامان عرفی آقامیرلو به ترتیب ۹۹، ۱۰۰ و ۶۲ درخت در هکتار دارند (جدول ۱). همان‌طور که مشاهده می‌شود بیشترین تعداد درختان در هکتار و سطح مقطع در هکتار در سامان‌های عرفی هوش و دینه‌ور مربوط به گونه ممرز و در سامان عرفی آقامیرلو مربوط به گونه بلوط است. گونه افرا در همه سامان‌های عرفی کمترین تعداد درختان در هکتار و سطح مقطع در هکتار را دارد. با توجه به اینکه تعداد درختان در هکتار و سطح مقطع در هکتار در سامان عرفی هوش بیشترین مقدار را دارند، بنابراین در این سامان عرفی تراکم درختان بالا است در حالی‌که در سامان عرفی آقامیرلو تراکم درختان نسبت به سایر سامان‌های عرفی پایین‌تر است. درصد تاج پوشش در همه سامان‌های عرفی بین ۵۰ تا ۹۰ درصد بوده، بنابراین تاج پوشش این مناطق نیمه بسته است (جدول ۱).

جدول ۱: میانگین تعداد درختان، سطح مقطع و درصد تاج پوشش در هکتار در سامان‌های عرفی مورد مطالعه

سامان عرفی	تعداد خط نمونه	میانگین تعداد درختان در هکتار (± اشتباه استاندارد)	میانگین سطح مقطع درختان در هکتار (± اشتباه استاندارد)	میانگین درصد تاج پوشش
هوش	۱۴	۵۲±۴۹۸	۱۰/۰±۷۷/۹۹	۷۶/۳۶
دینه‌ور	۳۲	۴۱±۳۸۸	۷/۰±۷۸/۷۶	۷۱/۳
آقامیرلو	۴۰	۲۷±۲۶۰	۵/۷۶ ۰±/۴۹	۷۱/۶۹

همان‌طورکه مشاهده می‌شود بیشترین پراکنش درختان به ترتیب در طبقات قطری ۱۵ و ۲۰ سانتی‌متر اتفاق افتاده است و در طبقات قطری بیشتر از ۳۰ سانتی‌متر کاهش یافته است که نشان دهنده‌ی کم قطر بودن درختان در سامان‌های عرفی مورد مطالعه است. در طبقه قطری ۱۵ سانتی‌متر در سامان‌های عرفی هوش و دینه‌ور، گونه ممرز و در سامان عرفی آقامیرلو گونه بلوط تعداد بیشتری نسبت به سایر گونه‌ها دارند. در طبقه قطری ۲۰ سانتی‌متر نیز در همه سامان‌های عرفی مورد مطالعه، تعداد گونه ممرز بیشترین است.





شکل ۲: پراکنش تعداد درختان در هکتار در طبقات قطری در سامان‌های عرفی هوش (الف)، دینه‌ور (ب) و آقامیرلو (ج)

۴. نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد در سامان‌های عرفی مورد مطالعه، وضعیت پراکنش تعداد در طبقات قطری به صورت کم شونده است. همچنین پراکنش درختان به ترتیب در طبقات قطری ۱۵ و ۲۰ سانتی‌متر بیشتر است. با توجه به این موارد می‌توان گفت که جنگل‌های موجود در سامان‌های عرفی مورد مطالعه از نظر ساختار سنی جوان و ناهمسال می‌باشند به طوری که قطورترین پایه آنها به صورت پراکنده در طبقه‌های قطری ۳۰ و ۳۵ سانتی‌متر است.

در این تحقیق مشخصه سطح مقطع در هکتار به عنوان یکی از مشخصه‌های مهم مورد بررسی قرار گرفت. در سامان‌های عرفی هوش، دینه‌ور و آقامیرلو میانگین سطح مقطع به ترتیب ۱۰/۷۷، ۷/۷۸ و ۵/۷۶ مترمربع در هکتار است. سطح مقطع گونه‌های ممرز، بلوط و افرا در سامان‌های عرفی مورد مطالعه به ترتیب ۱۱/۳۴، ۹/۶۱ و ۳/۳۱ مترمربع در هکتار برآورد گردید. این نتایج نشان می‌دهد که میانگین سطح مقطع در هکتار گونه‌های موجود در سامان‌های عرفی مورد مطالعه پایین است. با توجه به اینکه پایه‌های موجود در این جنگل‌ها از نظر سنی جوان بوده و از قطر برابر سینه کمتری نیز برخوردار هستند، بنابراین، میانگین سطح مقطع در هکتار نیز در این جنگل‌ها پایین است. مومنی مقدم و همکاران (۱۳۸۵) در تحقیقی میانگین سطح مقطع در هکتار درختان ارس را در دامنه‌های کپه داغ ۴۳/۳ مترمربع برآورد کرده و بیان کردند در بخش‌هایی از رویشگاه که دارای درختان نسبتاً قطوری است تعداد پایه‌های ارس کم است و در بخش‌هایی از رویشگاه (مناطق اطراف روستای سرانی) که دارای پایه‌های بیشتری است به دلیل جوان بودن پایه‌ها سطح مقطع برابر سینه در هکتار پایین است و در مقایسه با سایر رویشگاه‌های کشور وضعیت چندان مناسبی ندارد.

منابع

۱. اسحاقی، ف.، محمودی، ب. ۱۳۹۸. ارزیابی تقاضای مصرف چوب هیزمی خانوارهای جنگل‌نشین زاگرس مرکزی بررسی موردی: ناحیه عرفی سردشت، شهرستان لردگان، پژوهش و توسعه جنگل، ۵ (۴): ۶۲۷-۶۱۳.
۲. توحیدی، م.، جلالی، ج.، یزدیان، ف.، عادل، م. ن.، جیرود نژاد، ر.، آذرنوش، م. ر.، صادق کوهستانی، ج. ۱۳۹۷. اثر خروج دام و جنگل‌نشین از جنگل بر تجدید حیات طبیعی در جنگل عباس‌آباد استان مازندران، انسان و محیط زیست، ۴۷، ۱۵۸-۱۳۹.

۳. جوانمیری پور، م.، ۱۳۸۸. بررسی اثرات چرای دام وری زاداوری طبیعی جنگل. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۱۲۷ صفحه.

۴. زبیری، م. ۱۳۸۶. زیست سنجی (بیومتری) جنگل، انتشارات دانشگاه تهران، ۳۸۴ صفحه.

۵. شیخ الاسلامی، ع.، پورولی، ر.، کیالاشکی، ع. ۱۳۹۲. بررسی تاثیر چرای دام بر زادآوری طبیعی گونه‌های جنگلی (مطالعه موردی: طرح جنگلداری سرچشمه)، اکوسیستم‌های طبیعی ایران، ۳ (۳): ۵۱-۳۹.

۶. طاهری آبکنار، ک. ۱۳۸۲. جنگل‌شناسی جنگل‌های خارج از شمال در ایران، انتشارات حق شناس، ۱۵۲ صفحه.

۷. علیجانپور، ا.، اسحاقی‌راد، ج.، بانج شفیعی، ع. ۱۳۸۸. بررسی و مقایسه تنوع گیاهان چوبی دو منطقه حفاظت شده و غیر حفاظتی ارسباران، تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، ۱۷ (۱): ۱۳۳-۱۲۵.

۸. علیجانپور، ا.، زبیری، م.، مروی مهاجر، م. ر.، ضرغام، ن.، فقهی، ج. ۱۳۸۳. مقایسه ویژگی‌های کمی توده‌های جنگلی دو منطقه حفاظت شده و غیر حفاظتی ارسباران، منابع طبیعی ایران، ۵۷ (۳): ۴۵۳-۴۴۷.

۹. عواطفی همت، م.، شامخی، ت.، زبیری، م.، رضا عرب، د.، قاضی طباطبایی، م. ۱۳۹۲. دلایل تخریب جنگل: بررسی مدل‌های ذهنی کارشناسان منابع طبیعی و مردم محلی با استفاده از روش پویایی های سیستم، مجله منابع طبیعی ایران، ۶۶ (۱): ۵۴-۳۹.

۱۰. قنبری، س.، جعفری، م.، نصیری، و. ۱۳۹۴. اثر اجرای طرح صیانت در مقدار و نوع سوخت مصرفی روستاییان در جنگل‌های ارسباران، مجله پژوهش و توسعه جنگل، ۱ (۱): ۸۳-۶۷.

۱۱. مروی مهاجر، م.ر. ۱۳۹۰. جنگل‌شناسی و پرورش جنگل (چاپ سوم)، انتشارات دانشگاه تهران، ۴۴۰ صفحه.

۱۲. مومنی مقدم، ت.، حسینی، س. م.، مخدوم فرخنده، م.، اکبری نیا، م. ۱۳۸۵. بررسی وضعیت کمی و کیفی توده‌های ارس در دامنه‌های کپه داغ، محیط شناسی، ۳۲ (۴۰): ۱۱۶-۱۰۹.

13. Amacher, G. S., Hyde W. F., Kanel, K. R. 1999. Nepali fuelwood production and consumption: Regional and household distinction. *The Journal of Development Studies*, 35(4): 138-163.
14. Dovie, D. K., Witkowski, E. T. F., Shackleton, C. 2004. The Fuelwood Crisis in southern Africa: Relating Fuelwood Use to Livelihood in a Rural Village. *Geo Journal*, 60(2): 123-133.
15. Farris, E., Filigheddu, R. 2008. Effects of browsing in relation to vegetation cover on common yew (*Taxus baccata* L.) recruitment in Mediterranean environments. *Plant Ecology*, *199*(2), 309-318.
16. Schwarzbauer, P., Stern, T. 2010. Energy vs. material, Economic impacts of a "wood-for-energy scenario" on the forest-based sector in Austria: A simulation approach. *Forest Policy and Economics*, 12(1): 31-38.
17. Specht, M. J., Pinto, S. R. R., Albuquerque, U. P., Tabarelli, M., Melo, F. P. 2015. Burning biodiversity: Fuelwood harvesting causes forest degradation in human-dominated tropical landscapes. *Global Ecology and Conservation*, 3, 200-209.
18. World Bank. 2001. A revised Forest Strategy for the World Bank Group. Washington D. C. World Commission on Environment and Development (WCED). 1987, Our Common future, Oxford University Press.

Morphological diversity of a number of tea plants cultivated in three research stations (Azbaram, Fashalam, Fajr)

Sheida Golmohammadi[1]*; Davood Bakhsi[1], Shahin Jahangirzadeh Khiavi[2]

1. Department of Horticultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran; 2 Tea Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Lahijan, Iran

**Corresponding Author Email address: Golmohammadi.sheida@gmail.com*

Abstract

Tea plant with the scientific name of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze is one of the basic and strategic products of northern Iran, especially Guilan province .The commercial product of this plant as a tea drink is the cheapest non-alcoholic beverage after water. As many of these plants are dying for a variety of reasons, knowing the genetics of this plant is essential to protecting their germplasm. Such information can also be useful in designing targeted correctional programs. In the present study, using 20 quantitative and qualitative morphological traits related to leaf characteristics, diversity and genetic relationships, 15 samples of tea cultivated in three research stations of the Tea Research Institute, including Fajr Lahijan, Ezram Baram Siahkal and Fashalam Fooman, were investigated. PAST4.03 software and Euclidean coefficient of UPGA algorithm were used to analyze and design the cluster. Based on the analysis of the data obtained from this study, the samples were divided into 3 groups at the level of 35%. The third group consists of about 87% of the studied samples. In general, the results of the application of morphological markers indicate that there are not many differences between the studied tea samples. Also, based on these clustering results, it was found that the groupings of plants in the clusters obtained from this study are not consistent with the geographical distribution.

Keywords: Maximum 5 words separated with comma

بررسی تنوع مورفولوژی تعدادی از بوته های چای کشت شده در سه ایستگاه تحقیقاتی (ازبرم،فشالم،فجر)

شیدا گل‌محمدی[۱*]، داوود بخشی[۱]، شاهین جهانگیرزاده خیاوی[۲]

[۱*] دانشگاه گیلان، دانشکده علوم کشاورزی، گروه علوم باغبانی؛ [۲] پژوهشکده چای، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران

*ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: Golmohammadi.sheida@gmail.com

چکیده

گیاه چای با نام علمی Camellia sinensis (L.) O.Kuntze یکی از محصولات اساسی و استراتژیک شمال ایران خصوصا استان گیلان می‌باشد. محصول تجاری این گیاه به عنوان دمنوش چای، ارزان ترین نوشابه غیر الکلی بعد از آب است. به دلیل آنکه بسیاری از این بوته‌های بنابرعلل مختلف در حال ازبین رفتن می‌باشند و برای حفاظت از ژرم‌پلاسم آنها داشتن اطلاعات درباره ژنتیک این گیاه نیازی مشخص می‌باشد. همچنین اینگونه اطلاعات می‌توانند در طراحی برنامه‌های اصلاحی هدفمند مفید باشند. در مطالعه پیش رو با استفاده از ۲۰ صفت مورفولوژی کمی و کیفی مرتبط با خصوصیات برگی تنوع و روابط ژنتیکی ۱۵نمونه چای کشت شده در سه ایستگاه تحقیقاتی پژوهشکده چای شامل ایستگاه‌های فجر لاهیجان ،ازبرم سیاهکل و فشالم فومن مورد بررسی قرار گرفته‌اند. جهت آنالیز و طراحی کلاستر از نرم افزار PAST4.03 و ضریب Euclidean والگوریتم UPGA استفاده شده است. بر اساس آنالیز داده‌های حاصل از این بررسی نمونه‌ها در سطح ۳۵٪ در۳ گروه قرارگرفته‌اند. گروه سوم تشکیل شده حدود ۸۷ درصد نمونه‌های مورد بررسی را به خود اختصاص داده است. بطور کلی نتایج حاصل از کاربرد نشانگر مورفولوژی بیان می‌دارد که اختلافات زیادی مابین نمونه‌های چای مورد بررسی وجود ندارد. همچنین بر اساس این نتایج خوشه بندی مشخص گردید که گروه بندی‌های گیاهان در خوشه‌های بدست آمده از این بررسی با توزیع جغرافیایی هم خوانی ندارد.

واژگان کلیدی: Camellia sinensis، تنوع ژنتیکی، نشانگر موفولوژیکی، کلاستر

۱.مقدمه

گیاه چای با نام علمی Camellia sinensis(L.)O.Kuntze از خانواده Theaceace، یکی از قدیمی‌ترین گیاهان نوشـــلبه‌ای غیرالکلی حاوی کافئین در دنیا می‌باشـد. اسـاس و پایه ژنتیکی چای تحت کشـت در ایران از سـه واریته بذری با نام‌هایBetjan، Dhonjan و Rajghur می‌باشد (احمدی شاد و همکاران، ۱۳۸۸). گیاه چای از خانواده چای، از شاخه نهاندانگان یک پایه و از رده ی دولپه‌ای‌ها و همیشه سبز است که برای رشد و نمو به آب و هوای نسبتا گرم و مرطوب نیاز دارد. یکی از ساده‌ترین ابزار برای بررسی تنوع موجود بین موجودات خصوصا چای استفاده از نشانگر های مورفولوژی می‌باشد. نشانگرهای مورفولوژی عمدتا متناظر با صفاتی هستند که

پیامد جهش‌های قابل رویت در ژن‌ها می‌باشند. نشانگرهای مورفولوژی جز اولین نشانگرهایی هستند که مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند.از نشانگرهای مورفولوژی برای بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان متعددی استفاده شده است. از این دسته نشانگرها در چای نیز استفاده شده است که توانسته بخوبی تنوع را نشان دهد

(Vo, 2006، Rajkumar et al., 2010، Subramani et al., 2010، Phong et al., 2016 و جهانگیرزاده و همکاران، ۱۳۹۸). فونگ و همکاران (Phong et al., 2016) با کار برد نشانگرهای مورفولوژی همراه با نشانگر iPBS نتایج مشابهی گرفتند و بیان نمودند که با استفاده از این نشانگرها نتایج مشابه گزارش‌های گذشته در ارتباط با طبقه بندی گیاهشناسی چای حاصل می‌گردد. در بررسی دیگری اعلام شده است که صفات وابسته به برگ بخوبی می‌توانند مابین ارقام و نمونه‌های چای، تفاوت‌ها را بخوبی نشان دهند بنابراین از این صفات می‌توان برای شناسایی انواع ارقام استفاده گردند (Rajkumar et al., 2010).

هدف این تحقیق بررسی و مطالعه برخی ژنوتیپ های چای موجود در سه ایستگاه تحقیقاتی پژوهشکده چای شامل ایستگاه‌های فجر لاهیجان ،ازبرم سیاهکل و فشالم فومن با استفاده از برخی صفات مورفولوژیکی می باشد تا از این طریق بر دانش موجود در این زمینه افزوده و کمکی برای برنامه‌های به‌نژادی این گیاه باشد.

۲.مواد و روش‌ها

در این تحقیق تعداد ۱۵ ژنوتیپ گیاه چای که شامل ۵ نمونه از ایستگاه تحقیقات چای کاشف سیاهکل (ازبرم) شامل نمونه‌های وارداتی منسوب به سریلانکا (۳نمونه) و گرجستان (۲ نمونه)، به همراه ۱۰ نمونه تحت عنوان ژنوتیپ داخلی شامل ۵ نمونه از نمونه‌های گزینش شده از منطقه غرب چایکاری (از ایستگاه تحقیقات چای فشالم ،فومن) موجود در پژوهشکده چای با استفاده از صفات مورفولوژی ۵ صفت کمی و ۱۵ صفت کیفی مورد آزمایش قرار گرفتند. جدول ۱ و ۲ به ترتیب اسامی و کدبندی نمونه‌های مورد بررسی و صفات مورد استفاده در بررسی را نشان می‌دهند. این صفات براساس توصیف نامه معرفی شده توسط سازمان بین المللی مخازن ژنتیکی گیاهان IPGRI. 2000 انتخاب شده‌اند. این صفات توسط روش‌های موجود در توصیف نامه‌ی بین المللی مخازن ژنتیکی گیاهان اندازه گیری شدند. جهت آنالیز و طراحی کلاستر از نرم افزار PAST4.03 و ضریب Euclidean و الگوریتم UPGA استفاده شد.

جدول ۱:نمونه‌های بررسی شده

کد نمونه	منشا	محل جمع آوری	نام نمونه	کد نمونه	منشا	محل جمع آوری	نام نمونه
G1	منطقه مرکز چایکاری	فجر	رقم لاهیج	G9	سریلانکا	ازبرم	62.6
G2	منطقه مرکز چایکاری	فجر	رقم کاشف	G10	سریلانکا	ازبرم	3017
G3	منطقه مرکز چایکاری	فجر	2021	G11	منطقه غرب چایکاری	فشالم	277I
G4	منطقه مرکز چایکاری	فجر	416	G12	منطقه غرب چایکاری	فشالم	449
G5	منطقه مرکز چایکاری	فجر	2023	G13	منطقه غرب چایکاری	فشالم	278I
G6	گرجستان	ازبرم	101 smal leaf	G14	منطقه غرب چایکاری	فشالم	280
G7	گرجستان	ازبرم	102	G15	منطقه غرب چایکاری	فشالم	282I

G8	سریلانکا	ازبرم	62.5

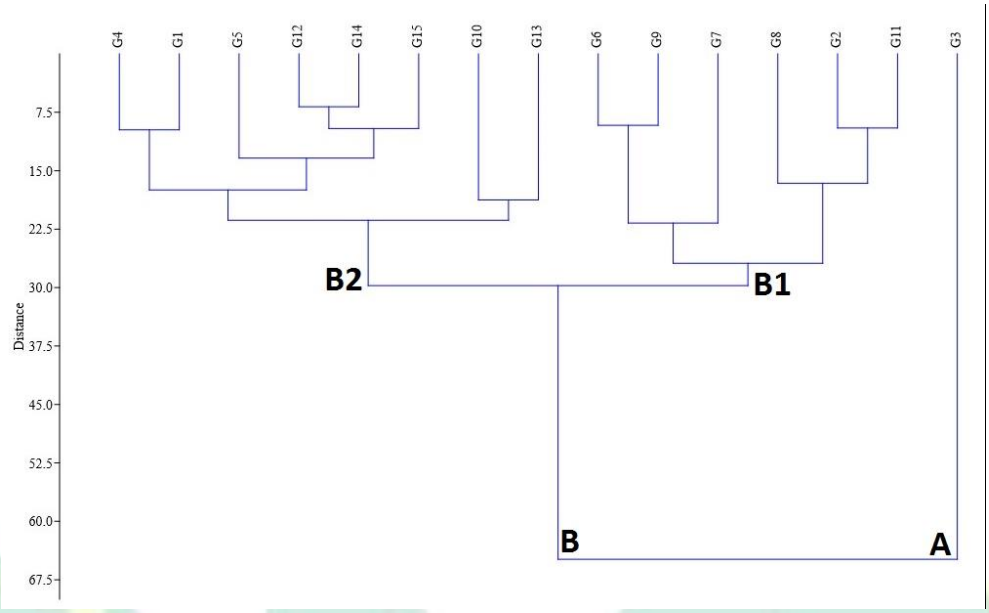
جدول ۲ :صفات مورفولوژیکی مورد بررسی

ردیف	صفات	ردیف	صفات
۱	طول میان گره	۱۱	حاشیه برگ
۲	رنگی شدن در برگ‌های جوان (در فصل رشد)	۱۲	طول به عرض برگ بالغ
۳	رنگی شدن در برگ‌های جوان (در فصل رکود)	۱۳	طول برگ بالغ
۴	رنگ برگ نابالغ	۱۴	عرض برگ بالغ
۵	رنگ برگ بالغ	۱۵	زاویه برگ
۶	شکل برگ	۱۶	رگه بندی
۷	سطح بالایی برگ	۱۷	طرز قرار گیری برگ روی گیاه
۸	شکل انتهای (نوک برگ)	۱۸	واکسی بودن برگ
۹	عادت رشد انتهای برگ (نوک برگ)	۱۹	رنگی بودن برگچه
۱۰	شکل پایه برگ	۲۰	طول دمبرگ برگ بالغ

۳. نتایج و بحث

شناسایی نمونه ها بر اساس توصیفنامه IPGRI برای مورفولوژی برگ نمونه های چای مورد نظر صورت گرفت. تمام نمونه‌های چای گزینش شده از نظر موفولوژی مشابه یکدیگر بودند، اگرچه برخی از آنها تفاوت‌های کوچک و کمی در ویژگی‌های مانند زاویه شاخه، شکل نوک برگ، شکل حاشیه برگ، زاویه برگ باشاخه، رنگ برگ بالغ، سطح بالایی برگ از نظر صاف یا مواجی، شکل پایه برگ (سمت دمبرگ)، حاشیه پهنک، شکل پهنک و اندازه (طول و عرض پهنک) نشان دادند اما در کل رابطه قوی ندارند. با بررسی کلاستر تهیه شده از داده‌های مورفولوژی با روش‌های متفاوت مشخص گردید ضریب Euclidean و الگوریتم UPGA بهترین حالت تفکیک و گروهبندی نمونه‌های مورد بررسی را انجام می‌دهد. برای این ضریب و الگوریتم ضریب کوفنتیک حدود ۰/۹۱ بدست آمده که نشان می‌دهد ۹۱ درصد اطلاعات ماتریس تشابه در کلاستر نشان داده شده است که عدد بسیار مناسبی است.

در این مطالعه ژنوتیپ‌های چای مورد بررسی با استفاده از ۲۰ صفت مورفولوژی (کمی و کیفی) مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس داده‌ها ونتایج تجزیه کلاستری، نمونه‌ها در میزان حدودی ۶۵ در دو گروه قرار گرفتند که گروه اول (A) شامل یک نمونه کد G3 (ژنوتیپ ۲۰۲۱) بود. از آنجایی که این گیاه پلی‌پلوئید می‌باشد تفکیک شدن آن از سایر نمونه‌ها به علت تاثیر پلوئیدی بر اندازه اندام قابل پذیرش است. گروه دوم (B) جدا شده را که باقی نمونه‌ها در آن قرار داشتند به علت آنکه تمام نمونه‌ها دیپلوئید بودند می‌توان به عنوان گروه اصلی بوته‌های چای متداول در نظر گفت. این گروه (B) خود در سطح حدود ۳۰ به دو زیر گروه تقسیم شد که توزیع نمونه‌ها در این دو گروه متوازن بود. توزیع متوازن نمونه‌ها در گروه‌های اصلی تشخیص داده شده در مطالعات مورفولوژی گیاه چای پیش از این نیز در مطالعات صورت گرفته گزارش شده است (بابایی و همکاران، ۱۳۹۶، جهانگیرزاده و همکاران، ۱۳۹۶).



نمودار۱:آنالیز نمونه های بررسی شده

با نگاه کلی به نتایج بدست آمده از کاربرد نشانگر مورفولوژی می‌توان بیان داشت که اختلافات زیادی مابین نمونه‌های چای مورد بررسی وجود ندارد که نتایج مشابهی در این رابطه در بررسی مورفولوژی نمونه‌های چای ایرانی در مطالعات متعدد انجام شده توسط جهانگیرزاده و همکاران (۱۳۹۶، ۱۳۹۷)، بابایی و همکاران (۱۳۹۶) و مهرآسا و همکاران (۱۴۰۰) گزارش شده است.

۴. نتیجه‌گیری

در ژنوتیپ‌های چای انتخاب شده در سطوح مورفولوژیکی تغییرات قابل توجهی مشاهده نمی‌شود. بررسی مورفولوژیکی نشان داد با وجود آنکه توزیع گیاه چای در گذشته هر چند بر اساس ویژگی‌های مطلوب بوده است اما با توجه به محدود بودن منبع اولیه وارداتی این گیاه تنوع چندانی در بین ژنوتیپ‌های مناطق مورد مطالعه دیده نمی‌شود.

منابع

۱. بابایی، ح.، صحرارو، الف.، جهانگیرزاده خیاوی، ش.، بخشی، د. و حسن‌پور، م. ۱۳۹۸. بررسی تنوع مورفولوژیکی برخی ژنوتیپ‌های چای دارجلینگ در ایران، یازدهمین کنگره علوم باغبانی ایران، ۴-۷ شهریور ۱۳۹۸. ایران، ارومیه (دانشگاه ارومیه)
۲. جهانگیرزاده خیاوی، ش.، فلک‌رو، ک.، چائی‌کار، ص.ص.، رمزی، س.، و کهنه، الف. ۱۳۹۸. کاربرد نشانگرهای مورفولوژی و ISSR جهت شناسایی برخی ژنوتیپ‌های چای. نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی، ۲۶(۴): ۱۳۱-۱۴۷
۳. مهرآسا، آ.، مرادی، ح.، بخشی، د. و جهانگیرزاده خیاوی، ش.، استفاده از خصوصیات مورفولوژی برای بررسی تنوع بین بوته‌های چای در ایران. دوازدهمین کنگره علوم باغبانی ایران، ۱۴-۱۷ شهریور ۱۴۰۰. ایران، رفسنجان (دانشگاه ولی عصر عج)

4. Ahmadishad, M.A., Kazemitabar, S.K., Babaeian Jelodar, N.A., Gholami M., and Kazemi Poshtmasari, H.2009. An Assessment of genetic diversity in cultivated Tea (*Camellia sinensis* L.) clones in Iran using RAPD markers, J. crop breed., 1(4): 65-76 (In Persian).
5. IPGRI. 2000. Descriptors for tea. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
6. Phong, N.H., Pongnak, W., Soytong, K., Poeaim, S. and Poeaim, A., 2016. Diversity of Tea (*Camellia sinensis*) Grown in Vietnam based on Morphological Characteristics and Inter-primer Binding Sites (iPBS) Marker. International Journal of Agriculture & Biology, 18(2).
7. Rajkumar, S., S. Karthigeyan, Rakesh K. Sud, R. Rajkumar, N. Muraleedaran, Suresh C. Das, M. Hazarika and Paramvir S. Ahuja, 2010. Genetic diversity of Indian tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) germplasm detected using morphological characteristics. *J. Cell Plant Sci*., 1: 13-22
8. Subramani, R.K., Subramanian, K.S.U.D., Rakesh, R., Rajagopal, N., Muraleedaran, C.D., Suresh, H., Paramvir, S.A. 2010. Genetic diversity of Indian tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) germplasm detected using morphological characteristics. Journal cell Plant Sciences, 1: 13-22.

An overview of taxonomical significance of fruit morphological and anatomical characters of Astereae

Robabeh Shahi Shavvon*

*r.shahi@yu.ac.ir

Abstract

Tribe Astereae is the second largest tribe of Asteraceae family in the world, with 205 genera and 3,100 species. This tribe has 16 genera and 38 species in Iran. Morphological diversity of fruits and anatomical traits are important distinguishing traits in Astereae, but no study in this field has been conducted in Iran. This study reviews the history of fruit morphological and anatomical studies of this tribe along with examining the taxonomic importance of these traits. For this purpose, different references like articles and books related to this tribe were studied. The results of studies show that the morphological (especially micromorphological) and anatomical traits of the members of the Astereae are very diverse. Size and shape of cypselas, surface hair, location of vascular trace, structure of carpopodium and their cellular arrangements, pappus structure, and nature of testal layer are taxonomically significant. According to the results of studies, it is better to combine molecular data, morphological and anatomical traits to resolve relationship among the genera and species in this tribe.

Keywords: **Asteraceae Family, Cypsela, Micromorphology**.

مروری بر اهمیت تاکسونومیکی صفات ریخت‌شناسی و تشریحی میوه در طایفه‌ی Astereae

ربابه شاهی شاوون*

استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه یاسوج

*r.shahi@yu.ac.ir

چکیده

طایفه‌ی Astereae، با داشتن ۲۰۵ سرده و ۳۱۰۰ گونه در دنیا دومین طایفه‌ی بزرگ در تیره‌ی کاسنی است. این طایفه در ایران دارای ۱۶ سرده و حدود ۳۸ گونه است. تنوع صفات ریخت‌شناسی و تشریحی میوه از صفت‌های مهم متمایزکننده در طایفه‌ی Astereae است، اما در ایران مطالعه-ای در این زمینه صورت نگرفته است. لذا در این مطالعه، مروری بر تاریخچه‌ی مطالعات ریخت-شناسی و تشریحی میوه در این طایفه به همراه بررسی اهیمت تاکسونومیکی این صفات پرداخته خواهد شد. بدین منظور مقالات و کتاب‌های مرتبط با این طایفه مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج مطالعات نشان می‌دهد که ویژگی‌های ریخت‌شناسی (به‌خصوص ریزریخت‌شناسی) و صفات تشریحی میوه اعضای طایفه‌ی Astereae دارای تنوع بسیار بالایی هستند. شکل و اندازه‌ی کافشه، کرک‌های سطح آن، موقعیت قرارگیری اثرات آوندی، ساختار پایه‌مادگی و آرایش سلول‌های آن، ساختار جقه، ماهیت لایه‌ی پوششی بذر به لحاظ تاکسونومیکی با اهمیت هستند و می‌توانند در تمایز گونه‌ها کمک کنند. بنابر نتایج مطالعات انجام شده در این طایفه، بهتر است به منظور حل روابط بین سرده‌ها و گونه‌ها اطلاعات مولکولی و صفات ریخت‌شناسی و تشریحی ترکیب شوند.

واژگان کلیدی: کافشه، ریزریخت‌شناسی، تیره‌ی کاسنی

۱. مقدمه

تیره‌ی کاسنی یکی از سه تیره‌ی بزرگ و متنوع است که شامل ۱۳ زیرتیره و ۴۷ طایفه است و بیشتر از ۲۵ درصد همه‌ی گونه‌های نهاندانگان موجود را دربر می‌گیرد (Mandel et al., 2019). با حدود ۲۵۰۰ تا ۳۵۰۰ گونه، حدود ۱۰ درصد کل گیاهان گل‌دار را شامل می‌شود (Smith and Richardson, 2011). گیاهان این تیره در همه‌ی قاره‌ها و زیستگاه‌ها با گونه‌هایی در بیابان‌ها، چمن‌زارها، استپ، نواحی کوهستانی و نواحی با آب و هوای مشابه مدیترانه وجود دارند (Mandel et al., 2019). بر اساس شواهد فسیلی جدید و اطلاعات مولکولی، تیره‌ی Asteraceae احتمالاً در طول اواخر کرتاسه یعنی حدود ۸۳ میلیون سال قبل منشأ گرفته است (Mandel et al., 2019). گیاهان این تیره دارای ارزش اقتصادی زیادی مانند استفاده در تغذیه، روغن، گیاهان دارویی و به عنوان گیاهان تزیینی هستند. وجود برخی از صفت‌های ریخت‌شناسی مانند گل‌آذین کلاهپرک، گل‌های بسیار کاهش‌یافته و تغییر شکل پیدا کرده، پرچم-هایی که از ناحیه‌ی بساک به یکدیگر متصل هستند، تخمدان تحتانی و میوه‌ی بسیار منحصر به فرد در شاخه‌ی گیاهان یعنی کافشه باعث شده که این تیره برای سالیان متمادی مورد مطالعه قرار گیرد.

طایفه‌ی Astereae، دومین طایفه‌ی بزرگ در تیره‌ی کاسنی است. این طایفه به‌طور گسترده در مناطق گرمسیری و معتدله‌ی دنیا وجود دارد. طایفه‌ی Astereae در زیرتیره‌ی Asteroideae قرار داشته و تک‌تبار است. محدوده‌ی طایفه از زمان مطالعات Bentham

در سال ۱۸۷۳ که این طایفه را به شش زیرطایفه تقسیم کرد، بدون تغییر ماند و توسط سایر کاربران نیز پذیرفته شد. این اعتقاد وجود دارد که طایفه‌ی Astereae مورد قبول‌ترین طایفه در تیره‌ی کاسنی است. این طایفه بیشترین خویشاوندی را با طایفه‌ی Anthemideae دارد (Mukherjee and Sarkar, 1992).

طایفه‌ی Astereae دارای ۲۰۵ سرده با ۳۱۰۰ گونه، در ۱۸ زیرطایفه در دنیا (Nesom, 1994; Nesom and Robinson 2006, Talukdar and Talukdar 2013) و ۱۶ سرده با حدود ۳۸ گونه در ایران (Farhani et al., 2018) است. طایفه‌ی Astereae از نظر صفت‌های فیتوشیمیایی، به دلیل فقدان پنتاینن و لاکتون‌های سسکی ترپن از سایر طایفه‌ها متمایز می‌گردد (Bremer, 1987; Brouillet et al. 2009). در ایران، این طایفه بر اساس شکل قاعده‌ی بساک که مدور است و شاخک‌های خامه‌ای با ضمائم مویی درفشی و سه گوش از سایر طایفه‌ها مجزا می‌گردد (مظفریان و همکاران، ۱۳۹۷). میوه‌ی ناشکوفا با یک دانه در تیره‌ی کاسنی، کافشه نام دارد که با یک ناحیه‌ی مریستمی به نام پایه‌ی مادگی به نهنج متصل می‌گردد. دانه‌های تیره‌ی کاسنی ابزاری کلیدی برای موفقیت این تیره هستند. اصطلاح میوه‌ی کافشه نخستین بار توسط Mirbel در سال ۱۸۱۵ استفاده شد و اغلب با فندقه اشتباه گرفته می‌شود. کافشه به دلیل موقعیت پایین‌تر تخمدان، با داشتن یک لایه از گلپوش در اطراف فرابر میوه متمایز می‌شود (Bremer, 1994). مطالعه‌ی تنوع ریخت‌شناسی میوه و تشریحی از صفت‌های مهم تمایزکننده در تیره‌ی Asteraceae هستند (Bremer, 1987)، اما مطالعه-ای در این زمینه در ایران صورت نگرفته است. لذا در این مقاله، با مطالعه‌ی منابع موجود (کتاب‌ها و مقالات) مروری بر مطالعات ریخت‌شناسی و تشریحی میوه در این طایفه، به همراه بررسی اهیمت تاکسونومیکی این صفات پرداخته خواهد شد.

۲.مواد و روش‌ها

به منظور مطالعه‌ی ریخت‌شناسی، میوه‌ی بالغ با استفاده از محلول هیدروکسید سدیم ٪۰.۳ به مدت ۳ تا ۷ روز نرم می‌گردد و پس از رنگ_آمیزی با محلول سافرانین ٪۰.۱ در فنول-گلیسیرین ثابت می‌گردند. جهت انجام مطالعات تشریحی، برش‌های دستی گرفته می‌شوند و توسط ترکیب سافرانین-سبز روشن رنگ‌آمیزی انجام می‌گردد. تصاویر مربوط به صفات ریخت‌شناسی و تشریحی توسط میکروسکوپ الکترونی و نوری تهیه و صفاتی مانند شکل، رنگ و طول و عرض میوه، ساختار سلول‌های برون‌بر میوه، نوع، جهت و پراکنش کرک‌ها، ساختار جقه و ... مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۳. نتایج و بحث

۱.۳ صفات ریخت‌شناسی

مطالعه‌ی ریخت‌شناسی گیاهی به همراه صفات تشریحی، همیشه پایه‌ی علم سیستماتیک بوده است که تلاش می‌کند تنوع، تکامل و فیلوژنی گیاهان را توضیح دهد (Endress et al., 2000).

ریخت‌شناسی میوه (ریزریخت‌شناسی و درشت ریخت‌شناسی) و صفات تشریحی به‌طور گسترده در تعیین روابط تاکسونومیکی در تیره‌ی کاسنی مورد استفاده قرار گرفته است و هنوز هم منبعی ارزشمند از صفات تاکسونومیکی معتبر است (Abid and Häffner, 2000; Schönberger, 2002; Zhu et al., 2006; Garg and Sharma, 2007; Zarembo and Boyko, 2008; Qaiser, 2009; Stuessy, 2009; Abid and Ali, 2010; Inceer et al., 2012; Batista and De Souza, 2017; Gavrilović et al., 2017; Gavrilović et al., 2018a, b; Gavrilović et al., 2019a, b; Janaćković et al., 2019Ozcan and Akinci, 2019). Bremer در سال ۱۹۸۷، اهمیت صفات میوه در سطوح پایین تاکسونومیکی، اما نه در سطح طایفه بیان نمود. در تیره‌ی کاسنی، صفات تشریحی و ریخت‌شناسی میوه به لحاظ تاکسونومیکی، هم در سطح سرده و هم گونه مهم هستند (Abid and Qaiser, 2009, Kulkarni, 2013, Hussein and Eldemerdash, 2016; Karanović et al., 2016; Gavrilović et al., 2019b). مطالعه‌ی ریزریخت‌شناسی میوه در این

طایفه توسط Bremer در سال ۱۹۸۷ نشان داده است که ساختار پوشش دانه از جمله صفات مهم است. Velez در سال ۱۹۸۱ ساختار میوه را در چند سرده از این طایفه در امریکا را مورد مطالعه قرار داد. Roth در سال ۱۹۷۷ بیان نمود ریخت شناسی میوه نه تنها صفت شاخص بوده، بلکه ساختار داخلی آن نیز مفید بوده که به لحاظ تاکسونومیکی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

در تیره‌ی کاسنی رنگ، شکل، اندازه‌ی ضخامت میوه از یک تاکسون به تاکسون دیگر بسیار متفاوت است. بسیاری از دانه‌ها و میوه‌های تیره‌ی کاسنی، در کنار پوشش مخصوص دانه، پوشش‌های اضافی دارند که کاسبرگ کاهش‌یافته هستند. گاهی این لایه‌ها و پوشش دانه به یکدیگر متصل هستند و در نتیجه تشخیص لایه‌ها از همدیگر مشکل است (Jana and Mukherjce, 2012).

کافشه و جقه‌ها ویژگی ریخت‌شناسی هستند که در طبقه‌بندی‌های تاکسونومیکی در سطح طایفه در تیره‌ی کاسنی کمک‌کننده هستند (Talukdar 2008, Frangiote-Pallone and Antonio de Souza 2014, Talukdar and Mukherjee 2014). از دیدگاه سیستماتیکی، ریخت‌شناسی سطح خارجی کافشه از ارزش بالایی برخوردار است و می‌تواند برای درک بهتر روابط بین تاکسون‌ها به کار رود. شکل میوه‌ی کافشه در این تیره از سرده به گونه نیز متغیر است (Jana and Mukherjce, 2012).

میوه در طایفه‌ی Astereae با وجود شیارهای جانبی، به‌صورت پشتی-شکمی مسطح شده است، کرک‌آلود بوده، گاهی با کرک‌های غده‌ای و کلافی با جقه‌های ریشک‌دار یا زبر، گاهی با موهای زبر یک ردیفه یا خزان‌کننده است (Datta and Mukherjee, 2018).

مطالعه‌ی ریزریخت‌شناسی و تشریحی به‌طور واضح نشان داده است که اعضای طایفه‌ی Astereae دارای تنوع بسیار بالایی هستند. بود و نبود بال و شیار، تمایز بافت میان‌بر، نوع کرک و سیخک، و ویژگی‌های مربوط به پوشش دانه در این طایفه بسیار مهم هستند و می‌توانند در تمایز گونه‌ها کمک کنند (Talukdar, 2015).

مطالعه‌ی Jana و Mukherjee در سال ۲۰۱۲، نشان داده است که گونه‌های سرده‌ی *Solidago* بر اساس شکل و ساختار کرک‌های سطح، پایه‌ی مادگی و سیخک‌های جقه‌ی میوه قابل تشخیص هستند.

Jana و همکارانش در سال ۲۰۱۲، ریخت‌شناسی گونه‌های *Aster alpinus*، *Felicia heterophylla* و *Olearia ramulosa* از طایفه‌ی Astereae را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داده است که نوع خارهای جقه، لایه‌های سلولی پایه‌ی مادگی، اثرات دسته‌های آوندی در شیارها از صفت‌های مهم ریخت‌شناسی هستند که در تمایز بین آرایه‌های مورد مطالعه کمک‌کننده بودند. در *Aster alpinus* جقه‌های فلسی وجود دارد، در حالی‌که در *Felicia heterophylla* و*Olearia ramulosa* تنها کرک‌های خاردار جقه وجود دارد. به‌عبارتی شکل جقه از جمله صفت‌های مجزاکننده است.

در دو زیرطایفه‌ی Brachycominae و Lageniferinae میوه دارای کرک‌های یک ردیفه، تاج‌دار است؛ مانند *Baccharis* و *Myriactis*. میوه هم‌شکل، به‌طور معمول تخم‌مرغی باریک، به‌ندرت تخم‌مرغی پهن است. ساختار بال‌های جانبی برای تشخیص گونه‌های *Brachyon* بسیار مهم هستند. در این گروه پایه‌ی مادگی در برخی سرده‌ها وجود ندارد یا در صورت وجود، از نوع متقارن است. سلول‌های پایه‌ی مادگی با دیواره‌ی ضخیم بوده و به‌طور معمول در ۲ تا ۵ ردیف افقی یا فقط یک ردیف آرایش پیدا کرده‌اند.

علاوه بر این، در این گروه، خارهای جقه وجود ندارد. در برخی سرده‌ها مانند *Myriactis* به شکل شیار ظریف یا تاج دیده می‌شود. تصویرهای میکروسکوپ الکترونی نشان داده است که در این گروه در سطح برخی گونه‌ها، کرک‌های انتهایی پیچ‌خورده و دوشکلی وجود دارند و کرک‌های کوتاه‌تر به‌طور پراکنده در نزدیک حاشیه‌ی بال‌های قاعده‌ای و کرک‌های استوانه‌ای باریک متمرکز روی بال‌های جانبی و انتهایی پراکنده هستند. کرک‌های ستاره‌ای در سطح قاعده‌ای بال جانبی دیده می‌شود (Mukherjee and Sarkarj, 2001).

بر اساس صفات ریخت‌شناسی، میوه‌ی زیرطایفه‌های Asterinae, Baccharidinae, Conyzinae و.Podocominae دارای خارهای جقه‌ای باریک، زبر و مویی هستند. میوه‌ها همه به‌صورت پشتی-شکمی فشرده شده هستند. با دو شیار جانبی مشخص و با تعداد کم

یا بدون شیارهای پشتی‌شکمی یا دارای تعداد زیادی شیار هستند. در سطح میوه دارای کرک‌های بدون پایه و تقریباً بدون پایه تا کرک‌های پایه‌دار، تعداد کم تا بسیار زیادی از کرک‌های غده‌ای هستند (Mukherjee and Sarkarj, 2001).

۲.۳ ویژگی‌های تشریحی

بیش از یک قرن است که مطالعات تشریحی به عنوان ابزاری در سیستماتیک گیاهی استفاده می‌شود. صفات تشریحی در درک روابط سیستماتیک و فیلوژنی گروه‌های خاصی از گیاهان بسیار مهم هستند. در حقیقت صفات تشریحی می‌توانند صفت‌های کاربردی فراهم کنند که در شناسایی آرایه‌های گیاهی مشکل‌دار و حل روابط تاکسونومیکی آن‌ها کمک کنند (Metcalfe and Chalk, 1957; Scatena et al., 2005; Makbul et al., 2011; Sosa et al., 2014; Karanović et al 2015, Gavrilović et al., 2019a, b; Janaćković et al., 2019).

در مطالعات تشریحی، صفت‌هایی مانند نوع بافت (پارانشیمی یا اسکلرانشیمی)، الگوی پراکنش آن‌ها و ماهیت لایه‌ی پوششی دانه در این طایفه مهم است. شکل و جهت قرارگیری سلول‌های اپیدرمی پوشش دانه از نظر تاکسونومیکی با ارزش هستند. Grau در سال ۱۹۷۷ گزارش کرد که در طایفه‌ی Asterea، اپیدرم پوشش دانه از یک لایه سلول تشکیل شده که از سه سطح ضخیم شده‌اند (U-شکل است). دیواره‌ی U-شکل برگشته یا معکوس در طایفه‌ی Mutisieae و Anthemideae نیز دیده می‌شود. به همین دلیل می‌توان گفت که طایفه‌ی Astereae و این دو طایفه با یکدیگر خویشاوند هستند (Grau, 1977).

در زیرطایفه‌های Asterinae, Baccharidinae, Conyzinae و.Podocominae نحوه‌ی قرار گیری دسته‌های آوندی در دیواره‌ی میوه در برخی گونه‌ها بسیار شاخص است. به‌طور معمول یک اثر آوندی از قاعده‌ی میوه وارد می‌شود. سپس دو شاخه شده و از هر دو شیار جانبی می‌گذرد. این حالت در برخی از سرده‌ها مانند *Aster* و *Erigeron* مشاهده می‌شود. در سرده‌ی *Baccharis* تعداد اثرهای آوندی مشابه شیارها است. در برخی گونه‌های *Aster* مانند *A. thomsonia* شیارها دو شکلی هستند (نازک و ضخیم) و به‌طور متناوب آرایش پیدا می‌کنند. پاخامه جز صفت‌های مهم است و در *Baccharis* به‌صورت تاژک‌مانند است، در حالی‌که در برخی تاکسون‌ها یا مشخص نبوده یا وجود ندارد. پایه‌ی مادگی به دو صورت دیده می‌شود: متقارن و نامتقارن. هر دو نوع، ساختار حلقه‌مانند کاملی از دید فوقانی تشکیل می‌دهند. سلول‌های پایه‌ی مادگی به‌طور کامل از سلول‌های دیواره‌ی میوه قابل تشخیص هستند. در برخی گونه‌ها کل سطح میوه به استثنای ناحیه‌ی پایه‌ی مادگی دارای کرک‌های بدون پایه، کوتاه، صفحه‌ای، تزئینات ثانویه به وسیله‌ی کریستال‌های اگزالات کلسیم که در درون سلول‌ها است، تشکیل می‌شود. در برخی گونه‌ها کرک‌های غده‌ای، با دیواره‌ی صاف، بدون پایه وجود دارند.

در حالی‌که در طایفه‌های Brachycominae و Lageniferinae میوه به‌صورت پشتی-شکمی با دو بال متورم برابر که حاشیه‌ی آن‌ها یک ردیف کرک پیچ خورده‌ی انتهایی دارد. سطح میوه دارای کرک‌های غده‌ای مدور بدون پایه که به‌صورت پنج ضلعی است. کرک‌های سطح، اغلب مخطط، شیاردار، ناحیه‌ی شیاردار دارای برآمدگی‌های کروی و نامنظم متعدد هستند. سطح میوه دارای برآمدگی‌های بزرگ، به‌صورت ظریف مخطط و دانه‌دار است. میوه دارای تاج شبیه منقار در رأس است. بنابراین به لحاظ تشریحی، زیرطایفه‌های Asterinae، Baccharidinae، Conyzinae و Lageniferinae به هم نزدیک‌تر هستند (Mukherjee and Sarkarj, 2001).

۴. نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه‌ی آرایه‌های تیره‌ی کاسنی نشان می‌دهد که صفات ریخت‌شناسی، ریزریخت‌شناسی و تشریحی در سیستماتیک این تیره بسیار اهمیت دارد. شکل میوه، بود و نبود خارهای جقه، وجود کرک، اثرات دسته‌های آوندی در شیارها از جمله صفات مهم و متمایزکننده در این طایفه هستند. در عصر مولکولی، برخی از محققین اهمیت ریخت‌شناسی، به‌ویژه مطالعات تشریحی را در مطالعات سیستماتیک و فیلوژنی گیاهان نادیده می‌گیرند؛ اما نتایج مطالعات نشان می‌دهند در این تیره بهتر است اطلاعات مولکولی به همراه

صفات ریخت‌شناسی استفاده شوند. علاوه بر این، مطالعات نشان داده‌اند که در صورت عدم دسترسی به نمونه‌ها در مرحله‌ی گل‌دهی در آرایه‌های این طایفه، با صفات ریخت‌شناسی و تشریحی میوه، می‌توان سرده‌های این طایفه را از یکدیگر مجزا نمود.

منابع

۱. مظفریان، و.، قهرمانی نژاد، ف.، نریمیسا، س.، جعفری، ع.، کاظم‌پور اوصالو، ش.، لطفی، ا. و اسدی م. ۱۳۹۷. تیره‌ی کاسنی. جلد ۱۴۴. چاپ اول، انتشارات مؤسسه‌ی تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، ۱۰۲۹ ص.

2. Abid R. and Ali N. 2010. Cypsela morphology and its taxonomic significance for the tribe Senecioneae (Asteraceae) from Pakistan. Pakistan Journal of Botany, 42: 117–133.
3. Abid R.D. and Qaiser M. 2009. Taxonomic significance of the cypsela morphology in the tribe Anthemideae (Asteraceae) from Pakistan and Kashmir. Pakistan Journal of Botany, 41: 555–579.
4. Batista M.F. and De Souza L.A. 2017. Flower structure in ten Asteraceae species: considerations about the importance of morpho-anatomical features at species and tribal level. Brazilian Journal of Botany, 40(1): 265–279.
5. Bentham G. 1873. Notes on the classification, history, and geographical distribution of Compositae. Journal of the Linnean Society Botany, 13: 335-577.
6. Bremer K. 1987. Tribal interrelationships of the Asteraceae. Cladistics 3: 210-253.
7. Bremer K. 1994. Asteraceae. Cladistics and Classification. Timber Press, Portland.
8. Datta M.D. and Mukherjee S.K. 2018. Microscopic analysis of cypselar features in five species of the tribe Astereae (Asteraceae). Plant Systematics & Biotechnology: Challenges & Opportunities, 203-218.
9. Farhani T., Kazempour-Osaloo Sh., Zare-Maivan H. and Mozaffarian V. 2018. Evolutionary history of the tribe Astereae in the Flora Iranica area: Systematic implications. Phytotaxa, 379(1): 095-117.
10. Jana B.K. and Mukherjee S.K. 2012. Cypsela as a taxonomic marker for the genus *Solidago* L. in the tribe Astereae (Asteraceae). Biodiversity Conservation: Fundamentals and Applications, 227-233.
11. Jana B.K. and Mukherjee S.K. 2012. Cypselar Morphology of Some Species of The Family Compositae and Their Taxonomic Significance. International Journal of pharma and bio sciences, 1(5): 463-484.
12. Jana B.K., Radharaman B. and Mukherjee S.K. 2012. Cypselar morpho-anatomy help in the separation of taxa, when flowering stage is not available. The Journal of Biodiversity Photon, 112: 160-165.
13. Jana B.K. and Mukherjee S.K. 2014. Distribution of trichomes on the mature cypselar surface of some species of Compositae. The Journal of Economic and Taxonomic Botany, 38(2): 369-383.
14. Endress P.K., Baas P. and Gregory M. 2000. Systematic plant morphology and anatomy - 50 years of progress. Taxon, 49(3): 401–434.
15. Frangiote-Pallone S. and Antonio de Souza L. 2014. Pappus and cypsela ontogeny in Asteraceae: structural considerations of the tribal category. Revista Mexicana de Biodiversidad, 85: 62-77.
16. Garg S.K. and Sharma K.C. 2007. Taxonomical significance of the micromorphological and scanning electron microscopic surface patterns of cypselas in some members of the tribe Heliantheae (Asteraceae). Feddes Repertorium, 118: 165–191.
17. Gavrilović M., Erić S., Marin P.D., GarciaJacas N., Susanna A. and Janaćković P. 2017. Scanning electron microscopy coupled with energy dispersive spectrometric analysis reveals for the first time weddellite and sylvite crystals on the surface of involucral bracts and petals of two Xeranthemum L. (Compositae) species. Microscopy and Microanalysis, 23(3): 679–686.
18. Gavrilović M., Tešević V., Đorđević I.S., Rajčević N., Bakhia A., Jacas N.G., Susanna A. and Janaćković P.T. 2018a. Leaf micromorphology, antioxidative activity and a new record of 3-deoxyamphoricarpolide of relict and limestone endemic Amphoricarpos elegans Albov (Compositae) from Georgia. Archives of Biological Sciences, 70(4): 613–620.

19. Gavrilović M., de Oliveira A.F.M., Barbosa M.O., Garcia-Jacas N., Susanna A., Marin P.D. and Janaćković P. 2018b. Micromorphology and fatty acid composition of the cypselae of Xeranthemum cylindraceum Sm.(Asteraceae, Cardueae). Botanica Serbica, 42(2): 241–250.
20. Gavrilović M., Rančić D., Škundrić T., Dajić-Stevanović Z., Marin P., Garcia-Jacas N., Susanna A. and Janaćković P. 2019a. Anatomical characteristics of Xeranthemum L. (Compositae) species: taxonomical insights and evolution of life form. Pakistan Journal of Botany, 51: 1007–1019.
21. Gavrilović M., Jacas N.G., Susanna A., Marin P.D. and Janaćković P. 2019b. How does micromorphology reflect taxonomy within the Xeranthemum group (Cardueae-Asteraceae)? Flora, 252: 51–61.
22. Grau J. 1977. Astereae - systematic review, In the Biology and Chemistry of the Compositae, vol 1, pp. 539-565 eds VH Heywood, JB Harborne & BL Turner (Academic Press : London, UK).
23. Häffner E. 2000. On the phylogeny of the subtribe Carduinae (tribe Cardueae, Compositae). Englera, 21: 1–208.
24. Hussein H.A. and Eldemerdash M.M. 2016. Comparative morphology and surface microsculpture of cypsela in some taxa of the Asteraceae and their taxonomic significance. Egyptian Journal of Botany, 56: 409–422.
25. Inceer H., Bal M., Ceter T. and Pinar N.M. 2012. Fruit structure of 12 Turkish endemic *Tripleurospermum* Sch. Bip. (Asteraceae) taxa and its taxonomic implications. Plant Systematics and Evolution, 298: 845–855.
26. Janaćković P., Gavrilović M., Rančić D., Dajić-Stevanović Z., Giweli A. and Marin, P.D. 2019. Comparative anatomical investigation of five Artemisia L. (Anthemideae, Asteraceae) species in view of taxonomy. Brazilian Journal of Botany, 42(1): 135–147.
27. Janaćković P., Susanna A. and Marin P.D. 2019. Micromorphology and anatomy in systematics of Asteraceae. An old-fashioned approach? Biologica Nyssana, 10 (2): 77-85.
28. Karanović D., Luković J., Zorić L., Anačkov G. and Boža P. 2015. Taxonomic status of Aster, Galatella and Tripolium (Asteraceae) in view of anatomical and micro-morphological evidence. Nordic Journal of Botany, 33: 484–497.
29. Karanović D., Zorić L., Zlatković B., Boža P. and Luković J. 2016. Carpological and receptacular morpho-anatomical characters of Inula, Dittrichia, Limbarda and Pulicaria species (Compositae, Inuleae): Taxonomic implications. Flora, 219: 48–61.
30. Kulkarni S.V. 2013. SEM studies of achenes in some taxa of Asteraceae. International Journal of Environmental Rehabilitation and Conservation, 4: 87–97.
31. Makbul S., Güler N.S., Durmuş N. and Güven S. 2011. Changes in anatomical and physiological parameters of soybean under drought stress. Turkish Journal of Botany, 35(4): 369–377.
32. Mandel J.R., Dikow R.B., Siniscalchi C.M., Thapa R., Watson L.E. and Funk V.A. 2019. fully resolved backbone phylogeny reveals numerous dispersals and explosive diversifications throughout the history of Asteraceae. Proceedings of the National Academy of Sciences, 116 (28): 14083–14088.
33. Metcalfe C.R. and Chalk L. 1957: Anatomy of the Dicotyledons. Clarendon Press, Oxford.
34. Nesom G.L. 1994. Subtribal classification of the Astereae (Asteraceae). Phytologia, 76 :193-274.
35. Nesom G.L. and Robinson H. 2007. Astereae. In JW Kadereit, C Jeffrey (eds.), Springer, Berlin, pp. 284-342.
36. Mukherjee SK and Sarkar AK. 1992. Cypselar morphology and anatomy in some members of the family Compositae - tribe Anthemideae, In Proceedings of the National Symposium on Plant Sciences in the Nineties, pp. 448-464 eds RD Banerjee, SP Sen, KR Samaddar, U Sen, AK Sarkar & AK Biswas (Department of Botany, Kalyani University: Kalyani, West Bengal, India).
37. Mukherjee S.K. and Sarkarj A. 2001. Morphology and Structure of Cypselas in Thirteen Species of the Tribe Astereae (Asteraceae). Phytomorphology, 51(1): 17-26.
38. Ozcan M. and Akinci N. 2019. Micromorphoanatomical fruit characteristics and pappus Features of representative Cardueae (Asteraceae) taxa: their systematic significance. Flora, 256: 16–35.
39. Roth I. 1997. Fruits of Angiosperms, Handbuch der Pflanzenanatomie, BandX, Teil I (Gebruder Borntraeger: Berlin, Germany).
40. Schönberger I. 2002. Biosystematics and taxonomy of the Ozothamnus leptophyllus (Compositae) complex in New Zealand. Doctorate. University of Canterbury.
41. Smith R.I.L. and Richardson M. 2011. Fuegian plants in Antarctica: natural or anthropogenically assisted immigrants? Biological Invasions, 13(1): 1–5.
42. Sosa M.M., Via do Pico G.M. and Dematteis M. 2014. Comparative anatomy of leaves and stems in some species of the South American genus Chrysolaena (Vernonieae, Asteraceae) and taxonomic implications. Nordic Journal of Botany, 32: 611–619.

43. Scatena V.L., Giulietti A.M., Borba E.L. and Van den Berg C. 2005. Anatomy of Brazilian Eriocaulaceae: correlation with taxonomy and habitat using multivariate analyses. Plant Systematics and Evolution, 253: 1–22.
44. Stuessy T.F. 2009. Plant taxonomy: The systematic evaluation of comparative data.–2nd ed. Columbia University Press, New York, Chichester, West Sussex.
45. Talukdar T. and Talukdar D. 2013. Response of antioxidative enzymes to arsenic-induced phytotoxicity in leaves of a medicinal daisy, Wedelia chinensis Merrill. Journal of Natural Science, Biology and Medicine, 4(2): 383-388.
46. Talukdar T. 2008. Comparative study of cypselas in three common species of Asteraceae. Pleione, 2(1): 147-149.
47. Talukdar T. 2015. Cypselas diversity as novel taxonomic marker in the tribe Astereae (Family Asteraceae). Emergent Life Sciences Research, 1(2): 26-34.
48. Talukdar T. and Mukherjee S.K. 2014. Cypselar diversity in four species of Senecio L. (Asteraceae). Bangladesh Journal of Plant Taxonomy, 21(1): 13-17.
49. Mirbel C.D. 1815. Elements of plant physiology and botany. Wang, Z. H., Peng, H., Kilian, N. 2013: Molecular phylogeny of the Lactuca alliance Cichorieae subtribe Lactucinae, Asteraceae) with focus on their Chinese centre of diversity detects potential events of reticulation and chloroplast capture. PLoS One, 8(12): p.e82692.
50. Zarembo E.V. and Boyko E.V. 2008. Carpology of some east Asian Cardueae (Asteraceae). Anales del Jardín Botánico de Madrid, 65: 129–134.
51. Zhu S.X., Qin H.N. and Shih, C. 2006. Achene wall anatomy and surface sculpturing of Lactuca L. and related genera (Compositae: Lactuceae) with notes on their systematic significance. Journal of Integrative Plant Biology, 48: 390–399.

.

Study of diatoms of Atrak river in Golestan province

Mostafa Koose Gharavi[*1], Jamileh Panahi Mirzahasanloo[2], Mojtaba Ghareh Mahmoudlou[3], Arsalan Bahalkeh[4]

[*1]M.Sc. Student of Systematic Biology and Plant Ecology, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran
[3]Assistant Professor, Department of Rangeland and Watershed Management, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran
[4]M.Sc. of Aquatic Ecology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran

[*]*Email: mostafafkgh@gmail.com*

Abstract

Diatoms are a large and diverse group of unicellular algae that are distributed in almost all types of aquatic ecosystems around the world and form an important food base in brackish and freshwater. Diatoms are often single-celled, although some specimens are Colony and string are also found. One of the prominent features of diatom cells is that they are enclosed in a unique wall, which is mainly made of silica. Diatoms have been used successfully to measure water quality throughout temperate and tropical countries because they are particularly sensitive to indigenous environmental conditions, from regional conditions to water quality. The Atrak River is a roaring and flooding river that originates from the mountains of Hezar Masjed in Khorasan Razavi and passes along the plains of Quchan, Farooj, Shirvan and Bojnourd along the route and flows in the Turkmen Sahara region of Golestan province, the border between Iran and Turkmenistan and then It flows into the Caspian Sea. Atrak is 669 km long and is the fifth longest river in Iran and the longest river in Turkmenistan. The aim of this study was to investigate the diatoms of this river. Sampling of two bedrock and sediment was done in 5 stations in two seasons of autumn and winter. The first sampling station was selected near Maraveh Tappeh city park and the last station was selected from the diversion channel of Atrak river in Incheh Borun city. 3 more stations were designated on the route of the first and last stations. The diatoms were boiled under concentrated nitric acid under the hood, then permanent slides were prepared. To identify diatoms, the specimens were examined under a light microscope and identified using available sources. For diatom counting, 300 to 400 valves were counted under a microscope and the relative abundance of each species was obtained. In total, 52 species belonging to 27 genera and 2 genera were identified in this study. 2 species belonged to the genus Mediophyceae and the rest of the species belonged to

the genus Bacillariophyceae. Nitzschia, Gomphonema and Tryblionella with 11, 4 and 3 species, respectively, were the largest genera in terms of number of species.

Keywords: diversity, diatom, Atrak river, Golestan province

مطالعه دیاتومه های رودخانه اترک در استان گلستان

مصطفی کوسه غراوی[۱]، جمیله پناهی میرزا حسنلو[۲]، مجتبی قره‌محمودلو[۳]، ارسلان بهلکه[۴]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سیستماتیک و اکولوژی،دانشکده علوم پایه دانشگاه گنبد کاووس
۲-استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس، ایران
۳-استادیار گروه مرتع و آبخیزداری، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس، ایران
۴-کارشناس ارشد بوم شناسی آبزیان، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس، ایران
*
Email: mostafafkgh@gmail.com

چکیده

دیاتوم‌ها یک گروه بزرگ و متنوع از جلبک‌های تک سلولی هستند که تقریبا در همه انواع اکوسیستم‌های آبی در سرتاسر جهان توزیع شده‌اند و پایه مهم غذایی را در آب‌های شور و شیرین را تشکیل می‌دهند.دیاتوم ها اغلب تک سلولی هستند، اگرچه برخی نمونه ها به صورت کلونی و رشته ای نیز یافت می شود. یکی از ویژگی‌های بارز سلول‌های دیاتومی این است که درون یک دیواره منحصر به فرد محصور شده‌اند که جنس این دیواره عمدتا از سیلیس می‌باشد. دیاتومه ها به طور موفقیت آمیزی در سنجش کیفی آب در سراسر کشور های معتدل و گرمسیری به کار گرفته شده اند چون آنها نسبت به شرایط بومی محیط، از وضعیت منطقه تا کیفیت اب حساسیت ویژه ای دارند .رودخانه‌ی اترک، رودی خروشان و سیل‌گیر است که از کوه‌های هزار مسجد در خراسان رضوی سرچشمه گرفته و در طول مسیر از دشت‌های قوچان، فاروج، شیروان و بجنورد گذشته و در ناحیه ترکمن صحرای استان گلستان، مرز ایران و ترکمنستان جاری می‌شود و پس از آن به دریای خزر می‌ریزد. اترک با داشتن ۶۶۹ کیلومتر درازا، پنجمین رودخانه بلند ایران و طولانی‌ترین رودخانه ترکمنستان است. این مطالعه با هدف بررسی دیاتومه‌های این رودخانه انجام گرفت. نمونه‌برداری از دو بستر سنگی و رسوب در ۵ ایستگاه در دو فصل پاییز و زمستان انجام شد. ایستگاه اول نمونه برداری در نزدیکی پارک شهر مراوه تپه و ایستگاه آخر از کانال انحرافی رودخانه اترک در شهر اینچه برون انتخاب شد. ۳ ایستگاه دیگر در مسیر ایستگاه های اول و آخر تعیین شدند. دیاتومه ها با استفاده از اسید نیتریک غلیظ در زیر هود جوشانده شدند، سپس اسلایدهای دائمی تهیه شد. برای شناسایی دیاتوم ها، نمونه ها در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شده و با استفاده از منابع موجود شناسایی شدند. برای شمارش دیاتوم ها نیز ۳۰۰ تا ۴۰۰ والو در زیر میکروسکوپ شمارش گردید و فراوانی نسبی هر کدام از گونه ها بدست آمد. به طور کلی در این بررسی ۵۲ گونه متعلق به ۲۷ جنس و ۲ رده شناسایی شد.۲ گونه متعلق به رده Mediophyceaeو مابقی گونه ها متعلق به رده Bacillariophyceaeبودند. Nitzschia، Gomphonemaو Tryblionellaبه‌ترتیب با ۱۱، ۴ و۳ گونه بزرگترین جنس‌ها را از نظر تعداد گونه به خود اختصاص دادند.

کلمات کلیدی: تنوع، دیاتوم، رودخانه اترک، استان گلستان

۱.مقدمه

رودخانه ها جز اکوسیستم های آبی محسوب می شوند که مطالعات زیادی در مورد تنوع زیستی آن ها انجام شده است.رودخانه‌ی اترک، رودی خروشان و سیل‌گیر است که از کوه‌های هزار مسجد در خراسان رضوی سرچشمه گرفته و در طول مسیر از دشت‌های قوچان، فاروج، شیروان و بجنورد گذشته و در ناحیه ترکمن صحرای استان گلستان، مرز ایران و ترکمنستان جاری می‌شود و پس از آن به دریای خزر می‌ریزد.از آنجایی که هیچ تحقیقی بر روی فلور جلبکی در منطقه انجام نشده است، مطالعه حاضر با هدف شناسایی دیاتومه های رودخانه اترک به عنوان جزئی از تنوع زیستی این اکوسیستم انجام شد. رودخانه اترک یکی از سه رودخانه اصلی در استان گلستان می‌باشد که نقش پایه و اساسی در عرضه آب دارد و منبع مهمی برای تامین آب مورد استفاده برای مصارف صنعت، شرب، کشاورزی و دامداری برای مرزنشینان می‌باشد.

۲.مواد و روش ها

نمونه‌برداری از۵ ایستگاه و در دو فصل پاییز و زمستان و در بستر رسوب انجام شد و در ایستگاه هایی که بستر سنگی یافت شد نمونه اپی لیت هم گرفته شد .ایستگاه اول نمونه برداری در نزدیکی پارک شهر مراوه تپه و ایستگاه آخر از کانال انحرافی رودخانه اترک در شهر اینچه برون انتخاب شد. ۳ ایستگاه دیگر در مسیر ایستگاه های اول و آخر تعیین شدند نمونه های جمع آوری شده با افزودن مقدار ۲ تا ۳ سی سی فرمالین ۴٪ تثبیت شده و به آزمایشگاه زیست شناسی منتقل شدند. در هر یک از ایستگاه ها به همراه نمونه های جلبکی، نمونه آب رودخانه نیز از آن محل برداشته شد و در ظروف ۱ لیتری ریخته شد و جهت آنالیز میزان نیترات، آمونیوم و فسفات به آزمایشگاه منتقل گردید. میزان اکسیژن محلول، دما، هدایت الکتریکی، شوری، PH و TDS با استفاده از دستگاه پرتابل در محل اندازه گیری شد. پس از آماده سازی دیاتوم ها با اسید نیتریک غلیظ، با استفاده از چسب Canada Balsam اسلایدهای دائمی تهیه شد. برای شناسایی دیاتوم ها، نمونه ها در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شده و با استفاده از منابع موجود شناسایی شدند. برای شمارش دیاتوم ها نیز ۳۰۰ تا ۴۰۰ والو در زیر میکروسکوپ شمارش گردید و فراوانی نسبی هر کدام از گونه ها بدست آمد.

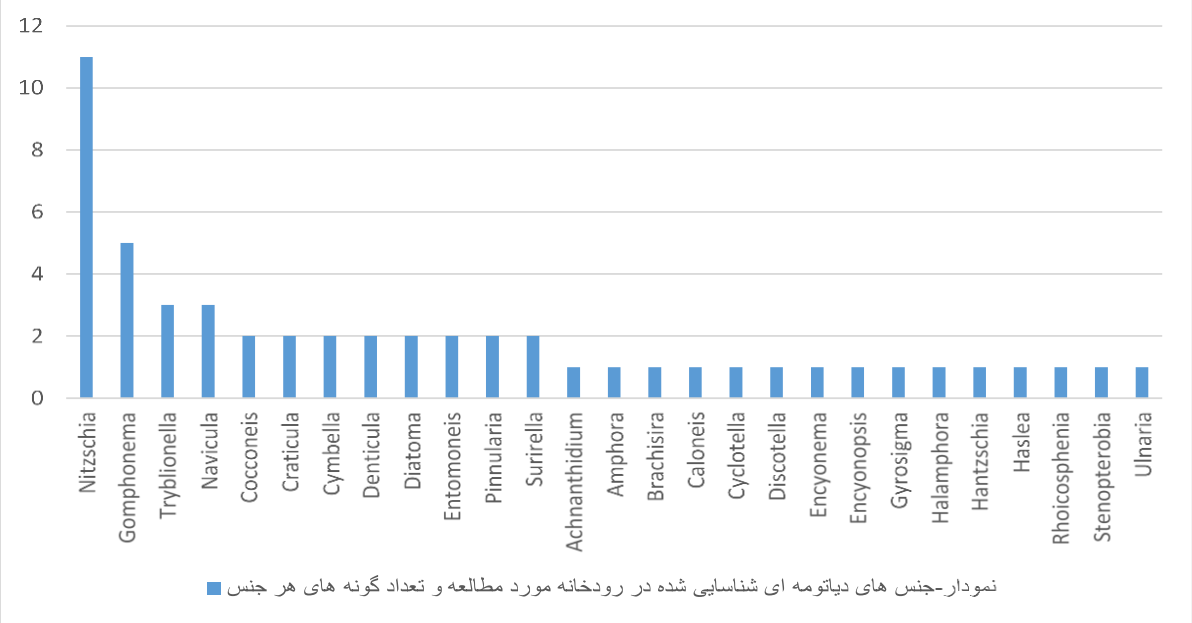
۳.نتایج و بحث

به طور کلی در این بررسی ۵۲ گونه متعلق به ۲۷ جنس و ۲ رده شناسایی شد (شکل1). ۲ گونه متعلق به رده Mediophyceae و مابقی گونه ها متعلق به رده Bacillariophyceae بودند. در بین تیره ها Bacillariaceae با ۱۷ گونه بزرگترین تیره و بعد از آن تیره های Naviculaceae با ۶ گونه و Gomphonemataceae با ۵ گونه قرار داشتند (شکل۲). در بین جنس ها نیز، *Nitzschia* ، *Gomphonema* و *Tryblionella* به‌ترتیب با ۱۱، ۴ و۳ گونه بزرگترین جنس‌ها را از نظر تعداد گونه به خود اختصاص دادند (شکل2).

از نظر مورفولوژیکی بیشترین تعداد گونه ها متعلق به گروه Nitzschia شکلی با ۱۷ گونه و ۴ جنس بود. از گروه های Eunotia شکلی و Ephithemia شکلی، نمونه ای در این رودخانه وجود نداشت (شکل۳). ٪۵۰ نمونه های دیاتومی شناسایی شده در هر دو

نمونه (اپی پل و اپی لیت) حضور داشتند، ۳۶/۵۳٪ از نمونه ها تنها در نمونه اپی پل حضور داشتند و ۱۳/۴۷٪ فقط در نمونه اپی لیت شناسایی شدند (شکل2).

شکل 1- نمودار تعداد گونه های متعلق به هر کدام از جنسهای شناسایی شده در رودخانه اترک



شکل۲:لیست دیاتوم های اپی پل و اپی لیت شناسایی شده به تفکیک ماه نمونه برداری

گونه	اسفند		دی		آبان	
	اپی لیت	اپی پل	اپی لیت	اپی پل	اپی لیت	اپی پل
Achnanthidium minutissimum **(Kutzing) Czarnecki**	+	+	+	+	+	+
Amphora pediculus **(Kützing) Grunow**	+	–	-	–	–	–
Brachysira micocephala **(Grunow) Compere**	–	+	–	+	–	–
Caloneis aequatorialis **Hustedt**	+	+	+	+	+	+

***Cocconeis pediculus* Ehrenberg**	+	-	-	-	-	-
***Cocconeis placentula* Ehrenberg**	+	-	-	-	-	-
***Craticula ambigua* (Ehrenberg)**	-	+	-	-	-	-
***Craticula buderi* (Hustedt) Lange-Bertalot**	+	+	+	+	+	+
***Cyclotella meneghiniana* Kutzing**	-	+	-	-	-	+
Cymbella compacta	-	+	-	-	-	-
***Cymbella excise* Kutzing**	-	-	+	+	-	+
***Denticula creticola* Lange-Bertalot &Krammer**	-	-	+	+	-	-
***Denticula kuetzingii* Grunow**	-	-	+	+	-	+
***Diatoma moniliformis* (Kuetzing) D.M.Williams**	+	-	+	-	-	-
***Diatoma tenuis* C.Agardh**	-	+	-	-	-	-
***Discostella stelligera* (Cleve&Grunow) Houk&Klee**	-	+	-	-	-	-
***Encyonema silesiacum* (Bleisch) D.G.Mann**	-	-	-	+	-	-
***Encyonopsis* sp**	-	-	+	-	-	+
***Entomoneis costata* (Hustedt) Reimer**	-	+	-	-	-	+
***Entomoneis paludosa* (W.Smith) Reimer**	-	+	+	+	+	+
***Gomphonella olivacea* (Hornemann) Rabenhorst**	+	+	+	+	+	+
***Gomphonema parvulum* (Kutzing) Kutzing**	+	-	+	-	-	-
***Gomphonema pumilum* (Grunow) E.Reichrdt&Lange-bertalot**	+	+	+	+	-	+
***Gomphonema subclavatum* (Grunow) Grunow**	+	+	-	-	-	-
***Gyrosigma* sp**	-	+	-	+	+	+
***Halamphora* sp**	-	+	-	+	-	-
***Hantzschia amphioxys* (Ehrenberg) Grunow**	-	+	+	+	-	-

***Haslea* sp**	-	+	-	+	-	+
***Navicula* sp**	-	-	-	+	-	-
***Navicula symmetrica* R.M.Patrick**	+	+	+	+	+	+
***Navicula veneta* Kutzing**	+	+	+	+	+	+
***Nitzschia acidoclinata* Lange-Bertalot**	-	-	+	+	-	+
***Nitzschia clausii* Hantzsch**	+	+	+	+	+	+
***Nitzschia commutatoides* Lange-Bertalot**	-	+	-	-	-	-
***Nitzschia dissipata* (Kutzing) Rabenhorst**	-	-	-	+	+	-
***Nitzschia elegantula* Grunow**	-	-	-	-	-	+
Nitzschia inconspicua Grunow	+	+	+	+	+	+
***Nitzschia obtusa* W.Smith**	-	+	-	-	-	-
***Nitzschia lorenziana* Grunow**	-	+	-	-	-	+
***Nitzschia palea* (Kutzing) W.Smith**	+	+	+	+	+	+
***Nitzschia sigma* (Kutzing) W.Smith**	-	+	-	-	-	-
***Nitzschia subacicularis* Hustedt**	-	-	-	+	+	+
***Pinnularia borealis* Ehrenberg**	-	-	-	-	+	-
***Pinnularia brebissonii* (Kutzing) Rabenhorst**	-	-	-	-	-	+
***Rhoicosphenia abbreviate* (C.Agardh) Lange-Bertalot**	+	-	-	+	-	-
***Stenopterobia* sp**	-	-	-	-	-	+
***Surirella brebissonii* Krammer&Lange-Bertalot**	+	+	+	+	+	+
Surirella sp	-	+	-	-	-	-
***Tryblionella apiculata* W.Gregory**	+	+	+	+	+	+
***Tryblionella calida*(Grunow) D.G.Mann**	+	+	-	+	+	+
***Tryblionella hungarica*(Grunow) Frenguelli**	-	+	+	-	-	-

***Ulnaria ulna*(Nitzsch) Compere**	-	-	-	-	+	+

دیاتومه های شناسایی شده رودخانه اترک شباهت هایی با سایر مطالعات انجام گرفته از اکوسیستم های آبی ایران دارد. جنس های Nitzschia، Gomphonema، Navicula جنس های بسیار متداول با تعداد زیادی گونه هستند. نتایج مشابهی در سایر مطالعات به دست آمده است. آق آتابای با مطالعه دیاتومه های رودخانه خرمارود جنس های Nitzschia، Gomphonema، را بزرگترین جنس ها از نظر تعداد گونه معرفی کرد. خیری با مطالعه بر روی رودخانه کرج در البرز مرکزی جنس های Nitzschia،Gomphonema را به عنوان جنس های غالب معرفی کرد.

منابع

۱. آق اتابای، ع.۱۳۹۷. بررسی دیاتومه های اپی لیت و اپی پل رودخانه خرمارود شهرستان آزادشهر در استان گلستان. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه گنبد کاووس،۹۷ ص.

۲. خیری، س. ۱۳۹۱. مطالعه جوامع دیاتومه های پری فیتیک (اپی پل و اپی لیت) و تغییرات فصلی آنها در رودخانه کرج، ایران. رساله دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ۱۶۰ ص.

۳. ملکشی، ع. ۱۳۹۳. بررسی گونه های دیاتومه مشاهده شده مشترک بین اپی پل و اپی لیت در رودخانه اترک بجنورد، دومین همایش سراسری محیط زیست، انرژی و پدافند زیستی تهران.

4. Potapova, M. G., & Charles, D. F. (2002). Benthic diatoms in USA rivers: distributions along spatial and environmental gradients. *Journal of biogeography*, *29*(2), 167-187.

Effect of different levels of sodium selenate on Growth and Some Physiological Characteristics of Mentha piperita

Halime Jafari[1], Mohammad Moghaddam*[2]

1- MSc Student, Department of Horticultural Science and Landscape, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2- Associated Professor, Department of Horticultural Science and Landscape, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

*Corresponding author: m.moghadam@um.ac.ir

Abstract

Peppermint is one of the most widely used and important plants of the Lamiaceae family in the food and pharmaceutical industries. Selenium is known as one of the beneficial element for the plant which the inorganic form of it is sodium selenate. The evidences suggests the antioxidant role of selenium and also the plants play an important role in transporting of this beneficial element to the human food chain. Therefore to investigate the effect of sodium selenate on fresh and dry biomass of aerial part and some physiological traits of peppermint (*Mentha piperita*) in a soilless culture system, a pot experiment was performed based on a completely randomized design with 4 levels (0, 4, 8, 12 mg/L) with 4 replications in the research greenhouse of the Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad. The evaluated traits included fresh and dry biomass of aerial part, antioxidant activity, total phenol, flavonoids, flavone, and flavonols. The results showed that the effect of sodium selenate on all the studied traits in this study was significant at 1% probability level. The highest fresh and dry aerial part biomass was observed at 4 mg/L sodium selenate treatment which increased by 2.1% and 9.6% compared to the control plant, respectively. The lowest fresh and dry aerial parts biomass was observed at 12 mg/L sodium selenate treatment which was 75.7% and 63.5% lower than the control, respectively. Sodium selenate in 4 mg/L concentration increased antioxidant activity by 13.8%. Also the highest amount of phenolic compounds (total phenol, flavonoids, flavone, and flavonols) was obtained in 4 mg/L concentration of sodium selenate which was increased by 154.8%, 38.7%, 237%, and 130%, respectively compared with the control. The lowest level of antioxidant activity and phenolic compounds were observed in the control plant. In total, due to the importance of high fresh and dry aerial part biomass of the plant, application of sodium selenate in 4 mg/L concentration in peppermint is recommended. Moreover, 12 mg/L concentration causes toxicity in the plant. Therefore, the addition of low concentrations of sodium selenate in peppermint plant as an essential ingredient for human health can increase plant growth and improve physiological characteristics of peppermint.

Keyword: Antioxidant activity, Total phenol, Biomass, Flavonoid

تأثیر سطوح مختلف سلنات سدیم بر برخی ویژگی‌های رشدی و فیزیولوژیکی نعناع فلفلی (Menta piperita)

حلیمه جعفری[۱]، محمد مقدم[۲]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- دانشیار گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

*آدرس پست الکترونیکی نویسنده مسئول m.moghadam@um.ac.ir :E-mail

چکیده

نعناع فلفلی از پر مصرف‌ترین و مهمترین گیاهان خانواده نعنائیان، در صنایع غذایی و دارویی می‌باشد. سلنیوم به‌عنوان عنصر مفید برای گیاه شناخته شده که شکل غیر آلی آن، سلنات سدیم است. شواهد نشانگر نقش آنتی‌اکسیدانی سلنیوم می‌باشد و همچنین گیاهان در انتقال این عنصر مفید به زنجیره غذایی انسان‌ها نقش بسزایی دارند. از این رو به‌منظور بررسی تاثیر سلنات سدیم بر زیست توده تر و خشک اندام هوایی و برخی صفات فیزیولوژیکی نعناع فلفلی (Mentha piperita) در بستر کشت بدون خاک، آزمایشی بر پایه طرح کاملا تصادفی با چهار سطح سلنات سدیم (۰، ۴، ۸، ۱۲ میلی‌گرم در لیتر) و ۴ تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد اجرا شد. صفات مورد ارزیابی شامل زیست توده تر و خشک اندام هوایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنل کل، فلاونوئید، فلاوون و فلاونول بودند. نتایج حاصل از آن‌ها نشان داد که اثر سلنات سدیم بر کلیه صفات مورد مطالعه در این تحقیق در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. بیشترین زیست توده تر و خشک اندام هوایی در تیمار ۴ میلی‌گرم در لیتر سلنات سدیم مشاهده شد که نسبت به گیاه شاهد به‌ترتیب ۲/۱ و ۹/۶ درصد افزایش داشت و کمترین زیست توده تر و خشک اندام هوایی مربوط به تیمار ۱۲ میلی‌گرم در لیتر سلنات سدیم بود که نسبت به شاهد به‌ترتیب ۷۵/۷ و ۶۳/۵ درصد کاهش داشت. سلنات سدیم در غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش ۱۳/۸درصدی فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد. همچنین بالاترین میزان ترکیبات فنلی (فنل کل، فلاونوئید، فلاوون و فلاونول) در غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر سلنات سدیم حاصل شد که نسبت به شاهد به‌ترتیب ۱۵۴/۸، ۳۸/۷، ۲۳۷ و ۱۳۰ درصد افزایش یافت. کمترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنلی در گیاه شاهد دیده شد. به‌طورکلی با توجه به اهمیت بالای وزن تر و خشک زیست توده گیاهی کاربرد سلنات سدیم در غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر برای افزایش این صفات در گیاه نعناع فلفلی توصیه می‌شود. علاوه‌براین، غلظت ۱۲ میلی‌گرم در لیتر موجب ایجاد سمیت در گیاه می‌شود. بنابراین افزودن سلنات سدیم با غلظت کم درگیاه نعناع فلفلی به‌عنوان یک ماده اساسی برای سلامت انسان می‌تواند باعث افزایش رشد گیاه و بهبود خصوصیات فیزیولوژیکی آن شود.

واژه‌گان کلیدی: فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنل کل، زیست توده، فلاونوئید

۱. مقدمه

نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) یک گیاه علفی چندساله متعلق به خانواده Lamiaceae است که دارای ساقه‌های چهارگوش و برگ‌های متقابل کمی پوشیده از کرک می‌باشد. ریشه نعناع فلفلی چندان عمیق نیست و در سطح خاک به‌صورت پراکنده قرار دارد. ماده موثره در نعناع فلفلی از نوع اسانس است و به واسطه وجود اسانس در پیکررویشی، دارای بویی مطبوع و مزه‌ای خنک و تند می‌باشد. به جهت اثرات دارویی و استفاده غذایی، این گیاه از دیرباز مورد توجه بوده و در صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی، نوشابه-سازی، شیرنی‌سازی و صنایع ادویه‌سازی مورد استفاده قرار می‌گیرد (امیدبیگی، ۱۳۸۶). در میان تنوع گیاهان، یکی از گیاهان دارویی پر مصرف در سراسر جهان و دارای سابقه طولانی کاربرد در پزشکی است که از برگ آن به‌عنوان داروی رایج سرماخوردگی، التهاب دهان، حلق، کبد و برای اختلالات دستگاه گوارش مانند حالت تهوع، استفراغ، اسهال، گرفتگی عضلات، نفخ و سوء هاضمه استفاده می‌شود و همچنین به‌عنوان آنتی‌اکسیدان، ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد التهابی و ضد سرطان عمل می‌کند (Valente et al., 2016).

علاوه بر عناصر ضروری، تعدادی از عناصر به‌عنوان عناصر مفید برای گیاهان شناخته می‌شوند. عناصر مفید، عناصری هستند که بدون وجود آن‌ها گیاه می‌تواند چرخه زندگی خود را کامل کند، ولی وجود این عناصر سبب بهبود رشد و نمو گیاه می‌شود. یکی از عناصر مفید سلنیوم است که به علت حضور در سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی و تعادل هورمونی به‌عنوان یک ماده اساسی برای سلامت انسان و حیوان شناخته شده است. تقویت گیاهان خوراکی با سلنیوم ممکن است یک سیستم جایگزین برای تأمین سلنیوم در رژیم غذایی انسان باشد. محتوای سلنیوم در گیاه را می‌توان با افزودن سلنیوم در کشت بدون خاک در محلول غذایی حاوی ترکیب‌های سلنیوم اضافه کرد. جذب سلنیوم عمدتاً از خاک به‌وسیله گیاهان به‌صورت سلنات (SeO_4^-) یا سلنیت (SeO_3^-) می‌باشد و تأکید بیشتر بر سلنات است. قابلیت دسترسی پایین‌تر سلنیت در خاک در مقایسه با سلنات، باعث کاهش استفاده از آن در کودها شده است. سلنیوم تحمل گیاهان را در برابر تنش اکسایشی ایجاد شده به‌وسیله رادیکال‌های آزاد و اکسیژنی افزایش می‌دهد (طباطبایی، ۱۳۹۳). گیاهان از نظر میزان ذخیره عنصر سلنیوم به دو گروه انباشته‌گر و غیر انباشته‌گر تقسیم می‌شوند. اکثر گیاهان خانواده براسیکاسه انباشته‌گر و خانواده نعناع غیر انباشته‌گر می‌باشند (Labanowska et al., 2012). گیاهان به غلظت بالای سلنیوم حساس هستند زیرا سبب کاهش رشد گیاه و ماده خشک گیاهی می‌گردد، بااین‌حال غلظت‌های پایین سلنیوم موجب بهبود رشد در برخی گیاهان شده است (خادمی و همکاران، ۱۳۹۶).

۲. مواد و روش‌ها

این پژوهش به‌منظور بررسی تأثیر سلنات سدیم بر زیست توده تر و خشک اندام هوایی و برخی صفات فیزیولوژیکی شامل فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنل کل، فلاونوئید، فلاوون و فلاونول نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) به‌صورت گلدانی و طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار در سیستم کشت بدون خاک در بستر ماسه در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد اجرا گردید. تیمارهای این آزمایش شامل سطوح مختلف سلنات سدیم در چهار سطح (۰، ۴، ۸، ۱۲ میلی‌گرم در لیتر) در محلول هوگلند انجام شد. در این پژوهش از محلول غذایی هوگلند با اندکی تغییرات تهیه و استفاده شد. برای تهیه محلول غذایی هوگلند، نمک‌های مورد استفاده با توجه به غلظت عناصر در فرمول غذایی ساخته شد که بعد از تنظیم pH و EC، مورد استفاده گیاهان قرار گرفت. برای آماده‌سازی و تهیه بستر کاشت از گلدان‌های ۱۲ کیلوگرمی (با قطر دهانه ۳۰ و ارتفاع ۴۰ سانتی‌متر) حاوی ماسه استفاده شد. قبل از کشت، بستر کاشت در گلدان‌ها چندین‌بار کاملاً با آب مقطر و اسید رقیق شستشو داده شد تا املاح احتمالی شسته شده و بستر کاشت از هر نوع ماده زائد و عناصر سمی عاری گردد. در زیر هر گلدان یک زیرگلدانی برای جمع شدن زه آب قرار داده شد. ریزوم‌های

سالم نعناع فلفلی (۷-۵ سانتی‌متر) در آخر اسفندماه از مزرعه تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. ریزوم‌های جمع‌آوری‌شده برای از بین بردن ذرات خاک چسبیده به آن‌ها با آب شسته شد و پس از آن در هر گلدان پنج ریزوم که دارای جوانه‌های سالمی بودند، در عمق پنج سانتی‌متری بستر کاشت گلدان، کشت شد. گلدان‌ها در گلخانه قرار گرفتند و با آب مقطر کاملاً آبیاری شد. تا پایان آزمایش گلدان‌ها پس از کاشت در گلخانه نگهداری شدند. محلول‌دهی با توجه به مرحله رشدی گیاه و شرایط محیطی (دما و رطوبت) صورت گرفت. برای اجتناب از تجمع عناصر و نمک‌ها در گلدان‌ها هر هفته به‌صورت مرتب یک‌بار بستر کاشت آبشویی شد. اعمال تیمارها تا زمان گلدهی گیاه انجام شد و نمونه‌گیری از گیاه و اندازه‌گیری صفات در مرحله گلدهی انجام شد.

برای اندازه‌گیری زیست توده تر و خشک اندام هوایی، قسمت‌های هوایی بعد از برداشت با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ وزن شد و برای تعیین وزن خشک، نمونه‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس توزین شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی از روش Yang et al. (2011) استفاده گردید. برای اندازه‌گیری فنل کل از روش Gao et al. (2000) و فلاوون از روش Popova et al. (2004) و فلاونوئید از روش Menichini et al. (2009) و فلاونول از روش Yermakov et al. (1987) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های به‌دست آمده از این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار Minitab انجام گردید. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون Bonnferroni در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2017 رسم شدند.

۳. نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر سلنات سدیم بر همه صفات مورد مطالعه در این پژوهش در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱).

جدول ۱: تجزیه واریانس اثر غلظت‌های سلنات سدیم بر زیست توده تر و خشک اندام هوایی و خصوصیات فیزیولوژیکی نعناع فلفلی.

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		زیست توده تر اندام هوایی	زیست توده خشک اندام هوایی	فعالیت آنتی‌اکسیدانی	فنل کل	فلاونوئید	فلاون	فلاونول
تیمار	۳	۶۱/۴۸۵**	۱۵/۹۷۷۵**	۸۷/۱۹۳**	۸۷/۱۹۳**	۸/۶۹۳۱**	۹۸/۹۶۹۹**	۳۵/۵۲۷۱**
خطا	۸	۴/۲۴۹	۰/۸۰۵۰	۴/۹۱۹	۰/۱۷۶۶	۰/۳۵۲۶	۰/۲۸۸۱	۰/۱۵۸۳

**معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد را نشان داد.

۳ـ۱. زیست توده تر و خشک اندام هوایی

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد بیشترین زیست توده تر و خشک اندام هوایی مربوط به تیمار ۴ میلی‌گرم در لیتر سلنات سدیم بود که نسبت به گیاه شاهد به‌ترتیب ۲/۱ و ۹/۶ درصد افزایش داشت. کمترین زیست توده تر و خشک اندام هوایی مربوط به تیمار ۱۲ میلی‌گرم در لیتر سلنات سدیم بود که نسبت به شاهد به‌ترتیب ۷۵/۷ و ۶۳/۵ درصد کاهش داشت (جدول ۲).

۳ـ ۲. صفات فیزیولوژیکی

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها بیانگر آن بود که فعالیت آنتی‌اکسیدانی با افزایش غلظت سلنات سدیم افزایش یافت به‌طوری‌که در تیمار۱۲ میلی‌گرم در لیتر سلنات سدیم بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده شد که نسبت به شاهد ۱۳/۹درصد افزایش یافت (جدول ۲). همچنین نتایج نشان داد که میزان فنل کل برگ تحت تاثیر سلنات سدیم قرار گرفته و در تیمار ۱۲ میلی‌گرم در لیتر سلنات سدیم افزایش معنی‌دار نشان داد. همچنین سلنات سدیم باعث افزایش معنی‌دار فلاوون و فلاونول در نعناع فلفلی شد. براساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها میزان فلاونوئید کل برگ نعناع فلفلی با افزایش غلظت سلنات سدیم افزایش یافت، به‌طوری‌که در تیمار ۱۲ میلی‌گرم در لیتر بیشترین میزان فلاونوئید کل مشاهده گردید که ۳۸/۷ درصد نسبت به شاهد افزایش داشت و کمترین آن در شاهد بود (جدول ۲).

در پژوهش حاضر کاربرد سلنات سدیم باعث افزایش زیست توده تر و خشک اندام هوایی در گیاه نعناع فلفلی در بستر بدون کاشت گردید، به‌طوری‌که در غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش وزن تر اندام هوایی و در غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر باعث کاهش وزن تر اندام هوایی شد. همچنین کمترین زیست توده خشک اندام هوایی در تیمار شاهد دیده شد که با نتایج حاصل از حبیبی و همکاران (۱۳۹۴)، مطابقت دارد (جدول ۲). طبق نظر این محققین کاهش رشد در تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر سلنیوم نشان داد که استفاده از این غلظت در محیط کشت هیدروپونیک برای گیاه بادرنجبویه قابل تحمل نمی‌باشد. همچنین در بررسی توسط Feng et al. (2013) نتایج نشان داد اکثر گیاهان نمی‌توانند، سلنیوم را در مقادیر بالا در خود انباشته کنند. در گیاهان انباشته‌گر، غلظت‌های بالای سلنیوم باعث بروز سمیت و مهار رشد و غلظت‌های پایین سلنیوم باعث تحریک رشد می‌گردد و گیاهان در برابر تنش‌های مختلف زیستی و غیر زیستی مقاوم می‌شود.

جدول ۲: مقایسه میانگین اثر غلظت‌های سلنات سدیم بر زیست توده تر و خشک و خصوصیات فیزیولوژیکی نعناع فلفلی

غلظت‌های سلنات سدیم (mg/L)	زیست توده تر اندام هوایی (g/plant)	زیست توده خشک اندام هوایی (g/plant)	فعالیت آنتی‌اکسیدانی (٪)	فنل کل (mg g^{-1} FW)	فلاونویید (mg g^{-1} FW)	فلاون (mg g^{-1} FW)	فلاونول (mg g^{-1} FW)
شاهد	۳۵/۹۲۳۳^{a}	۱۱/۲۷۶۷^{ab}	۷۰/۶۳^{b}	۳/۱۵۸۵۹^{c}	۹/۳۰۳۶^{b}	۵/۸۷۲۵^{d}	۵/۶۵۴۹^{d}

سلنات ۴	۳۶/۶۹۰۰^{a}	۱۲/۳۶۶۷^{a}	۷۱/۰۹۶^{b}	۴/۰۹۹۸۵^{c}	۱۰/۷۰۳۸^{b}	۱۱/۰۸۵۰^{c}	۶/۸۸۷۷^{c}
سلنات ۸	۳۶/۰۷۶۷^{a}	۹/۱۶۳۳^{bc}	۷۹/۹۰۰^{a}	۶/۱۳۲۱۶^{b}	۱۲/۵۶۹۵^{a}	۱۳/۸۰۷۷^{b}	۱۱/۱۴۷۱^{b}
سلنات ۱۲	۲۷/۲۰۰۰^{b}	۷/۱۶۳۳^{c}	۸۰/۴۸۱۷^{a}	۷/۹۴۹۳۴^{a}	۱۲/۹۶۴۲^{a}	۱۹/۶۶۸۰^{a}	۱۲/۹۰۶۹^{a}

در هر ستون اعداد دارای حروف مشترک به لحاظ آماری با هم تفاوت ندارند.

در این آزمایش با افزایش غلظت سلنیوم فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ نعناع فلفلی به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت. Turlo et al. (2010) گزارش کردند که سلنیوم باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش رادیکال‌های آزاد قارچ می‌شود که با این تحقیق مطابقت دارد. تولید ترکیبات فنلی تحت شرایط تنش‌های مختلف در گیاهان متفاوتی گزارش شده است. این ترکیبات مانند آنتی‌اکسیدان‌های نیرومندی در بافت‌های گیاهی تحت تنش هستند و این ویژگی به‌علت ساختار اسکلتی و گروه فنلی این متابولیت‌هاست. گروه‌های هیدروکسیل آزاد متصل به حلقه آروماتیک توانایی جاروکردن رادیکال‌های آزاد را دارند، به همین دلیل آسیب‌های اکسیداتیو را می‌توانند کاهش دهند و ساختار سلولی را از اثرات منفی تنش حفظ می‌کنند (Al-Amir and Craker, 2007). طی بررسی‌های انجام شده در این تحقیق سلنات سدیم در غلظت ۱۲ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین میزان ترکیبات فنل کل، فلاونوئید، فلاوون و فلاونول را نشان داد که با نتایج به‌دست آمده در مطالعه اثر سلنات سدیم بر روی کاهوی دریایی که باعث تجمع فنل‌ها شده است، در برخی موارد همخوانی دارد (Schiavon et al., 2010). نتایج در یک بررسی که توسط عامریان و همکاران (۱۳۹۳) صورت گرفت، اثر معنی‌داری کاربرد سلنات سدیم بر میزان ترکیبات فنل کل و فلاونوئید را در گیاه پیاز نشان داد که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد.

۴. نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از سلنات سدیم به‌عنوان یک عنصر مفید در گیاه نعناع فلفلی می‌تواند باعث افزایش معنی‌دار صفات مورد بررسی شود، به‌طوری‌که در غلظت کم سلنات سدیم باعث بهبود رشد و در غلظت زیاد باعث سمیت و کاهش رشد می‌گردد. با افزایش غلظت سلنات سدیم (۱۲ میلی‌گرم بر لیتر)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، میزان فنل کل، فلاونوئید، فلاوون و فلاونول افزایش یافت. بنابراین برای تولید این گیاه در سیستم کشت بدون خاک غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر سلنات سدیم توصیه می‌گردد.

منابع

۱- امیدبیگی، ر. ۱۳۸۶ . تولید و فراوری گیاهان دارویی. جلد دوم، انتشارات آستان قدس رضوی،۴۳۸ ص.

۲- حبیبی ق.، قربانزاده پ. و عابدینی م. ۱۳۹۴. تاثیر سلنیوم بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.). پایان‌نامه کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور ایران. جلد۳۲، شماره ۴، ص: ۷۱۵-۶۹۸.

۳- طباطبایی. ج. ۱۳۹۳. اصول تغذیه معدنی گیاهان. چاپ اول، دانشگاه تبریز،۵۶۲ ص.

۴- عامریان م.، دشتی ف. و دلشاد م. ۱۳۹۳. اثر نیتروژن، سلنیوم و نانوسلنیوم بر برخی ویژگی‌های فیتوشیمیایی پیاز (*Allium cepa* L.). پایان نامه دکتری تخصصی، مهندسی کشاورزی در علوم باغبانی و فیزیولوژی و اصلاح سبزیها، دانشگاه بوعلی سینا. مجله فناوری تولیدات گیاهی، جلد۱۴، شماره دوم، ص: ۱۷۹-۱۶۳.

۵- خادمی آستانه، ر.، طباطبایی،ج، بلندنظر، ص.ع. ۱۳۹۶. تأثیر سلنیوم بر روی عملکرد و ویژگی های رویشی کلم تکمه ای کشت شده در هیدروپونیک. نشریه علوم باغبانی،جلد۳۱، شماره اول، ص: ۱۷۹-۱۶۷.

6- Al-Amir H. and Craker L.E. 2007. In-vitro selection for stress tolerant spearmint. Issues in New Grops and New Uses, pp 306-310.
7- Feng R., Weic C. and Tu S. 2013. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. Environmental and Experimental Botany, 87: 58-68.
8- Gao X., Ohlander M., Jeppsson N., Bjrk L. and Trajkovski V. 2000. Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(5): 1485-1490.
9- Labanowska M., Filek M., Ko´scielniak J., Kurdziel M., Kuli´s E. and Hartikainen, H. 2012. The effects of short-term selenium stress on Polish and Finnish wheat seedlings, enzymatic and fluorescence studies. Journal of Plant Physiology, 169: 275-284.
10- Menichini F., Tundis R., Bonesi M., Loizzo M.R., Conforti F., Statti G. and Menichini, F. 2009. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. Food Chemistry, 114(2): 553-560.
11- Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A.G., Marcazzan, G.L. and Bogdanov, S. 2004. Validated methods for the quantification of biologically
12- Schiavon M., Moro I., Pilon-Smits E.A.H., Matozzo V., Malagoli M. and Vecchia, F.D. 2010. Accumulation of selenium in *Ulva* sp. and effects on morphology, ultrastructure and antioxidant enzymes and metabolites. Aquatic Toxicology, 122-123: 222-231.
13- Turło J., Gutkowska B. and Herold F. 2010. Effect of selenium enrichment on antioxidant activities and chemical composition of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. mycelial extracts. Food and Chemical Toxicology, 48: 1085-1091.
14- Valente J.S.S., Fonseca A.O.S., Denardi L.B., Dal Ben V.S., Filho F.S.M., Baptista C.T., Braga C.Q., Zambrano C.G., Alves S.H., Botton S.A. and Pereira, D.I.B. 2016. In vitro susceptibility of *Pythium insidiosum* to *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* and *Origanum vulgare* essential oils combinations. Mycopathologia, 181(7-8): 617-22.
15- Yang H., Yuqiong D., Huijing D., Haiming S., Yunhua P. and Xiaobo, L. 2011. Antioxidant compounds from Propolis collected in Anhui, China. Molecules, 16: 3444-3455.
16- Yermakov A.l., Arasimov V.V. and Yarosh, N.P. 1987. Methods of Biochemical Analysis of Plants. Agropromizdat. Leningrad. pp. 122-142 .

Biodiversity as a treasure trove of natural and human heritage

(Initial and basic questions in the field of biological and social research)

Mahmood Maham[1417], Mahnaz Ghobadi[2]

1 -Assistant Professor of Islamic Revolution Studies Group, Research Institute of Culture and Social Studies, Research Institute of Islamic Culture and Thought

2- Graduate of Sociology, Department of Sociology, Al-Zahra University

[1] Corresponding Author. Email address: maham812002@yahoo.com

Abstract

The main idea of this article is based on the connection between natural and human fields in the analysis of biodiversity issues and its research. Hence, how to rethink biodiversity based on the interconnectedness of complex levels and layers of biology, physiology, and ecology is an issue and a challenge. If we consider biodiversity as a treasure trove of natural and human heritage, the relationships of the aforementioned layers will be observed and understood over time. The entanglement of natural and human heritages involves a variety of changes and interventions that represent internships and human performance in a range of "cultural and technological" relationships throughout history. Accordingly, how to rethink biodiversity over time and conserve it and foreshadow the process of change, is presented in the main question of the article: How can the place of human issues and social studies in biological sciences research be identified and culturally and technologically retrieved? What is the relationship between the human dimension of ecology from a research perspective and its natural dimension, as well as with other layers? In other words, what are the barriers and challenges of the relationship between the biological and human domains from a research perspective, and how can we succeed in rethinking biodiversity as a natural and human heritage and looking forward to it? To answer the main question, descriptive-analytical-critical method and combined approach of deep ecological landscapes and land use were used. It seems that by rearranging and moving from single-discipline to interdisciplinary and interdisciplinary activities to overcome the existing knowledge gap between the natural and human domains, On the one hand, and considering the correlation of "culture-ecosystem-technology (native and new)" on the other hand, it is possible to organize scientific collaborations with the focus on the ecosystem and the goal of sustainable development. Land- plant as a field of sustainable habitats and diversity in settlement and settlement in collective life in the form of land management, a major chapter for the macro linkage of scientific fields (social sciences and humanities, technical-engineering, and medical and veterinary sciences) is. Obviously, the process of scientific rehabilitation and the revitalization of bio-social literacy, in order to move towards sustainable progress, must be completed in a dynamic

network of other fundamental topics and constantly improved and upgraded. This is suggested in this article as "Culture-Ecology-Technology".

Keywords: Geological heritage, Plant diversity, Biosocial literacy, Biological complexes, Spatial planning

تنوع زیستی به مثابه گنجینه مواریث طبیعی و انسانی

(طرح پرسش‌های اولیه و بنیادین در حوزه پژوهش‌های زیستی و اجتماعی)

محمود مهام[418]، مهناز قبادی

۱- استادیار گروه مطالعات انقلاب اسلامی، پژوهشکده فرهنگ و مطالعات اجتماعی، پژوهشگاه فرهنگ و اندیشه اسلامی
دانش آموخته کارشناسی ارشد جامعه‌شناسی، گروه جامعه‌شناسی، دانشگاه الزهرا

Corresponding Author. Email address :maham812002@yahoo.com

چکیده

ایده اصلی این مقاله بر پیوند حوزه‌های طبیعی و انسانی در تحلیل مسائل تنوع زیستی و پژوهش‌های آن، استوار است. از این‌رو، چگونگی بازاندیشی تنوع زیستی بر مبنای پیوستگی و یکپارچگی سطوح و لایه‌های در هم پیچیده‌ی بیولوژی، فیزیولوژی و اکولوژی به عنوان یک مساله و چالش مطرح می‌شود. چنانچه تنوع زیستی را به مثابه گنجینه مواریث طبیعی و انسانی در نظر بگیریم، روابط لایه‌های پیش‌گفته، در طول زمان، مشاهده و درک خواهند شد. در هم تنیدگی مواریث طبیعی و انسانی، تنوعی از تغییرات و مداخلات را در بر دارد که کارورزی و عملکرد بشر را در طیفی از انواعِ روابط «فرهنگ و فناوری» در طول تاریخ به نمایش می‌گذارد. بر این اساس، چگونگی بازاندیشی تنوع زیستی در طول زمان و حفاظت از آن و آینده‌نگری روند تغییرات، بدین‌صورت در پرسش اصلی مقاله آورده شده است: جایگاه مباحث انسانی و مطالعات اجتماعی در پژوهش‌های علوم زیستی چگونه قابل شناسایی و بازیابیِ فرهنگی و فناورانه است؟ ارتباط بُعد انسانی اکولوژی از منظر پژوهشی با بُعد طبیعی آن و هم‌چنین، با سایر لایه‌ها چگونه است؟ به بیان دیگر، موانع و چالش‌های ارتباط حوزه‌های زیستی و انسانی از منظر پژوهشی کدامند و چگونه می‌توان موفق به بازاندیشی تنوع زیستی به مثابه مواریث طبیعی و انسانی و آینده‌نگری درباره آن شد؟ برای پاسخ‌گویی به پرسش اصلی از روش توصیفی-تحلیلی-انتقادی و رویکرد تلفیقی از مناظر اکولوژی عمیق و آمایش سرزمین استفاده شد. به نظر می‌رسد با بازآرایی و عبور از تک-حوزه‌رشته‌ها به سوی فعالیت‌های بین‌رشته‌ای و فرارشته‌ای برای غلبه بر گسست دانشی موجود میان حوزه‌های طبیعی و انسانی، از یک‌سو و توجه به هم‌بست «فرهنگ-زیست‌بوم-فناوری(بومی و نو)» از سوی دیگر، بتوان هم‌کاری‌های علمی را با محوریت زیست‌بوم و هدف‌گذاریِ پیشرفت پایدار، سامان داد. زمین-گیاه به مثابه بستر زیست‌های پایدار و تنوع استقرار و اسکان در زیست جمعی در قالب آمایش سرزمین، سرفصلی کلان برای پیوندشناسی کلان‌حوزه‌های علمی(علوم اجتماعی و انسانی، فنی-مهندسی، و علوم پزشکی و دام‌پزشکی) می‌باشد. بدیهی است روند بازتوانی علمی و احیاء سواد زیستی-اجتماعی برای حرکت به سویِ پیشرفت پایدار، می‌بایستی در شبکه‌ای پویا از دیگر سرفصل‌های بنیادین، تکمیل شود و مستمراً اصلاح و ارتقاء یابد. امری که در این مقاله با عنوان «هم‌بست فرهنگ-زیست‌بوم-فناوری» پیشنهاد شده است.

واژگان کلیدی: میراث زمین‌شناسی، تنوع گیاهی، سواد زیستی-اجتماعی، مجتمع‌های زیستی، آمایش سرزمین

۱.مقدمه

وقتی ارتباط «زمین» با «زندگی» واکاوی می‌شود و علوم زمین و جامعه مورد مطالعه قرار می‌گیرند با تنوع‌های مختلفی روبرو می‌شویم: تنوع زمینی[۴۱۹]، تنوع در استقرار و تحرک و اسکان، تنوع زیست جمعی و مجتمع‌های زیستی. در فلات مرتفع ایران که سرزمینی با انواعی از تنوع‌های طبیعی و انسانی است، سه الگوی زیست جمعی داشته‌ایم که در قالب سه شیوه زیست عشایری، روستایی و شهری پدیدار گشته‌اند. سوال این است که دامنه «زیست» از منظر پژوهشی تا کجا و چگونه است؟ محوریتِ «زیست» در حوزه‌های بیولوژی و فیزیولوژی و اکولوژی، چگونه در رشته‌های علمی و پیوند و هم‌کارهای علمی و فناورانه آن‌ها نمایان می‌گردد؟ مثلا، وقتی در ریاضیات زیستی[۴۲۰] میان یک پزشک با ریاضی‌دان[۴۲۱] برای مقابله با بیماری سرطان در یک بیمار، گفت‌وگو و هم‌کاری علمی صورت می‌گیرد، جایگاه حوزه اکولوژی چگونه دیده می‌شود؟ مساله سرطان که صورت مساله مشترک در هم‌کاری یاد شده است، فاقد بُعد انسانی است یا در مساله‌شناسی سرطان نمی‌تواند کمک نماید؟ ریاضیات زیستی چگونه تعاملات حوزه‌های زیستی در سطوح و لایه‌های در هم پیچیده‌ی بیولوژی، فیزیولوژی و اکولوژی را هضم و مطالعه می‌نماید؟ محققان حوزه‌های زیستی چگونه یکدیگر را می‌شناسند و با یکدیگر هم‌کاری علمی می‌نمایند؟ مثلاً وقتی محققان علوم زیستی در مورد فون و فلور یک منطقه به مطالعه می‌پردازند، اگر فرض نماییم که پژوهش آن‌ها به‌صورت پیوسته و در کنار یکدیگر انجام می‌شود، این پرسش مطرح می‌گردد که حضور انسان‌ها و فعالیت‌های جوامع انسانی را در فضای منطقه مورد بررسی، چگونه در نظر می‌گیرند و این ارتباط، چگونه شناسایی، پردازش و تحلیل می‌گردد؟ الگوهای زیستیِ زیست‌مندان گذشته‌های دور و باستانی در قالب سازه‌ها و فناوری‌ها و مجتمع‌های زیستی، چه درس‌هایی برای امروز و آینده دارند؟ دانش و فناوری‌های بومی بیانگر چه الگویی میان فرهنگ و زیست‌بوم و فناوری هستند؟ با توجه به این قبیل پرسش‌ها و چالش‌های دانشی از یک‌سو و وفور تنوع طبیعی و انسانی در سرزمین ایران از سوی دیگر، اگر تنوع زیستی را به مثابه گنجینه مواریث طبیعی و انسانی در نظر بگیریم، آن‌گاه این پرسش مطرح می‌شود که: جایگاه مباحث انسانی و مطالعات اجتماعی در پژوهش‌های علوم زیستی، چگونه قابل شناسایی و بازیابیِ فرهنگی و فناورانه‌اند؟ ارتباط بُعد انسانی اکولوژی از منظر پژوهشی با بُعد طبیعی آن و هم‌چنین، با سایر لایه‌ها چگونه است؟ به بیان دیگر، موانع و چالش‌های ارتباط حوزه‌های زیستی و انسانی از منظر پژوهشی کدامند و چگونه می‌توان موفق به بازاندیشی تنوع زیستی به مثابه مواریث طبیعی و انسانی و آینده‌نگری درباره آن شد؟ناکامی‌های مکرر در برنامه‌های توسعه به مثابه صورت مساله‌ای انسانی، تخریب‌های گسترده و ژرفی را حوزه‌های زیستی به دنبال داشته است. خسارت‌های اقتصادی و ناامیدی از دستیابی به بهبود زندگی در آینده، مباحث انتقادی و جدیدی را با عنوان «توسعه پایدار» مطرح ساخته است. پیشینه‌شناسی مباحث انتقادی منجر به توسعه پایدار و سوابق شکست‌شناسی توسعه، نشان می‌دهند بیگانگی با محیط و زیست‌بوم از یک‌سو و ضعف درک اکوسیستمیِ حوزه‌های زیستی(اعم از طبیعی و انسانی) از سوی دیگر، صورت مساله تنوع زیستی را از واقعیت یکپارچگیِ حوزه‌های طبیعی و انسانی خارج کرده است. بدین ترتیب، مطالعات تک‌حوزه-

---

۴۱۹ Geodiversity
۴۲۰ Biomathematic
۴۲۱ - گفتنی است «رابطه رياضي و زيست شناسي در سده بيست و يكم وارد مرحله بسيار متفاوتي شده است»(رکنی لموکی،۱۳۹۶: ۲۰).

رشته به صورت‌بندی‌های ناقص از روند تغییرات طبیعی و انسانی و اندر کنش میان آن‌ها منجر شده است که تاثیری نامطلوب بر آینده‌نگری مسائل توسعه پایدار بر جای می‌گذارد. کوشش‌های جهانی قابل توجه‌اند امّا ناپیوستگی حوزه‌های مطالعاتی و تحقیقاتی را نباید نادیده گرفت: شکاف در هم‌بستِ «فرهنگ-زیست‌بوم-فناوری».

مروری سریع بر این فعالیت‌ها نشان دهنده این واقعیت هستند:

تشکیل اتحادیه بین‌المللی حفاظت از طبیعت و منابع طبیعی؛ اتحادیه جهانی حفاظت(IUCN)(۱۹۴۸م/۱۳۲۷شمسی)، کنفرانس محیط زیست انسانی(۱۹۷۲م/۱۳۵۱شمسی)، گزارش محدودیت‌های رشد(۱۹۷۲م/۱۳۵۱شمسی)، منشور اروپایی خاک(۱۹۷۲م/۱۳۵۱شمسی؛ بازبینی شده در ۲۰۰۳م/۱۳۸۲شمسی)، اولین همایش اسلام و محیط زیست(۱۳۷۸شمسی)، برنامه زیست‌کره(۱۹۷۸م/۱۳۵۷شمسی)، منشور جهانی خاک(۱۹۸۰م/۱۳۵۸شمسی)، گزارش برانت‌لند(۱۹۸۷م/۱۳۶۶شمسی)، تشکیل هیات بین‌المللی تغییر اقلیم(۱۹۸۷م/۱۳۶۶شمسی)، تاسیس مرکز اقتصاد و محیط زیست لندن(۱۹۸۸م/۱۳۶۷)، اعلامیه‌ی ونکوور(۱۹۸۹ م/۱۳۶۸شمسی)، طراحی شاخص‌های توسعه انسانی(۱۹۹۰م/۱۳۶۹شمسی)، کنفرانس سران زمین(۱۳۷۱/۱۹۹۲شمسی)، کنوانسیون تنوع زیستی(۱۹۹۳م/۱۳۷۲شمسی)، کنفرانس جمعیت و توسعه(۱۹۹۴م/۱۳۷۳شمسی)، اجلاس کپنهاگ(۱۹۹۵م/۱۳۷۴شمسی)، کنفرانس ورزش و محیط زیست(۱۹۹۵م/۱۳۷۴شمسی)، کنوانسیون آرهوس(۱۹۹۸م/۱۳۷۷شمسی)، اهداف توسعه هزاره(۲۰۰۰م/۱۳۷۹شمسی)، معاهده بین‌المللی در خصوص منابع ژنتیکی گیاهی برای غذا و کشاورزی(۲۰۰۱م/۱۳۸۰شمسی)، اجلاس ریو+۱۰(۲۰۰۲م/۱۳۸۱شمسی)، حسابداری سبز(۲۰۰۵م/۱۳۸۵شمسی)، کنوانسیون تنوع فرهنگی(۲۰۰۵م/۱۳۸۵شمسی)، برنامه ملّی جنگل(۲۰۰۷م/۱۳۸۷شمسی)، ریو+۲۰(۲۰۱۲م/۱۳۹۱شمسی)، توافق-نامه پاریس(۲۰۱۵م/۱۳۹۴شمسی).

این‌همه تلاش‌های جهانی که آخرینشان سند توسعه پایدار ۲۰۳۰ می‌باشد، نیازمند پشتوانه‌های قوی و مستمر پژوهشی از مقیاس‌های خُرد و محلی تا مقیاس‌های وسیع و فوق وسیع‌اند تا بتوانند تنوع زیستی را که در معرض تهدیدهای گوناگون قرار گرفته است، واقعاً بازشناسی و حفاظت نمایند. روند رو به رشد مباحث اکولوژی در نیمه دوم قرن بیستم میلادی قابل توجه‌اند. نکته‌ای که در این مقاله بر آن تاکید می‌شود، ضعف پژوهشی در مباحث تنوع زیستی، به‌واسطه گسست دانشی موجود میان حوزه‌های زیستی و انسانی می‌باشد. پرسش از جایگاه فرهنگ در تحلیل‌های زیستی و نسبت‌شناسیِ «زیست و فرهنگ»، سوالی غریب و صورت مساله‌ای است که کمتر مورد توجه جدی قرار می‌گیرد. به بیان دیگر، سامانه‌های زیستی در سرزمین، در حوزه‌های طبیعی و انسانی دچار گسست شده‌اند که ریشه آن را می‌بایستی در جدایی دانشی این حوزه‌ها از یکدیگر دانست. پیشینه آمایش سرزمین و مرور سوابق سامانه‌ها و سازه‌های زیستی در فلات مرتفع ایران که در دانش‌ها و فناوری‌های بومی متبلور هستند، نشان‌دهنده‌ی یکپارچگی زیستی و لذا پیوستگی لایه‌های تنوع زیستی می‌باشد. بازیابی تنوع زیستی(اعم از الگوشناسی، حفاظت و آینده‌نگری)، نیازمند تغییر الگوها و تعاملات و هم‌کاری‌های پژوهشی است به نحوی که الگوهای فردی تحقیق و تمرکز بر تک-حوزه‌رشته‌ها به سوی کارهای تیمی در قالبِ تحقیقات بین‌رشته‌ای و فرارشته‌ای ناظر بر مساله معین در زیست‌بوم، تغییر یابند.

۱-۱-پیامد شکاف دانشی بر مطالعات پژوهشی

بر اساس آن‌چه گفته شد، شکاف دانشی بر مطالعات پژوهشی در حوزه‌های طبیعی و انسانی سایه افکنده است که مانعی جدی در پیشرفت پژوهش‌های علوم زیستی و اجتماعی محسوب می‌شود. برای توضیح بهتر این شکاف، چند نمونه صرفاً به عنوان مثال‌هایی روشنگر ذکر می‌شوند تا زمینه بحث بیشتر در پژوهش‌های زیستی(اعم از حوزه‌های طبیعی و انسانی) فراهم آید.

نمونه اول، در کنوانسیون تنوع زیستی تاکید شده است: اهداف مدیریت زمین، آب و منابع زنده یک انتخاب اجتماعی هستند. از این‌رو، باید پرسید روابطِ منابع زنده و طبیعی با «انتخاب اجتماعی»، چگونه در پژوهش‌های علوم زیستی و علوم اجتماعی مطالعه می‌شوند؟ تولید داده، مستندسازی و پردازش و تحلیل آن‌ها به‌صورت ترکیبی، چگونه انجام می‌شود؟ نقش «فرهنگ» به مثابه نرم‌افزارِ مشاهده پدیده، فهم مساله و رویکرد حل مساله، در نظر گرفته شده است؟ زیست‌بوم به عنوانِ منبع مولد داده‌های متنوع که ورودی سیستم دانشی-پژوهشی را تدارک می‌نماید و هم‌چنین به مثابه بسترِ پذیرایِ نتایج تحقیقات و پژوهش‌های زیستی و اجتماعی، که بازخورد سنجی را امکان‌پذیر می‌سازد، تا چه اندازه به مثابه یک پیکره و بافت یکپارچه مورد مطالعه قرار می‌گیرد؟ فناوری‌های بومی و نو که نمایانگر بُعد سخت فرهنگ و شکلِ ابزاریِ آن، محسوب می‌شوند و کالبدسازی می‌نمایند، چگونه توازن طبیعی و انسانی را برقرار می‌نمایند؟ ضرورت آگاهی از تاریخ تحول محیطی چگونه در الگوهای تحقیقاتی و شبکه همکاری‌های علمی و فناورانه، پیگیری و عملیاتی می‌شود تا پیوند پژوهش‌های زیستی و اجتماعی را برقرار سازد؟ به عنوان مثال، هر چند «کوهستان‌ها از جمله سیستم‌های انسان- طبیعت هستند که دارای هویت در ابعاد اکولوژیک، اقتصادی و اجتماعی می‌باشند»(ایرانی بهبهانی،۱۳۸۶: ۱۰۹) امّا در دستور کار ۲۱ اعلام شد: دانش چندانی درباره اکوسیستم‌های کوهستانی در دست نیست(دستور کار ۲۱، ۱۳۷۷: ۱۶۴). «کوهستان‌ها تا گذشته نه چندان دوری به عنوان عوارض جغرافیایی مزاحم(سد کننده راه، محل اختفاء اشرار، و محلی خطرناک) و فاقد امکانات زیست، تولید و توسعه شناخته می‌شدند. پس از درک اهمیت کوهستان(خدمات، کالا و ارزش‌های اکولوژیک و زیست‌محیطی که برای اهالی دشت‌ها مهیا می‌نماید) و نیز تخریب شدید محیط زیست کوهستان که به شیوه‌های غلط و بهره‌برداری گردید، موضوع برنامه‌ریزی و حمایت از محیط زیست کوهستانی مورد توجه قرار گرفت»(یاوری،۱۳۸۱ :۸۷) و حتی در مباحث زیست‌درمانی[۴۲۲و۴۲۳] و ژئومورفولوژی پزشکی، «کوه‌درمانی»(احمدی،۱۳۹۶: ۱۱۴ و ۲۱۹) مطرح گردیده است.

---

٤٢٢ Biotherapy

۴۲۳ - طبق تعریف انجمن بین‌المللی بیوتراپی عبارت از: استفاده از موجودات زنده در معالجه و تشخیص بیماری‌های انسان است. اگرچه طب مدرن غربی در عمل پزشکی روزمره، معمولاً درک کمی از موجودات زنده دارد، امّا در بسیاری از روش‌های زیست‌درمانی یک سنت دیرینه وجود دارد. این حجم کاوش خاطره‌انگیز در تاریخ ، مبانی علمی و کاربرد عملی موجودات زنده در پزشکی است(Grassberger,2013). یک نمونه آن، هیپوتراپی و درمان به کمک اسب می‌باشد. در واقع، «یک روش فیزیوتراپی بر اساس فیزیولوژی عصبی است و به بهره‌گیری از حرکت اسب به عنوان ابزاری درمانی برای بهبود عملکرد سیستم عصبی-عضلانی گفته می‌شود. هیپوتراپی نوعی مداخله پزشکی است که کارشناسان طب فیزیکی، کار درمانی و آسیب‌شناسان گفتار و زبان که اصول هیپوتراپی را آموزش دیده باشند، آن را اجرا یا بر آن نظارت می‌کنند»(عرشی،۱۳۹۵: ۴ و ۶۱). هم‌نشینی و بهره‌مندی از اسب، همواره در زیست عشایری وجود داشته است و فواید این شیوه زیستن برای عشایر، رازهایی در خود دارد که زیست‌درمانی‌های جدید آن‌ها را رمزگشایی می‌کنند.

از این‌رو، بی‌توجهی و نادیده‌انگاری این پیوستگی و بافت، هر گونه مداخله‌ای را بی‌ثمر و بلکه مخرّب می‌سازد و مانع هم‌کاری و پیشرفت پایدار خواهد بود. باید افزود که ضعف در شناسایی کوه و کوهستان به مثابه اکوسیستم طبیعی و انسانی، ریشه در غفلت از دانش بومی عشایر و ویژگی‌های زیست ایلی-عشایری به مثابه یک نوع از الگوهای زیست جمعی در ایران(تنوع زیست جمعی) دارد.

نمونه دوم، معرفی جغرافیای گیاهی می‌باشد: «جغرافیای گیاهی، یکی از علوم زیستی است. جغرافی‌دان گیاهی باید اطلاعات زیست-شناختی به‌ویژه از رفتار فیزیولوژیکی و رشد و نمو و مکانیسم‌های تکثیر گیاهان داشته باشد. این علم با زمین‌شناسی، اقلیم‌شناسی، رسوب‌شناسی، ژئومورفولوژی، گیاه‌شناسی، فیزیولوژی گیاهی، اکولوژی و ژنتیک رابطه‌ای نزدیک دارد. از آن‌جا که گیاهان مانند جانوران تحرک ندارند و زیستگاه مشخص‌تری دارند، مطالعه آن‌ها آسان‌تر است. بخش اصلی جغرافیای زیستی را جغرافیای گیاهی تشکیل داده است»(قربانلی،۱۳۸۱: ۱). با این معرفی، چند پرسش جدی مطرح می‌شود: جغرافیا، در زیر مجموعه علوم اجتماعی، شناسایی و طبقه‌بندی شده است. بنابراین، جغرافیای گیاهی زیرمجموعه علوم اجتماعی محسوب می‌گردد، امّا در این معرفی، یکی از علوم زیستی است. پس باید پرسید نسبت علوم زیستی با علوم اجتماعی چگونه است؟ اگر علوم اجتماعی متمرکز بر زیست انسانی و تغییراتِ مجتمع‌های زیستی می‌باشد، نقش گیاهان در مطالعات اجتماعی چگونه دیده شده است؟ و چرا مباحث زیستی-در معنای رایج آن- در علوم اجتماعی در ایران بحث نمی‌شوند، هم‌چنان‌که مباحث اجتماع انسانی در علوم زیستی؛ مثلاً جغرافیای گیاهی، فاقد سرفصل پژوهشی است و بحث از اکوسیستم و اکولوژی نیز فراتر از مباحث طبیعی نمی‌رود؟ نکته مهم‌تر این‌که جغرافیا دو زیرشاخه دارد: طبیعی و انسانی. با این وجود، این تقسیم‌بندی موجب تجمیع مباحث طبیعی و انسانی در محوری روشن مانند آمایش سرزمین نشده است و جغرافیا در مجموعه علوم اجتماعی در ایران فاقد اعتبار در مقایسه با برخی دیگر از رشته‌ها می‌باشد. این وضعیت در مقایسه با رشته‌های زیستی برتر نظیر علوم پزشکی هم وجود دارد. حتی پیوندهای مشخص و مهمی چون جغرافیای پزشکی[۴۲۴] نیز به کلی در یک حالت بلاتکلیفی به سر می‌برند. شاید به این علت که جغرافیا به «زمین» و تغییرات سطحی آن- در مطالعات ژئوموفولوژی- توجه دارد در حالی‌که، نه «زمین» و نه تغییرات ژئومورفولوژی در مطالعات اجتماعی، جایگاهی ندارند، حتی وقتی که مساله به انسان و جوامع انسانی برگردد، نظیرِ زمین‌شناسی پزشکی[۴۲۵]. گسست زمین از مباحث زیستی و انسانی مانعی در پیشرفت پژوهش‌های مربوطه است.

«به این ترتیب، علم جغرافیای گیاهی با وجود سابقه تاریخی در دنیا و به‌خصوص در جوامع در حال پیشرفت مثل ایران، نه تنها پیشرفت زیادی نداشته است، بلکه در بسیاری از محافل علمی هنوز کاملاً شناخته نیست، و با آن‌که جغرافیای گیاهی اساس شناخت منابع طبیعی در مجموعه‌های اکولوژی است، بسیاری از متخصصان مسائل بوم‌شناختی نیز نقش انکارناپذیر علم جغرافیای گیاهی را در برنامه‌ریزی‌های توسعه اقتصادی و در شناخت اکوسیستم‌ها و محیط‌های زیستی از نظر دور داشته‌اند»(قربانلی،۱۳۸۱: ۳). با درک «نقش پایه‌ای که گیاهان در شکل‌گیری اکوسیستم‌های طبیعی دارند»(جم‌زاد،۱۳۸۷: ۳) و نگاهی به گذشته که تصویرگر تمدن کشاورزی در این سرزمین است، این پرسش مطرح می‌شود که بین‌رشته‌ای‌های مرتبط نظیر مردم‌شناسی گیاهی، دیرین‌گیاه‌شناسی،

۴۲۴ - سوابق تحقیقاتی و آموزشی جغرافیای پزشکی قابل توجه‌اند که شرح آن نیازمند فرصت دیگری است.

۴۲۵ - بررسی پیشینه پژوهش‌ها و اقدامات زمین‌شناسی پزشکی نیازمند فرصت دیگری می‌باشد.

دیرین‌قوم‌گیاه‌شناسی، جامعه‌شناسی گیاهی در پژوهش‌های زیستی و اجتماعی چه نقش مشترک و مرکبی در تعاملات علمی و شبکه‌های همکاری فناورانه با هدف الگوشناسی، روندیابی، حفاظت و آینده‌نگریِ تنوع زیستی به مثابه گنجینه مواریث طبیعی و انسانی ایفا می‌نمایند؟ «نقش‌آفرینی فوق‌العاده گیاهان در تعامل با زمین و ایجادِ شکل کنونی زمین و تغییرات آن، قابل تامل است»[۴۲۶]. امروزه با استفاده از رشته‌های مختلف به‌صورت ترکیبی، این گستره به عنوان یک حوزه یکپارچه مطالعاتی، در نظر گرفته می‌شود. مطالعات ژئوبوتانی[۴۲۷]، به عنوانِ «ادغام کننده فرایندهای فیزیکی و بیولوژیکی در نظر گرفته می‌شوند»(Ustin,1997:7) و تحقیقات اتنوبوتانی[۴۲۸] یا «قوم‌گیاه‌شناسی، در کنار دیرین‌گیاه‌شناسی[۴۲۹] و دیرین‌قوم‌گیاه‌شناس[۴۳۰]»(علی‌زاده، ۱۳۸۰: ۷۸) روند رو به گسترشی یافته‌اند. این فعالیت‌ها، دانش و فناوری‌های بومی را آشکار می‌سازند که برای فناوری‌های آینده و پیشرفت پایدار که توازن طبیعی و انسانی را نیاز دارد، بسیار ذی‌قیمت هستند.

پس از آن نوبت به مباحثی چون ژنتیک گیاهی و جانوری باستان(ترکیبی از مطالعات مهندسی، زیستی و اجتماعی)، کاوشِ اسپرو پولن[۴۳۱]، مطالعاتِ «عصب‌شناسی گیاهی»(Minorsky,2020:2) و گل‌خوشناسی می‌رسد که «صرفاً رفتارشناسی گیاهان و روان‌شناسی گیاهی است، آن‌گونه که واقعاً بوده و یا در فضای فرهنگی تصور می‌شده است. به عبارت دیگر، گل‌خوشناسی از منظر گیاه‌مردم-شناسی»(فرهادی،۱۳۹۲: ۱۱ و ۱۳). البته لازم است پیش از این گام بلند، مشخص شود که باستان‌شناسی در حوزه علوم زیستی است یا فنی-مهندسی یا علوم اجتماعی و انسانی؟ آن‌چه روشن است باستان‌شناسی در حوزه مطالعات اجتماعی بسیار مهجور و ناشناخته است. با این اوصاف، پژوهش‌های فعلی نخواهند توانست ابعاد مسائل زیستی را آشکار سازند.

نمونه سوم، مفهوم‌سازی عمیق اجتماعی مبتنی بر مشاهدات میدانی بلند مدت و مستندسازی شواهد تاریخی و باستانی از شیوه‌های زیست جمعی در ایران با کلیدواژه «یاریگری» می‌باشد: «یاریگری، اصطلاحی بین‌رشته‌ای در علوم اجتماعی و زیستی است»(فرهادی،۱۳۸۸: ۲۸۰). از آن‌جایی که کلان‌مفهومِ یاریگری از پردازش داده‌ها و اطلاعات بوم‌شناختی در حوزه انسانی از یک‌سو و اندرکنشِ حوزه‌های انسانی و طبیعی در شکل‌گیری مجتمع‌های زیستی، شیوه‌های زیست جمعی و فناوری‌های گوناگون بومی-نظیر سازه‌های متنوعی که سیمای فرهنگی سرزمین را رقم زده‌اند، از سوی دیگر، به‌دست آمده است، این پرسش مطرح می‌شود که مفاهیم مشابه در پژوهش‌های زیستی کدامند تا مباحث اکولوژیک محدود به حوزه طبیعی نمانند و بُعد انسانی را نیز در بر گیرند. هر چند در پژوهش‌های زیستی در مورد انسان نظیر فعالیت‌های آموزشی-تحقیقاتی در دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران،

---

۴۲۶ - برای کسب اطلاعات بیشتر بنگرید به: Gense,2001:3

۴۲۷ - Geobotany

۴۲۸ - Ethnobotany

۴۲۹ - Paleobotany

۴۳۰ - Paleoethnobotanist

۴۳۱ - یکی از زیرشاخه‌های میکروپالئونتولوژی(Micropaleontology)، فسیل‌شناسی گیاهان میکروسکوپی است. مانند مطالعه اسپورها و پولن(هاشمی‌یزدی،۱۳۹۹: ۱، سایت سازمان جنگل‌ها، ۶ تیرماه، دیرینه‌شناسی، https://www.ucl.ac.uk/GeolSci/micropal/spore.html). گیاهان فسیلی و اسپورها و گرده‌های آن‌ها به‌طور گسترده‌ای در زیست‌چینه‌نگاری(biostratigraphy) مورد استفاده قرار می‌گیرند و داده‌های مهمی را برای تعیین میزان و وسعت وقایع اقلیمی در زمان طولانی ارائه می‌دهند(Slater,2018:3). اسپورها و گرده‌ها از نظر گیاه‌شناسی برای ارزیابی تغییرات وسیع پوشش گیاهی، گروه‌بندی شدند(Peng,2018:15).

گروه اکولوژی انسانی وجود دارد امّا پیوند آن با سایر حوزه‌های زیستی نظیر زیست گیاهی و چگونگی پیوندهای انسانی آن برای ارتقاء پژوهش‌های زیستی روشن نیست. در سال گذشته(۱۳۹۹/۵/۲۵) اولین دانش آموخته گروه اکولوژی انسانی در مقطع کارشناسی ارشد(ستاره احمدیان یزدی) از پایان نامه خود با عنوانِ بررسی ارتباط شاخص‌های سرمایه اجتماعی با نگرش زیست‌محیطی در شهر مشهد، دفاع کرد(سایت دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی، ۱۳۹۹/۱۲/۲۹).

باید افزود که مفاهیم زیست‌ژئوموفولوژی[۴۳۲]؛ «روابط پیچیده و دو طرفه بین سیستم‌های بیولوژیکی، اکولوژیکی و ژئومورفولوژیکی را در طیف وسیعی از مقیاس‌های فضایی و زمانی مورد توجه قرار می‌دهد»(Viels,2019:5) و ژئواکودینامیک[۴۳۳]؛ «تلاش برای درک هر چه بهتر شکل زمین و رمزگشایی از پویایی آن و کاربست مفاهیم و دانش مربوط به زمین و علوم زیستی در یک ترکیب بین‌رشته‌ای»[۴۳۴](COTTERILL,2011:489,502)، می‌باشد و مجموعاً تلاش‌های نظری-عملی برای فهم عوامل و فرایندهای زیستی در ابعاد گوناگونش است. اجرای پروژه‌هایِ زمان‌بر و دشواری چون پروژه بیوژنوم زمین[۴۳۵] با هدف تعیین «استانداردهای تجزیه و تحلیل[۴۳۶]» برای توالی، فهرست‌بندی و مشخص کردن ژنوم‌های همه تنوع زیستی یوکاریوتی[۴۳۷] زمین در طول یک دوره ده ساله(https://www.earthbiogenome.org,2021/) در همین راستا است.

نمونه چهارم، توجه به امنیت غذایی به عنوان ضرورتی حیاتی برای بقاء جامعه است. طبیعتاً امنیت بحثی اجتماعی است و غذا در حوزه مباحث طبیعی قرار می‌گیرد. «گیاهان برای مردم[۴۳۸] و حیوانات[۴۳۹]، هم غذا و هم دارو[۴۴۰] هستند»(Heinrich,1998:25). از منظر غذایی، ضرورت تلاش برای بازیابی گیاهان فراموش شده جهت بهبود کیفیت و تنوع غذایی، این پرسش را مطرح کرده است:

---

۴۳۲ - Biogeomorphology
۴۳۳ - Geoecodynamics
۴۳۴ - Cross-disciplinary
۴۳۵ - The Earth BioGenome Project (EBP)
۴۳۶ - Analysis standards
۴۳۷ Eukaryotic

۴۳۸ - مثلاً استان همدان از گذشته‌های دور، از قطب‌های تولید انواع گیاهان دارویی در کشور بوده و طب سنتی با طبیبان سنتی در آن رواج داشته و با فرهنگ مردم و عشایر عجین شده است(آقامحمدی،۱۳۹۰: ۲۵).

۴۳۹ - در مورد گیاهان دارویی برای انسان‌ها زیاد بحث شده و مسائل زیادی هم‌چنان باقی است امّا در خصوص طرح مساله در این فصل، لازم است به استفاده درمانی از گیاهان برای دام‌ها نزد عشایر که دام‌پروران آگاه به احوالات دام و تاثیرات گیاه به مثابه دارو بر سلامتی دام‌ها بوده‌اند، توجه شود. این دانش از دهه ۱۹۸۰ میلادی مورد توجه قرار گرفته است. اتنووتریناری(Ethnoveterinary)، دانش بومی دامداران سنتی است که از مهارت‌های منحصر به فرد خود از قبیل استفاده از گیاهان دارویی و اجزای موجودات زنده و همچنین مواد طبیعی در جهت درمان دام‌های بیماران خود بهره می‌بردند. شاید بتوان مطرح نمود که بخش اعظمی از طب سنتی از آزمایش گیاهان دارویی بر روی حیوانات منشأ گرفته شده است که در این میان برخورد حیوانات نسبت به برخی گیاهان و استفاده‌ی غریزی از آن‌ها بر درمان بیماری‌های خود تا حدود زیادی تأثیر گذار بوده است. در این تحقیق از عشایر کرمان، ۴۲ گیاه دارویی شناسایی گردید که برای درمان بیماری‌های دامی مورد استفاده قرار می‌گرفت(کوه‌پایه،۱۳۹۰: ۲۱۲).

۴۴۰ - به عنوان مثال، در سفرنامه یاکوب ادوارد پولاک جایگاه قابل توجهی برای گیاهان مخدر و زهرها و پادزهرها(حشیش، تریاک، تنباکو، تاتوره، بذرالبنج، مردم‌گیاه(مهرگیاه)، بیخ تفت(شوکران)، جوزالقی، بیش، بادام کوهی، چای و غیره) اختصاص داده شده است. هم‌چنین بحثی تحت عنوان «گیاهانی که از خود شیره و صمغ ترشح می‌کنند» ارائه شده که در واقع، تاریخچه تعدادی از گیاهان اقتصادی کشور است. گیاهان صمغی(اشق، بارزد(وشا، باریجه)، انجدان،انقوزه هراتی، سک‌بینج، بیوزه، سقز، انزروت) و گیاهانی که شیره می‌دهند(گز انگبین، ترنجبین، شیر خشت، بید خشت، کتیرا)(جوانشیر،۱۳۷۷: ۱۳۱).

آیا این گیاهان، غذای آینده هستند؟(Baldermann,2016:106). بدین ترتیب، کدام رشته‌ها در چه حوزه‌هایی می‌توانند به بحث امنیت غذایی آن‌چنان که بایسته است، بپردازند؟ یعنی بتوانند واقعیت اکوسیستمی آن را در ابعاد طبیعی و انسانی در نظر بگیرند. به‌ویژه اگر توجه نماییم که «جامعه‌شناسی گیاهی شالوده مطالعات تنوع زیستی است»(عصری،۱۳۸۴: ۱۱۰). قابل تامل است که «ایمنی و امنیت غذایی» در نقشه جامع علمی کشور جایگاهی بهتر از اولویت ج نیافته است!(نقشه جامعه علمی کشور،۱۳۸۹: ۱۲). توجه به گسست حوزه‌های طبیعی و انسانی از منظر دانشی نشان می‌دهد که سیاست‌گذاری دانشی-فناورانه تا چه اندازه به کیفیت ارتباط حوزه‌های طبیعی و انسانی وابسته است. حال در نظر بگیریم که در این با پدیده «فراموشی» هم مواجه هستیم: فراموشی گیاهان، در حالی‌که «گونه‌های فراموش شده[۴۴۱] می‌توانند نقش به‌سزایی در تأمین امنیت غذایی و ارتقای سطح کیفی تغذیه‌ای که منادی تأمین امنیت غـذایی است، داشته باشند. حذف این‌گونـه گیاهـان از سبد غذایی بشـر در صورتی بیشتر جلوه‌گر می‌شود که پیامدهای اجتناب‌ناپذیر تغییر اقلیم بر تولیدات غذایی را مدنظر قرار دهیم. بـا توجـه بـه همگـامی تـاریخی بسیاری از گونه‌های گیاهان فراموش شـده در تامین غـذا و دارو در کشور ما و نیز سازگاری ضمنی این گیاهان به شرایط متنوع اقلیمـی ایران، توجه مجدد به این گیاهان یکی از راه‌کارهای حفظ موثر آن‌ها است. احیای جایگاه این قبیل گیاهان در الگوی کشت و بهره‌گیری از دانش بومی در تولید این گیاهـان مـی‌توانـد از راه‌کارهـای موسوم به سازگاری در مواجه با پدیده تغییر اقلیم قلمداد شود»(کوچکی،۱۳۹۷: ۳۶۳). همین شواهد نشان می‌دهند که درک تنوع زیستی به مثابه میراث طبیعی و انسانی که می‌بایستی برای تحقق پیشرفت پایدار حفظ و حراست شود، تا چه اندازه با چالش‌های دانشی روبرو است. پژوهش‌های نوین در علوم زیستی می‌توانند با رویکردی کل‌گرا و مساله‌محور نسبت به ریشه‌یابی ضعف‌ها اقدام نمایند و طراحی‌های خلاقانه و مبتکرانه‌ای برای بازتوانی علمی و فناورانه پیشنهاد کنند.

۳. نتیجه‌گیری

در این مقاله تلاش شد پرسش‌هایی در مطالعات و تحقیقات علوم زیستی طرح شود. نقطه عزیمت طرح پرسش‌های اولیه و بنیادین با توجه به مفهوم عمیق تنوع زیستی به مثابه میراث طبیعی و انسانی صورت گرفت. انتخاب نمونه نیز از حوزه‌های طبیعی و انسانی با تمرکز بر روابطی که میان آن‌ها وجود دارد، انجام شد. نکته مهمی که مشخص شد این است که اولاً، ضعف دانشی موجود در شناسایی روابط و اندرکنش‌های حوزه‌های طبیعی و انسانی مانعی جدی در تعمیق مباحث زیستی می‌باشد. ثانیاً، علاوه بر ناتوانی در تدارک یکپارچگی دانشی برای درک مسائل تنوع زیستی(اعم از الگوشناسی، حفاظت و آینده‌نگری)، چالشی مهم در این پیوندشناسی و پیوندیابی وجود دارد که معطوف به ارتباطات و تعاملات انسانی در حوزه‌های زیستی و اجتماعی است: الگوهای هم‌کاری‌ها و یاریگری‌های علمی و فناورانه‌ی مرکب ناظر بر پدیده‌های درهم تنیده و پیچیده در تنوع زیستی. پیشنهاد مقاله حاضر رو آوردن به هم‌بست «فرهنگ-زیست‌بوم-فناوری(بومی و نو)» است که حوزه‌های انسانی و طبیعی را در ابعاد فهم مساله، رویکرد به حل مساله، بستر و محیط مساله‌شناسی و حل مسائل، طراحی ابزارهای مفید برای حل مسائل را به‌صورت یکپارچه و نه گسسته از یکدیگر مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار می‌دهد. بدین ترتیب، تنوع زیستی آن‌گونه که هست، شناخته و تحلیل می‌شود، یعنی به عنوان یک

[۴۴۱] Neglected plants (NP)

میراث متاثر از مداخلات انسانی و موثر بر آینده مجتمع‌های زیستی. در این فرایند، زمین و گیاه و جوامع انسانی و لذا زمین‌شناسی، گیاه‌شناسی و علوم اجتماعی و انسانی، یک لایه زیرین و حیاتی را در تحلیل مباحث تنوع زیستی تشکیل می‌دهند که حفاظت پایدار و آینده‌نگری را میسر می‌سازند. یک گام پایه در این مسیر، تمهید جعبه ابزار مناسب برای تحلیل است که در تحقیق دیگری به عنوان جعبه ابزار مرکب پیشنهاد کرده‌ایم و به جهت محدودیت حجم مقاله، صرفاً برای اطلاع خوانندگان محترم در اینجا ذکر می‌نماییم.

شکل ۱: جعبه ابزار مرکب در تحلیل زیست جمعی(با تاکید بر زیست عشایری)



(مهام، ۱۴۰۰: ۱۵)

منابع

۱- آقامحمدی، م. و شرفی، ح .۱۳۹۰. تحلیلی بر پراکندگی جغرافیایی ایلات و عشایر استان همدان، چاپ اول، قومس، ۱۲۴ ص.

۲- احمدی، ع. و کاکاوند، ا. ۱۳۹۶. مبانی و مفاهیم ژئومورفولوژی پزشکی. چاپ اول، انتشارات دانشگاه بزرگمهر قائنات، ۲۵۰ ص.

۳- ایرانی بهبهانی، ه. و شفیعی، ب. ۱۳۸۶. منظرسازی کوهستان با استفاده از گیاهان بومی(نمونه موردی: دره جمشیدیه). فصلنامه محیط‌شناسی، سال ۳۳، شماره ۴۲، ص: ۱۰۹-۱۲۴.

۴- جوانشیر،ک. ۱۳۷۷. تاریخ علوم منابع طبیعی ایران. چاپ اول، سازمان تحقیقاتی آموزش و ترویج کشاورزی-فرهنگستان علوم، چاپ اول، ۴۹۰ ص.

۵- جم‌زاد، ز. با همکاری اعضای تدوین برنامه.۱۳۸۷. برنامه راهبردی تحقیقات گیاه‌شناسی و رده‌بندی گیاهان در محیط‌های طبیعی ایران، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، ۲۴۸ ص.

۶- سایت دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی. ۱۳۹۹/۱۲/۲۹. برگزاری جلسه دفاع اولین دانش آموخته مقطع کارشناسی ارشد اکولوژی انسانی، آدرس بازیابی:
http://sph.tums.ac.ir/he/portal/home/?news/4662/55502/260777/

۷- رکنی لموکی، غ. ۱۳۹۶. ارمغان زیست شناسی برای ریاضی در سده بیست و یکم. مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۱، شماره ۱، ص: ۲۰-۳۰.

۸- عرشی، ا.ر. و بهرامی‌زاده سجادی، ش. ۱۳۹۵. زیرساخت‌های پروتکل ملّی درمان با اسب(هیپوتراپی): مبانی بیومکانیک، نرومکانیک، پزشکی و روان‌شناسی. چاپ اول، انتشارات دانشگاه صنعتی امیرکبیر، ۲۸۸ ص.

۹- علی‌زاده، ع. ۱۳۸۰. تئوری و عمل در باستان‌شناسی(با فصل‌هایی در زیست‌شناسی تحولی و معرفت‌شناسی)، چاپ اول، سازمان میراث فرهنگی کشور-پژوهشکده باستان‌شناسی، ۲۹۷ ص.

۱۰- عصری، ی. ۱۳۸۴. جامعه‌شناسی گیاهی شالوده مطالعات تنوع زیستی. تنوع گیاهی ایران(مجموعه مقالات)، تهیه و تدوین: محمدحسن عصاره، چاپ اول، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، ص: ۱۰۱-۱۵۳.

۱۱- فرهادی، م. ۱۳۸۸. انسان‌شناسی یاریگری. چاپ اول، ثالث، ۶۳۱ ص.

۱۲- فرهادی، م. ۱۳۹۲. گل‌خوشناسی گونه‌ای گل حسرت، جوغاسم(جی غال اِسمک، پیشوک، پیغوک، ...). فصلنامه علوم اجتماعی، شماره ۶۳، ص: ۱-۳۳.

۱۳- قربانلی، م. ۱۳۸۱. جغرافیای گیاهی. چاپ اول، سمت، ۳۰۷ ص.

۱۴- کوچکی، ع؛ رضوانی مقدم، پ؛ عسگری، ا و رستمی، ر. ۱۳۹۷. شناسایی و ارزیابی زراعی و اکولوژیک گیاهان فراموش شده در بوم‌نظام‌های زراعی ایران؛معرفی گیاهان کم بهره‌برداری شده و فراموش شده، نشریه بوم‌شناسی کشاورزی، جلد ۱۰، شماره ۲، ص: ۳۵۳-۳۶۷.

۱۵- کوه‌پایه، ع. قاسمی پیربلوطی، ع. یزدان‌پناه راوری، م.م. پورمحسنی‌نسب، الهام. ارجمند، د.آ. ۱۳۹۰. مطالعه دام‌پزشکی سنتی(اِتنووِترینَری) گیاهان دارویی استان کرمان. فصلنامه داروهای گیاهی، سال دوم، شماره ۳، ص: ۲۱۱-۲۱۶.

۱۶- مهام، م. ۱۴۰۰. زمین-گیاه»، بسترِ «زیست‌های پایدار» (مطالعه موردی: الگوی زیست جمعیِ جامعه‌نگاران و جامعه‌شناسان گیاهی متقدم در فلات مرتفع ایران). دوفصلنامه دانش‌های بومی ایران. شماره ۱۵، ص: ۱-۳۶.

۱۷- نقشه جامع علمی کشور. ۱۳۸۲. چاپ اول، دبیرخانه شورای عالی انقلاب فرهنگی، ۳۲ ص.

۱۸- هاشمی یزدی، ف. ۱۳۹۶. علم دیرینه گیاهی و گیاه‌شناسی روز. نشریه طبیعت ایران، جلد ۵ ، شماره ۲، ص: ۲۱-۲۶.

۱۹- یاوری، ا.ر. ۱۳۸۱. سال جهانی کوه‌ها و وضعیت زیست‌بوم‌های کوهستانی در ایران. فصلنامه محیط‌شناسی، شماره ۳۰، ص: ۸۷-۹۶.

13- - Baldermann, S, L. Blagojevic, K. Frede, R. Klopsch, S. Neugart, A. Neumann, B. Ngwene, J. Norkeweit, D. Schroter, A. Schroter, F. J. Schweigert, M. Wiesner, and M. Schreiner (2016), “Are Neglected Plants the Food for the Future?”, **CRITICAL REVIEWS IN PLANT SCIENCES**, VOL. 35, NO. 2, pp 106–119

14- COTTERILL, F.P.D, and M.J. DE WIT .2011. “GEOECODYNAMICS AND THE KALAHARI EPEIROGENY: LINKING ITS GENOMIC RECORD, TREE OF LIFE AND PALIMPSEST INTO A UNIFIED NARRATIVE OF LANDSCAPE EVOLUTION”, South African Journal of Geology · December, p: 488-514.

14 - Grassberger, Martin, Ronald A. Sherman, Olga S. Gileva, Christopher M.H. Kim, Kosta Y. Mumcuoglu. 2013. Biotherapy: History, Principles and Practice: A Practical Guide to the Diagnosis and Treatment of Disease using Living Organisms, Kindle Edition, Published by Springer, p: 330.

15- Heinrich, Michael (1998), “Plants as Antidiarrheals in medicine and diet”, In H.D.V. Prendergast, N.L.ETKIN,D.R. Harris and P.J. Houghton (Editors), **Plants for food and medicine**, Royal Botanic Gardens, Kew. p: 17-30

۱۳16- Minorsky, Peter V .2020. “American racism and the lost legacy of Sir Jagadis Chandra Bose, the father of plant neurobiology”, Plant Signaling & Behavior, 16:1, 1818030, p:1-18 -

17 - Plants Invade the Land: Evolutionary and Environmental Perspectives. 2001. Edited by: Patricia Gensel and Dianne Edwards, Published by Columbia University Press, p: 512.

18 - Ustin, Susan L, Stéphane Jacquemoud, and Michel M. Verstraete. 1999. “Geobotany: Vegetation Mapping for Earth Sciences”, In book: Remote Sensing for the Earth Sciences, Manual of Remote Sensing. Publisher: John Wiley and Sons, Editors: Andrew N. Rencz,, Third Edition, Volume 3: 189-248.

19 - Viles, Heather .2020. Biogeomorphology: Past, present and future, Geomorphology Volume 366, Elsevier B.V. 1(10): 106809

Optimization of phytoremediation by Azolla filiculoides through Taguchi method

Zahra Ramezannezhad[1] , Akbar Norastehnia[2] , Zahra Masoudian[3*]

1- M.Sc. Student in plant physiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan

2- Associate Professor in Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan

3-Ph.D. in Plant Physiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan

** Corresponding Author Email address: Zahramasoodian@yahoo.com*

Abstract

Colored wastewater is produced in various industries including textile, dyeing, pharmaceutical, food, cosmetic, paper and leather industries. Dyes in the water block sunlight and plant photosynthesis is disrupted. Colored contaminants are absorbed by aquatic organisms and threaten their lives. In this study, the refining of AB62 dye by *Azolla filiculoides* was investigated. Using Taguchi method, optimal conditions for AB62 dye remediation under the influence of various factors including dye (5, 10, 15 and 20 mg/l), nitrogen (0.1, 0.2 and 0.4 g/l), NaCl (0.025, 0.05 and 0.1 g/l) and CaCO3 (0.025, 0.065 and 0.125g/l), in a period of one week evaluated. The results showed that Azolla plant was able to purify the dye from contaminated water and the concentration of dye and water hardness had the highest and lowest effect on the amount of AB62 decolorization, respectively. Based on the signal to-noise ratio in all 4 parameters, the dye remediation efficiency at level 1 of treatment was higher than the other levels. Therefore, it can be concluded that water quality in terms of nitrogen, salinity and hardness was effective on the phytoremediation process of the dye. With increasing water quality, the remediation efficiency of the dye was improved.

Keywords: purify,AB62 dye, decolorization

بهینه‌سازی گیاه‌پالایی آزولا با روش تاگوچی

زهرا رمضان‌نژاد[۱]، اکبرنورسته نیا[۲]، زهرامسعودیان[۳*]

۱-دانشجو کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم‌پایه، دانشگاه گیلان
۲-دانشیارگروه زیست شناسی، دانشکده علوم‌پایه، دانشگاه گیلان
۳-دکترای فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان

*ایمیل نویسنده مسئول: zahramasoodian@yahoo.com

چکیده

فاضلاب‌های رنگی در صنایع مختلفی از جمله صنایع نساجی، رنگرزی، داروسازی، صنایع غذایی، آرایشی - بهداشتی، کاغذسازی و چرم‌سازی تولید می‌شوند. مواد رنگی وارد شده به آب، مانع عبور نورخورشید شده و فتوسنز گیاهان اعماق آب را با مشکل مواجه می‌سازند. همچنین، آلاینده های رنگی جذب ارگانیسم‌های آبزی شده و حیات آنان را تهدید می‌کنند. در این تحقیق پالایش ماده رنگزای AB62 توسط گیاه *Azolla filiculoides* مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از روش تاگوچی شرایط بهینه برای پالایش ماده رنگزای AB62 تحت تاثیر عوامل مختلف شامل ماده رنگزا (۵،۱۰،۱۵ و۲۰ میلی گرم در لیتر)، نیتروژن (۰.۱ ،۰.۲ و ۰.۴ گرم درلیتر)، NaCl (۰.۱،۰.۰۵،۰.۰۲۵ گرم درلیتر) و $CaCO_3$ (۰.۰۲۵، ۰.۰۶۵ و ۰.۱۲۵ گرم درلیتر)، طی بازه زمانی یک هفته ارزیابی شد. نتایج نشان داد که گیاه آزولا قادر به پالایش ماده رنگزا از آب آلوده بوده و غلظت ماده رنگزا و درجه سختی آب به ترتیب بیشترین و کمترین تاثیر را بر میزان رنگزدایی AB62 داشته است. براساس نسبت سیگنال به نویز در هر ۴ پارامتر مورد آزمایش کارایی پالایش ماده رنگزا در سطح یک تیمار دهی نسبت به سایر سطوح از مقادیر بالاتری برخورداربود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که کیفیت آب از نظر میزان نیتروژن و سختی بر روند گیاه پالایی ماده رنگزا تاثیرگذار بود، به نحوی که با افزایش کیفیت آب کارایی پالایش ماده رنگزا ارتقا یافت.

واژه‌های کلیدی: رنگزدایی، ماده رنگزای AB62، پالایش

۱.مقدمه

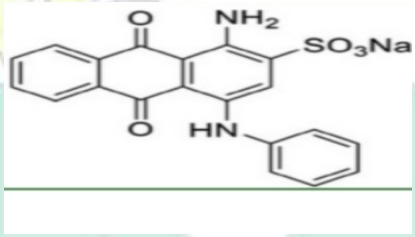
رنگ‌های سنتتیک به عنوان یکی از مشکلات اساسی از نظر زیست‌محیطی محسوب می‌شوند. به خاطر اینکه این نوع رنگ‌ها ممکن است در اثر تجزیه به محصولات سمی تبدیل شوند. رنگ‌های نساجی و دیگر مواد رنگی صنعتی یکی از بزرگ‌ترین آلاینده های آلی را تشکیل می‌دهند که افزایش خطرات زیست‌محیطی را دنبال دارد. حدود ۱-۲۰٪ از کل تولیدات جهانی رنگ‌ها در طول فرآیند تولید از دست می‌رود و در جریان‌های نساجی رها می‌شود. این مواد رنگی از ساختارهای شیمیایی متفاوتی همچون اسیدی، قلیایی، ری‌اکتیو، دیسپرس، آزو، پایه آنتراکینون و رنگ‌های فلزی تشکیل شده‌اند (Crini and Colak et al.,2009. شدب Badot P.,2008). باتوجه به اینکه رنگ‌ها به طور عمده ساختار آروماتیک پیچیده و مصنوعی دارند، بنابراین پایدارتر بوده و حذف زیستی آن‌ها مشکل‌تر

است. این مواد رنگی که اغلب مصنوعی هستند طی مراحل مختلف تولید و مصرف، وارد پساب می‌شوند و درصورت عدم توجه به اجرای مراحل تصفیه، این مواد همراه پساب وارد محیط زیست می‌شوند (Talarposhti et al.,2001.Prigione et al.,2008). فرآیندهای متنوعی، مانند تجمع ذرات (Prigione et al.,2008)، ته نشینی، صاف کردن، فرآیندغشایی (Aksu and Karabayur.,2008)، سیستم-های تعویض یونی، کربن فعال، الکترودیالیز، ازوناسیون، اکسیداسیون الکتروشیمیایی (Gucek et al.,2005)، به منظور تصفیه پساب‌های رنگی استفاده می‌شوند (Prigione et al .,2008). هریک ازاین روش‌ها درتصفیه‌ی فاضلاب، دارای مزایا و معایبی هستند. برخی اشکالات این روش‌ها عبارتنداز: راندمان حذف پایین، تولید بالای لجن، عدم بهره‌وری هزینه و انرژی، تولیدمحصولات جانبی سمی و نیز اضافه کردن موادشیمیایی بالقوه سمی به محیط زیست می‌باشد (Shehzad et al.,2015). گیاه‌پالایی یا پالایش سبز استفاده ازگیاهان یا دیگر موجودات فتوسنتزکننده، برای کاهش آلاینده‌های آلی یا غیرآلی درطبیعت به‌ویژه آب و خاک است (Pivetz.,2001). گیاه‌پالایی روشی موثر در حفظ و بهبودکیفیت منابع آب می‌باشد (Srivastava et al.,2008).گیاهان پتانسیل بالایی در از بین بردن آلودگی‌های آب دارند، (Rizzo et al., 2012). مطالعات نشان داده که جلبک و خیار دریایی می‌توانند فلزات سنگین ازجمله سرب، روی، کادمیوم را از فاضلاب‌ها و رودخانه‌های شهری حذف کنند (Hoang et al., 2009). ریشه و برگ پوسیده گیاهان باقی مانده در آب باعث کاهش شدید آلودگی‌های موجود در آب می‌گردد (Burezq and Aliewi.,2018). استفاده از گیاهان برای حذف آلاینده‌های آلی آب و خاک موجب صرفه‌جویی در منابع و جلوگیری ازآلودگی ثانویه محیط می‌شود. گیاهان از مکانیسم خود برای تجزیه آلاینده‌های آلی برای به دست آوردن موادمغذی و تحریک فعالیت میکروارگانیسم‌های ریزوسفر استفاده می‌کنند (Wei et al.,2021).

ماده رنگزای آبی اسیدی ۶۲ متعلق به گروه رنگ‌های آنتراکینون بوده که این گروه از رنگ‌ها بعد از رنگ‌های آزو دومین دسته رنگ‌های واکنش دهنده هستند و به دلیل تنوع زیاد و سهولت کاربرد، در صنعت نساجی برای رنگ‌آمیزی پنبه، الیاف پشم و پلی‌آمین مورد استفاده گسترده قرار می‌گیرند (Alkan et al.,2005). سرخس آبزی آزولا (*Azolla filiculoides*)، از خانواده *Azollacea*، یک گیاه آبزی شناور است. به جز گونه *Azolla nilotica* اندازه گونه‌های دیگرآن به ندرت از ۳-۴ سانتی‌متر تجاوز می‌کند. ساقه‌ها توسط برگ‌های کوچک، متناوب و پولک‌مانند پوشیده شده است و ریشه‌های نابه‌جا در پایین ساقه قرار دارند و به صورت عمودی در آب رشد می‌کنند (Lejeune et al., 2000). مطالعه‌ای با هدف ارزیابی حذف رنگ آبی اسیدی۱۵ از محلول آبی، توسط آزولا خشک انجام شد، نتایج نشان داد در pH =۳، زمان تماس ۹۰ دقیقه، دوز جاذب ۱۰ گرم در لیتر و غلظت رنگ ۱۰ میلی گرم در لیتر ، آزولا ۹۸٪ از رنگ آبی اسیدی ۱۵ را از محلول آبی حذف نمود (Zazoli et al.,2013). همچنین بررسی جذب رنگ AB 225 توسط گیاه آزولا نشان داد که جذب رنگ به دوزجاذب و غلظت اولیه رنگ و pH بستگی دارد. با افزایش دوز جاذب و زمان تماس راندمان جذب رنگ توسط گیاه افزایش یافت (Sadeghi et al., 2016). کارایی حذف رنگAR88، از محلول آبی، توسط زیست‌توده آزولا به عنوان یک زیست‌توده طبیعی، مورد بررسی قرارگرفت. بهترین بازده حذف AR88 توسط زیست‌توده آزولا در pH اسیدی، دوز جاذب ۴ گرم درلیتر، زمان تماس ۷۵ دقیقه و غلظت اولیه ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر رنگ به دست آمد. افزایش دما باعث افزایش ظرفیت جذب زیست توده آزولا شد (Balarak and Mahdavi., 2016). در پژوهش حاضر تاثیر غلظت‌های مختلف ماده رنگزا، تاثیر درجه سختی، درجه شوری و مقدار نیتروژن بر میزان پالایش گیاه آزولا در شرایط آزمایشگاه با روش تاگوچی ارزیابی شد.

۲.مواد و روش‌ها

در این طرح گیاه آبزی آزولا، از تالاب سوستان، واقع در شهر لاهیجان جمع آوری و سپس به آزمایشگاه منتقل گردید. گیاه در شرایط دمایی ۲۵درجه سانتیگراد و دوره روشنایی و تاریکی ۱۶/۸ ساعت و در محیط کشت هوگلند ۱۰درصد در آزمایشگاه نگهداری و سپس تیماردهی اعمال شد. ماده رنگزای آبی اسیدی ۶۲ از شرکت الوان ثابت تهیه گردید. تاثیر غلظت‌های مختلف ماده رنگزا، تاثیر درجه سختی، درجه شوری و مقدار نیتروژن بر میزان پالایش گیاه آزولا با استفاده از برنامه Minitab و آزمون تاگوچی مورد بررسی قرار گرفت. در تحقیق حاضر، تاثیر ۴ غلظت AB62(۵،۱۰،۱۵،۲۰میلی‌گرم برلیتر) و تاثیر۴ غلظت NaCl، ۴غلظت $CaCO_3$ و ۴ سطح نیتروژن بر میزان پالایش گیاه آزولا (۴ گرم) در سه تکرار در مجموع ۴۸ تیمار طی بازه زمانی یک هفته مورد بررسی قرار گرفت. همزمان پالایش رنگ در ۴۸ نمونه کنترل منفی (در شرایط عدم حضور گیاه) ارزیابی و میزان پالایش خالص رنگ توسط گیاه محاسبه شد..



شکل۱:ساختاررنگ آبی اسیدی ۶۲

۳.نتایج و بحث

در این پژوهش، برای طراحی آزمایش و تعیین شرایط بهینه رنگبری گیاه آزولا از روش تاگوچی استفاده شد. روش تاگوچی یک روش طراحی آزمایش از نوع کسری از فاکتوریل کامل است، که در این روش تعدادی از ترکیب‌های ممکن بین متغیرها انتخاب می‌شود. انتخاب این تعداد براساس طرح آزمایش به‌کار رفته، طوری انجام می‌شود که واریانس خطا، با حالتی که تمام ترکیب‌های ممکن اجرا شود، یکسان باشد. پس از انجام آزمایش‌ها و ارزیابی پاسخ‌های به دست آمده، بهترین پاسخ انتخاب می‌شود. به طور کلی در این پژوهش چهارعامل غلظت رنگ، شوری، میزان نیترات و درجه سختی در نظرگرفته شده است درجدول ۱ عامل‌ها و سطوح بررسی شده نشان داده شده است. با توجه به جدول آرایه‌های متعامد چهارعامل و چهارسطح، ۱۶ آزمایش طراحی شد (جدول۲). برای هر آزمایش از مقادیر مختلف رنگ، نیتروژن، NaCl و $CaCo_3$ طبق جدول ۲ استفاده شد. در کلیه آزمایشات مقدار ۲۵۰ سی سی از محیط کشت در سه تکرار و هرتکرار شامل ۴ گرم گیاه آزولا و همچنین سه تکرار فاقد گیاه در ظروف شیشه ای و به مدت هفت روز در دمای اتاق قرار گرفت و بعد از هفت روز مقدار حذف رنگ آبی اسیدی ۶۲ توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر و در طول موج بیشینه ۶۳۶ نانومتر بررسی گردید.

جدول ۳-۱:عوامل وسطوح موردبررسی درطراحی آزمایش‌ها

	Level ۱	Level ۲	Level ۳	Level ۴
Blue 62(ppm)	۵	۱۰	۱۵	۲۰
N (g/L)	**0**	۰/۱	۰/۲	۰/۴
Na Cl (g/L)	**0**	۰/۰۲۵	۰/۰۵	۰/۱
Ca CO_3 (g/L)	**0**	۰/۰۲۵	۰/۰۶۵	۰/۱۲۵

Experimental number	Blue 62	N (g/L)	Na Cl (g/L)	Ca CO3 (g/L)
۱	۵	۰	۰	۰
۲	۵	۰/۱	۰/۰۲۵	۰/۰۲۵
۳	۵	۰/۲	۰/۰۵	۰/۰۶۵
۴	۵	۰/۴	۰/۱	۰/۱۲۵
۵	۱۰	۰	۰/۰۲۵	۰/۰۶۵
۶	۱۰	۰/۱	۰	۰/۱۲۵
۷	۱۰	۰/۲	۰/۱	۰
۸	۱۰	۰/۴	۰/۰۵	۰/۰۲۵
۹	۱۵	۰	۰/۰۵	۰/۱۲۵
۱۰	۱۵	۰/۱	۰/۱	۰/۰۶۵
۱۱	۱۵	۰/۲	۰	۰/۰۲۵

وسطوح انتخابی توسط تاگوچی

جدول ۳-۲: عوامل

۰	۰/۰۲۵	۰/۴	۱۵	۱۲
۰/۰۲۵	۰/۱	۰	۲۰	۱۳
۰	۰/۰۵	۰/۱	۲۰	۱۴
۰/۱۲۵	۰/۰۲۵	۰/۲	۲۰	۱۵
۰/۰۶۵	۰	۰/۴	۲۰	۱۶

۴.نتیجه گیری

نتایج رنگزدایی حاصل از ۱۶ تیمار تحت تاثیر چهار فاکتور غلظت رنگ، نیتروژن، شوری و سختی در جدول ۳ ارائه شده است. طبق جدول بالاترین درصد پالایش رنگAB62 ، درغلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر از ماده رنگزا و عدم حضور هریک از مواد ایجاد کننده شوری و سختی و نیتروژن، به صورت میانگین ۳۵٪ اندازه‌گیری شد. و به ترتیب هریک از عوامل غلظت رنگ، شوری، نیتروژن و درجه سختی، در روند رنگزدایی و به دست آوردن بیشترین و کمترین میزان درصد پالایش موثر واقع شده‌اند.

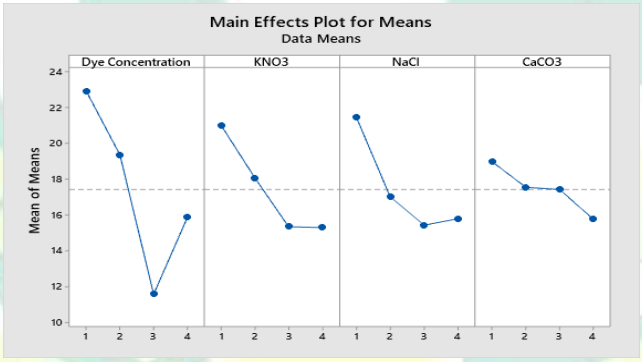
جدول ۴-۱: نتایج نهایی رنگزدایی رنگ آبی اسیدی۶۲ توسط گیاهAzolla filiculoides

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
	Concentration	KNO_3	NaCl	$CaCO_3$	R1	R2	R3	SNR1	STDE1	MEAN1
۱	۵	۰	۰	۰	۳۶/۲۶	۴۳/۷۱	۲۵/۲۹	۳۰/۲۲۶۶	۹/۲۹۵۹	۳۵/۰۸۶۷
۲	۵	۰/۱	۰/۰۲۵	۰/۰۲۵	۱۸/۶۴	۳۸/۳۸	۱۴/۱۰	۲۶/۳۶۵۲	۱۲/۲۱۸۸	۲۷/۰۴۰۰
۳	۵	۰/۲	۰/۰۵	۰/۰۶۵	۱۳/۶۸	۱۸/۱۸	۱۷/۸۲	۲۴/۱۵۷۴	۲/۵۰۰۶	۱۶/۵۶۰۰
۴	۵	۰/۴	۰/۱	۰/۱۲۵	۱۳/۹۳	۱۶/۵۷	۱۸/۱۸	۲۴/۰۴۴۶	۲/۱۴۵۷	۱۶/۲۲۶۷
۵	۱۰	۰	۰/۰۲۵	۰/۰۶۵	۳۲/۹۱	۲۲/۲۵	۸/۵۹	۲۲/۵۹۷۵	۱۲/۱۹۰۸	۲۱/۲۵۰۰
۶	۱۰	۰/۱	۰	۰/۱۲۵	۲۰/۹۹	۱۹/۱۴	۲۰/۱۸	۲۶/۰۴۶۷	۰/۹۲۷۴	۲۰/۱۰۳۳
۷	۱۰	۰/۲	۰/۱	۰	۱۹/۴۶	۱۴/۱۵	۱۹/۲۸	۲۴/۶۳۲۲	۳/۰۱۵۱	۱۷/۶۳۰۰
۸	۱۰	۰/۴	۰/۰۵	۰/۰۲۵	۱۸/۴۲	۱۵/۷۸	۲۰/۹۵	۲۵/۱۱۳۷	۲/۵۸۵۲	۱۸/۳۸۳۳
۹	۱۵	۰	۰/۰۵	۰/۱۲۵	۱۱/۰۶	۱۰/۵۶	۱۴/۲۳	۲۱/۳۳۱۰	۱/۹۹۰۳	۱۱/۹۵۰۰
۱۰	۱۵	۰/۱	۰/۱	۰/۰۶۵	۱۹/۷۰	۸/۶۶	۱۲/۵۰	۲۱/۲۸۶۱	۵/۶۰۴۶	۱۳/۶۲۰۰
۱۱	۱۵	۰/۲	۰	۰/۰۲۵	۱۵/۷۹	۱۲/۳۰	۹/۱۶	۲۱/۲۴۱۹	۳/۳۱۶۵	۱۲/۴۱۶۷
۱۲	۱۵	۰/۴	۰/۰۲۵	۱	۶/۵۱	۸/۶۶	۹/۷۶	۱۸/۰۱۰۹	۱/۶۵۳۰	۸/۳۱۰۰
۱۳	۲۰	۰	۰/۱	۰/۰۲۵	۱۶/۵۹	۱۴/۳۳	۱۶/۰۱	۲۳/۸۳۵۴	۱/۱۷۳۸	۱۵/۶۴۳۳

۱۴	۲۰	۰/۱	۰/۰۵	۰	۱۴/۶۱	۱۳/۹۰	۱۵/۹۲	۲۳/۳۷۰۵	۱/۰۲۴۷	۱۴/۸۱۰۰
۱۵	۲۰	۰/۲	۰/۰۲۵	۰/۱۲۵	۱۷/۱۴	۱۳/۰۶	۱۴/۰۳	۲۳/۲۰۳۶	۲/۱۳۱۵	۱۴/۷۴۳۳
۱۶	۲۰	۰/۴	۰	۰/۰۶۵	۱۸/۹۴	۱۹/۳۰	۱۶/۴۵	۲۵/۱۴۸۶	۱/۵۵۲۰	۱۸/۲۳۰۰

۴-۱.تحلیل میزان کیفیت (تحلیل نسبت S/N)

براساس نتیجه تحلیل کیفیت بیشترین کارایی حذف رنگ در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر از ماده رنگزا و عدم حضور نیتروژن، بوده است (شکل ۴-۱).NaCl و $CaCO_3$



شکل ۴-۱:محاسبه عملکرد سیگنال به نویز در چهارسطح غلظت رنگ(۵و۱۰و۱۵و۲۰ میلی‌گرم درلیتر)،۴سطح $CaCO_3$(۰و۰/۰۲۵و۰/۰۶۵و۰/۱۲۵ گرم برلیتر)، ۴سطح NaCl(۰و۰/۰۲۵و ۰/۰۵و ۰/۱ گرم برلیتر) و چهارسطح نیتروژن (۰و۰/۱ و۰/۲ و۰/۴ گرم برلیتر).

۴-۲.اهمیت عوامل موردآزمایش براساس S/N

جدول ۴-۲ نشان داده شده است. Azolla filiculoidesتوسط گیاه AB62 میزان اهمیت هریک از متغیرها در فرآیند رنگزدایی ، عامل غلظت ماده رنگزا را به عنوان موثرترین و عامل سختی را به عنوان آخرین عامل تاثیرگذار S/Nنتایج به دست آمده براساس در این فرآیند نشان داد.

جدول۴-۲: میزان اهمیت متغیرهای آزمایشی درفرآیندرنگزدایی

Level	Dye Concentration	KNO3	NaCl	CaCO3

۱	۲۵/۹۷	۲۴/۵۰	۲۵/۶۷	۲۴/۰۶
۲	۲۴/۶۰	۲۴/۰۳	۲۲/۳۱	۲۳/۹۱
۳	۲۰/۴۷	۲۳/۳۱	۲۳/۴۹	۲۳/۳۰
۴	۲۳/۸۹	۲۳/۰۸	۲۳/۴۵	۲۳/۶۶
Delta	۵/۵۰	۱/۴۲	۳/۳۵	۰/۷۶
Rank	۱	۳	۲	۴

در این پژوهش تاثیر ۴ عامل شامل غلظت ماده رنگزا، شوری، سختی و نیتروژن بر پالایش ماده رنگزا AB62 توسط گیاه آزولا بررسی گردید. بر اساس نتایج این مطالعه کارایی پالایش ماده رنگزا AB62 به غلظت آن بستگی داشته بطوریکه با افزایش غلظت آن میزان پالایش کاهش یافت. دلایل احتمالی زیر را می‌توان در این امر دخیل دانست. در گیاه آزولا با شدت یافتن تنش، از یک طرف کاهش نرخ رشد و کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی از کمیت بالایی برخوردار بود و از طرف دیگر میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشاها (غلظت مالون دی آلدئید) بعنوان شاخص تنش اکسیداتیو مقادیر بالایی را نشان داد (نتایج آورده نشده اند) که بیانگر کاهش تحمل این گیاه نسبت به حضور غلظت‌های بالای ماده رنگزا می‌باشد. بنابراین احتمالا مکانیسم‌های موثر در کنترل جذب و پالایش رنگ در این گیاه با شدت یافتن تنش از قدرت کافی برخوردار نبوده است و کارایی پالایش کاهش یافته است. در مطالعات پیشین پالایش ماده رنگزا AB15 توسط پودر خشک شده آزولا در غلظت‌های مختلف از این ماده رنگزا بررسی گردید، نتایج نشان داد که در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر از ماده رنگزا ، بالاترین درصد پالایش به میزان ۹۸٪ اندازه‌گیری شد (Zazoli et al.,2013). همچنین بررسی جذب رنگ AB 225، توسط گیاه آزولا نشان داد که جذب رنگ به دوز جاذب و غلظت اولیه رنگ و pH بستگی دارد. با افزایش دوز جاذب و زمان تماس راندمان جذب رنگ توسط گیاه افزایش یافت (Sadeghi et al.,2016). در پژوهش حاضر با افزایش مقادیر NaCl کارایی پالایش ماده رنگزا به مقدار قابل توجهی کاهش یافت. شوری آب یک عامل تاثیر گذار بر پالایش مواد رنگزا است. نتایج مطالعه‌ای که در زمینه تاثیر شوری‌آب بر پالایش رنگ آزو AO7صورت گرفت، نشان داد که سطح قابل‌ملاحظه نمک در فاضلاب‌ها، کارایی تصفیه رنگ را کاهش داده و حتی منجر به ایجاد ترکیبات هالوژنه سمی تر می‌شود (Yuan et al.,2012). فاضلاب رنگرزی شامل بسیاری از نمک‌های غیرآلی مانند $NaSO_4$ است که یک عامل بافر کننده در صنایع رنگرزی بحساب می‌آید. بررسی تاثیر $NaSO_4$ بر رنگ زدایی متیل اورانژ نشان داد، هنگامی که مقدار نمک از صفر به ۲۰گرم بر لیتر افزایش یافت، کارایی رنگزدایی طی مدت ۶۰دقیقه، از ۱۰۰درصد به ۸۴درصد کاهش پیدا کرد. آنیون‌های SO_4 می‌توانند در اشغال جایگاه‌های جذب با متیل اورانژ رقابت کرده، بنابراین منجر به کاهش رنگزدایی شوند (Fan et al.,2008). درپژوهش حاضر با افزایش غلظت نیترات درصد پالایش روند کاهشی نشان داد. این یافته با نتایج گزارش پیشین مطابقت دارد. در مطالعه پیشین میزان رنگ زدایی رنگ بنفش ۷، در۷= pH، محدوده دمایی ۴۰-۳۵ درجه سانتی‌گراد و در حضور نیترات نشان داد که نیترات اثر مهاری شدیدی بر رنگزدایی رنگ بنفش ۷دارد، بطوریکه در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از نیترات منجر به افت ۱۰درصدی و غلظت ۱۰۰۰میلی‌گرم در لیتر منجر به توقف کامل رنگ‌زدایی گردید (Yu et al.,2001). در این مطالعه مشخص شد افزایش درجه سختی آب روند کاهشی درصد پالایش را در پی دارد. در پژوهش قبلی مشخص شد که میزان رنگ‌زدایی رنگ آزو Black T با افزایش غلظت $CaCO_3$ به میزان ۳۶۰ میلی‌گرم در لیتر به مقدار قابل توجهی

کاهش یافت این امر می‌تواند به دلیل ایجاد کمپلکس‌های آلی کلسیم- رنگ و افزایش پایداری رنگ رخ داده باشد (Dos Santos et al.,2016).

تایج پژوهش حاضر نشان داد که گیاه آزولا توانایی پالایش ماده رنگزا AB62 را دارد.کارایی پالایش گیاه بشدت تحت تاثیر غلظت ماده رنگزا و سایر عوامل مانند میزان شوری، غلظت نیتروژن و درجه سختی آب قرار دارد. غلظت ماده رنگزا و درجه سختی آب به ترتیب بیشترین و کمترین تاثیر را در پالایش ماده رنگزا AB62 توسط گیاه آزولا دارد. در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر از ماده رنگزا و عدم حضور هریک از فاکتورهای شوری و سختی و نیتروژن بیشترین درصد پالایش به میزان ۳۵ درصد اندازه‌گیری شد.

منابع

1. Aksu, Z. and Karabayır, G., 2008. Comparison of biosorption properties of different kinds of fungi for the removal of Gryfalan Black RL metal-complex dye. *Bioresource Technology*, *99*(16), pp.7730-7741.
2. Alkan, M., Çelikçapa, S., Demirbaş, Ö. and Doğan, M., 2005. Removal of reactive blue 221 and acid blue 62 anionic dyes from aqueous solutions by sepiolite. *Dyes and Pigments*, *65*(3), pp.251-259.
3. Burezq, H. and Aliewi, A., 2018. Using phytoremediation by decaying leaves and roots of reed (Phragmites austrates) plant uptake to treat polluted shallow groundwater in Kuwait. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(34), pp.34570-34582.
4. Balarak, D. and Mahdavi, Y., 2016. Experimental and Kinetic Studies on Acid Red 88 Dye (AR88) Adsorption by Azolla Filiculoides. *Biochem & Physiol*, *5*(1), pp.1-5.
5. Çolak, F., Atar, N. and Olgun, A., 2009. Biosorption of acidic dyes from aqueous solution by Paenibacillus macerans: Kinetic, thermodynamic and equilibrium studies. *Chemical Engineering Journal*, *150*(1), pp.122-130.
6. Crini, G. and Badot, P.M., 2008. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. *Progress in polymer science*, *33*(4), pp.399-447.
7. Dos Santos, A.J., De Lima, M.D., Da Silva, D.R., Garcia-Segura, S. and Martínez-Huitle, C.A., 2016. Influence of the water hardness on the performance of electro-Fenton approach: decolorization and mineralization of Eriochrome Black T. *Electrochimica Acta*, *208*, pp.156-163.
8. Fan, J., Guo, Y., Wang, J. and Fan, M., 2009. Rapid decolorization of azo dye methyl orange in aqueous solution by nanoscale zerovalent iron particles. *Journal of Hazardous Materials*, *166*(2-3), pp.904-910.
9. Gücek, A., Şener, S., Bilgen, S. and Mazmancı, M.A., 2005. Adsorption and kinetic studies of cationic and anionic dyes on pyrophyllite from aqueous solutions. *Journal of colloid and interface science*, *286*(1), pp.53-60.

10. Hoang Ha, N.T., Sakakibara, M., Sano, S., Hori, R.S. and Sera, K., 2009. The potential of Eleocharis acicularis for phytoremediation: case study at an abandoned mine site. *Clean–Soil, Air, Water*, *37*(3), pp.203-208.
11. Lejeune, A., Peng, J., Le Boulengé, E., Larondelle, Y. and Van Hove, C., 2000. Carotene content of Azolla and its variations during drying and storage treatments. *Animal Feed Science and Technology*, *84*(3-4), pp.295-301.
12. Pivetz, B.E., 2001. *Phytoremediation of contaminated soil and ground water at hazardous waste sites*. US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Office of Solid Waste and Emergency Response.
13. Prigione, V., Varese, G.C., Casieri, L. and Marchisio, V.F., 2008. Biosorption of simulated dyed effluents by inactivated fungal biomasses. *Bioresource technology*, *99*(9), pp.3559-3567.
14. Rizzo, P.F., Arreghini, S., Serafini, R.J.M., Bres, P.A., Crespo, D.E. and de Iorio, A.R.F., 2012. Remediation of feedlot effluents using aquatic plants. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, *44*(2), pp.47-64.
15. Sadeghi, S., Joghataei, A., Azadi, N.A. and Balarak, D., 2015. Biosorption of acid blue 225 from aqueous solution by Azolla filiculoides: Kinetic and equilibrium studies. *Chemical Science International Journal*, pp.1-9.
16. Shehzad, A., Bashir, M.J., Sethupathi, S. and Lim, J.W., 2015. An overview of heavily polluted landfill leachate treatment using food waste as an alternative and renewable source of activated carbon. *Process safety and environmental protection*, *98*, pp.309-318.
17. Srivastava, M., Begovic, E., Chapman, J., Putnam, N.H., Hellsten, U., Kawashima, T., Kuo, A., Mitros, T., Salamov, A., Carpenter, M.L. and Signorovitch, A.Y., 2008. The Trichoplax genome and the nature of placozoans. *Nature*, *454*(7207), pp.955-960.
18. Talarposhti, A.M., Donnelly, T. and Anderson, G.K., 2001. Colour removal from a simulated dye wastewater using a two-phase anaerobic packed bed reactor. *Water Research*, *35*(2), pp.425-432.
19. Wei, Z., Van Le, Q., Peng, W., Yang, Y., Yang, H., Gu, H., Lam, S.S. and Sonne, C., 2021. A review on phytoremediation of contaminants in air, water and soil. *Journal of hazardous materials*, *403*, p.123658.
20. Yuan, R., Ramjaun, S.N., Wang, Z. and Liu, J., 2011. Effects of chloride ion on degradation of Acid Orange 7 by sulfate radical-based advanced oxidation process: implications for formation of chlorinated aromatic compounds. *Journal of hazardous materials*, *196*, pp.173-179.
21. Yu, J., Wang, X. and Yue, P.L., 2001. Optimal decolorization and kinetic modeling of synthetic dyes by Pseudomonas strains. *Water research*, *35*(15), pp.3579-3586.
22. Zazoli, M.A., Belalak, D., Mahdavi, Y. and Karimnejad, F., 2014. Application of Azolla Filiculoides biomass for Acid blue 15 dye (AB15) Removal from aqueous solutions. *Journal of Basic Research in Medical Sciences*, *1*(1), pp.29-37.

Study of correlation and path coefficient analysis of various agronomic traits and barley grain yield under normal conditions and drought and salinity stress

Somayyeh Makhtoum[1], Hossein Sabouri[2], Abdollatif Gholizadeh[3], Leila Ahangar[3] and Mahnaz Katouzi[4]

1.Department of Plant production, Faculty of Agriculture Science and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad

2. Associate Professor of Plant Production, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad-e-Kavous University,

3. Assistant Professor, Department of Plant Production, Faculty of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gonbad Kavous University

4. Department of Plant breeding and Genetic Resource. Agroscope, 1260 Nyon 1, Switzerland.

*Corresponding Author Email address: somayyeh.makhtoum@yahoo.com

Abstract

In order to study of relationships between various agronomic traits and their influences on barley grain yield, Under normal conditions, salinity and drought, F8 Llines derived from the cross of two cultivars of Badia and Kavir were planted in a completely randomized design were planted in the greenhouse of Gonbad Kavous University in three replications. Among the recorded traits are grain number, Peduncle weight, Shoot thickness, Plant length, Plant weight, grain length, grain thickness, Internode length, Score, awn weight, flag leaf weight, spike length, peduncle weight, Shoot weight, biomass And node number of traits were effective on grain yield. Path analysis was performed based on multiple regression for grain yield. The number of grains per panicle in all three conditions of normal and drought stress and salinity entered the model and the number of grains had the highest correlation effect under normal conditions and salinity stress and the greatest effect in justifying the grain weight And grain thickness in drought stress had the most direct positive effect on grain yield. The results of this study can be used in positive and significant choices to increase grain yield under normal conditions and drought and salinity stress.

Keywords: Barley, Drought and salinity stress, correlation, path coefficient analysis

مطالعه همبستگی و تجزیه علیت صفات زراعی و عملکرد دانه جو در شرایط نرمال و تنش خشکی و شوری

سمیه مختوم *[1]،حسین صبوری ،[2]عبداللطیف قلیزاده ،[3]لیلا آهنگر[3] ومهناز کاتوزی ،[4]

1.دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس
2.دانشیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس
3.استادیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس
4.گروه منابع ژنتیکی و اصلاح نباتات موسسه تحقیقات اگروسکوپ سوئیس

ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: somayyeh.makhtoum@yahoo.com

چکیده

به منظور بررسی روابط بین صفات زراعی و عملکرد دانه جو تحت شرایط نرمال، شوری و خشکی، ۱۰۶ لاین F_8 حاصل از تلاقی دو رقم بادیا×کویر در قالب طرح کاملا تصادفی در گلخانه دانشگاه گنبدکاووس در سه تکرار کشت شدند. از بین صفات ثبت شده تعداد دانه، وزن پدانکل، قطر ساقه، ارتفاع گیاه، وزن کل گیاه، طول دانه، قطر دانه، طول میانگره، کد ژنتیکی، وزن ریشک، وزن برگ پرچم، طول سنبله، وزن پدانکل ، وزن ساقه، بیوماس و تعدادگره صفات تاثیرگذار بر روی عملکرد دانه بودند. تجزیه علیت براساس رگرسیون چند گانه برای عملکرد دانه انجام گرفت. تعداد دانه در خوشه در هر سه شرایط نرمال و تنش خشکی و شوری وارد مدل شد و تعداد دانه بیشترین اثر همبستگی رو در شرایط نرمال و تنش شوری و بیشترین اثر در توجیه وزن دانه‌ها داشت و قطر دانه در تنش خشکی بیشترین اثر مستقیم مثبت را بر عملکرد دانه داشتند. از نتایج این پژوهش می‌توان در انتخاب‌های مثبت و معنی‌دار جهت افزایش عملکرد دانه در شرایط نرمال و تنش خشکی و شوری استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: جو، تنش خشکی و شوری، ضرایب همبستگی، تجزیه علیت.

۱.مقدمه

جو با دامنه وسیع اکولوژیکی و سطح زیر کشت حدود ۵۵ میلیون هکتار و تولید حدود ۱۵۳ میلیون تن، چهارمین محصول مهم غلات بعد از گندم، ذرت و برنج در جهان می‌باشد که به عنوان غذا مورد استفاده انسان و دام قرار می‌گیرد (FAO, 2019). در سال ۱۳۹۳، تولید جو در ایران، ۳ میلیون تن تخمین زده شده است (FAO, 2015). رشد و نمو گیاهان تحت تأثیر خصوصیات ژنتیکی و شرایط

محیط می‌باشد. تنش‌های شوری و خشکی مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی هستند که رشد و نمو محصولات زراعی را کاهش می-دهند(Yagmur and Kaydan. 2008). تنش‌ها باعث تغییرات ساختاری، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در گیاهان گردیده است(Ghosh et al., 2017). ضریب علیت، ضریب رگرسیون جزئی استاندارد شده است که اثر مستقیم یک صفت بر صفت دیگر را اندازه‌گیری میکند و ضریب همبستگی را به دو جزء اثرات مستقیم و غیرمستقیم تقسیم‌بندی می‌کند(Board et al., 1997). همبستگی بین صفات دراصلاح نباتات از اهمیت ویژه‌ای برخودار است، زیرا میزان و نوع رابطه بین دو یا چند صفت را معین میکند (پورمرادی و همکاران، ۱۳۸۹). با محاسبه ضریب همبستگی ماهیت ارتباط بین صفات مشخص نمی‌شود و لازم است ازطریق تجزیه علیت روابط علت و معلولی صفات مشخص شوند(Amiri et al., 2009) تجزیه علیت اثرات مستقیم و غیرمستقیم متغیرهای علت بر روی متغیر معلول را مورد مطالعه قرار می‌دهد. در این روش ضرایب همبستگی بین دو صفت به اجزایی که اثرات مستقیم و غیرمستقیم را اندازه‌گیری میکنند، تفکیک میگردد(Zakizadeh et al., 2010)

سینگ و همکاران (Singh et al., 2014) در بررسی همبستگی بین صفات با عملکرد دانه در جو نشان دادند که عملکرد دانه در جو با وزن هزار دانه، طول پدانکل، تعداد پنجه هر بوته و ارتفاع بوته همبستگی مثبت و معنی‌داری دارد، تجزیه علیت صفات نشان داد وزن هزار دانه بیشترین اثر مستقیم با عملکرد دانه داشت. خدادادی و همکاران (۱۳۹۰) بیان کردند که در گندم صفاتی همچون عرض برگ پرچم و ارتفاع در زمان سنبله رفتن دارای همبستگی معنی‌داری با وزن هزار دانه بوده‌اند و به همراه صفات طول سنبله و طول برگ پرچم به طور معنی‌داری تغییرات وزن هزار دانه را توجیه نمودند. همچنین اظهار داشتند که از صفات مذکور می‌توان به عنوان شاخص‌های انتخاب برای وزن هزار دانه در جامعه مورد مطالعه استفاده کرد. هدف از این پژوهش، برآورد ضرایب همبستگی و علیت صفات مهم زراعی در جو، جهت تعیین بهترین صفت مؤثر بر عملکرد دانه در برنامه‌های اصلاح نباتات بود.

۲.مواد و روش‌ها:

۲-۱-ارزیابی‌های فنوتیپی

جهت مکان‌یابی QTLهای کنترل‌کننده صفات زراعی جو ۱۰۶ لاین F_8 حاصل از تلاقی دو رقم بادیا × کویر در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در سال زراعی ۱۳۹۷-۱۳۹۸تحت شرایط نرمال، شوری و خشکی در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه گنبدکاووس مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای کشت از گلدان‌های ۵ کیلویی استفاده شد، برای هر لاین تعداد ۷ عدد بذر در گلدان قرار داده شد.

۲-۲-اعمال تنش

برای اعمال تنش خشکی، لاین‌ها تا پایان مرحله رویشی در خاکی با میزان رطوبت حدود ۰/۸ ظرفیت زراعی (۲۰ درصد رطوبت وزنی) نگهداری شدند. سپس، آبیاری با فاصله یک هفته انجام شد. میزان رطوبت وزنی بعد از پایان هر هفته به حدود ۹ درصد رطوبت وزنی می رسید. برای تنظیم میزان رطوبت، با محاسبه میزان کاهش رطوبت در گلدان، مقدار کمبود آب تا رسیدن به میزان مطلوب (۲۰درصد رطوبت وزنی) جبران شد.

برای اعمال تنش شوری نیز لاین‌ها تا پایان مرحله رویشی به صورت نرمال نگهداری شدند و سپس در مرحله آبستنی با آب شور ۱۶ دسی‌زیمنس بر متر ($dS.m^{-1}$) از منبع کلرید سدیم آبیاری شدند. یادداشت برداری‌ها از هر رقم در هر تکرار برای پنج بوته رقابت کننده انجام شد و ارتفاع گیاه، طول ساقه، طول سنبله، طول ریشک، طول برگ پرچم، عرض برگ پرچم، طول برگ، طول میانگره، طول پدانکل، عرض برگ، تعداد برگ، تعداد گره، قطر پدانکل، قطر سنبله، قطر ساقه، وزن ساقه، وزن سنبله، وزن دانه‌ها، وزن ریشک، وزن پدانکل، وزن برگ‌ها، وزن برگ پرچم، طول دانه، تعداد دانه، قطر دانه، وزن کل خوشه، تعداد بوته، وزن کل گیاه، وزن کاه و کد ژنتیکی براساس لورستو و چانگ(Loresto and Chang, 1981) و (Yoshida et al.,1976) اندازه‌گیری شدند. جهت محاسبات آماری در این تحقیق از نرم افزار SPSS 23 استفاده شد.

۳.بحث و نتایج

جهت گزینش صفاتی که نقش مهم‌تری در توجیه تغییرات در شرایط نرمال، تنش خشکی و شوری در مرحله زایشی داشتند، از رگرسیون مرحله‌ای به روش پیش‌رونده استفاده شد. نتایج رگرسیون پیش‌رونده در شرایط نرمال نشان داد زمانی که وزن دانه‌ها به عنوان متغیر وابسته و سایر صفات به عنوان متغیر مستقل در نظر گرفته شدند به ترتیب تعداد دانه، وزن پدانکل، قطر ساقه، ارتفاع گیاه، وزن کل گیاه و طول دانه وارد مدل شدند ۸۹/۲ درصد تغییرات وزن دانه‌ها را توجیه نمودند(جدول۱). در شرایط تنش خشکی به ترتیب قطر دانه، تعداد دانه، طول میانگره، کد ژنتیکی، وزن ریشک، وزن برگ پرچم، طول سنبله و وزن پدانکل وارد مدل شدند ۷۸ درصد تغییرات وزن دانه‌ها را توجیه نمودند و در تنش شوری به ترتیب تعداد دانه، وزن ساقه، کد ژنتیکی، قطر ساقه، طول میانگره، بیوماس و تعداد گره وارد مدل شدند و ۸۶/۲ درصد تغییرات وزن دانه‌ها را توجیه نمودند(جداول ۲و۳).

جدول۱: رگرسیون پیش‌رو در شرایط نرمال برای زمانی وزن دانه‌ها به عنوان متغییر وابسته و سایر صفات به عنوان متغییر مستقل باشند.

متغییر وارد شده به مدل	ضریب رگرسیون	میانگین مربعات	F	R^2
تعداد دانه	۰/۰۳۱**	۴/۶۴۴	۲۷۱/۸۵۷	۷۲/۹
وزن پدانکل	۰/۹۵۶*	۲/۶۹۷	۲۷۶/۷۰۴	۸۴/۷
قطر ساقه	۰/۲۰۲**	۱/۸۴۲	۲۱۶/۶۱۷	۸۶/۸
طول گیاه	۰/۰۰۷**	۱/۴۰۳	۱۸۱/۸۱۱	۸۸/۱
بیوماس	۰/۰۰۲*	۱/۱۲۹	۱۵۱/۵۱۵	۸۸/۶
طول دانه	۰/۴۱۷*	۰/۹۴۶	۱۳۱/۵۰۹	۸۹/۲

جدول۲:رگرسیون پیش‌رو در شرایط تنش خشکی برای زمانی که وزن دانه‌ها به عنوان متغییر وابسته و سایر صفات به عنوان متغییر مستقل باشند

متغییر وارد شده به مدل	ضریب رگرسیون	میانگین مربعات	F	R^2
قطر دانه	۰/۳۰۵**	۱/۵۰۱	۱۱۱/۵۱۱	۵۲/۵
تعداد دانه	۰/۰۱۲**	۰/۹۴۸	۹۸/۳۹۹	۶۶/۳
طول میانگره	-۰/۰۱۷*	۰/۶۷۶	۸۰/۵۱۳	۷۰/۹
کد ژنتیکی	-۰/۰۲۴**	۰/۵۲۲	۶۶/۲۰۹	۷۳/۰
وزن ریشک	۱/۸۵۷**	۰/۴۲۵	۵۶/۱۷۶	۷۴/۳
وزن برگ پرچم	-۴/۴۹۵**	۰/۳۶۰	۴۹/۶۰۵	۷۵/۶
طول سنبله	-۰/۰۲۳**	۰/۳۱۴	۴۴/۹۳۲	۷۶/۸
وزن پدانکل	۰/۸۴۸*	۰/۲۷۹	۴۱/۷۲۴	۷۸/۰

جدول۳: رگرسیون پیش‌رو در شرایط تنش شوری برای زمانی که وزن دانه‌ها به عنوان متغییر وابسته و سایر صفات به عنوان متغییر مستقل باشند.

متغییر وارد شده به مدل	ضریب رگرسیون	میانگین مربعات	F	R^2
تعداد دانه	۰/۰۲۵*	۳/۹۸۵	۱۴۶/۶۴۳	۵۹/۲
وزن ساقه	۰/۶۵۲**	۲/۵۳۴	۱۵۲/۴۶۱	۷۵/۳
کدژنتیکی	-۰/۰۵۴**	۱/۸۵۱	۱۵۵/۸۹۰	۸۲/۵
قطر ساقه	۰/۰۸۸**	۱/۴۰۶	۱۲۴/۶۴۹	۸۳/۶
طول میانگره	-۰/۰۱۹*	۱/۱۳۶	۱۰۵/۲۱۸	۸۴/۴
بیوماس	۰/۰۰۴**	۰/۹۶۰	۹۴/۸۴۵	۸۵/۶
تعداد گره	-۰/۰۴۸*	۰/۸۲۹	۸۵/۰۱۳	۸۶/۲

با استفاده از ضرایب همبستگی بین صفات مختلف می‌توان در مورد شاخص‌های انتخاب غیرمستقیم و حذف صفات غیر موثر به طور دقیق‌تری تصمیم‌گیری نمود (گلپرور و همکاران، ۱۳۸۱). در این بررسی همبستگی وزن دانه‌ها با بقیه صفات بررسی شد. در شرایط نرمال وزن دانه‌ها با وزن پدانکل(۰/۶۹۴) با تعداد دانه (۰/۸۵۴) و بیوماس (۰/۶۴۹) همبستگی مثبت و معنی‌داری داشت و در شرایط تنش خشکی وزن دانه‌ها با وزن ریشک (۰/۵۳۹) و با وزن پدانکل(۰/۳۶۸)، تعداد دانه (۰/۴۶۰) و قطر دانه (۰/۷۲۴) همبستگی مثبت و معنی‌داری داشت و با کد ژنتیکی (۰/۶۶۷-) رابطه منفی و معنی‌داری داشت. همبستگی در شرایط تنش شوری وزن دانه‌ها با طول میانگره(۰/۳۶۸)، قطر ساقه(۰/۶۰۳) و وزن ساقه (۰/۶۵۸) همبستگی مثبت و معنی‌داری داشت و با کد ژنتیکی (۰/۷۶۴-) رابطه منفی و معنی‌داری داشت.

نتایج تجزیه علیت نشان داد که صفات مختلفی در توجیه وزن دانه‌ها در شرایط بدون تنش و تنش خشکی و شوری نقش داشتند در شرایط نرمال نشان داد (جدول ۴) که بیشترین اثر مستقیم، مربوط به صفت تعداد دانه در خوشه (۰/۵۶۳) بود و همچنین در شرایط تنش شوری هم تعداد دانه(۰/۴۳۰) در خوشه دارای بالاترین اثر مستقیم و مثبت بر وزن دانه‌ها بود(جدول ۵). در شرایط تنش خشکی (جدول۶) که بیشترین اثر مستقیم، مربوط به صفت قطر دانه (۰/۵۶۰) بود.

داداشی و همکاران (۱۳۸۹) نشان دادند که وزن هزار دانه، دارای بیشترین اثر مستقیم بر عملکرد دانه جو بود. اثر مستقیم تعداد دانه در سنبله و تعداد پنجه بارور بر عملکرد دانه، مثبت و معنی‌دار بود. محمدی نیا و همکاران (۱۳۹۳) گزارش کردند که صفات تعداد پنجه بارور و وزن هزار دانه، بیشترین همبستگی مثبت و معنی‌دار با عملکرد دانه جو داشتند. تعداد پنجه بارور، دارای بیشترین اثر مستقیم بر عملکرد دانه بود. بابایی و همکاران (۱۳۹۲) بیان کردند که بیوماس بیشترین اثر مستقیم مثبت و تعداد پنجه بارور از طریق بیوماس، بیشترین اثر غیرمستقیم مثبت را بر عملکرد دانه جو داشتند.

جدول۴ : تجزیه علیت صفات برگزیده بر روی عملکرد دانه در شرایط نرمال

	تعداد دانه	وزن پدانکل	قطر ساقه	طول گیاه	بیوماس	طول دانه	وزن دانه‌ها
تعداد دانه	۰/۵۶۳	۰/۰۶۲	۰/۱۱۴	۰/۰۵۰	۰/۰۵۹	۰/۰۰۴	۰/۸۵۲
وزن پدانکل	۰/۲۵۶	۰/۱۳۷	۰/۱۳۷	۰/۱۰۶	۰/۰۴۷	۰/۰۰۹	۰/۶۹۲
قطر ساقه	۰/۳۰۷	۰/۰۹۰	۰/۲۰۹	۰/۰۷۵	۰/۰۴۲	-۰/۰۰۱	۰/۷۲۵
طول گیاه	۰/۱۷۶	۰/۹۰۸	۰/۹۸۶	۰/۱۶۱	۰/۲۶۹	۰/۰۷۷	۰/۵۶۲
بیوماس	۰/۳۴۴	۰/۰۶۶	۰/۰۹۲	۰/۰۴۴	۰/۰۹۷	۰/۰۰۴	۰/۶۴۹
طول دانه	۰/۰۳۵	۰/۰۱۸	۰/۰۰۴	۰/۰۱۷	۰/۰۰۶	۰/۰۷۲	۰/۱۴۸

جدول۵ : تجزیه علیت صفات برگزیده بر روی عملکرد دانه در شرایط تنش خشکی

	قطر دانه	تعداد دانه	طول میانگره	کد ژنتیکی	وزن ریشک	وزن برگ پرچم	طول سنبله	وزن پدانکل	وزن دانه ها
قطر دانه	۰/۵۶۰	۰/۰۳۵	-۰/۰۰۶	۰/۱۰۷	۰/۰۶۸	-۰/۰۱۷	-۰/۰۵۲	۰/۰۲۹	۰/۷۲۴
تعداد دانه	۰/۰۷۰	۰/۲۸۰	-۰/۰۱۸	۰/۰۹۵	۰/۱۰۸	-۰/۰۷۸	-۰/۰۸۵	۰/۰۸۷	۰/۴۵۹
طول میانگره	۰/۰۳۸	۰/۰۵۰	-۰/۱۰۲	-۰/۰۰۹	-۰/۰۰۳	-۰/۰۳۷	-۰/۰۷۳	۰/۳۹۴	-/۰۹۸
کد ژنتیکی	-۰/۲۹۲	-۰/۱۲۹	-۰/۰۰۴	-۰/۲۰۶	-۰/۰۷۷	۰/۰۳۷	۰/۰۵۳	-۰/۴۷۵	-۰/۶۶۶
وزن ریشک	۰/۱۸۶	۰/۱۴۷	۰/۰۰۱	۰/۰۷۷	۰/۲۰۷	-۰/۰۸۰	-۰/۰۷۷	۰/۰۷۷	۰/۵۳۹
وزن برگ پرچم	۰/۰۵۲	۰/۱۱۸	-۰/۰۲۰	۰/۰۴۲	۰/۰۸۹	-۰/۱۸۶	-۰/۰۵۳	۰/۰۸۶	۰/۱۳۰
طول سنبله	-/۱۶۶	۰/۱۳۵	-۰/۰۴۲	۰/۶۲۸	۰/۹۰۸	-۰/۰۵۳	-۰/۱۷۶	۰/۰۷۷	۰/۲۶۱
وزن پدانکل	۰/۱۰۵	۰/۱۵۷	-۰/۰۲۵	۰/۶۲۸	-۰/۱۰۲	۰/۱۰۲	-۰/۰۸۷	۰/۱۵۶	۰/۳۶۸

جدول۶ : تجزیه علیت صفات برگزیده بر روی عملکرد دانه در شرایط تنش شوری

	تعداد دانه	وزن ساقه	کد ژنتیکی	قطر ساقه	طول میانگره	بیوماس	تعداد گره	وزن دانه-ها
تعداد دانه	۰/۴۳۰	۰/۱۱۹	۰/۱۸۵	۰/۰۳۸	-۰/۰۶۷	۰/۰۶۸	-۰/۰۰۴	۰/۷۶۹
وزن ساقه	۰/۱۵۹	۰/۳۲۱	۰/۱۶۰	۰/۰۶۴	-۰/۰۵۶	۰/۴۲۰	-۰/۰۰۵	۰/۶۵۸
کدژنتیکی	-۰/۲۴۳	-۰/۱۵۷	-۰/۳۲۷	-۰/۰۳۱	۰/۰۴۵	-۰/۰۵۰	-۰/۰۰۲	-۰/۷۶۵
قطر ساقه	۰/۱۷۸	۰/۲۲۶	۰/۱۱۲	۰/۰۹۲	-۰/۰۶۹	۰/۰۴۶	۰/۰۱۵	۰/۶۰۳
طول میانگره	۰/۱۸۱	۰/۱۷۱	۰/۰۹۲	۰/۰۳۹	-۰/۱۶۰	۰/۰۵۴	۰/۰۰۵	۰/۳۸۶
بیوماس	۰/۲۱۵	۰/۰۹۹	۰/۱۲۰	۰/۰۳۱	-۰/۰۶۴	۰/۱۳۶	-۰/۰۰۳	۰/۵۳۶
تعداد گره	۰/۰۲۰	۰/۰۱۹	۰/۰۰۸	-۰/۰۱۶	۰/۰۱۰	۰/۰۰۵	-۰/۰۸۸	-۰/۰۴۲

۴.نتیجه‌گیری

رگرسیون یکی از کاربردی‌ترین روش‌های آماری می‌باشد که در مطالعه روابط بین متغیرها در علوم مختلف از جمله کشاورزی کاربرد دارد زیرا روابط بین متغییرها را به سادگی و به صورتی با مفهوم بیان میکند. در این بررسی وزن پدانکل در دو شرایط نرمال و خشکی وارد مدل شد و قطر ساقه و بیوماس در شریط نرمال و شوری وارد مدل شد. تعداد دانه در هر سه شرایط نرمال و تنش خشکی و شوری وارد مدل شد و تعداد دانه بیشترین اثر همبستگی رو در شرایط نرمال و تنش شوری و بیشترین اثر در توجیه وزن دانه‌ها داشت. کد ژنتیکی هم در شرایط تنش خشکی و شوری با وزن دانه همبستگی منفی داشت چون گیاهانی که دارای واکنش بهتری

به تنش خشکی و شوری داشتند (کد ژنتیکی کمتر) از نظر صفات مذکور ارزش بیش‌تری را به خود اختصاص داده بودند. بررسی روابط بین صفات در ارقام مختلف جزء مهمی از برنامه‌های اصلاحی است زیرا اطلاعاتی در مورد تنوع ژنتیکی محصولات زراعی به منظور ایجاد جمعیت‌های اصلاحی مناسب در دسترس قرار می دهد.

منابع

۱. بابایی، ع. ح.، اهری زاد، س.، محمدی، س. ا. ، یارنیا، م.، نوروزی، م. ۱۳۹۲. شناسایی صفات مؤثر بر عملکرد دانه در لاین های جو (*Hordeum vulgare* L) .(از طریق تجزیه علیت. پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی. ۵(۱۱): ۴۹-۵۹.

۲. پورمرادی، ص.، میرزایی ندوشن، ح. ۱۳۸۹. تجزیه علیت صفات مورفولوژیک مؤثر بر عملکرد علوفه در جمعیت‌هایی از جنس لولیوم (spp Lolium). دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۱۸(۲): ۲۹۴-۳۰۴.

۳. خدادادی، م.، دهقانی، ح.، فتوکیان، م.ح.، ۱۳۹۰. بررسی توارث‌پذیری، تجزیه علّیت و تحلیل عامل‌ها در ژنوتیپ‌های گندم پاییزه (*Triticum aestivum* L.). مجله دانش زراعت. ۴: ۶۷-۷۸.

٤. داداشی، م. ر.، نوری‌نیا، ع. ع.، عسگر، م. عزیزی چاخرچمن ، ش. ۱۳۸۹. ارزیابی همبستگی تعدادی از خصوصیات فیزیولوژیکی ومورفولوژیکی ارقام جو لخت با عملکرد دانه. مجله علمی- پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی و علف های هرز. ۴(۵): ۲۹-۴۰.

۵. گلپرور، ا. ر.، قنادها، م. ر.، زالی، ع. ع.، احمدی، ع. ۱۳۸۱. ارزیابی برخی از صفات مورفولوژیکی به عنوان معیارهای انتخاب در اصلاح گندم نان. مجله علوم زراعی ایران. ۴(۳) : ۲۰۲-۲۰۷.

٦. محمدی نیا، غ.، نصیرزاده، ع.، نگهداری، ح.، ۱۳۹۳. استفاده از تجزیه علیت در بررسی روابط بین عملکرد و سایر صفات مورفولوژیک در چهار لاین جو آبی. نشریه زراعت (پژوهش و سازندگی). شماره۱۰: ۷۶-۸۳.

7. Amiri S., Nour Mohammadi S., Jafari A.A. and Chougan R. 2009. Correlation, regression and path analysis for grain yield and yield components on early maturing hybrids of grain corn. Journal of Plant Production, 16: 99-112.

8. Board J. E., Kang M.S. and Harville B. G. 1997. Path analyses identify indirect selection criteria for yield of late planted soybean. Crop Science. 37: 879-884.

9. FAO STAT. 2019. FAO Statistical Data. [www.faostat.org.]

10. FAO. FAOSTAT. 2015. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

11. Ghosh D., Lin Q., Xu J. and Hellmann H. A. 2017 .How plants deal with stress: exploration through proteome investigation. Frontiers in Plant Science 8 (1176): 1-2.

12. Loresto G.C, Chang T.T .1981 .Decimal scoring system for drought reactions and recovery ability in screening murseries of rice. International rice research notes 6: 9–10.

13. Singh I., Prasad L.C., Madakemohekar A.H. and Bornare. S.S. 2014. Genetic varibility and character association diverse genotypes of barley (*hordeum vulgare* L.). Journal of Genetics and Plant Breeding.9(3): 759-761.

14. Yagmur M. and Kaydan D. 2008. Early seedling growh and relative water content of-Triticale varieties under osmotic stress of water and NaCl. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 4: 767- 772.

15. Yoshida S, Forno D.A, Cock J.H, Gomez K.A. 1971. Laboratory manual for physiological studies of rice. IRRI. Los Babos. Philippines.PP.61.

16. Zakizadeh M., Esmaeilzadeh Moghaddam M. and Kahrizi D. 2010. Study on genetic variation and relationship between plant characteristics and grain yield in long spike bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypesusing multivariate analysis. Iranian Journal of Crop Science. 12: 18-30.

Investigation of genetic variation of wheat genotypes using random markers

Jamshid Azizi*[1]; Hossein Sabouri[2]; Fakhtak Taliei[3]; Seyed Javad Sajjadi[3]; Habibollah Sooghi[4]; Hossein Ali Fallahi[5]

Master student of Plant Production Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University,

2- Associate Professor, Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University,

3- Assistant Professor, Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University ,

4- Assistant Professor of Agricultural and Horticultural Research Department, Golestan Agricultural and Natural Resources Research and Training Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization,

5- Assistant Professor of Agricultural Engineering and Natural Resources Research Center of Mazandaran Province Agricultural and Horticultural Research Department.

Corresponding Author Email address: j.azizi0911@gmail.com

Abstract

Wheat is one of the oldest and most important crops used by humans. In breeding programs, different methods in genetic diversity are examined. The aim of this study was to investigate the genetic diversity of 46 wheat genotypes using 13 random primers CAAT and SCoT. The primers used were able to identify a total of 81 locations, showing 49 polymorphic locations. The lowest percentage of polymorphism with 50% was assigned to primers (SCoT2) and (SCoT3). Primers CAAT5, SCoT7 and SCoT1 with the highest percentage of polymorphism were 75.00, 70.00 and 66.67%, respectively, were suitable markers for studying the genetic diversity of wheat genotypes. SCoT7 marker with 7 alleles had the highest number of polymorphic alleles and SCoT1 and SCoT3 markers with 2 alleles had the lowest number of polymorphisms. The highest number of alleles was related to CAAT1 marker and the lowest number of alleles was related to SCoT7 marker. The overall content of polymorphic information (PIC) ranged from 0.31 to 0.50 with an average of 0.41. Reed index showed the amount of variability from 0.30 to 0.49 and SCoT1 primer with 0.49 had the highest and SCoT6 primer with 0.30 had the lowest value of reed index. Cluster analysis divided the genotypes into four groups. The results of this research can be used in wheat breeding programs for crossbreeding of different cultivars**.**

Keywords : Wheat, Genetic diversity, CAAT, SCoT

بررسی تغییرات ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم با استفاده از نشانگرهای تصادفی
Investigation of genetic variation of wheat genotypes using random markers

جمشید عزیزی*[۱]؛ حسین صبوری[۲] ؛ فاختک طلیعی[۳]؛ سیدجواد سجادی[۳]؛ حبیب اله سوقی[۴] ؛ حسینعلی فلاحی[۵]

۱-دانشجو کارشناسی ارشد گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس،

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

۳- استادیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس،

۴- استادیار بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی،

۵- استادیار مهندسی کشاورزی مرکز تحقیقات اموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی j.azizi0911@gmail.com

چکیده

گندم از جمله قدیمی ترین و مهم ترین گیاهان زراعی مورد استفاده انسان می‌باشد. در برنامه‌های اصلاحی روش‌های متفاوتی در تنوع ژنتیکی مورد بررسی قرار می‌گیرد. هدف از این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی ۴۶ ژنوتیپ گندم با استفاده از ۱۳ آغازگر تصادفی CAAT و SCoT بود. آغازگرهای مورد استفاده در مجموع توانستند ۸۱ مکان را شناسایی کنندکه ۴۹ مکان چند شکلی نشان دادند. کمترین درصد چند شکلی با مقدار ۵۰ درصد به آغازگرهای (SCoT2) و (SCoT3) اختصاص یافت. آغازگرهای CAAT5، SCoT7 و SCoT1 با داشتن بالاترین میزان درصد چند شکلی به ترتیب ۷۵/۰۰ و ۷۰/۰۰ و ۶۶/۶۷ درصد، نشانگرهای مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم بودند. نشانگر SCoT7 با ۷ آلل دارای بیشترین تعداد آلل چندشکل و نشانگرهای SCoT1 و SCoT3 با ۲ آلل دارای کمترین تعداد چند شکل بودند. بیشترین تعداد آلل مربوط به نشانگرCAAT1 و کمترین تعداد آلل مربوط

به نشانگرSCoT7 بود. محتوای کلی اطلاعات چند شکلی (PIC) از ۰/۳۱ تا ۰/۵۰ با میانگین ۰/۴۱ متغیر بودند. شاخص نی نشان داد میزان تنوع از ۰/۳۰ تا ۰/۴۹ متغیر و آغازگر SCoT1 با مقدار ۰/۴۹ بیشترین و آغازگر SCoT6 با مقدار ۰/۳۰ کمترین مقدار شاخص نی را داشت. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها را به چهار گروه تقسیم بندی کرد. از نتایج این تحقیق می‌توان در برنامه‌های به نژادی گندم جهت تلاقی‌های ارقام مختلف استفاده نمود.

واژگان کلیدی : گندم، تنوع ژنتیکی، CAAT، SCoT

۱.مقدمه

گندم از خانواده گندمیان (Gramine) و از جنس Triticum است. گندم بالاترین سطح زیر کشت و تولید را در بین غلات دارد. گندم دارای ۲۰ درصد پروتئین روزانه و کالری ۴/۵ میلیارد نفر از مردم جهان را تامین می‌کند. سطح زیر کشت گندم در ایران تقریبا ۶/۱۵۲/۶۶۷ میلیون هکتار می‌باشد. (FAO2021) در مجموع این سطح زیرکشت حدود ۴/۱۴۷/۸۲۰ میلیون هکتار کشت دیم اختصاص داده شده است و میزان کشت ابی ۲/۰۰۴/۸۴۷ میلیون هکتار است. اصلاح گران به دنبال کاهش تاثیرات محیطی و افزایش عملکرد محصولات، در طول زمان با انتخاب گیاهان، که سبب کاهش ذخایر ژنتیکی گیاه می‌شوند. تنوع ژنتیکی یکی از مهم‌ترین عوامل بقا در گیاهان و جانوران برای تغییرشرایط محیطی و افت ها می‌باشد. استفاده از تنوع ژنتیکی یکی از فرصتهای بهبود تولیدات کشاورزی و کلید دستیابی به امنیت غذایی جهانی میباشد. تنوع ژنتیکی پایه اصلاح گیاهان است و انتخاب به تنوع ژنتیکی صفات مورد بررسی بستگی دارد.(تیلمن و همکاران۲۰۰۱)

از نشانگرهای مولکولی برای استفاده از تنوع ژنتیکی در گیاهان، نقشه‌یابی ژنتیکی، انتخاب نشانگرها با صفات مورد استفاده، پژوهش های اکولوژیکی، برای تهیه نقشه‌های ژنومی استفاده می‌شود. به طورکلی نشانگر مورد استفاده باید دو ویژگی را دارا باشد. ۱ـ بین دو فرد چندشکلی و یا متفاوت دارد.۲ـ به توارث رسیدن نشانگرهای ژنتیکی به عنوان نشانه‌ای برای شناسایی حامل صفت مورد استفاده تلقی شود (نقوی و همکاران ۱۳۸۸) به منظور بررسی صفات و تاثیرات مستقیم و غیر مستقیم عملکرد دانه های گندم در ۱۸ لاین و به مدت سه سال زراعی در خرم اباد ارزیابی شد (رحمتی و همکاران ۱۳۹۷). در این تحقیق تنوع ژنتیکی و فنوتیپی نشان داد که طول پدانکل، عملکرد دانه و تعداد سنبله در متر مربع دارای تنوع ژنتیکی بالایی بودند. تنوع ژنتیکی۳۵ ژنوتیپ گندم که بر اساس نشانگر ریز ماهواره ای از ۱۵ جفت نشانگر ریز ماهواره ای و ۱۳ آلل مشاهده شده بررسی شدند. آلل مشاهده شده و میانگین کل الل ها در مجموع کل مکان‌های ژنی بدست امد. در این تحقیق از روش جاکارد به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۱۶ گونه Aegilops crassa با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR در ۱۰۵ آلل تکثیر شده و درصد چند شکلی بودن ان (۸۱/۹۰) تشخیص داده شدند. در تعدار تکثیر الل ها از ۶ تا ۱۵ با میانگین ۱۱ آلل متغییر بود (خرمی فرد و همکاران ۱۳۹۶). تحقیق برروی ۶۳ ژنوتیپ گندم واقع در ایستگاه تحقیقاتی گرگان بررسی شد. نتایج تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش UPGMA ژنوتیپ‌ها به ۳ گروه تقسیم بندی شد. نتایج ارتباط که از ۱۶ جفت آغازگر و تعداد ۹۹ آلل چندشکل بود. نشانگرهای SCoT بیشترین درصد چند شکلی و CBDP کمترین میزان چندشکلی را داشتند نتایج نشان داد در برنامه اصلاحی آینده و بررسی تنوع ژنتیکی میتواند از نشانگر SCoT، CBDP استفاده کرد (نعیمی و همکاران ۱۴۰۰). تنوع ژنتیکی گندم نان، گندم دروم و تریتیکاله با استفاده از صفات فیزیولوژیکی و زراعی انجام گرفت و بررسی بر روی ۲۴ ژنوتیپ که در دو ناحیه در قالب طرح کامل تصادفی با دو تکرار در سال زراعی ۹۶ -۹۵ صورت گرفت. این مطالعه بر روی ۲۱ ژنوتیپ گندم نان و دو ژنوتیپ گندم دوروم و تریتیکاله مورد بررسی قرار گرفت (علی پور کندری و همکاران ۱۳۹۹). این پژوهش به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم گندم با استفاده از نشانگرهای CAAT و SCoT انجام شد.

۲.مواد وروشها:

استخراج DNA

این پژوهش در سال ۱۳۹۸- ۱۳۹۹ در دانشگاه گنبد کاووس انجام گرفت ژنوتیپ های مورد بررسی از ایستگاه تحقیقات ساری در یافت شد. استخراج DNA از ۴۶ ژنوتیپ گندم در آزمایشگاه دانشگاه گنبدکاووس انجام شد. هر ژنوتیپ نمونه ای از برگ های جوان وقتی که گیاه در مرحله رشد ۳ الی ۴ برگی انتخاب شدند. از ازت مایع جهت آسیاب برگ‌ها استفاده گردید از پودر بافت گیاهی اسیاب شده مقدار یک سوم در تیوب های ۱/۵ ریخته شده و در فریزر ۲۰- نگهداری شد. استخراج DNA برگ‌ها را به روشCTAB (ساقی معروف و همکاران ۱۹۹۴)انجام شد. بررسی کیفیت و کمیت DNA، در این تحقیق و بررسی از ژل ۸ درصد با استفاده از الکتروفورز افقی ساخت انگلیس مدل Bioneer انجام شد. مشاهده DNA استخراج شده از دستگاه Geldoc ساخت شرکت UPV امریکا کیفیت هر ژنوتیپ مورد ارزیابی قرار گرفت و از ۱۳ نشانگر مولکولی CAAT و SCoT برروی بررسی تنوع مولکولی استفاده شد.

روش الکتروفورز با ژل آگارز، روش سریع و ساده برای تعیین کیفیت DNA می‌باشد که بر مبنای بارگذاری DNA روی ژل آگارز استوار است. برای کیفیت DNA استخراج شده از الکتروفورز افقی استفاده شد و از طریق نحوه تشکیل نوارها روی ژل توسط هر نمونه در جریان الکتروفورز کیفیت نمونه‌ها پیش بینی شد. به این ترتیب که مشاهده یک نوار ممتد کشیده شده در کل مسیر حرکت DNA در روی ژل حاکی از شکسته شدن و کیفیت نامطلوب DNA ژنومی استخراج شده و وجود کشیدگی در انتهای نوارها و نیز در داخل چاهک‌ها آلودگی نمکی است. همچنین مشاهده نوارهای اضافی در پایین ژل افقی نشان دهنده وجود RNA در نمونه‌ها می‌باشد. در مقابل مشاهده نوارهای کاملا واضح و بدون کشیدگی نشان دهنده کیفیت خوب DNA ژنومی استخراج شده است.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز PCR

این واکنش در دستگاه ترموسایکلرکه یک انکوباتور کاملا اتوماتیک و قابل برنامه‌ریزی است انجام شد. در این تحقیق برای تکثیر DNA از دستگاه ترموسایکلر، با بلوک ۹۶ تایی برای تیوپ‌های PCR به حجم ۰/۲ میلی‌لیتر استفاده شد. مواد مورد استفاده حاوی بافرX۱۰، ۵۰ میلی مول$_2$ mgcl، ۱۰ میلی مول Dntp و ۵۰ میلی مول آنزیم Tag DNA polymerase، آب دیونیزه و روغن معدنی بود. پس از اضافه کردن کلیه مواد و رساندن نمونه به حجم نهایی مورد نظر، میکروتیوپ‌های حاوی نمونه به مدت چند ثانیه (٤ ثانیه) تا ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و سپس یک قطره روغن معدنی به هر نمونه اضافه گردید تا از تبخیر محتویات لوله هنگام PCR جلوگیری شود. کلیه مراحل آماده‌سازی مواد مورد استفاده در واکنش بر روی یخ انجام گرفت.

جدول۱:لیست ارقام و ژنوتیپ‌های گندم مورد بررسی

رقم	شماره	رقم	شماره	رقم	شماره	رقم	شماره	رقم	شماره
وری ناک	41	گنبد	31	هاشمی	21	ur-92-15	11	SOMdi3	1
روشن	42	البرز	32	جوانیلوا	22	لاین۱۷	12	شیرودی	2
نیک نژاد	43	مروارید	33	پاژ	23	لاینA	13	زرین	3
میلان	44	گهر	34	طبسی	24	قابوس	14	احسان	4
بزوسیا	45	چناب	35	قلدت	25	زاگرس	15	تیرگان	5

شانگهایی	46	سایونر	36	پاستور	26	کریم	16	رادیان	6
		رسول	37	مغان	27	کوهدشت	17	کلکتور	7
		گاسپارد	38	N-91-7	28	ET-79-13	18	ارگ	8
		هیرمند	39	مغان ۲	29	ET-86-14	19	قدس	9
		N-80-19	40	ET-79-17	30	سناباد	20	مهرگان	10

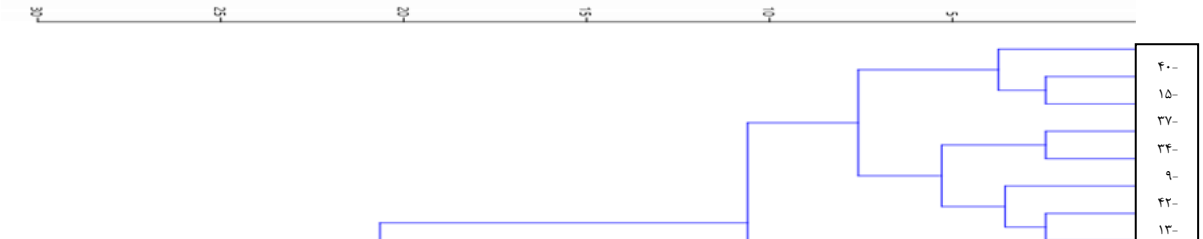
۳.نتایج وبحث :

ازجمله معیارهای تعیین میزان چند شکلی شاخص شانون (I) و تعداد الل موثر (ne) می‌باشد. از میان ۱۳ آغازگر مورد بررسی ۶ اغازگر چند شکلی مناسبی داشتند. آغازگرهای مورد استفاده در مجموع توانستند ۸۱ مکان را شناسایی کنند که ۴۹ مکان از انها چند شکلی را نشان دادند. از ۸۱ باند تشکیل شده ۷۷/۰۵ درصد از باندها چند شکل بودند و ۳۳/۹۵ درصد از باندها یک شکل بودند و نیز میانگین درصد چندشکلی ۶۰/۱۷ درصد بود. انتظار می‌رود که این نشانگرها به عنوان یک ابزار قدرتمند در شناسایی و تفکیک ژنوتیپ های گندم عمل نمایند. نشانگر SCoT7 با ۱۰ باند بیشترین تعداد باند و نشانگر SCoT1 با ۳ باند کمترین تعداد باند را داشتند. آلل‌های چند شکل شناسایی شده برای هر نشانگر از ۲ تا ۷ آلل متغیر بود و به طور متوسط ۳/۷۶ آلل بود. محتوای اطلاعات چند شکلی نیز بین ۰/۳۵ تا۰/۴۴ متغیر بود و به طور متوسط ۰/۴۱ بود.

از معیارهای دیگر برای ارزیابی کارایی نشانگر در تعیین چند شکلی شاخص شانون است که بیشترین مقدار ان برای نشانگر SCoT-1 با مقدار ۰/۶۸۹ به دست آمد. همچنین یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در بین کل ژنوتیپ‌ها شاخص نی است. براورد شاخص نی نشان داد میزان تنوع از ۰/۳۰ تا ۰/۴۹ متغییر است و آغازگر SCoT1 با مقدار ۰/۴۹ بیشترین و آغازگر SCoT6 با مقدار ۰/۳۰ کمترین مقدار شاخص نی را داشتند. نشانگرهای (CAAT5)، (SCoT7)، (SCoT6) و (SCoT1) نسبت به سایر ترکیبات نشانگری مقادیر بالاتری را به خود اختصاص دادند. در حقیقت می‌توانند در تمایز ژنوتیپ‌ها نقش بارزتری ایفا کنند. کمترین درصد چند شکلی با مقدار ۵۰ درصد به آغازگرهای (SCoT2) و (SCoT3) اختصاص یافت. آغازگرهای CAAT5، SCoT7 و SCoT1 با داشتن بالاترین میزان درصد چند شکلی به ترتیب ۷۵/۰۰ و ۷۰/۰۰ و ۶۶/۶۷ درصد، نشانگرهای مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم بودند. نشانگر SCoT7 با ۷ آلل دارای بیشترین تعداد آلل چندشکل و نشانگرهای SCoT1 و SCoT3 با ۲ آلل دارای کمترین تعداد چند شکل بودند.

میانگین محتوای اطلاعاتی چندشکلی (PIC) ۰/۴۱ برآورد شد که نشانگر CAAT1 با ۰/۴۴ بیشترین و SCoT7 با ۰/۳۵ کمترین *PIC* رانشان دادند. برش دندوگرام در تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها به چهار گروه تقسیم کرد. در گروه یک ژنوتیپ‌های (۴۳، ۱، ۲۸، ۷، ۳۷، ۱۳، ۴۲، ۹، ۳۴، ۳۷، ۱۵، ۴۰، ۲ و ۳) قرار داشتند. در گروه دوم ژنوتیپ‌های (۲۴، ۴، ۴۶، ۴۵، ۳۹، ۳۰، ۲۳ و ۸) قرار داشتند. گروه سوم شامل ژنوتیپ‌های(۱۲، ۶، ۳۵، ۱۸، ۱۹، ۱۱ و ۲۱) قرار داشتند. گروه چهارم ژنوتیپ‌های(۲۲، ۲۶، ۴۱، ۳۱، ۲۵، ۱۰، ۲۰، ۵، ۴۴، ۱۷، ۱۶، ۲۹، ۳۶، ۳۲، ۳۳ و ۲۷) قرار داشتند. گروه چهارم با دارا بودن تعداد ۱۷ ژنوتیپ بزرگترین گروه بوده و گروه سوم تعداد ۷ ژنوتیپ کوچکترین گروه بودند. از انجایی که نشانگرهای مورد استفاده جز نشانگرهای تصادفی هستند بنابر این قرارگیری ژنوتیپ‌های متفاوت از نظر ظاهری شاید به دلیل تکثیر مناطق غیر رمز کننده توسط آغازگرهای مورد استفاده در این بررسی باشد. البته تاثیر محیطی در بروز صفات ریخت شناسی را نباید فراموش کرد رولدن رویز (۲۰۰۱). (شکل ۱)

ارزیابی تجزیه خوشه ای درسه گروه حساس، مقاوم و حدواسط قرار گرفتند. مقایسه میانگین به روش LSD، لاینهای ۱۲۷ و ۸۰۱ مقاوم ترین لاین بودند. لاین ۳۹۰، ۵۱۵ و ۸۳۳ بیشترین حساسیت را نسبت به بیماری نشان داد. تجزیه ارتباط نشانگر و صفات آن دارای ۵۶ آلل با صفات در ارتباط خواهند بود. آلل PR50-6 بیشترین رابطه با دیگر صفات داشت(مسعودی و همکاران ۱۳۹۶).



شکل ۱: دندوگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های گندم

منابع

۱. نقوی م.، قره‌یاضی ب. و حسینی سالکده ق. ۱۳۸۸. نشانگرهای مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران، ص: ۱۲۵-۲۹۱

۲. رحمتی م.، احمدی ع. و حسین پور ط. ۱۳۹۷. پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی. سال دهم، شماره۲۵، ص: ۱۷۵-۱۶۷
۳. خرمی فرد ط.، مهرابی ع. ا. آرامینیان ع. و فاضلی آ. ۱۳۹۶. فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. جلد۲۵، شماره۱، ص:۱۲۲- ۱۱۱
۴. علی پورکندری ح.، ارزانی ا. ربانی ع. و نیکبخت م. ۱۳۹۹. نشریه تولید و فرآوری محصولات زراعی و باغی. سال دهم، شماره سوم، ص: ۷۱ – ۵۹
۵. نعیمی ب.، طلیعی ف. بیابانی ع. صبوری ح. و خیرگو م. ۱۴۰۰. مجله علمی زیست فناوری گیاهان زراعی. سال دهم، شماره سوم، پیاپی سی و سوم، ص: ۹۶-۷۹
۶. مسعودی ح.، صبوری ح. طلیعی ف. و جعفربای ج. ۱۳۹۶. مجله علمی - پژوهشی زیست فناوری گیاهان زراعی. سال هفتم، شماره هجدهم، ص: ۵۶-۴۱
7. **Saghi Maroof M.A., Biyaoshev R.M. Yang G.P. Zhang Q. and Allard R.W. 1994.** Extra ordinarily polymorphic microsatellites DNA in barly species diversity chromosomal location and population dynamics Processing of the academy of sciences. USA, 91: 4566-5570.
8. **Roldan-Ruiz F.A., Gilliland T.J. Dubreuil P. Dillmann, C. and Lallemand . J. 2001.** A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne L.*) varieties Theor . Journal of Applied Genetics, 103: 1138-1150.
9. **Nevo E., 1978.** Genetic variation in natural populations patterns and theory Theoretical Population Biology. 13: 121-127.
10. **Tilman D.P., Reich J. Knops D. Wedin and T. Mielke. 2001**. Diversity and productivity in a longterm grassland experiment. Science, 294: 843-845.

The mitigation role of cytokinin on *SGR* gene

Zahra Rezaei Ghaleh[1*]; Seyedeh Safoura Rasaei[2]; Hossein Zarei[3]; Tatyana Savchenko[4]; Mostafa Khoshhal Sarmast[5]

1-Ph.D. student of Horticultural Plant Breeding and biotechnology, Department of Horticultural Science, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (GUASNR)
2- M.Sc. student of Ornamental plants, Department of Horticultural Science, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (GUASNR).

3-Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (GUASNR).

4-Senior Researcher, Institute of Fundamental Problems in Biology, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Russia.

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

*Corresponding Author E-mail address: Zahra.rezaeighaleh@gmail.com

Abstract

Tall Fescue (Festuca arundinacea Schreb.) is a perennial, drought-resistant, and cool-season turf grass. Drought stress is a limiting factor to grass growth. Drought stress closes the stomata, restricts gas exchange, and reduces leaf area, thereby reducing photosynthetic activity and pigments. The tall fescue avoids drought stress with various morphological changes, including a decrease in the number of stomata and leaves, an increase in leaf hairs, an increase in root depth, and its expansion. During drought stress in turf grasses such as tall fescue, stress hormone levels such as abscisic acid increase sharply, and growth and regeneration hormone levels such as cytokinin decrease sharply. The role of cytokinin in lightening drought stress in turf grasses is not well understood. In this study, by measuring the transcript of SGR genes by RT-PCR, the molecular relationship between 6-Benzylaminopurine (BA) and genes involved in chlorophyll degradation was evaluated during drought stress and normal growth condition. The results demonstrate that the expression of the SGR gene is significantly decreasing in control plants with BA foliar application compared to plants without BA treatment. By increasing the rate of drought stress, SGR expression at 50% and 25% of field capacity gradually increased and even doubled, but after foliar application, the upward trend in the expression of the SGR gene was prevented, indicating a direct relationship between Cytokinin and SGR gene, which is effective in chlorophyll degradation. The results improve our knowledge of the interaction between cytokinin and genes involved in chlorophyll degradation during drought stress.

Keywords: 6-Benzylaminopurine, Chlorophyll, STAY-GREEN gene, Tall fescue

سایتوکنین در تعدیل میزان بیان ژن *SGR*

زهرا رضایی قلعه[1*]، سیده صفورا رسایی[2]، حسین زارعی[3]، تاتیانا ساوچنکو[4]، مصطفی خوشحال سرمست[5]

۱-دانشجوی دکتری اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهان باغبانی، گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۲-دانشجوی کارشناسی ارشد گیاهان زینتی، گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۳-دانشیار گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۴- پژوهشگر ارشد، موسسه مسائل بنیادی در زیست شناسی، مرکز علمی تحقیقات بیولوژیکی پوشچینو، آکادمی علوم روسیه،

۵-استادیار گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: Zahra.rezaeighaleh@gmail.com

چکیده

فستوکای بلند (Festuca arundinacea Schreb.) چمنی چندساله و سردسیری مقاوم به تنش خشکی است. تنش خشکی یکی از عوامل محدودکننده رشد چمن‌ها است. تنش خشکی باعث بسته شدن روزنه‌ها، محدودیت تبادل گازی و کاهش سطح برگ و در نتیجه کاهش فعالیت فتوسنتزی و رنگدانه‌ها می‌گردد. فستوکای بلند، با تغییرات مختلف مورفولوژیکی، از جمله کاهش تعداد روزنه و برگ‌ها، افزایش کرک برگ، افزایش عمق ریشه و گسترش آن از تنش خشکی اجتناب می‌کند. طی تنش خشکی در سبزفرش‌هایی مانند فستوکای‌بلند سطوح هورمون‌های مربوط به تنش، مانند اسید آبسزیک به شدت افزایش و سطوح هورمون‌های مرتبط با رشد و باززایی گیاه مانند سایتوکنین کاهش می‌یابد نقش سایتوکنین‌ها در تعدیل تنش خشکی در چمن‌ها به خوبی درک نشده است. در این تحقیق ارتباط مولکولی میان بنزیل‌آدنین و ژن موثر در تجزیه کلروفیل طی تنش خشکی و شرایط رشد نرمال به کمک اندازه‌گیری میزان رونوشت ژن‌های SGR به کمک RT-PCR ارزیابی شد. بررسی نتایج انجام شده در این تحقیق نشان می‌دهد که حتی در گیاهان شاهد محلول‌پاشی شده با بنزیل‌آدنین میزان بیان ژن *SGR* نسبت به گیاهانی که سایتوکنین دریافت نکرده‌اند کاهشی است. با افزایش میزان تنش، بیان *SGR* در تنش ۵۰٪ و ۲۵٪ ظرفیت زراعی مزرعه به تدریج افزایشی است و حتی تا دو برابر افزایش یافته اما پس از آغاز محلول‌پاشی بنزیل‌آدنین به روشنی از افزایش صعودی بیان این ژن جلوگیری شده است که بیانگر ارتباط مستقیم میان سایتوکنین با این ژن موثر در تخریب کلروفیل است. نتایج این تحقیق درک ما را از ارتباط میان سایتوکنین و ژن‌های موثر در تخریب کلروفیل در طی تنش خشکی بهبود می‌بخشد.

کلمات کلیدی: بنزیل‌آدنین، ژن سبزمان، فستوکای بلند، کلروفیل

۱.مقدمه

فستوکای بلند (Festuca arundinacea Schreb.) چمنی چندساله و سردسیری است (Chaney et al., 1999). چمن فستوکای بلند، به دلیل خصوصیات فیزیولوژیکی خاصی مانند سطح تبخیر بالای برگ (Cross et al., 2013) و سیستم ریشه‌ای گسترده و عمیق (Carrow, 1996b) از مقاومت بالاتری به خشکی نسبت به تمامی چمن‌های فصل سرد متداول در فضای سبز از قبیل چاوی (Lolium perenne L.) و فریژ (Poa annua L.) و غیره برخـوردار اسـت (Ojeda et al., 2015).

آب اساسی‌ترین مولکول تمامی فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهان بوده که بین ۸۰ تا ۹۰٪ زیست توده گیاهان علفی را تشکیل می‌دهد. اگر مقدار آب در گیاه ناکافی باشد، گیاه مرحله کم آبی را تجربه نموده که به اصطلاح به آن تنش خشکی می‌گویند (Zhu et al., 2002). تنش خشکی یکی از عوامل محدودکننده رشد چمن‌ها است. تنوع زیادی برای مقاومت به خشکی در میان ارقام و گونه‌های چمن وجود دارد. درک تغییرات ژنتیکی برای مقاومت به خشکی در میان چمن‌ها برای انتخاب گیاهان سازگار با محیطی که آب به عنوان عامل محدودکننده می‌باشد، مهم است (Huang et al., 2008). فستوکای بلند، با تغییرات مختلف مورفولوژیکی، از جمله کاهش تعداد روزنه و برگ‌ها، افزایش کرک برگ، افزایش عمق ریشه و گسترش آن از تنش خشکی اجتناب می‌کند (Qian et al., 1997).کلروفیل‌ها از اجزاء اصلی ترکیب‌های پروتئینی رنگدانه برگ هستند و نقش عمده‌ای در فتوسنتز دارند. کلروپلاست منبع اصلی گونه‌های اکسیژن فعال در سلول‌های گیاهی در طول تنش خشکی است و با افزایش میزان گونه‌های اکسیژن فعال، کلروفیل به میزان زیادی کاهش می‌یابد. کاهش و یا عدم تغییر میزان کلروفیل برگ در شرایط تنش خشکی در بسیاری از گونه‌ها گزارش شده است و شدت آن بستگی به مدت و شدت تنش خشکی دارد (Anjum, 2011). تنش خشکی باعث بسته شدن روزنه‌ها، محدودیت تبادل گازی و کاهش سطح برگ و در نتیجه کاهش فعالیت فتوسنتزی و رنگدانه‌ها می‌گردد (Kumudini, 2010؛ Jaleel et al., 2009). هر دو محدودیت روزنه‌ای و غیرروزنه‌ای می‌تواند علت اصلی کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی تحت تنش خشکی باشد (Farooq et al., 2009). در سال‌های اخیر، مسیر تخریب کلروفیل که شامل چندین واکنش آنزیمی است روشن‌تر شده است (Taiz et al., 2015). STAY-GREEN (*SGR*) یکی از مهمترین آنزیم‌ها در تجزیه کلروفیل است. فنوتیپ *SGR* از جهش یافته‌های sgr در ابتدا توسط مندل (۱۸۶۶) توصیف شد. در سال ۲۰۰۷، هومولوگ‌های *SGR* در ابتدا در *Pisum sativum*، *Arabidopsis* و *Festuca pratensis* شناسایی شدند (Armstead et al. 2007). *SGR* یک پروتئین کلروپلاستی است که مجموعه بی‌ثبات کننده کلروفیل-پروتئین در گیاهان را به خوبی تنظیم می‌کند. گیاهان جهش یافته *SGR* سبز باقی می‌مانند زیرا از بین بردن کمپلکس کلروفیل پروتئین در طول پیری به *SGR* نیاز دارد (Taiz et al., 2015). جهش *SGR* از طریق تأثیر بر تخریب کلروفیل در پیری طبیعی برگ‌ها ایجاد تداخل می‌کند. برگ‌های پیر در جهش یافته‌های sgr برای مدت طولانی‌تری سبز باقی می‌مانند (Jiao et al., 2020). از طرفی سایتوکنین‌ها که در بسیاری از فرآیندهای حیاتی رشد گیاه (Werner2010 and et al.,) ضروری هستند در فرآیندهای مختلف از جمله تمایز کلروپلاست، پیری برگ، تقسیم سلولی در شاخه و ریشه، پاسخ به تنش‌ها و حتی مقاومت به پاتوژن‌ها موثرند (Kakimoto, 2003). سایتوکنین‌ها همچنین پیری برگ را به تاخیر می‌اندازند (Catsky1996 et al., ؛ Naqvi1999 ,) و ساخت پروتئین‌های فتوسنتزی و انتقال الکترون را تقویت می‌کنند (Synkova1997 et al.,). بنابراین یکی از اهداف این پژوهش آشکار سازی نقشی است که بنزیل‌آدنین در تنظیم بیان *SGR* در شرایط تنش خشکی ایفا می‌کند.

۲.مواد و روش‌ها

۲-۱- اعمال تنش خشکی و محلول‌پاشی بنزیل‌آدنین

این پژوهش بر روی چمن فستوکای‌بلند (*Festuca arundinacea*) در گلخانه شیشه‌ای پژوهشی علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. از یک نمونه بالغ فستوکای بلند در کلکسیون چمن واقع در مزرعه دانشگاه علوم کشاورزی گرگان برای تکثیر استفاده شد. تیمارهای آبیاری در سه سطح (۱۰۰٪، ۵۰٪ و ۲۵٪ با دقت ±۵٪ ظرفیت زراعی مزرعه) اعمال شد. در رابطه با نحوه اعمال تنش خشکی، گلدان‌ها با استفاده از ترازو به صورت هم وزن از خاک پر شدند. یک نمونه از خاک مورد استفاده با آب به حالت اشباع درآمد و سپس در داخل سه لوله آزمایش قرار داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه با ۴۹۰۰ دور سانتریفیوژ گردید تا آب ثقلی آن جدا گردد. بعد از جدا نمودن آب ثقلی، خاک داخل هر چهار لوله وزن گردید و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد در آون خشک گردید و دوباره وزن گردید. در نهایت با کسر نمودن وزن خشک خاک از وزن مرطوب خاک، درصد رطوبت در حد ظرفیت زراعی از رابطه زیر بدست آمد (موحدی نائینی و رضایی، ۱۳۸۷).

$$\theta_m = \frac{m_w}{m_s} \times 100$$

در این رابطه θ_m درصد رطوبت خاک، m_w وزن خاک مرطوب و m_s وزن خاک خشک می‌باشد. موازی با این آزمایش، تیمارهای کم آبیاری دیگری در سه سطح (۱۰۰٪، ۵۰٪ و ۲۵٪ با دقت ± ۵٪ ظرفیت زراعی مزرعه) به همراه تیمار برگی چمن‌ها با بنزیل‌آدنین صورت گرفت. محلول‌پاشی برگی چمن‌ها با استفاده از تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آدنین بر روی گیاهان تحت تنش خشکی ۵۰٪ و ۲۵٪ ظرفیت زراعی صورت گرفت. بدین صورت که برای هر سطح تنش، یک تیمار شاهد بدون محلول‌پاشی برگی در نظر گرفته شده بود. تیمار محلول‌پاشی برگی ۷ روز پس از شروع تنش با استفاده از بنزیل‌آدنین با غلظت ۵۰ میکرومولار در بازه ۷ روزه در ۳ نوبت صورت گرفت.

۲-۲RNA- استخراج

جهت استخراج RNA از کیت شرکت دنازیست (ایران) استفاده شد. روش کار طبق دستورالعمل شرکت انجام شد. روش کار طبق دستورالعمل شرکت به شرح زیر می‌باشد. مقدار۵۰ میلی‌گرم از هر نمونه کوبیده شده و کاملا پودر شده در ازت مایع، در داخل تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری اتوکلاو شده جدید ریخته شد و بلافاصله ۱ میلی‌لیتر بافر G1 به آن اضافه گردید. بعد از ۵ الی ۱۵ ثانیه ورتکس تیوب‌ها را به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شدند و سپس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. فاز بالایی که حاوی مایع شفاف بود (۱۰۰۰ میکرولیتر) به تیوب ۱/۵ میلی لیتری استریل جدید منتقل گردید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به تیوب اضافه گردید و چندبار تیوب‌ها تکان داده شد و سپس به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شدند. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از تشکیل ۳ فاز مجزا، فاز بالایی با احتیاط تمام به تیوب استریل جدید منتقل شد و نصف مقدار فاز بالایی منتقل شده به آن ایزوپروپانول سرد و بافر G2 اضافه شد. محتویات تیوب را به خوبی مخلوط و در دمای اتاق برای۱۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و قسمت شفاف بالایی دور ریخته شد و پلیت تشکیل شده در ته تیوب باقی ماند. به پلیت RNA، ۱میلی‌لیتر اتانول ٪۷۵ اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور۱۲۰۰۰ در

دقیقه سانتریفیوژ گردید. اتانول داخل تیوب‌ها حذف گردید و تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه زیر هود در دمای اتاق قرار داده شدند تا خشک شوند. در نهایت ۳۰ میکرولیتر آب‌دپس (DEPC) به تیوب اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت تا RNA موجود در نمونه کاملا در آب حل شود.RNA استخراج شده جهت نگهداری به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید.

۲-۳- طراحی آغازگرها

آغازگرهای با طول ۱۵۰ تا حداکثر ۲۰۰ جفت باز از ناحیه کد کننده مربوط به ژن خانه‌دار *ACT1* به کمک نرم افزار Allel ID و ژن *SGR* از مقاله سرمست و همکاران (۲۰۱۵) استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱: مشخصات و توالی آغازگرهای مورد استفاده.

Gene	Forward primer sequences (5'→3')	Reverse primer sequences (5'→3')	دمای ذوب
SGR	CGGACCTACACGCTCACC	CCACTCTGCCACCACCTC	۵۹
ACT1	GGTATTGTGTTGGATTCTGGTGATG	CCGCTTGGCAGTGGTAGTG	۵۶

۲-۴- انجام Real-Time PCR و آنالیز داده‌های آن

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمی جهت ارزیابی الگوی تظاهر ژن‌های درگیر در مسیر تجزیه کلروفیل با استفاده از تکنولوژی رنگ SYBR Green I که به مولکول‌های DNA دو رشته‌ای متصل می‌شود و در محل اتصال سیگنال فلئورسنت منتشر می‌نماید انجام شد. کیت سایبرگرین استفاده شده در این تحقیق از شرکت یکتا تجهیز (ایران) فراهم شد. این تحقیق در دانشگاه علوم پزشکی گرگان و با دستگاه Real-Time، FQD 48A محصول شرکت BIOER (ساخت چین) انجام شد. این دستگاه در هر چرخه از فعالیت، مقدار محصول واکنش پلیمراز را نشان می‌دهد. به منظور نرمال‌سازی داده‌ها از ژن خانه‌دار *ACT1* که دارای بیان یکسانی در تمام تیمارها می‌باشد استفاده گردید.

شرایط بهینه برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی در حجم ۱۰ میکرولیتر تهیه شد و از هر نمونه ۳ تکرار مطابق جدول زیر (جدول ۲) فراهم گردید.

جدول ۲: شرایط بهینه برای انجام واکنش‌های **Real-Time PCR** در حجم ۱۰ میکرولیتر

ماده	حجم مورد نیاز برای یک واکنش
سایبرگرین	۵
cDNA(۱۰ نانوگرم)	۰/۵
آغازگر پیشرو (۱۰pmol)	۰/۴
آغازگر پسرو (۱۰pmol)	۰/۴
آب دوبار تقطیر	۳/۷

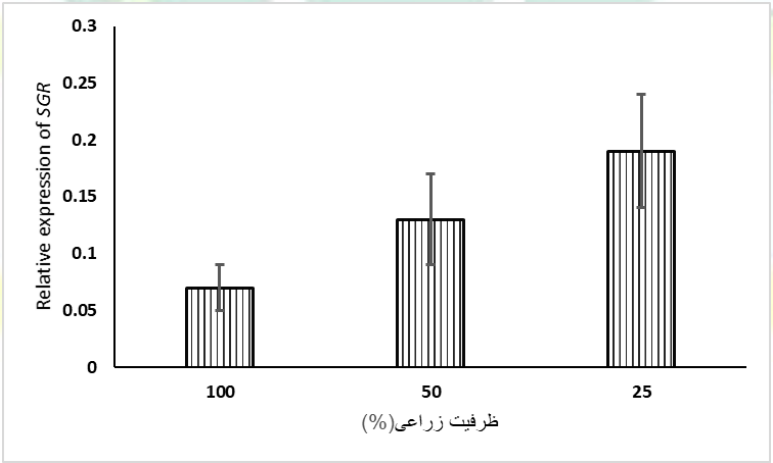
۲-۵- آنالیز داده‌ها

بیان نسبی ژن مربوط به *SGR* به کمک نرمال نمودن سطح بیان ژن هدف نسبت به کنترل داخلی به کمک روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ در نرم افزار اکسل انجام شد (Livak and Schmittgen, 2001). نتایج به کمک نسخه ۲۲ نرم افزار SPSS آنالیز شد. مقایسه میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ با آزمون دانکن انجام و برای رسم نمودار از نرم افزار Excel استفاده شد.

۳.نتایج و بحث

۳-۱- ارتباط بین تنش خشکی و میزان بیان ژن *SGR*

با افزایش میزان تنش خشکی میزان بیان *SGR* در چمن فستوکای بلند به تدریج افزایش یافت. بیشترین میزان بیان مربوط به تنش شدید (۲۵٪ ظرفیت زراعی) است که می‌تواند بیانگر این باشد که در تنش خشکی میزان کلروفیل کاهش پیدا می‌کند (Majumdar et al,1991؛ Kuroda et al., 1990) و با افزایش تنش خشکی تخریب کلروفیل صورت می‌گیرد که باعث افزایش فعالیت *SGR* می‌شود (شکل ۱). سرمست و همکاران (۲۰۱۵) با اعمال تنش خشکی بر چند رقم چمن فستوکای بلند بیشترین میزان بیان *FaSGR* را در رقم mini-mustang مشاهده کردند. یانگ و همکاران (۲۰۲۰) ژن *SlSGRL* را که پروتئین مشابه با *SGR* است را در گوجه‌فرنگی کلون کردند و گیاهان گوجه‌فرنگی تراریخته با بیان بیش از حد *SlSGRL* (OE) ایجاد کردند. تجزیه و تحلیل بیان این ژن نشان داد که *SlSGRL* توسط اسیدآبسیزیک (ABA) تنظیم می‌شود و لاین‌های *SlSGRL*-OE زردی برگ را زودتر از لاین‌های نوع وحشی (WT) تحت تیمار ABA نشان دادند. *SGR* همچنین باعث تخریب کلروفیل در حین رسیدن میوه در گوجه فرنگی و فلفل می‌شود (Borovsky and Paran, 2008; Barry et al., 2008).

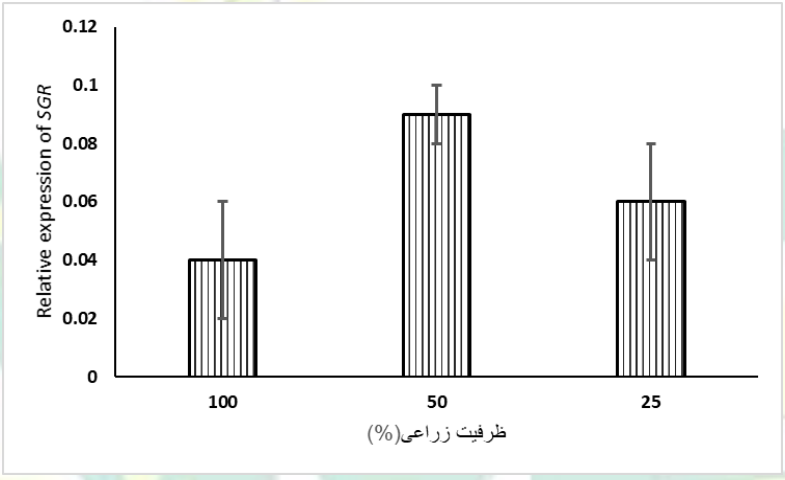


شکل ۱: اثر سطوح مختلف تنش خشکی بر میزان بیان ژن *SGR*.

۳-۲- برهمکنش بین تنش خشکی و محلول‌پاشی سایتوکنین با میزان بیان ژن *SGR*

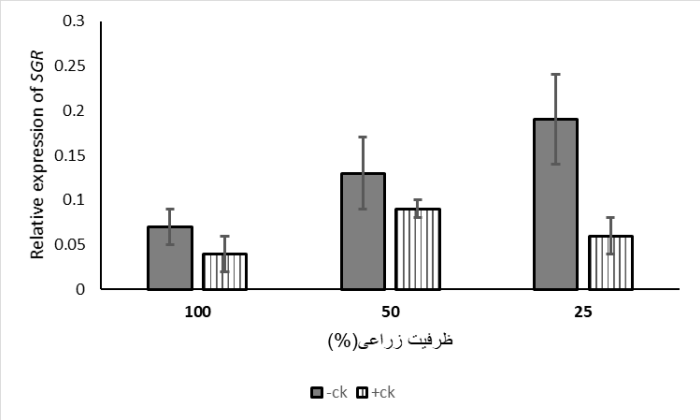
بررسی نتایج انجام شده در این تحقیق نشان می‌دهد که حتی در گیاهان شاهد محلوپاشی شده با بنزیل‌آدنین میزان بیان ژن *SGR* نسبت به گیاهانی که سایتوکنین دریافت نکرده‌اند، کاهشی است. با افزایش میزان تنش بیان *SGR* در تنش ۵۰٪ و ۲۵٪ ظرفیت

زراعی مزرعه به تدریج افزایشی است و حتی تا دو برابر افزایش یافته اما پس از آغاز محلول‌پاشی به روشنی از افزایش صعودی بیان این ژن جلوگیری شده است که بیانگر ارتباط مستقیم میان سایتوکنین با این ژن موثر در تخریب کلروفیل است.
این موضوع می‌تواند به دلیل اثر تعدیل‌کنندگی سایتوکنین بر تنش خشکی باشد و به‌طور مستقیم به نقش سایتوکنین‌ها در جلوگیری از تجزیه و احیاء کلروفیل و ممانعت از پیری در گیاهان مربوط است. این ادعا به آسانی با مقایسه گیاهان شاهد که سایتوکنین را دریافت نکرده‌اند آشکار می‌شود (شکل ۲ و ۳). گوپتا و همکاران (۲۰۱۲) با محلول‌پاشی بنزیل‌آدنین و پوتریسین بر روی گندم مشاهده کردند که تنش خشکی باعث کاهش شدید صفات فتوسنتزی، وضعیت آب و میزان کلروفیل می‌شود که با استفاده از پوترسین/ بنزیل‌آدنین، این صفات به طور قابل توجهی بهبود یافت. البته در برخی از گونه‌ها طی تنش، بسته به مدت زمان و شدت خشکی، سطح کلروفیل کاهش یافته یا حتی تغییری نداشته است (Zhang et al., 1996).



شکل ۲: اثر سطوح مختلف تنش خشکی بر میزان بیان ژن SGR در حضور بنزیل‌آدنین.

نتایج این تحقیق تاکیدی بر نقش تنش خشکی در افزایش بیان ژن SGR است. همچنین نقش مستقیم بنزیل‌آدنین در تنظیم بیان ژن SGR که در تخریب کلروفیل موثر می‌باشد. در طی تنش خشکی ۵۰ و ۲۵ درصد زراعی آشکار نمود. نتایج این تحقیق درک ما را از ارتباط میان سایتوکنین و ژن‌های موثر در تخریب کلروفیل در طی تنش خشکی بهبود می‌بخشد.



شکل ۳: اثر سطوح مختلف تنش خشکی بر میزان بیان ژن *SGR* در حضور یا عدم حضور بنزیل‌آدنین.

۴.نتیجه‌گیری

با افزایش میزان تنش، بیان *SGR* در تنش ۵۰٪ و ۲۵٪ ظرفیت زراعی مزرعه به تدریج افزایشی است و حتی تا دو برابر افزایش یافته اما پس از آغاز محلول‌پاشی بنزیل‌آدنین به روشنی از افزایش صعودی بیان این ژن جلوگیری شده است که بیانگر ارتباط مستقیم میان سایتوکنین با این ژن موثر در تخریب کلروفیل است. نتایج این تحقیق درک ما را از ارتباط میان سایتوکنین و ژن‌های موثر در تخریب کلروفیل در طی تنش خشکی بهبود می‌بخشد.

منابع

۱- موحدی نائینی. س. ع. ا، رضائی. م. ۱۳۸۷. فیزیک خاک. جلد اول، چاپ اول، انتشارات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ٤٨٤ ص.

2- Anjum, S.A., Xie, X.Y., Wang, L.C., Saleem, M.F., Chen, M. and Wang, L. 2011. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. Afr. J. Agr. Res. 6(9): 2026-2032.

3- Armstead I, Donnison I, Aubry S, Harper J, Hortensteiner S, James C, Mani J, Moffet M, Ougham H, Roberts L, Thomas A, Weeden N, Thomas H and King I (2007) Cross-species identification of Mendel's *I* locus. Science 315(5808):73

4- Barry CS, McQuinn RP, Chung MY, Besuden A and Giovannoni JJ (2008) Amino acid substitutions in homologs of the STAY-GREEN protein are responsible for the *green-flesh* and *chlorophyll retainer* mutations of tomato and pepper. Plant Physiol 147(1):179–187

5- Borovsky, Y and Paran, I (2008) Chlorophyll breakdown during pepper fruit ripening in the *chlorophyll retainer* mutation is impaired at the homolog of the senescence-inducible stay-green gene. Theor Appl Genet 117(2):235–240

6- Carrow, R.N. 1996b. Drought resistance aspects of turfgrasses in the southeast: Root-shoot responses. Crop Science 36: 687-694.

7- Catsky, J., Pospisilova, J., Kaminek, M., Gaudinova, A., Pulkrabek, J. and Zahradnicek, J. 1996. Seasonal changes in sugar beet photosynthesis as affected by exogenous cytokinin N6-(m hydroxybenzyl)adenosine. Biologia Plantarum 38: 511-518.

8- Cross J.W., Bonos S.A., Huang B. and Meyer W.A. 2013. Evaluation of heat and drought as components of summer stress on tall fescue genotypes. Hort. Sci. 48:1562-1567.

9- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. and Basra, S.M.A. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. Agron. Sustain. Dev., 29:185-212.

10- Gupta, S., Agarwal, V. P. and Gupta, N. K. 2012. Efficacy of putrescine and benzyladenine on photosynthesis and productivity in relation to drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiology and molecular biology of plants*, 18(4): 331-336.
11- Huang, B. and Xu, C. 2008. Identification and characterization of proteins associated with plant tolerance to heat stress. J. Integrative Plant Biol. 50: 1230-1237.
12- Jaleel, C. A., P. A. Manivannan, A. Wahid, M. Farooq, H. J. Al-Juburi, R. A. Somasundaram, et al. 2009. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. and Biol.* 11: 100-105.
13- Jiao, B., Meng, Q., & Lv, W. (2020). Roles of stay-green (SGR) homologs during chlorophyll degradation in green plants. *Botanical studies*, *61*(1), 1-9.
14- Kakimoto, T. 2003. Biosynthesis of cytokinins. *Journal of plant research.* 116(3): 233-239.
15- Kumudini, S. 2010. Soybean Growth and Development. Pp. 48-73 *in* B. Singh, ed. *The Soybean: botany, Production and Uses*. CAB International, Oxfordshire, UK.
16- Naqvi, S.S.M. 1999. Plant hormones and stress phenomena. In: Pessarakli M (ed.) Handbook of Plant and Crop Stress. Marcel Dekker, New York. Pp. 709-730.
17- Ojeda, J. J., Caviglia, O. P., Agnusdei, M. G. and Eriksen, G. E. 2015. Comparative analysis of water productivity between "Tall fescue" (*Festuca arundinacea* Schreb.) and "Oats"(*Avena sativa* L.). In 38th Congreso Argentino de Produccion Animal. 35: 158-158.
18- Qian, Y. L., Fry, J. D. and Upham, W. S. 1997. Rooting and drought avoidance of warm-season turfgrasses and tall fescue in Kansas. Crop Sci. 37: 905-910.
19- Sarmast, M. K., Salehi, H., and Niazi, A. (2015). Biochemical differences underlie varying drought tolerance in four Festuca arundinacea Schreb. genotypes subjected to short water scarcity. *Acta Physiologiae Plantarum*, *37*(9), 1-13.
20- Synkova H, Wilhelmova N, Sestak Z. and Pospisilova J. 1997. Photosynthesis in transgenic plants with elevated cytokinin contents. In: Pessarakli M (ed.) Handbook of Photosynthesis. Marcel Dekker, New York. Pp: 541-552.
21- Taiz L, Zeiger E, Møller IM and Murphy A (2015) Plant physiology and development. Sinauer Associates, Inc. p 761.
22- Werner, T., Nehnevajov, E., Koellmer, I., Novak, O., Strnad, M., Kraemer, U. and Schmuelling, T. 2010 specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in *Arabidopsis* and tobacco. Plant Cell. 22: 3905-3920.
23- Yang, M., Zhu, S., Jiao, B., Duan, M., Meng, Q., Ma, N., and Lv, W. (2020). SlSGRL, a tomato SGR-like protein, promotes chlorophyll degradation downstream of the ABA signaling pathway. *Plant Physiology and Biochemistry*, *157*, 316-327.
24- Zhang, J. and Kirkham, M.B. 1996. Enzymatic responses of the ascorbategluthathione cycle to drought in sorghum and sunflower plants. Plant Sci. 113: 139-147.
25- Zhu, J. K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. Annual review of plant biology, 53(1): 247-273.

The control of apical dominance in induction of *Sanseviera* offset production

Matin Kazemzadeh Behnemirei[1]; Zahra Rezaei Ghaleh[2*]; Mostafa Khoshhal Sarmast[3]

1- B.Sc. student of Horticultural Science, Department of Horticultural Science, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (GUASNR).

2-Ph.D. student of Horticultural Plant Breeding and biotechnology, Department of Horticultural Science, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (GUASNR).

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

**Corresponding Author E-mail address: Zahra.rezaeighaleh@gmail.com*

Abstract

The clonal propagation of ornamental plants especially in variegated species is of great importance. *Sanseviera* is a succulent plant native to regions such as the Canary Islands, subtropical regions of Japan, India, Nigeria, Thailand and Brazil. This plant is also known by various names such as mother-in-law tongue, snake plant, lucky plant and devil plant. *Sanseviera* in some species can be propagated by seeds, leaf cuttings and rhizomes. Some species of *Sanseviera* can be propagated by seed, but due to the slow growth rate and the unavailability of seeds, seed propagation is not a suitable method. Due to the fact that rhizome –based propagation is the only way to clonally propagate a variegated *Sanseviera* as a result, the improvement of this procedure is pivotal. Cytokinin is a plant hormone that regulates a wide range of vital processes for plant growth. Cytokinin was initially identified as a cell division-inducing factor in tissue culture but now is recognized as a key regulator in the cell cycle. Therefore, in this study the apical meristem growth was troubled through application of 6-BA and mechanical treatments. A pot-based experiment was laid out on dwarf *Sanseviera* in greenhouse condition. Research results indicated that combination treatments of 50 µM of 6-BA together with removal of apical meristem could significantly improve offset production. It seems that higher concentration of BA has a negative effect on regeneration capacity. Removal of apical dominance and foliar application of 6-BA has increased plant regeneration rate by 1.5-fold and the number of roots and regenerated plants weight has increased twice.

Keywords: 6-Benzylaminopurine, Clonal propagation, Chimeric plants, Succulent plants

کنترل غالبیت انتهایی در القاء تولید پاگیاه در سانسوریای پاکوتاه

متین کاظم زاده بهنمیری[۱]؛ زهرا رضایی قلعه[۲]*؛ مصطفی خوشحال سرمست[۳]

۱-دانشجوی کارشناسی علوم و مهندسی باغبانی، گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۲-دانشجوی دکتری اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهان باغبانی، گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۳-استادیار گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: Zahra.rezaeighaleh@gmail.com

چکیده

افزایش همگروهی گیاهان زینتی به ویژه در گونه‌های بافت ناهمسان بسیار با اهمیت است. سانسوریا گیاهی گوشتی و بومی مناطق مانند جزایر گرمسیری قناری، مناطق نیمه گرمسیری ژاپن، هند، نیجریه، تایلند و برزیل است. این گیاه با نام‌های گوناگونی مانند زبان مادرشوهر، گیاه مار، گیاه خوش شانس و گیاه شیطان نیز معروف است. سانسوریا را در برخی گونه‌ها می‌توان با بذرها ، قلمه‌های برگ و ریزوم‌ها تکثیر نمود. برخی از گونه‌های سانسوریا با بذر قابل تکثیر است اما به دلیل سرعت رشد کم و به دلیل غیردسترس بودن بذر، افزایش بذری روش مناسبی نیست. با توجه به اینکه تنها راه افزایش همگروهی گیاه سانسوریای ابلق استفاده از تولید گیاه با منشاء ریزوم است، بنابراین بهبود راندمان باززایی آنها بسیار با اهمیت است. سایتوکنین هورمون گیاهی است که گستره وسیعی از فرآیندهای حیاتی برای رشد گیاه را تنظیم می‌کند. سایتوکنین ابتدا به عنوان یک عامل القاءکننده تقسیم‌سلولی در کشت‌بافت شناسایی شد اما اکنون به عنوان یک تنظیم‌کننده کلیدی در چرخه سلولی شناخته می‌شود. بدین منظور در این مطالعه با استفاده از تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آدنین و استفاده از تیمارهای مکانیکی، رشد مریستم انتهایی برای بهبود تولید پاگیاه دچار اختلال گردید. این آزمایش در شرایط کنترل شده گلخانه و در داخل گلدان‌های پلاستیکی بر روی سانسوریای پاکوتاه انجام شد. ارزیابی‌ها بیانگر این است که استفاده از تیمار ترکیبی حذف جوانه انتهایی برای کنترل غالبیت انتهایی به همراه محلول‌پاشی برگی ۵۰ میکرومولار بنزیل‌آدنین به صورت معنی‌داری بر تعداد پاگیاه‌های تولید شده می‌افزاید. به نظر می‌رسد که غلظت‌های بالای سایتوکنین اثر منفی در باززایی داشته و استفاده از غلظت‌های کمتر به تنهایی در از بین بردن غالبیت انتهایی اثر جزئی دارد. حذف غالبیت انتهایی به همراه محلول‌پاشی برگی بنزیل‌آدنین (۵۰ میکرومولار) حداقل به میزان یک و نیم برابر میزان باززایی و تا دو برابر تعداد ریشه و وزن گیاهک‌های باززایی شده را افزایش دهد.

کلمات کلیدی: افزایش همگروهی، بنزیل‌آدنین، گیاهان شیمر، گیاه گوشتی

مدمه

سانسوریا (Sanseviera trifasciat L.) گیاهی گوشتی و بومی مناطق مختلفی مانند جزایر گرمسیری قناری، مناطق نیمه‌گرمسیری ژاپن، هند، نیجریه، تایلند و برزیل است. این گیاه با نام‌های متعددی مانند زبان مادرشوهر، گیاه مار، گیاه خوش‌شانس و گیاه شیطان نیز معروف است (Takawira and Nordal 2002, Hartmann et al., 2002). سانسوریا اگرچه که در باغبانی دارای ارزش زینتی است اما برای ویژگی‌های دیگری مانند تولید محصولات فیبری، ترکیبات زیستی و به عنوان منبع ارزشمندی برای مواد شیمیایی گیاهی نیز به کار گرفته می‌شود (Mimaki et al., 1996; Tchegnitegni et al., 2017; Teponno et al., 2016; Sreenivasan et al., 2011). نظر به اینکه که افزایش ارقام بافت ناهمسان به کمک قلمه برگ منجر به تولید گیاهان با برگ سبز می‌شود بنابراین در حال حاضر با اطمینان‌ترین روش افزایش ارقام ابلق استفاده از پاگیاه است. سانسوریا را در برخی گونه‌ها می‌توان با بذرها ، قلمه‌های برگ و ریزوم‌ها تکثیر نمود (Arnold, 2004). برخی از گونه‌های سانسوریا با بذر قابل تکثیر است اما به دلیل سرعت رشد کم و به دلیل غیردسترس بودن بذر، افزایش بذری روش مناسبی نیست. نتایج بررسی‌های پیشین ما نشان می‌دهد که استفاده از فنون کشت درون شیشه‌ای نیز قادر به تولید گیاهان بافت ناهمسان پایدار نیست. برای تولید تجاری و افزایش عملکرد برگ که قسمت زینتی این گیاه را تشکیل می‌دهد باید روشی داشته باشیم که بتوان گیاهچه را در مدت زمان کوتاهی تولید کرد. استفاده از پاگیاه، شاید منطقی‌ترین روش افزایش رویشی این گیاه است. پاگیاه‌ها از انتهای ریزوم کوتاه تولید می‌شوند و می‌توانند به عنوان روش موثر تکثیر رویشی در تولید گیاهان چند ساله استفاده شوند (Carey, 2008). نظر به اینکه حذف غالبیت انتهایی و سرکوب نمودن اثر اکسین در اثر حذف غالبیت انتهایی منجر به تولید سایتوکنین و تحریک تولید جوانه جانبی می‌شود، بنابراین استفاده از روش‌هایی که در کاهش غالبیت انتهایی موثر باشند به احتمال در بالا بردن راندمان تولید پاگیاه موثر خواهند بود. سایتوکنین‌ها بر میزان رشد پاگیاه‌ها تاثیر مثبتی دارند این فرضیه پیش‌تر با افزایش میزان رشد پاگیاه در گیاه هاورتیا تحت تاثیر بنزیل‌آدنین ثابت شده است (Lizumi and Amaki, 2011).

سایتوکینین‌ها به طور گسترده‌ای در تولید گیاهان زینتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. چندین مطالعه نشان داده است که تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه مانند سایتوکینین‌ها می‌توانند رشد اندام هوایی (شاخساره‌ها) را بهبود بخشند (Carey, 2008). بنابراین در این پژوهش، به منظور بهبود افزایش کلونی گیاه سانسوریا روش‌های هورمونی و غیرهورمونی برای حذف یا کاهش غالبیت انتهایی در راستای القاء تولید پاگیاه در گلدان و در شرایط گلخانه کنترل شده انجام شد.

۲.مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد گیاهی و استقرار گیاه

در این تحقیق از سانسوریا سبز پاکوتاه ۱۲ ماهه استفاده شد. در اسفند ۱۳۹۹ کشت گیاهان در گلدان شماره ۱۲ نشایی در آمیخته خاکی (۳۵ درصد کمپوست چوب، ۳۵ درصد ماسه بادی، ۱۳ درصد پرلیت، ۸.۵ درصد پوسته برنج و ۸.۵ درصد کود پوسیده دامی) صورت گرفت. قبل از جابجایی گیاه از عدم وجود هرگونه جوانه بر روی طوقه گیاه اصلی اطمینان حاصل شد. تمامی گیاهان استفاده شده یک اندازه و کاملا یکنواخت بودند. گیاهان به مدت یک ماه در شرایط گلخانه مستقر شدند.

۲-۲- تیمارها

بلافاصله پس از استقرار، ۷ تیمار بر روی این گیاهان انجام شد. تیمارها شامل ایجاد سوراخ به طور افقی در دو جهت به کمک پنس آزمایشگاهی در ناحیه وسط طوقه گیاه، حذف کامل جوانه انتهایی به کمک تیغ آزمایشگاهی، حذف جوانه انتهایی به وسیله آلوده کردن آن به قارچ، تیمار ۵۰ میکرومولار بنزیل‌آدنین، تیمار ۵۰۰ میکرومولار بنزیل آدنین، BA ۵۰ میکرومول بعلاوه حذف جوانه انتهایی، BA ۵۰۰ میکرومولار بعلاوه حذف جوانه انتهایی و شاهد بود. محلول‌پاشی با بنزیل‌آدنین چهار مرتبه و با فاصله یک هفته‌ای انجام شد. صفات گیاه مادری از قبیل قطر ساقه (میلی‌متر) از کولیس دیجیتال استفاده شد. برای اندازه‌گیری صفات پاگیاه، ابتدا پاگیاه‌ها از گیاه مادری جدا و تعداد آن‌ها شمارش گردید و بعد خصوصیاتی از قبیل قطر ساقه با کولیس دیجیتال (mm) و تعداد ریشه‌های اصلی دارای ریشه ثانویه در داده‌برداری استفاده شد.

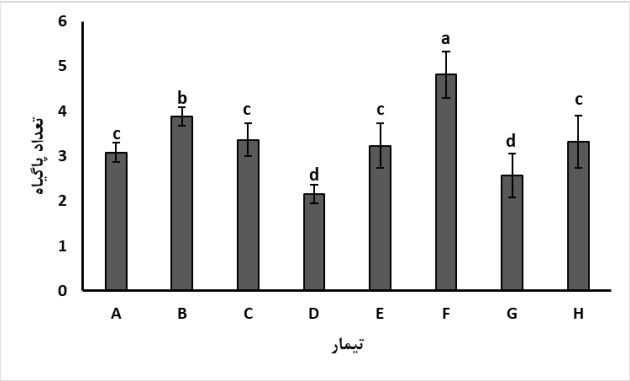
۳-۲- آنالیز داده‌ها

این آزمایش با شش تکرار در قالب طرح کامل تصادفی در گلخانه واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. جمع‌آوری داده‌ها ۷۰ روز پس شروع تیمار انجام شد و با استفاده از نسخه ۲۲ نرم‌افزار SPSS آنالیز و مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال ۵٪ با استفاده از آزمون دانکن انجام شد.

۳.نتایج و بحث

۳-۱- بنزیل‌آدنین و حذف غالبیت انتهایی اثر هم‌افزایی در بهبود باززایی سانسوریا دارد

بررسی‌های انجام شده در شرایط گلخانه بیانگر این است که استفاده از غلظت بالای بنزیل‌آدنین برای غلبه بر غالبیت انتهایی بی‌اثر است و استفاده از ۵۰۰ میکرومولار بنزیل‌آدنین حتی منجر به تولید تعداد کمتری پاگیاه در مقایسه با گیاه شاهد شده است. این در حالی است که غلظت‌های ۱۰ برابر کمتر این هورمون قادر نبود به طور معنی‌داری بر تعداد پاگیاه بیفزاید. ارزیابی‌ها بیانگر این است که استفاده از تیمار ترکیبی حذف جوانه انتهایی برای کنترل غالبیت انتهایی به همراه محلول‌پاشی برگی ۵۰ میکرومولار بنزیل‌آدنین به صورت معنی‌داری بر تعداد پاگیاه‌های تولید شده می‌افزاید. در حالی که استفاده جدا از این تیمارها در بهبود تولید پاگیاه معنی‌دار نبود (شکل ۱). به نظر می‌رسد که استفاده جدا از این هورمون‌ها قادر به کنترل کامل غالبیت انتهایی نیست. به طور جالبی استفاده از تیمار قارچ برای از بین بردن مریستم انتهایی، حذف مریستم انتهایی به کمک اسکالپل و تیمار ۵۰ میکرومولار بنزیل‌آدنین اثر مشابه‌ای بر میزان پاگیاه‌های تولید شده داشتند که این افزایش نسبت به شاهد معنی‌دار نبود. به نظر می‌رسد که اثر این سه تیمار در القاء، نسبی بوده است. اثر مثبت تنظیم‌کننده رشد سایتوکنین در کاهش غالبیت انتهایی و تولید پاگیاه (Khalighi et al., 2005; Garner et al., 1998) ، همچنین بسیاری از فرایندهای رشدی و نموی گیاهان (Taiz et al., 2015) و حتی بهبود مقابله با تنش غیرزیستی (RezaeiGhaleh et al., 2021) پیش‌تر گزارش شده است.



شکل ۱: میزان تولید پاگیاه در سانسوریا پاکوتاه در پاسخ به تیمارهای مختلف، ۴ ماه پس از شروع آزمایش
(**A**: شاهد، **B**: سوراخ کردن طوقه، **C**: بنزیل‌آدنین ۵۰ میکرومولار، **D**: بنزیل‌آدنین ۵۰۰ میکرومولار، **E**: حذف جوانه انتهایی، **F**: حذف جوانه انتهایی به همراه بنزیل‌آدنین ۵۰ میکرومولار، **G**: حذف جوانه انتهایی به همراه بنزیل‌آدنین ۵۰۰ میکرومولار، **H**: قارچ)
حروف غیرمشترک بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P<0.05$ با استفاده از آزمون دانکن است.

۲-۳- اثر بنزیل‌آدنین بر روی ساقه و ریشه گیاهان باززایی شده

نتایج بیانگر این است که به تقریب تمامی تیمارهای به کار رفته در مقایسه با شاهد منجر به افزایش طول ساقه‌های پاگیاه‌های باززایی شده گردید (جدول ۱). با حذف جوانه انتهایی و همچنین محلول‌پاشی بنزیل‌آدنین با غلظت ۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار میزان رشد هر ۳ پارامتر (طول، وزن و قطر ساقه) نسبت به محلول‌پاشی بنزیل‌آدنین بدون حذف جوانه انتهایی و شاهد بیشتر بود. تیمار ترکیبی۵۰ میکرومولار بنزیل‌آدنین به همراه حذف جوانه انتهایی در تمامی عامل‌های رشدی و نموی در گیاهان باززایی شده برتری دارد (جدول ۱). وجود تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، به ویژه سایتوکنین در محیط‌کشت، مهمترین عامل برای تکثیر اندام هوایی است (Abrie and van Staden, 2001; Chaudhuri and Mukundan, 2001; Aggarwal and Barna., 2004). غلظت پایین سایتوکنین‌ها به همراه حذف جوانه انتهایی دو برابر میزان ریشه‌های تولید شده را در پاگیاه‌ها بهبود بخشید (Zhang and Hasenstein, 1999). این در حالی است که حذف جوانه انتهایی به تنهایی تاثیر معنی‌داری در بهبود تولید ریشه نداشته همچنین اعمال تیمار بنزیل‌آدنین ۵۰ میکرومولار در گیاهانی که جوانه انتهایی آن‌ها حذف شده بود نیز تاثیر مثبتی بر تعداد ریشه داشت. با حذف جوانه انتهایی اثر بازدارندگی اکسین بر جوانه‌های پایین برطرف می‌شود (Müller and Leyser, 2011). از سوی دیگر، کاربرد سایتوکنین خارجی قادر به مهار غالبیت اکسین بر فعالیت جوانه‌های جانبی است (Chatfield et al., 2000). این موضوع می‌تواند بالانس اکسین را در پاگیاه‌های تولید شده برای بهبود ریشه‌زایی بهبود ببخشد. اکسین در غلظت‌های بالا سبب تحریک ریشه‌زایی و تشکیل ریشه‌های فرعی و نابجا می‌شود، ولی از طویل شدن ریشه‌های اولیه جلوگیری می‌کند. حذف جوانه انتهایی به دلیل حذف منبع اکسین سبب کاهش تشکیل ریشه‌های ثانویه می‌شود. همانطور که مشاهده می‌شود در ابتدا با حذف جوانه انتهایی و کاهش یافتن مقادیر اکسین تشکیل ریشه‌ها افزایش یافت و اعمال بنزیل‌آدنین خارجی با غلظت پائین (۵۰ میکرومولار) تشکیل ریشه را بهبود بخشید، اما در غلظت بالاتر سایتوکنین، تعداد ریشه کاهشی شد. علت این موضوع می‌تواند مربوط به اثر سایتوکنین خارجی۵۰۰ میلی‌مولار باشد (SalehiSardoei et al., 2013). سورافل و همکاران (۲۰۱۸) گیاه آلوئه‌ورا (*Aloe barbadensis*) را در محیط‌کشت MS با ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA، ۱.۰ میلی‌گرم در لیتر BAP و محیط بدون هورمون تکثیر کردند که این غلظت از هورمون‌ها به ترتیب برای

استقرار، تکثیر و ریشه‌زایی مناسب بودند. بالاترین میانگین تعداد شاخساره و فاکتورهای موثر در تکثیر در محیط‌های MS با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱.۰ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد (Hashem and Kaivani, 2018; Kalimuthu, 2010).

جدول ۱: طول ساقه، قطر ساقه، وزن ساقه، تعداد ریشه گیاه باززایی شده و قطر گیاه مادری تحت تیمارهای مختلف پس از ۷۰ روز

	تیمار							
پارامترها	شاهد	دوطر فه	بنزیل‌آدنین ۵۰	بنزیل‌آدنین ۵۰۰	حذف جوانه	حذف جوانه به همراه بنزیل‌آدنین ۵۰	حذف جوانه به همراه بنزیل‌آدنین ۵۰۰	قارچ
طول ساقه(cm)	4.09 b	7.72 a	4.92^{b}	7.16^{a}	8.50^{a}	7.17^{a}	8.01^{a}	7.99 a
قطر ساقه(cm)	10.24^{b}	10.76^{b}	13.28^{a}	13.83^{a}	13.48^{a}	13.17^{a}	12.77^{a}	10.97^{b}
تعداد ریشه	2.17 d	2.55 cd	3.28^{bc}	3.68^{b}	2.25^{d}	5.27^{a}	4.55^{a}	3.51 b

میانگین‌هایی که حروف مشترک دارند ار نظر آماری در سطح ۵٪ آزمون Duncan تفاوت معنی‌داری ندارند.

۴.نتیجه‌گیری

در اثر غالبیت انتهایی، مقادیر زیاد اکسین در جوانه‌های انتهایی از رشد و تقسیم جوانه جانبی جلوگیری می‌کند. با حذف جوانه انتهایی که منبع اکسین است، مقادیر اکسین در جوانه جانبی کاهش می‌یابد و اثر بازدارندگی اکسین بر این جوانه‌ها برطرف می‌شود. استفاده از تیمارهای ترکیبی حذف جوانه انتهایی برای کنترل غالبیت انتهایی به همراه محلول‌پاشی برگی ۵۰ میکرومولار بنزیل‌آدنین به صورت معنی‌داری بر تعداد پاگیاه‌های تولید شده می‌افزاید. به نظر می‌رسد که غلظت‌های بالای سایتوکنین اثر منفی در باززایی داشته و استفاده از غلظت‌های کمتر به تنهایی در از بین بردن غالبیت انتهایی اثر جزئی دارد. نتایج این تحقیق درک ما را از ارتباط میان بنزیل‌آدنین و کنترل غالبیت انتهایی بهبود می‌بخشد.

منابع

1- Abrie, A. Á., and Van Staden, J. (2001). Micropropagation of the endangered Aloe polyphylla. *Plant Growth Regulation*, *33*(1), 19-23.
2- Aggarwal, D., and Barna, K. S. (2004). Tissue culture propagation of elite plant of Aloe vera Linn. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, *13*(1), 77-79.
3- Arnold MA. 2004. Sansevieriatrifasciata. In: Landscape plants for Texas and environments, Third Edition, Stipes Publishing, USA.
4- Chatfield, S. P., Stirnberg, P., Forde, B. G., and Leyser, O. (2000). The hormonal regulation of axillary bud growth in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *24*(2), 159-169.
5- Chaudhuri, S., and Mukundan, U. (2001). Aloe vera L.-Micropropagation and characterization of its gel.

6- Garner, J.M., keever, G.J., Eakes, D. J and Keesler J. R (1998). Sequential BA application enhance offset formation in hosta. HortSci, 33:707-709.

7- Ghaleh, Z. R., Sarmast, M. K., and Atashi, S. (2020). 6-Benzylaminopurine (6-BA) ameliorates drought stress response in tall fescue via the influencing of biochemicals and strigolactone-signaling genes. *Plant Physiology and Biochemistry*, *155*, 877-887.

8- Hartmann HT, Kester DE, Davies FT and Geneve RL. 2002. Plant propagation principle and practices. 7th edition, Prentice Hall International.Englewood Cliffs. New York, USA.

9- Hashem AD and Kaviani B. In vitro proliferation of an important medicinal plant Aloe – A method for rapid production.Australian Journal of Crop Science. 2010; 4(4):216-222.

10- Kalimuthu K, Vijayakumar S, Senthilkumar RR and Suresh KM. Micropropagation of Aloe vera Linn. - a medicinal plant. International Journal of Biotechnology and biochemistry. 2010; 6(3):405-410.

11- Khalighi, A., Hojati Y, Babalar, M and Naderi, R (2005). Effects on nutrition solutions, cytokine and soil texure on bulb growth, quality of bulb and number of bulblet in Drawin hybrid tulip Apeldoorn. J pajoushsazandegi, 73: 58-64.

12- Mimaki Y, Inoue T, Kuroda M and Sashida Y (1996) Steroidal saponins from SansevieriatrifasciataPhytochemistry 43:1325–1331.

13- Müller, D. and Leyser, O. (2011) Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Ann. Bot-london.* **107**, 1203– 1212.

14- SalehiSardoei, A., Sarhadi, H., RohanyYazdi, M., Arbabi, M., and Jahantigh, M. (2013). Effect of gibberellic acid and benzylaadenine growth regulators on offsets production of Aloe Barbadensis at greenhouse conditions. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, *1*(11), 1457-1465.

15- Sreenivasan V, Somasundaram S, Ravindran D, Manikandan V and Narayanasamy R (2011) Microstructural, physico-chemical and mechanical characterisation of Sansevieriacylindricabres– An. exploratory investigation Materials Design 32:453–461

16- Surafel S, Gamachu O and Abel D. In vitro propagation of Aloe vera Linn from shoot tip culture.GSC Biological and Pharmaceutical Sciences. 2018; 4(2):001-006.

17- Takawira R and Nordal I. The genus Sansevieria (family Dracaenaceae) in Zimbabwe. In: XX International Eucarpia Symposium, Section Ornamentals, Strategies for New Ornamentals-Part II 572 (2001) pp 189–198

18- Tchegnitegni BT, Teponno RB, Jenett-Siems K, Melzig MF, Miyamoto T and Tapondjou LA (2017) A dihydrochalcone derivative and further steroidal saponins from SansevieriatrifasciataPrainZeitschrift fur Naturforschung C. Journal of biosciences 72:477–482. doi:10.1515/znc-2017-0027

19- Teponno RB, Tanaka C, Jie B, Tapondjou LA and Miyamoto T (2016) Trifasciatosides A-J, Steroidal Saponins from Sansevieriatrifasciata. Chem Pharm Bull 64:1347–1355. doi:10.1248/cpb.c1600337

20- Zhang, N and Hasenstein H (1999). Initiation and elongation of lateral roots in Lac ca sativa. International J Plant Sci, 160(3): 511-519.

Investigation of the regression relationship between storage time and increase in peroxide value content in olive oil

Ahmad Reza Dadras[1*]; Azizollah Abdollahi[2]

1- Research Assistant of Agricultural and Horticultural Research Department, Zanjan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Zanjan, Iran.
2-Expert in Agricultural and Horticultural Research Department, Zanjan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Zanjan, Iran.

*Corresponding Author Email address: a.dadras@yahoo.com; a.dadras@areeo.ac.ir

Abstract

Olive, as one of the most important agricultural products, has always played an important role in the country's economy. The quality of olive oil changes during the storage period. One of the most important indices of the quality of olive oil during storage is the value of peroxide. In this regard, in order to determine how the relationship between the amount of peroxide over time, the present experiment was performed. For this purpose, after extracting the oil, the amount of peroxide was measured during nine stages at intervals of three months. The results showed that there was a significant difference between the value of peroxide in different stages. Also, the relationship between the value of peroxide and time with an explanation coefficient of 99% is justified by a quadratic relationship. There were no significant differences in the first three samples (six months after oil extraction). However, from the third to the ninth stage, the value of peroxide increased linearly with a very significant regression slope (P<.001), so that for each month, by 0.9 meq O2/kg oil increased the value of peroxide. It is worth mentioning that due to important influential factors including the mechanical cold press method for oil extraction, choosing the proper time to harvest olive fruit, and also oil extraction immediately after fruit harvest, the initial value of peroxide was very low (0.76 meq O2/kg oil). For this reason, after 24 months, the value of peroxide reached to 17.41meq O2/kg oil. Obviously, if the usual methods are used in oil extraction, due to the significant regression slope of the increase of peroxide per time, the value of peroxide will reach a very high level after a few months and will be directly related to reducing the olive oil quality.

Keywords: Relationship, olive oil quality, storage

بررسی رابطه رگرسیونی بین طول زمان نگهداری و افزایش ارزش پراکسید در روغن زیتون

احمدرضا دادرس[۱*]؛ عزیزاله عبداللهی[۲]؛

۱- استادیار پژوهشی بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، زنجان، ایران.
۲- کارشناس مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، زنجان، ایران

*ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: a.dadras@yahoo.com; a.dadras@areeo.ac.ir

چکیده

زیتون همواره به عنوان یکی از مهمترین محصولات کشاورزی، نقش مهمی در اقتصاد کشور دارد. کیفیت روغن زیتون در طی دوره مدت نگهداری تغییر می‌کند. یکی از مهمترین شاخص‌های موثر در کیفیت روغن زیتون در طول دوره نگهداری، میزان پراکسید است. در این راستا و به منظور تعیین چگونگی ارتباط بین میزان پراکسید در طی زمان آزمایش حاضر انجام شد. بدین منظور پس از استخراج روغن در طی نه مرحله زمانی و با فاصله هر سه ماه، میزان پراکسید اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد اختلاف معنی‌داری بین میزان پراکسید روغن در مراحل مختلف وجود دارد. همچنین رابطه بین میزان پراکسید با زمان با ضریب تبیین ۹۹ درصد با یک رابطه درجه دوم توجیه می‌شود. در سه نمونه‌برداری نخست (شش ماه پس از استخراج روغن) اختلافات غیرمعنی‌دار بود. اما از مرحله سوم تا مرحله نهم میزان پراکسید به صورت خطی و با شیب رگرسیونی بسیار معنی‌دار ($P<.001$) افزایش یافت، به‌طوری که با ازای سپری شدن هر ماه، به میزان ۰/۹ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم روغن ارزش پراکسید افزایش یافت. شایان ذکر است با توجه عوامل مهم تاثیر گذار شامل روش مکانیکی سرد برای استخراج روغن، انتخاب زمان مناسب برداشت میوه زیتون و همچنین روغن کشی بلافاصله بعد از برداشت میوه، میزان اولیه پراکسید بسیار پایین و به میزان ۰/۷۶ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم روغن بود و به همین علت پس از سپری شدن ۲۴ ماه میزان پراکسید به ۱۷/۴۱ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم رسید و بدیهی است اگر از روش‌های معمول در کارخانجات روغن‌کشی استفاده شود با توجه به شیب رگرسیونی معنی‌دار افزایش پراکسید به ازای زمان، میزان پراکسید پس از سپری شدن چند ماه به میزان بسیار بالایی خواهد رسید که رابطه مستقیم با کاهش کیفیت روغن زیتون خواهد داشت.

واژگان کلیدی: ارتباط، کیفیت روغن زیتون، ماندگاری

۱.مقدمه

زیتون با نام علمی (Olea europaea L.) متعلق به خانواده (Oleaceae) یک گیاه ویژه مناطق نیمه گرمسیری است. این درخت با پیشینه هزارساله در ایران یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی بوده و همواره نقش مهمی در اقتصاد دارد. درخت زیتون در اقلیم مدیترانه‌ای با آب و هوای معتدل و زمستان‌های ملایم رشد و نمو می‌کند (محمدی و وکیلی، ۱۳۸۶). امروزه بیش از ۱۰۰۰ رقم زیتون با هدف تولید روغن، کنسرو و یا دو منظوره به صورت بومی در کشورهای مختلف جهان وجود دارد (Wiesman, 2009).

مهمترین فرآورده کشت زیتون، روغن آن می‌باشد که تقریبا ۹۳ درصد تولید جهانی آن منحصراً جهت تهیه روغن بکار می‌رود (درویشیان، ۱۳۷۶). دوعامل زمان برداشت و نگهداری مناسب میوه پس از برداشت در تعیین مقدار روغن و کیفیت آن اهمیت به سزایی دارد. تعیین زمان برداشت زیتون از منطقه‌ای به منطقه دیگر با توجه به شرایط اقلیمی، زراعی و باردهی متفاوت می‌باشد (درویشیان، ۱۳۷۶؛ حامدی و همکاران، ۱۳۸۳). روغن زیتون طبیعی با داشتن طعم منحصر به فرد و خوشمزه، متمایز از دیگر روغن‌های گیاهی است (Boskou, 1996). روغن زیتون، روغنی است که با روش مکانیکی، فقط از میوه درخت زیتون بدون هیچ گونه عمل‌آوری شیمیایی یا اختلاط با سایر روغن‌ها به دست می‌آید (استاندارد ملی ایران شماره ۱۴۴۶، ۱۳۸۹)، به عبارت دیگر می‌توان گفت که فرآیند تهیه روغن زیتون فرابکر از درخت زیتون شروع و به بطری ختم می‌شود. بنابراین، لازم است که در هر مرحله از فرآیند، عواملی که روی خواص کیفی روغن تأثیر دارند کنترل شوند تا باعث تولید ترکیبات اکسیداتیو نشود که نتیجه آن کاهش کیفیت روغن زیتون است (Morello et al., 2004). روغن زیتون فرابکر غنی از اسیدهای چرب غیراشباع، ویتامین‌ها و ترکیبات مفید (آنتی اکسیدان‌های طبیعی) می‌باشد (Cecchi et al., 2006).

تعیین کیفیت روغن زیتون با استفاده از برخی از روش‌های فیزیکوشیمیایی و ارزیابی حسی انجام می‌شود. از شاخص‌های کیفی روغن زیتون می‌توان به ترکیب اسیدهای چرب، ارزش پراکسید، ترکیبات فنلی، عدد یدی، شاخص‌های حسی اشاره نمود (Khaleghi et al., 2015). یکی از روش‌های بررسی کیفیت روغن زیتون بررسی ارزش پراکسید است. پراکسیدها محصولات حد واسط اکسیداسیون روغن هستند و زمانیکه روغن در معرض اکسیژن، نور و یا مخصوصا در دماهای بالا قرار میگیرد در روغن ایجاد میشوند. اکسیداسیون و تشکیل پراکسید در طول استخراج روغن نیز تولید می‌شود و بعد از ریختن روغن در شیشه و در مدت ذخیره‌سازی نیز ادامه می‌یابند (Mailer and Graham,2009). لازم به ذکر است که میزان ارزش پراکسید در طی مدت زمان نگه‌داری روغن افزایش می‌یابد. لذا پژوهش حاضر برای بررسی ارتباط بین میزان افزایش این شاخص در طی مدت زمان نگه‌داری روغن طراحی شد.

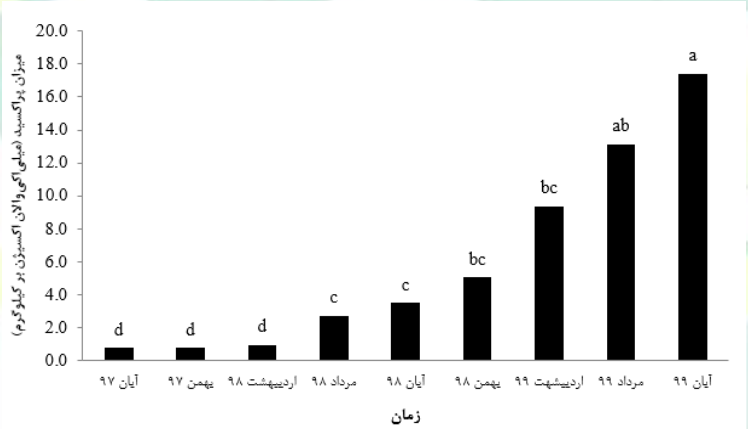
۲.مواد و روش‌ها

عملیات اجرایی این پژوهش از آبان ۱۳۹۷ آغاز و تا آبان ۱۳۹۹ در نه مرحله با فاصله زمانی هر سه ماه یکبار، انجام شد. آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. در ابتدا نمونه‌ها از باغات زیتون سازمان اتکا در منجیل از درختان زیتون رقم زرد جمع‌آوری شد. فاصله درختان شش در شش بود و آبیاری تحت فشار و به صورت قطره‌ای و تغذیه درختان در این باغ به صورت چال کود در پاییز و در فصول دیگر به صورت کودآبیاری و همچنین محلول پاشی انجام شد. میوه‌ها پس از برداشت در سه تکرار مجزا به آزمایشگاه منتقل شد و سپس عملیات روغن‌گیری از هر کدام از تکرارها بطور جداگانه انجام شد. روش استخراج روغن، روش مکانیکی سرد بود. روغن حاصل از هر یک از تکرارها در ظروف شیشه‌ای تیره رنگ بطور جداگانه منتقل و شماره‌گذاری شد. محل نگهداری شیشه‌های حاوی روغن در شرایط معمولی دمای اتاق (داخل آزمایشگاه) و در داخل کابینت (به دور از دسترسی به نور) در نظر گرفته شد. اندازه‌گیری شاخص کیفی روغن‌های زیتون استحصالی بر مبنای ارزش پراکسید در طی نه مرحله انجام شد که شامل مرحله اول بلافاصله پس از استخراج روغن (آبان ۹۷)، سه ماه (بهمن۹۷)، شش ماه (اردیبهشت ۹۸)، نه ماه (مرداد ۹۸)، ۱۲ ماه (آبان۹۸)، ۱۵ ماه (بهمن ۹۸)، ۱۸ ماه (اردیبهشت ۹۹)، ۲۱ ماه (مرداد۹۹) و ۲۴ ماه (آبان۹۹) پس از روغن‌گیری بود. اندازه‌گیری عدد پراکسید

طبق استاندارد ملی ایران (۱۳۸۷) به شماره ۴۱۷۹ انجام شد. پس از ثبت داده‌ها، ابتدا مفروضات تجزیه واریانس بررسی شد. پس از اطمینان از برقراری مفروضات، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین به روش توکی در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد.

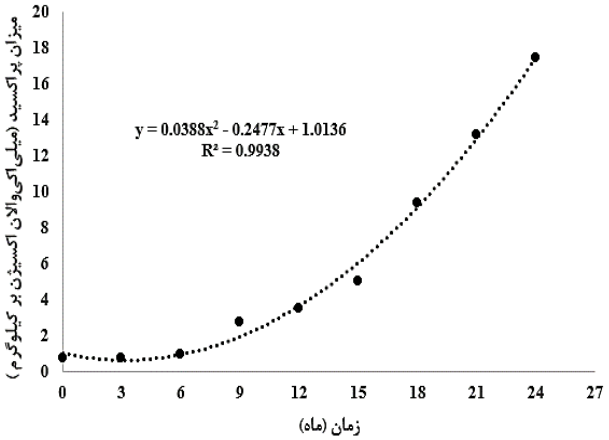
۳.نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس میزان پراکسید در نه مرحله زمانی نشان داد، اختلاف بین زمان‌ها در سطح یک درصد معنی‌دار است. بر اساس نتایج مقایسه میانگین، تا شش ماه پس از استخراج روغن، اختلاف بین نمونه‌های روغن از لحاظ ارزش پراکسید غیرمعنی‌دار برآورد شد که نشاندهنده حفظ کیفیت روغن زیتون تا شش ماه پس از استخراج در صورت نگه‌داری در شرایط مناسب از جمله قراردادن دور از دسترس نور و دمای مناسب (دمای آزمایشگاه) می‌باشد (شکل ۱). پس از گذشت نه ماه، میزان پراکسید از ۰/۷۶ (در مرحله استخراج روغن) به ۲/۷۳ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم روغن افزایش معنی‌دار یافت که یک افزایش نزدیک به سه برابری است. افزایش میزان پراکسید از این زمان تا پایان آزمایش به صورت خطی و با میزان شیب رگرسیونی قابل ملاحظه افزایش یافت به طوری‌که مقدار این متغیر در آخرین نمونه برداری (آبان ۹۹) به ۱۷/۴۱ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم روغن یعنی حدود ۲۳ برابر مقدار اولیه رسید.

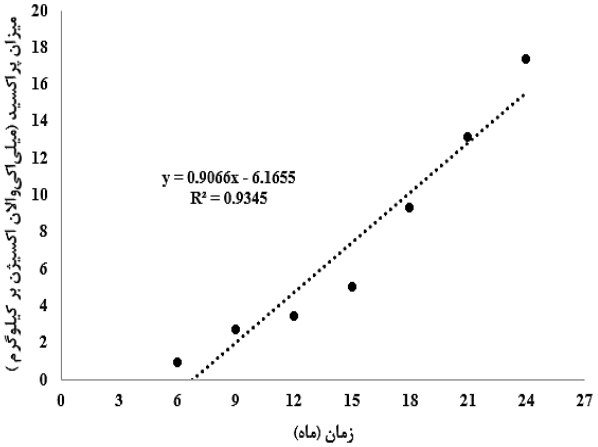


شکل۱: مقایسه میانگین مقدار پراکسید روغن زیتون در زمان‌های مختلف ماندگاری. حروف مشابه اختلاف غیرمعنی‌دار با استفاده از مقایسه میانگین توکی در سطح ۵ را نشان می‌دهد.

به منظور درک چگونگی ارتباط بین میزان پراکسید در طی زمان، رابطه رگرسیونی بین دو متغیر برازش شد. منحنی و معادله برازش شده در شکل ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج، رابطه بین افزایش پراکسید در روغن زیتون در طی زمان بر اساس یک معادله درجه دوم و با درصد توجیه بیش از ۹۹ درصد تبیین می‌شود. این نوع رابطه نشان می‌دهد که در ابتدای منحنی (شش ماه نخست پس از استخراج روغن)، مقادیر پراکسید افزایش غیرمعنی‌داری داشت اما پس از سپری شدن این مدت زمان، افزایش پراکسید یک روند افزایشی و با یک شیب تند داشت. به منظور درک ریاضی چگونگی این افزایش، بخش دوم منحنی یعنی از نمونه برداری سوم تا انتهای آزمایش به صورت یک معادله خطی برازش شد که در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۲: رابطه بین میزان پراکسید روغن زیتون در طی زمان از زمان استخراج روغن تا ۲۴ ماه



شکل ۳: رابطه بین میزان پراکسید روغن زیتون در طی زمان از شش ماه پس از استخراج روغن تا ۲۴ ماه

ضریب تبیین این رابطه خطی برازش شده، ۹۳ درصد برآورد شد که بیانگر قدرت بالای معادله در توجیه افزایش پراکسید روغن زیتون در طی زمان پس از شش ماه تا ۲۴ ماه پس از استخراج روغن می‌باشد. همچنین ضریب رگرسیون این معادله ۰/۹ بدست آمد که در سطح یک درصد معنی‌دار بود. این مقدار ضریب رگرسیون نشان می‌دهد پس از شش ماه سپری شدن از استخراج روغن زیتون، به ازای هر ماه، میزان پراکسید ۰/۹ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم روغن افزایش می‌یابد که مقدار قابل توجهی است. البته نکته بسیار مهمی که باید به آن توجه داشت، مقدار اولیه پراکسید در روغن زیتون بلافاصله بعد از استخراج می‌باشد. در آزمایش حاضر استخراج روغن به روش مکانیکی سرد بود و از عوامل تأثیرگذار دیگر می‌توان به زمان مناسب برداشت میوه زیتون و همچنین روغن‌کشی بلافاصله بعد از برداشت میوه است که نقش کلیدی در مقدار بسیار پایین ارزش پراکسید روغن زیتون در ابتدای آزمایش دارد. این در صورتی است که لطفی و همکاران، ۱۳۹۷ با ارزیابی کیفی دو رقم زیتون طارم ۲ و دزفولی در شرایط اهواز با استفاده از صفت ارزش پراکسید مقدار این متغیر را پس از استخراج روغن برای این ارقام را بترتیب ۹/۲۵ و ۵/۵ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم روغن گزارش نمودند. در مطالعه‌ای که به منظور بررسی تاثیر اقلیم کازرون بر شاخص‌های کیفی روغن زیتون ارقام زرد، روغنی و ماری انجام گرفت محققین گزارش نمودند که میزان پراکسید برای این ارقام به ترتیب ۵/۶۲، ۷/۷۵ و ۵/۵۶ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم روغن است (هاشم‌پور و همکاران، ۱۳۸۹). بر همین اساس، روغن زیتون در آزمایش حاضر حتی پس از سپری شدن ۲۴ ماه از استخراج روغن و افزایش حدود ۲۳ برابری ارزش پراکسید، براساس استاندارد ملی ایران(۱۳۹۰) به شماره ۱۴۴۶در محدوده استاندارد مصرف انسانی حفظ شد (طبق گروه‌بندی استاندارد فوق مقدار پراکسید کمتر از ۲۰ در محدوده مجاز مصرف انسانی است). لذا بدیهی است اگر از روش‌های معمول در کارخانجات روغن‌کشی استفاده شود با توجه به شیب رگرسیونی بسیار معنی‌دار افزایش پراکسید به ازای زمان، میزان پراکسید پس از سپری شدن چند ماه به میزان بسیار بالایی خواهد رسید که رابطه مستقیم با کاهش کیفیت روغن زیتون خواهد داشت.

نکته مهم بعدی شرایط نگهداری روغن در طی زمان است که در آزمایش حاضر روغن‌ها در ظروف شیشه‌ای تیره رنگ و در دمای آزمایشگاه و دور از دسترسی به نور نگهداری شدند. بدیهی است در صورت افزایش دما و قرار گرفتن روغن زیتون در معرض نور باعث افزایش بیشتر پراکسید و افت شدیدتر کیفیت روغن در طی زمان خواهد شد.

۴.نتیجه‌گیری

به منظور بررسی رابطه بین میزان ارزش پراکسید به عنوان یک شاخص مهم ارزیابی کیفیت روغن زیتون در طی زمان، رابطه رگرسیونی بین دو متغیر با بررسی میزان پراکسید در نه مرحله زمانی برازش شد و نتایج بیانگر این مطلب بود که کیفیت روغن زیتون بر اساس شاخص ارزش پراکسید به طور معنی‌داری تحت تأثیر زمان قرار می‌گیرد. به طوری‌که ارزش پراکسید در طی ۲۴ ماه از میزان ۰/۷۶ در زمان استخراج روغن به میزان ۱۷/۴۱ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم روغن (یعنی افزایش ۲۳ برابر) رسید که رابطه مستقیم با کاهش کیفیت روغت زیتون دارد.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دادند از همکاری شرکت مزارع نوین ایرانیان (کشت و صنعت گیلان) و ایستگاه تحقیقات زیتون طارم تشکر قدردانی نمایند.

منابع

۱. استاندارد ملی ایران، ۱۳۸۷. اندازه گیری عدد پراکسید در روغن ها و چربی های خوراکی. استاندارد ملی شماره ۴۱۷۹.
۲. استاندارد ملی ایران، ۱۳۹۰. روغن زیتون-ویژگی ها و روش های آزمون (تجدید نظر سوم). استاندارد ملی شماره ۱۴۴۶.
۳. حامدی م.م.، دمیرچی ص.ا. و صفافر ح. ۱۳۸۳. آثار تثبیت گرمایی بر کیفیت و میزان استحصال روغن زیتون. فصلنامه علوم و صنایع غذایی ایران .دوره ۱، شماره ۱، صفحه- ۲۵-۳۰.
٤. درویشیان م. ۱۳۷۶. زیتون. نشر آموزش کشاورزی. ۲۵۰ صفحه.
٥. هاشم‌پور، ا.، فتوحی قزوینی، ر.، بخشی، د. و اسدی صنم، س. ۱۳۸۹. تاثیر اقلیم کازرون برشاخص‌های کیفی روغن زیتون (*Olea europaea* L.) ارقام زرد، روغنی و ماری. علوم باغبانی ایران. دوره ۴۱، شماره ۱، صفحه ۴۷-۵۳.
٦. لطفی ی.، خالقی ا. و معلمی ن. ۱۳۹۷. ارزیابی کیفی روغن دو رقم زینون طارم و دزفولی در شرایط اهواز. بەزراعی کشاورزی. دوره ۲۰، شماره ۴، صفحه ۹۰۳- ۹۱۵.
۷. محمدی ح. و وکیلی د. ۱۳۸۶. زیتون (کاشت، داشت، برداشت و فراوری). انتشارات ندای سبز شمال، ۲۱۶ صفحه.
8. Boskou D. 1996. Olive oil: Chemistry and technology. Champaign, IL (USA): AOCS Press.
9. Cecchi T., De Marco C., Passamonti P. and Pucciarelli F. 2006. Analytical definition of the quality of extra-virgin olive oil stored in polyethylene terephthalate bottles. Journal of Food Lipids, 13: 251–258.
10. Khaleghi E., Arzani K., Moallemi N. and Barzegar, M. 2015. The efficacy of kaolin particle film on oil quality indices of olive trees (*Olea europaea* L.) cv. 'Zard' grown under warm and semi-arid region of Iran. Food Chemistry, 166: 35-41.
11. Mailer, R.J and K. Graham. 2009. Effect of storage containers on olive oil quality. rural research and
12. development corporation. 31 pages.
13. Morello JR., Motilva MJ., Tovar MJ. and Romero MP. 2004. Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. Food Chemistry, 85: 357–364.
14. Wiesman Z. 2009. Desert Olive Oil Cultivation. Academic Press publication. pp. 416

Relationship between traits in recombinant Iranian rice lines under salinity stress

Mohammad Javad Behrozbeh[1]; Mahjoubeh Akbari[2*]; Hussein Sabouri[3]

1. Former graduate student of crop biotechnology, Department of Plant Production, Collage of Agriculture science and Natural Resource, Gonbad Kavous University
2. M.Sc. student of crop biotechnology, Department of Plant Production, Collage of Agriculture science and Natural Resource, Gonbad Kavous University
3. Associate Professor, Department of Plant Production, Collage of Agriculture science and Natural Resource, Gonbad Kavous University

**Corresponding Author Email address:* mahjoob.htr@gmail.com

Abstract

Soil salinity is one of the most important limitations of crop growth due to the toxicity and prevention of water absorption. In order to evaluate the traits related to salinity tolerance in rice vegetative stage, an experiment was conducted in greenhouse of Gonbad Kavous University as a randomized complete block design with three replications and a salinity treatment on the RIL population obtained from the crossing of Ahlami Tarom cultivar and Neda variety. The data measured in the experiment showed high variation and the presence of relative resistance to salinity in the vegetative stage in the population under study. The highest correlation was found between leaf number per plant and stem dry weight of 0.734. Regression results also indicated that salinity resistant lines have higher stems and leaves and higher altitudes. The results of this research can be used for selection projects for breeding programs.

Keywords: Regression, Genotype code, correlation, Rice, Salinity

رابطه بین صفات در لاین‌های نوترکیب برنج ایرانی تحت تنش شوری

محمدجواد به روزبه[۱]؛ محجوبه اکبری[2*]؛ حسین صبوری[3]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس
۲. دانشجو کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس
۳. دانشیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: mahjoob.htr@gmail.com

چکیده

شوری خاک به دلیل ایجاد سمیت و جلوگیری از جذب آب و عناصر یکی از مهم‌ترین محدودیت های رشد گیاهان زراعی محسوب می شود. به منظور ارزیابی صفت های مرتبط با تحمل شوری در مرحله گیاهچه‌ای برنج آزمایشی در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه گنبدکاووس به صورت طرح بلوک های کامل تصادفی با سه تکرار در دو سطح شاهد بدون تنش و شوری ۸ دسی‌زمینس بر متر بر روی ۹۶ ژنوتیپ جمعیت لاین‌های نوترکیب حاصل از تلاقی رقم های اهلمی طارم و ندا انجام گرفت. بررسی اطلاعات حاصل از داده‌های صفات اندازه‌گیری شده در آزمایش نشان دهنده تنوع بالا و وجود مقاومت نسبی به شوری در مرحله رویشی در جمعیت مورد بررسی بود. همچنین بیشترین همبستگی مربوط به تعداد برگ در بوته و وزن خشک ساقه به میزان 0.734 بود. نتایج رگرسیون نیز حاکی از آن بود که لاین های مقاوم به شوری دارای ساقه و برگ بیشتر و ارتفاع بلندتر هستند. از نتایج این تحقیق می‌توان برای برنامه‌های انتخاب پروژه های اصلاحی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: برنج ، رگرسیون ، شوری ، کد ژنوتیپی ، همبستگی

۱. مقدمه

برنج (Oryza sativa L.) از مهمترین و قدیمی ترین محصولات زراعی و غذای اصلی بیش از نیمی از مردم جهان می باشد (Ghosh and Chakma, 2015 ; Park et al., 2015) . براساس گزارش سازمان خواروبار جهانی (فائو) تولید برنج در سال ۲۰۱۸ برابر ۵۱۰ میلیون تن بوده است (FAO, 2019). کشت برنج همواره توسط تنش های زیستی و غیرزیستی تهدید می‌شود و در میان تنش‌های غیرزیستی، شوری خاک از عوامل اصلی موثر بر رشد و عملکرد آن در سراسر جهان است (Wang et al., 2012; Ganie, 2019). تنش شوری یکی از مهمترین تنش های غیر زیستی است که تولید برنج در سراسر جهان را محدود می کند (Jahan et al., 2019). کشت برنج در ایران حائز اهمیت است و شوری روزافزون خاک های زراعی تولید این محصول را با مشکل مواجه نموده (Nabiollahi et al., 2017) و با توجه به این موضوع تولید ارقام متحمل به تنش شوری از برنامه های مهم به نژادی محسوب می شود (Kordrostami et

(al., 2017). تنش شوری برنج را در مراحل مختلف ، از جوانه زنی تا بلوغ تحت تاثیر قرار می دهد (Choudar et al., 2016; Krishnamurthy et al., 2015; Tiwari et al., 2015) . در اواخر مرحله رشد برنج توانایی تحمل برخی تنش شوری را دارد اما در مرحله ی گیاهچه نسبت به شوری حساس تر است شوری منجر به کاهش جوانه زنی و عملکرد و رشد گیاه می شود (Tack et al., 2015 ; Zhang et al., 2018) . بهبود برای تحمل به تنش های غیر زیستی در برنج، می تواند تولید را در مناطق تحت تاثیر تنش که هم اکنون از آن ها استفاده نمی شود، گسترش دهد. بر همین مبنا، نیاز بیشتر به فهم چگونگی پاسخ گیاهان در شرایط مختلف با امید به توسعه مقاومت نباتات به تنش‌های محیطی جلوه‌گر می‌شود (ربیعی و همکاران ۱۳۹۲). با روند رو به رشد جمعیت جهان و افزایش زمین های شور، درک سازوکارهای گیاهان در پاسخ به تنش شوری در جهت تأمین امنیت غذایی و افزایش کارایی تولید محصولات زراعی حائز اهمیت می باشد (Mirdarmansuri 2017., al et) .

گیاهچه های برنج در مرحله یک تا دو برگی حساسیت بالایی به شوری دارند (Isfahani, Flowers and Yeo, 1988; Moradi, 2002 ;1999). بررسی عکس العمل گیاهچه های ۱۰ تا ۱۴ روزه در برابر شوری ۵۰ تا ۷۰ میلی مولار مشخص کرده است که دلیل مرگ اکثر ارقام برنج در مرحله گیاهچه به علت تجمع زیاد نمک در برگ هاست (Flowers et al., 1977).

Kumar و همکاران (2007) و Kibria و همکاران (۲۰۱۷) با مطالعه عکس‌العمل ارقام برنج ایندیکا نشان دادند که در تنش شوری درصد جوانه زنی، رشد گیاه و مقدار رنگیزه کلروفیل کاهش پیدا می کند در حالی که سطوح پرولین و پراکسیداسیون چربی ها افزایش می یابد. آن ها اختلاف معنی‌داری را بین ارقام ایندیکا برای صفات مذکور مشاهده نمودند. Shiro و همکاران (2002)، ارتباط بین توزیع و تجمع سدیم و آسیب وارد شده ناشی از شوری را در برگ های گیاهچه های برنج بررسی نمودند. آن‌ها نشان دادند که تجمع سدیم در برگ های مسن تر بیشتر است. در مطالعه ای با اعمال تنش شوری ۸ دسی زیمنس در مرحله گیاهچه تحت شرایط هیدروپونیک صفاتی چون طول اندام هوایی، وزن خشک ریشه، وزن خشک اندام هوایی، سطح برگ، محتوای کلروفیل کاهش پیدا کرد اما نسبت سدیم به پتاسیم افزایش پیدا کرد (Gholizade, 2013) . مقدار کلروفیل در چهارمین برگ نسبت به برگ های دیگر کمتر بود. در پژوهشی نشان داده شد که شوری موجب کاهش فتوسنتز، محتوای کلروفیل و فعالیت آنزیم روبیسکو می گردد (Singh et al., 2007) . یکی از اثرات شوری بر گیاه کاهش مساحت برگ بوده که باعث مختل شدن فتوسنتز و کاهش آن می شود (میرعرب رضی و همکاران، ۱۳۹۸). این مطالعه نشان داد که ارتباط بین آسیب ناشی از شوری و سن برگ قوی تر از ارتباط آن با غلظت سدیم در برگ‌هاست. در تحقیق دیگری صبوری و همکاران (۱۳۸۷) ژنوتیپ های متحمل را دارای میانگین کم برای صفت های کد ژنوتیپی، درصد سدیم و نسبت سدیم به پتاسیم و میانگین بالا برای صفت های وزن خشک ریشه، ساقه، زیست توده، طول ساقه و ریشه گزارش نمودند. هدف این پژوهش بررسی صفت های تاثیرگذار بر مقاومت برنج به شوری در مرحله گیاهچه ای بود.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱- ارزیابی فنوتیپی صفات

ارزیابی واکنش لاین های مورد بررسی به تنش شوری در مرحله رویشی به وسیله آزمایشی به صورت طرح بلوک های کامل تصادفی با سه تکرار در دو سطح شاهد بدون تنش و شوری ۸ دسی‌زمینس بر متر در گلخانه دانشگاه گنبدکاووس اجرا شد. برای هر لاین ابتدا

درون پتری دیش جوانه زنی انجام گرفت و سپس در هر گلدان یک گیاهچه نشاء گردید. گلدان‌های تیمار شاهد با آب معمولی (EC برابر با ۰/۸۵۰ دسی‌زیمنس بر متر) و تیمار شوری با آب شور (EC هشت دسی‌زیمنس بر متر) آبیاری شدند. محلول آب شور به وسیله نمک (NaCl) تهیه شده و تنظیم میزان شوری محلول توسط دستگاه EC متر (مدل ۸۶۵۰۳، شرکت AZ، تایوان) انجام شد. هر گلدان دو مرتبه، یک بار در طول مرحله شروع رشد و بار دیگر سه هفته پس از نشاء کاری، توسط یک گرم کود کامل مخصوص گیاه برنج شامل N:15% - P_2O_5 15% - K_2O 30% - Mg 1% - Fe 1mg که در آن آهن به صورت کلاته شده است تغذیه شد. همچنین برای کنترل آفات از سم دیازنون گرانول به میزان یک گرم در هر گلدان ۱۰ کیلوگرمی استفاده شد. صفات مورفولوژیکی گیاهان در زمان شروع دوره زایشی یادداشت برداری شدند که این صفات شامل تعداد پنجه، ارتفاع بوته، وزن خشک ساقه، تعداد برگ، وزن خشک ریشه، کد ژنوتیپی، کلروفیل برگ و حجم ریشه اندازه‌گیری شدند. کلروفیل برگ گیاه توسط دستگاه کلروفیل متر(مدل CL-01، شرکت Hansatech، انگلستان) اندازه‌گیری شد. کد ژنوتیپی تحمل به شوری گیاهان هر لاین طبق جدول یک به آن ها داده شد.

جدول ۱: کددهی ژنوتیپی به لاین‌های مورد آزمایش در مرحله رویشی

میزان تحمل	علائم	کد ژنوتیپی
بسیار متحمل	رشد نرمال فاقد علائم برگی	۱
متحمل	رشد تقریبا نرمال، نوک برگ‌ها سفید یا تعدادی از برگ‌ها سفید و لوله‌ای	۳
نسبتا متحمل	تاخیر شدید رشد، اغلب برگ‌ها لوله‌ای، تعدادی از برگ‌ها بلند	۵
حساس	توقف کامل رشد، اغلب برگ‌ها خشک، تعدادی از گیاهان مرده	۷
بسیار حساس	تقریبا همه گیاهان مرده یا خشک	۹

۲-۲- تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های حاصل از بررسی ارقام با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند. نظر به اینکه ازمایش در دو زمان مجزا به دلیل کوچک بودن فضا انجام شد، داده ها به صورت مرکب تجزیه شد. تجزیه واریانس مرکب و ساده با استفاده از نرم‌افزار SAS در قالب طرح تجزیه مرکب انجام شد.

۳. نتایج و بحث

۱-۳- تجزیه واریانس صفت‌ها

نظر به معنی دار شدن اثر متقابل شرایط کشت و لاین، تجزیه واریانس برای هر محیط جداگانه انجام شد. نتایج تجزیه واریانس در شرایط شوری در جدول ۲ آمده است و طبق اطلاعات به دست آمده اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد بین لاین ها مشاهده گردید که این اختلاف از تنوع موجود در میان لاین‌ها حاصل می‌شود. در پژوهشی دیگر تمام صفات مورد آزمایش شامل تعداد پنجه،

ارتفاع گیاه، طول ساقه، طول ریشه، وزن خشک ریشه، وزن خشک برگ، وزن خشک ساقه و زیست توده کاهش بسیار معنی داری یافتند (میردارمنصوری و همکاران، ۱۳۸۸).

جدول ۲: تجزیه واریانس صفت‌های مورد ارزیابی تحت تنش هشت دسی زیمنس

		میانگین مربعات							
منابع تغییر	درجه آزادی	تعداد پنجه	ارتفاع بوته	وزن خشک ساقه	تعداد برگ در بوته	وزن خشک ریشه	کددهی فنوتیپی	کلروفیل برگ	حجم ریشه
تکرار	۲	2/۸۰۴	۲۹/۹۳۱	۰/۱۰۹	۴/۶۳۴	۱/۳۰۵	1/۶۸۴	۶/۸۱۴	۵۰/۷۷۰
لاین	۹۵	۵/۸۹۷**	۲۶۴/۳۳۱**	۱/۴۹۹**	۲۴/۲۸۷**	۱۵/۹۷۱**	5/۸۳۵**	۵/۴۲۵**	۱۰۳۵/۹۸**
خطای	۱۹۰	۱/۰۳۳	۳۴/۶۲	۰/۱۴	۵/۱۳	۰/۱۸	۰/۳۵	۰/۱۵	۱۱/۸۶
ضریب تغییرات		۱۵/۵۱۵	۸/۶۶۷	۱۶/۱۲۷	۲۶/۶۰۳	۴/۳۸۸	9/۶۷۰	۷/۱۶۴	۳/۸۸۳

*معنی دار در سطح ۵ درصد، **معنی دار در سطح ۱ درصد و ns عدم معنی داری را نشان می‌دهد.

۳.۲. همبستگی صفت‌ها

در بررسی همبستگی بین صفت‌ها بیشترین همبستگی مربوط به تعداد برگ در بوته و وزن خشک ساقه، به میزان 0/734 بود. همبستگی دیگر بین صفت‌های وزن خشک ریشه و حجم ریشه به میزان 0/679 مشاهده شد. برای دو صفت وزن خشک ساقه و ارتفاع بوته نیز به میزان ۰/۵۶۷درصد همبستگی وجود داشت (جدول ۳). تعیین همبستگی بین صفات مختلف به ویژه عملکرد دانه و اجزای آن و تعیین روابط علت و معلول آنها، به به نژادگران این فرصت را میدهد که مناسب ترین ترکیب اجزاء را که منجر به عملکرد بهتر و بیشتری شود را انتخاب کنند (بلوچزهی و کیانی، ۱۳۹۲) .

جدول ۳: همبستگی صفت‌های مورد ارزیابی تحت تنش شوری هشت دسی‌زیمنس

شماره صفت	صفت	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸
۱	تعداد پنجه	۱							
۲	ارتفاع بوته	-۰/۱٥۱	۱						
۳	وزن خشک ساقه	-۰/۲۷۹**	۰/٥٦۷**	۱					
٤	تعداد برگ در بوته	-0/۲۹۰**	۰/۳۰۷**	۰/۷۳٤**	۱				
٥	وزن خشک ریشه	۰/۰۸۳	۰/۲۰۹*	۰/۰۹۱	-۰/۰٤۲	۱			
٦	کد دهی ژنوتیپی	۰/۰۰٥	-۰/۳۷۳**	-۰/۳۲۳**	-۰/۲٦۲**	-۰/۱۹۹	۱		
۷	کلروفیل برگ	-۰/۲۲۳*	۰/۱٤۸	۰/۱٦٤	۰/۰۷۸	۰/۱۹۰	-۰/۰۲٤	۱	

۸	**حجم ریشه**	۰/۱۴۳	۰/۰۷۱	۰/۰۸۹	-۰/۰۶۹	۰/۶۷۹**	-۰/۰۵۵	۰/۰۴۸	۱

*معنی دار در سطح ۵ درصد، ** معنی دار در سطح ۱ درصد و ns عدم معنی داری را نشان می‌دهد.

۳-۳- رگرسیون صفت‌ها

در بررسی رگرسیون مرحله‌ای، صفت کددهی ژنوتیپی به عنوان متغیر وابسته و دیگر صفات به عنوان متغیر مستقل در نظر گرفته شدند، نتایج نشان داد صفت ارتفاع گیاه حدود 0/139 درصد از تغییرات کددهی ژنوتیپی گیاه را توجیه می‌نماید (جدول ۴). پس می‌توان گفت احتمالاً لاین‌های مقاوم به شوری دارای ساقه و برگ بیشتر و ارتفاع بلندتر هستند.

صبوری (۱۳۸۶) در مطالعه ای برای تنش شوری هشت دسی زیمنس بر متر در مرحله رشد رویشی ارقام برنج نشان داد که ارقام متحملی که از زیست توده بالایی برخوردار هستند، نسبت سدیم به پتاسیم کمتری نیز دارند و از این سازوکار برای مقابله با تنش شوری استفاده می‌کنند. در مطالعه صبوری (۱۳۸۶) صفت امتیاز ارقام به عنوان متغیر وابسته و سایر صفات به عنوان متغیر مستقل در نظر گرفته شد که صفت طول اندام هوایی 0/506 درصد از تغییرات توجیه نمود و همبستگی بین صفت امتیاز ارقام و طول اندام هوایی گیاه برابر با 0/415- گزارش شد (رابطه همبستگی منفی به علت کسب امتیاز پایین‌تر برای ارقام متحمل تر می باشد). در مطالعه اخیر نیز همبستگی بین صفت کددهی ژنوتیپی و ارتفاع بوته برابر با 0/373- مشاهده شد.

در تحقیقی Ismail و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که وزن خشک و تر ساقه و درصد سبز بودن گیاه برنج می‌تواند معیار مناسبی جهت ارزیابی تحمل گیاه به شوری باشد. در مطالعه ای نشان داده شد که با افزایش شوری ارتفاع بوته، وزن خشک ریشه و اندام هوایی و عملکرد ارقام مورد آزمایش به طور معنی داری کاهش یافت (Puvanitha and Mahendran, 2017) . در پژوهش دیگری رحیمی و همکاران (۱۳۸۹) عنوان کردند که عملکرد دانه در برنج با مساحت برگ پرچم، تعداد خوشه در بوته و طول دوره رویشی همبستگی مثبت و معنیداری داشت. با این وجود، در رگرسیون به روش گام به گام برای گزینش صفات توجیه کننده عملکرد دانه، صفات ارتفاع بوته، تعداد دانه پوک در خوشه، طول دوره رویشی، طول خوشه، وزن هزار دانه و مساحت برگ پرچم، وارد مدل شدند که با توجه به میزان درجه تبیین، 76/5 درصد از کل تغییرات عملکرد دانه توسط این صفات توجیه شد (رحیمی و همکاران، ۱۳۸۹).

در پاسخ به شوری نسبت بخش هوایی به ریشه کاهش می یابد. در تحقیقی دیگر محمدزاده و همکاران(۱۳۸۹) نشان دادند که در برنج صفات بیوماس کل، تعداد دانه پر و پوک، وزن کاه و کلش اثر معنی‌داری در تنش شوری دارد و صفات ارتفاع گیاه ، تعداد پنجه موثر اثر معنی‌داری نداشت. ایزددوست و همکاران (۱۳۹۲) در تحقیقات خود عنوان کردند که تنش شوری در مراحل ابتدایی رشد بر روی ویژگی های مورفولوژیک شامل طول شاخساره و ریشه، وزن خشک شاخساره و ریشه، نسبت طول ریشه به طول شاخساره و بیوماس رویشی اثر دارد و طول ریشه و شاخساره ها با افزایش شوری کاهش می یابد.

جدول ۴: رگرسیون مرحله‌ای برای صفت کددهی ژنوتیپی به عنوان وابسته و سایر صفات به عنوان متغیر مستقل

متغیر وارد شده به مدل	ضریب رگرسیون	خطای استاندارد	F	R^2
ارتفاع گیاه	۰/۳۷۳	۰/۰۱۴	۱۵/۲۲۶	۰/۱۳۹**

*معنی دار در سطح ۵درصد، ** معنی دار در سطح ۱ درصد و ns عدم معنی داری را نشان می‌دهد.

۴.نتیجه گیری

لاین های اصلاحی از نظر کد ژنوتیپی بر اساس جدول (۱) در چهار گروه کدبندی شدند که این موضوع نتایج تجزیه واریانس مبنی بر وجود اختلاف بین لاین‌ها را تایید می‌کند.

همچنین هیچ‌کدام از لاین ها، کد یک که نشان‌دهنده لاین بسیار متحمل به شوری است را دریافت ننمودند و همه لاین ها اثر تیمار شوری را نشان دادند. اکثر لاین ها دارای کد ژنوتیپی پنج (نسبتا متحمل به شوری) بودند و می توان گفت نتایج لاین های حاصل از تلاقی رقم های اهلمی طارم و ندا در مرحله رویشی نسبتا به شوری مقاوم می باشند. نتایج حاصل از خوشه بندی لاین‌ها نیز این نتیجه را تایید نمودند. نتایج حاصل از رگرسیون نیز نشان دهنده این موضوع بود که لاین های مقاوم به شوری دارای ساقه و برگ بیشتر و ارتفاع بلندتر هستند. جدول همبستگی صفات هم مشخص نمود که تعداد پنجه با وزن خشک ساقه نسبت عکس دارد. از نتایج این تحقیق می توان برای برنامه‌های انتخاب پروژه های اصلاحی استفاده نمود.

منابع

۱. اصفهانی م. ۱۳۷۷. بررسی واکنش های فیزیولوژیکی و مولکولی ارقام مختلف برنج به شوری و پساب. پایان نامه دکترا، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۲. ایزددوست ه.، سمیع زاده ح.، ربیع ب و عبدالهی ش. ۱۳۹۲. ارزیابی تحمل به شوری در ارقام و لاین های برنج (*Oryza sativa L.*) با تاکید بر شاخص های تحمل به تنش. فصلنامه تحقیقات غلات، دوره ۳، شماره ۳، ص: ۱۶۷-۱۸۰.

۳. بلوچزهی ا و کیانی غ. ۱۳۹۲. تعیین شاخص انتخاب برای بهبود عملکرد در برنج از طریق تجزیه علیت. پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی، دوره 5، شماره ۱۲، ص: ۷۵-۸۴.

٤. ربیعی ب.، مردانی ز.، صبوری ح و صبوری ع. ۱۳۹۲. مکانیابی QTLهای کنترلکننده ی تحمل به تنش های خشکی و شوری در مرحله جوانه زنی برنج. نشریه علوم گیاهان زراعی ایران، دوره۴۴، شماره ۴، ص: ۵۸۵-۵۹۶.

۵. رحیمی م.، ربیعی ب.، رمضانی م و موافق ص. ۱۳۸۹. ارزیابی صفات زراعی و تعیین متغیرها برای بهبود عملکرددر برنج. نشریه پژوهشهای زراعی ایران، دوره ۸، شماره ۱، ص: ۱۱۱-۱۱۹.

٦. میرعرب رضی م.، شیرزادیان خرم آباد ر.، صبوری ح.، ربیعی ب و حسینی مقدم ح. ۱۳۹۸. پاسخ لاین های نوترکیب برنج ایرانی (*Oryza sativa* L.) به تنش شوری در مرحله گیاهچه. پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی، دوره ۱۱، شماره ۲۹، ص: ۶۵ – ۸۴ .

۷. محمدزاده م.، پیغمبری س.ع.، نبی پوری ع و نوروزی م. ۱۳۸۹. ارزیابی عملکرد و صفات مورفولوژیکی در ژنوتیپهای متحمل و حساس به شوری در برنج. زراعت و اصلاح نباتات ایران، دوره ۶، شماره ۴، ص: ۶۱-۷۱.

۸. میردارمنصوری ش.، بابائیان جلودار ن و باقری ن. ۱۳۸۸. ارزیابی مقاومت ژنوتیپ های مختلف برنج ایرانی (*Oryza sativa L.*) تحت تنش شوری (NaCl). دانشور علوم زراعی، دوره ۲، شماره ۳، ص: ۵۸-۴۹ .

۹. صبوری ح. ۱۳۸۶. ارزیابی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم برنج ایرانی برای تحمل به شوری و مکان یابی QTL های مرتبط با آن. پایان نامه دکترا، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

۱۰. صبوری ح.، رضایی ع و مومنی ع. ۱۳۸۷. ارزیابی تحمل به شوری در ارقام بومی و اصلاح شده برنج ایرانی. نشریه علوم آب و خاک(علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی)، دوره ۱۲، شماره ۴۵ (الف)، ص: ۴۷-۶۳.

11. Choudary AD., Haritha G., Sunita T., Krishanmurthy SL., Divya B., Padmavathi G., Ram T and Sarla N. 2016. Haplotyping of rice genotypes using SSRs associated with salt tolerance. Rice Sci, 23, 317–325 .
12. FAO. 2019.
13. Flowers T.J., Troke, P.F. and Yeo A.R. 1977. The mechanisms of salt tolerance in halophytes. Annual review of plant physiology, 28, 183-221.
14. Flowers T.J. and Yeo A.R. 1988. Salinity and rice: A Physiological approach to breeding for resistance. Proceedings International Congress Plant Physiology, New Delhi, India. 2, 953-959.
15. Ganie S.A, Molla K.A, Henry R.J, Bhat K.V and Mondal T.K. 2019. Advances in understanding salt tolerance in rice. Ther Appl Genet, 132,851–870 .
16. Gholizade M. 2013. Study effect salt stress genotypes rice in germination stage. Journal Biotechnology Cells-Molecular, 2(6), 75-81.
17. Ghosh B and Chakma N. 2015. Impacts of rice intensification system on two C. D. blocks of Barddhaman district. West Bengal of Current Science, 109(2), 342-346.
18. Ismail A.M., Heuer S., Thomson M.J and Wissuwa M. 2007. Genetic and genomic approaches to develop rice germplasm for problem soils. Plant Molecular Biology, 65, 547–570.
19. Jahan N., Zhang Y., Lv Y., Song M., Zhao C.H., Hu H., Cui Y., Wang Z.H., Yang S.H., Hu J., Ye G., Qian Q., Gao Z.H and Guo.L. 2019. QTL analysis for rice salinity tolerance and fine mapping of a candidate locus *qSL7* for shoot length under salt stress. Plant Growth Regulation, 90, 307–319.
20. Kibria M.G., Hossain M., Murata Y and Hoque M.A. 2017. Antioxidant defense mechanisms of salinity tolerance in rice genotypes. Rice Science, 24, 155-162.
21. Kordrostami M., Rabiei B and Kumleh H.H. 2017. Different physiobiochemical and transcriptomic reactions of rice (*Oryza sativa L.*) cultivars differing in terms of salt sensitivity under salinity stress. Environmental Science and Pollution Research, 24, 7184.
22. Krishnamurthy SL., Sharma SK., Kumar V., Tiwari S and Singh NK. 2015. Analysis of genomic region spanning Saltol using SSR markers in rice genotypes showing differential seedlings stage salt tolerance. J Plant Biochem Biot, 25, 331–336.
23. Kumar V., Shiram V., Jawali N and Shitole M.G. 2007. Differential response of indica rice genotypes to NaCl stress in relation to physiological and biochemical parameters. Archives of Agronomy and Soil Science, 53(2), 581-592.
24. Mirdarmansuri S.H. 2017. Introducing the promising salt tolerance involved genes in rice based on the microarray data analysis. Science and Agricultural Industries, 18, 65-76.
25. Moradi F. 2002. Physiological characterization of rice cultivars for salinity tolerance during vegetative and reproductive stages. PhD Thesis, Los Banos, Philipines.
26. Nabiollahi K., Taghizadeh-Mehrjardi R., Kerry R and Moradian S. 2017. Assessment of soil quality indices for salt-affected agricultural land in Kurdistan Province, Iran. Ecological Indicators, 83, 482-494.
27. Park G.H., Kim J.H and Kim K.M. 2014. QTL analysis of yield components in rice using a cheongcheong/nagdong doubled haploid genetic map. American Journal of Plant Sciences, 5, 1174-1180
28. Puvanitha S and Mahendran S. 2017. Effect of Salinity on Plant Height, Shoot and Root Dry Weight of Selected Rice Cultivars. Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences , 4(4), 126-131.
29. Shiro M., Katsuya Y., Michio K., Mitsutaka T and Hiroshi M. 2002. Relationship between the distribution of Na and the damages caused by salinity in the leaves of rice seedling grown under a saline condition. Plant Production Science, 5, 269-274.
30. Singh M.P., Singh D.K and Rai M. 2007. Assessment of growth, physiological and biochemical parameters and activities of antioxidant enzymes in salinity tolerant and sensitive basmati rice varieties. Journal of Agronomy and Crop Science, 193, 398-412.
31. Tack J., Singh R.K., Nalley L.L., Viraktamath B.C., Krishnamurthy S.L., Lyman N and Jagdish K.S. 2015. High vapor pressure deficit drives salt-stress induced rice yield losses in India. Glob Change Biol, 21,1668–1678 .

32. Tiwari S., Krishnamurthy S.L., Kumar V., Singh B., Rao A.R., Mithra S.V A., K. Singh A and K. Singh N. 2016. Mapping QTLs for salt tolerance in rice (*Oryzasativa* L.) by bulked segregant analysis of recombinant inbred lines using 50K SNP chip. PLoS ONE, 11, e0153610.
33. Wang Z., Cheng J., Chen Z.H., Huang J., Bao Y., Wang J and Zhang H. 2012. Identification of QTLs with main, epistatic and QTL x environment interaction effects for salt tolerance in rice seedlings under different salinity conditions. Theor Appl Genet, 125, 807–815.
34. Zhang Y., Lv Y., Jahan N., Chen G., Ren D and Guo L. 2018. Sensing of abiotic stress and ionic stress responses in plants. International Journal of Molecular Sciences, 19, 3298.

Meta-analysis of QTL location experiments

Mahjoubeh Akbari[1*]; Hossein Sabouri[2]; Sayed Javad Sajjadi[3]; Leila Ahangar[4]; Saeed Yarahmadi[5]; Mahnaz Katouzi[6]

1- M.Sc. student of crop biotechnology, Department of Plant Production, Collage of Agriculture science and Natural Resource, Gonbad Kavous University

2- Associate Professor, Department of Plant Production, Collage of Agriculture science and Natural Resource, Gonbad Kavous University

3- Assistant Professor, Department of Plant Production, Collage of Agriculture science and Natural Resource, Gonbad Kavous University

4- Assistant Professor, Department of Plant Production, Collage of Agriculture science and Natural Resource, Gonbad Kavous University

5- Horticulture-Crops reseaech department, Golestan agricultural and natural resources research and education center, Agricultural research, Education and extension organization (AREEO), Gorgan,Iran

6- Department of plant Breeding and Genetic Resource, Agroscope, Switzerland

*Corresponding Author Email address: mahjoob.htr@gmail.com

Abstract

Meta analysis methods have been used in various fields of science. QTL meta-analysis is an important tool in integrating information from several QTL location studies. By integrating the information of several separate experiments, more statistical power is obtained to detect QTLs and more accurately estimate their genetic effects. QTL meta-analysis provides a better approach to identifying the genetic structure of complex inherited traits. This paper summarizes the basic theories and methods for meta-analysis of QTL location tests. Parametric and non-parametric statistical methods have been used in this field.

Keywords: Genetic map, Bio Mercator, Genetic effects, Consensus map

متاآنالیز آزمایش های مکان‌یابی QTL

محجوبه اکبری[۱*]؛ حسین صبوری[۲]، سید جواد سجادی[۳]؛ لیلا آهنگر[۴]؛ سعید یاراحمدی[۵]؛ مهناز کاتوزی[۶]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس
۲- دانشیار ،گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزي و منابع طبيعي، دانشگاه گنبد کاووس
۳- استادیار، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزي و منابع طبيعي، دانشگاه گنبد کاووس
٤- استادیار، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزي و منابع طبيعي، دانشگاه گنبد کاووس
٥- بخش تحقیقات علوم زراعی_باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران
٦- گروه اصلاح نباتات و منابع ژنتیکی، اگروسکوپ، سوئیس

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: mahjoob.htr@gmail.com

چکیده

روش های تحلیل متا، در زمینه های مختلف علوم مورد استفاده قرار گرفته است. متاآنالیز QTL یک ابزار مهم در ادغام اطلاعات از چندین مطالعه مکان یابی QTL است. با یکپارچه کردن اطلاعات چندین آزمایش جداگانه، قدرت آماری بیشتری برای تشخیص QTL ها و تخمین دقیق‌تر اثرات ژنتیکی آن‌ها به دست می‌آید. متاآنالیز QTL رویکرد بهتری برای شناسایی ساختار ژنتیکی صفات دارای وراثت پیچیده فراهم می‌آورد. در این مقاله، خلاصه‌ای از نظریه ها و روش‌های اساسی برای متاآنالیز آزمایش‌های مکان‌یابی QTL ارائه می شود. روش‌های آماری پارامتری و ناپارامتری در این زمینه مورد بهره برداری قرار گرفته است.

کلمات کلیدی : نقشه ژنتیکی، بیومرکاتور، اثرات ژنتیکی، نقشه توافقی

۱.مقدمه

به دست آوردن یک نتیجه منسجم و هماهنگ و مقایسه بین مطالعات به سبب وجود اختلاف در انتخاب جامعه، نمونه، متغیرهای مستقل و وابسته، روش های آماری بکار رفته در مطالعات و طرح های آزمایشی، با توجه به افزایش روزافزون مطالعات کاری سخت به نظر میرسد (Habibi et al., 2009) . در این صورت از متاآنالیز برای پاسخگویی به سوالاتی که یک مطالعه به تنهایی نمیتواند به آنها پاسخ دهد، به عنوان یک روش پژوهشی استفاده میشود (مختاری و همکاران، ۱۳۹۶). متاآنالیز ترکیب کمی و علمی نتایج تحقیقات است (Gurevitch etal., 2018) و یک روش آماری جدید برای ادغام اطلاعات مطالعات مستقل است. مطالعات مذکور می‌بایست موضوع مشابهی داشته باشند. بهترین متاآنالیز زمانی انجام می شود که تمام پژوهش هایی که در آن استفاده می شود دارای یک هدف اولیه (point end Primary) باشند (عزیزی، ۱۳۹۳) . تاکنون آزمایش های مکان‌یابی QTL متعددی در حیوانات و گیاهان انجام

شده است. برای مثال می توانید تاریخچه ای از مطالعات متا در علم اکولوژی را در جدول ۱ ببینید. اما تاکنون مطالعات QTL با استفاده از جمعیت هایی مختلف با نشانگرهایی متفاوت در محیط های متنوع انجام شده اند. همچنین تعداد افراد و نشانگرها نیز معیار دیگری از تنوع بین ازمایشات است. در نتیجه، یافته‌های این آزمایشات مستقیما با یکدیگر قابل مقایسه نیستند. متاآنالیز میتواند نشان دهد که مکان های QTL شناسایی شده برای یک صفت معین در یک جمعیت با مکان های شناسایی شده در سایر جمعیت ها یا حتی گونه‌های دیگر چقدر تطابق دارد (Goffinet and Goffinet, 2000; Hayes and Goddard, 2001; Khatkar et al., 2004). در دسترس بودن پایگاه‌های داده عمومی QTL، مانند Animal QTLdb (Hu et al., 2005; Hu et al., 2007) ، GRAMENE (Ni et al., 2009) و QTL MatchMaker (Star et al., 2006)، اطلاعات اولیه از مطالعات QTL را فراهم می‌کنند تا با مقایسه و ترکیب داده‌های QTL رسیدن به یک پاسخ قطعی تسهیل شود. Glaas در سال ۱۹۷۶ ادغام یافته های مجموعه ای از تحقیقات را با عنوان متاآنالیز در انجمن پژوهشی آموزشی آمریکا ابداع کرد (Glass,1976) و تأثیر انقلابی در بسیاری از زمینه‌های علمی داشته است و به ایجاد رویه مبتنی بر شواهد و حل و فصل نتایج تحقیقاتی به ظاهر متناقض کمک می‌کند (Gurevitch etal., 2018) . از آن زمان تاکنون، متاآنالیز به عنوان یک ابزار تحقیقاتی در رشته‌های مختلف مانند علوم پزشکی، اجتماعی و رفتاری به کار گرفته شده است (Hedges and Olkin,1985) و همچنین در سال های گذشته در گیاهانی مانند ذرت (Chardon et al., 2004; Xiang et al., 2010) و گندم (Hanocq et al., 2007; Mao et al. 2010) و برنج (Ballini et al. 2008) بطور مداوم استفاده شده است (Li et al., 2013). متاآنالیز بررسی کمی و ترکیب نتایج مطالعات مرتبط و مستقل با استفاده از روش های آماری مناسب است (Normand,1999). هدف متاآنالیز دستیابی به اطلاعات بیشتر، با جمع آوری نتایج مطالعه های کوچکتر و با یک یا چند آنالیز آماری است (رزجی و همکاران، ۱۳۹۹). نتایجی که ممکن است در مطالعات کوچکتر کشف نشود با استفاده از متاآنالیز چندین مطالعه کوچک بدست مبی آید (شجاعی و همکاران، ۱۳۹۹). در متاآنالیزQTL قدرت تشخیص QTL را افزایش خواهد یافت. در تحقیقاتی که تاکنون انجام شده است، مطالعات QTL با اندازه جمعیت های کوچک بررسی شدند و اغلب در یافتن QTL با اثرات کوچک با شکست مواجه می‌شوند (Ball,2005). کنار هم قرار دادن نتایج می‌تواند اندازه نمونه مؤثر جمعیت را بهبود بخشد و بنابراین اثر QTLها دقیق‌تر تخمین زده می‌شود و منجر به افزایش توان آزمون خواهد شد. به علاوه، یک متاآنالیز قادر است از تنوع بین مطالعات و ویژگی های هر مطالعه، QTL های خاص را شناسایی نموده و به شناخت ساختار ژنتیکی صفات پیچیده کمک نماید (Salih and Adelson,2009). متاآنالیز به QTL شناسایی شده از آزمایش‌های مستقل اجازه می‌دهد تا در کلاس‌ها گروه‌بندی شوند و یک برآورد توافقی از موقعیت QTL ارائه دهند (Goffinet and Gerber, 2000; Arcade et al., 2004). ازلحاظ روش‌شناسی، یک متاآنالیز شامل کاربرد اصول آماری استاندارد (یعنی آزمون فرضیه و استنباط آماری) در موقعیت‌هایی است که اطلاعات مهم آن موقعیت یا مکان ژنومی را در بر می‌گیرد اما داده های اصلی (به عنوان مثال فنوتیپ و ژنوتیپ افراد) را ندارد. ترکیب اطلاعات با ادغام داده های اصلی در یک مجموعه داده واحد، "مگا تحلیل" نامیده می شود (Goldstein and Guerra,2010) . با این حال، ترکیب نتایج مکان‌یابی QTL در چندین مطالعه یک چالش است زیرا بسیاری از جنبه های این مطالعات ممکن است متفاوت باشند، مانند تراکم نشانگر، پیوستگی، اندازه نمونه، نوع جامعه، طراحی آزمایشی و روش های آماری .(Goffinet and Goffinet,2000) . برای انجام آنالیز متا، مراحل کلی به صورت مروری بر مطالعات گذشته و جمع آوری QTL های قابل اطمینان برای صفت مورد نظر و گیاه مورد مطالعه، ایجاد یک نقشه توافقی و مشخص کردن مکان و توزیع

QTLها روی کروموزوم ها و انجام آنالیز متا روی کلاسترهای QTL ها و شناسایی Meta QTL ها می باشد که در نهایت منجر به شناسایی QTL های توافقی و ژن های کاندید می گردد (Shinozuka et al., 2012; Zhang et al., 2010; نورالهی و همکاران، ۱۳۹۳). به منظور مطالعه تطابق QTL، یک استراتژی متا آنالیز را برای حل تعداد QTL و مکان آنها بر اساس انتخاب مدل پیشنهاد کردند . اولین گزارش از یک رویکرد فرا تحلیلی را برای غلبه بر ناهمگونی بین مطالعات و برای اصلاح مکان QTL و بزرگی اثرات ژنتیکی توسط Etzel و Guerra در سال ۲۰۰۲ ارائه شد (Etzel and Guerra,2002). Veyrieras و همکاران یک متاآنالیز دو مرحله ای برای ادغام چندین آزمایش نقشه برداری QTL مستقل، با استفاده از بسته MetaQTL پیشنهاد کردند (Veyrieras et al.,2007) . پیشرفت در علوم آماری و بیوانفورماتیک موجب انجام ده‌ها مطالعه متاآنالیز QTL در سال‌های گذشته شد (Ioannidis et al., 2001; Hanocq et sl., 2007; Rong et al., 2007; Truntzler et al., 2010) متا-QTL (MQTL) یک رویکرد قوی برای تشریح ژنتیکی صفات کمی پیچیده است (Khahani et al., 2021). متاآنالیز برای اولین بار حدود ۳۰ سال پیش توسط بوم شناسان و زیست شناسان تکاملی پذیرفته شد (جدول ۱) و تأثیر قابل توجهی بر این زمینه تحقیقاتی در حوزه های بنیادی و کاربردی داشته است(Gurevitch et al., 2018).در این بررسی ما میخواهیم مسیر انجام یک آزمایش متا آنالیز QTL را شرح دهیم. در این راستا ابتدا هدف آزمایش تعیین شده و سپس به جمع‌آوری داده‌ها در زمینه موضوع مورد نظر اقدام می‌کنیم. سپس با توجه به نقشه های ژنتیکی مرجع یک نقشه جامع توافقی رسم کرده و نهایت با استفاده از نرم افزارهای متاآنالیز محل ژن‌ها را روی نقشه توافقی مکان‌یابی می کنیم.

جدول ۱: تاریخچه مطالعات متاآنالیز در اکولوژی

Year	Milestone
1991	First meta-analysis in ecology published
۱۹۹۵	Seminal paper by Arnqvist and Wooster published in Trends in Ecology and Evolution, introducing meta-analysis to many ecologists
۱۹۹۵	National Center for Ecological Analysis and Synthesis established in USA
۱۹۹۷	MetaWin, the first software for ecological meta-analysis created
۱۹۹۹	Special feature on meta-analysis published in Ecology, including an influential paper on statistical issues in ecological meta-analysis and the introduction of the logarithmic response ratio as a metric for effect size
۲۰۰۱	First general review of meta-analysis in ecology published
۲۰۰۳	Centre for Evidence-Based Conservation established in UK
۲۰۰۷	Collaboration for Environmental Evidence created
۲۰۰۹/۲۰۰۸	Seminal papers on phylogenetic meta-analysis published and phyloMeta software for integrating phylogeny into meta-analyses released
۲۰۱۱	Environmental Evidence (the official journal of the Collaboration for Environmental Evidence) established
۲۰۱۳	First handbook of meta-analysis in ecology and evolution published
۲۰۱۴	OpenMEE, software for ecological and evolutionary meta-analysis, released
۲۰۱۶	First international conference of the Collaboration for Environmental Evidence, in Stockholm

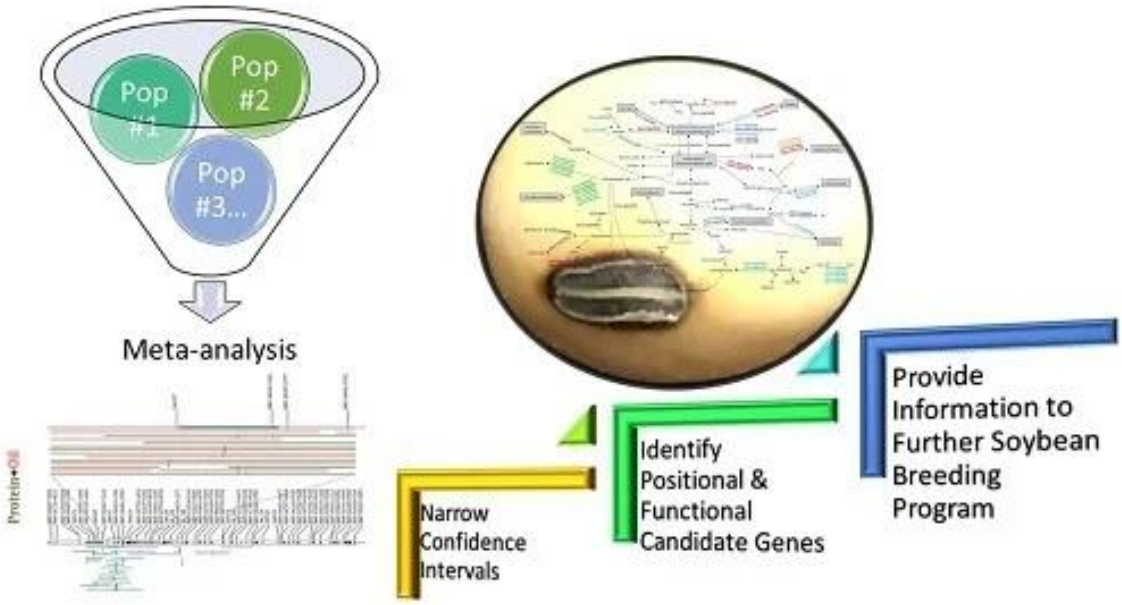
۲.برنامه ریزی برای یک متاآنالیز

۲-۱-تعریف اهداف و طرح های متاآنالیز

در انتخاب موضوع توجه به دو نکته بسیار مهم است، نخست تعداد زیاد مقالات و مطالعات که در حیطه موضوع مدنظر کار کرده باشند و دوم اینکه تاکنون جمع بندی کاملی روی موضوع موردنظر انجام نشده باشد (سلطانی و سلطانی، ۱۳۹۳). یک متاآنالیز با یک طرح چند سئوال شروع می شود. ابتدا باید اهداف مطالعه مشخص شود. به عنوان مثال، آیا هدف از مطالعه اعتبارسنجی نتایج QTL در یک جمعیت گسترده‌تر است یا هدایت مطالعات جدید؟ شیوه طراحی متاآنالیز با پاسخ به این سوال متفاوت است. در مرحله بعد، تعاریف عملیاتی از نتیجه تحقیق چیست؟ آیا تفاوت بین میانگین های ژنوتیپی QTL (به عنوان مثال، اثرات افزایشی و غالب) مطرح است یا اینکه با واریانس QTL اندازه گیری می‌شود؟ این تفاوت به آزمایش‌های اجرا شده و نوع جمعیت‌های مرجع مورد استفاده در مطالعات مستقل مربوط می شود. اولی یک اندازه گیری معمولی از اثر QTL در تلاقی های مختلف است، در حالی که دومی برای جمعیت های دگرگرده افشان استفاده می شود. همچنین سوال این است که چه چیزی به تنوع در مطالعات مستقل کمک می کند. پاسخ به این سوال بر انتخاب مدل های آماری برای استنتاج و تفسیر نتایج تاثیر دارد. بطور کلی در انتخاب موضوع باید با این موضوع توجه نمود که تمرکز روی سوالی واضح باشد که منابع و مطالعات مختلفی برای آن در دسترس باشد و یافتن پاسخ این سوال حائز اهمیت باشد (سلطانی و سلطانی، ۱۳۹۳).

۲-۲-بررسی منابع

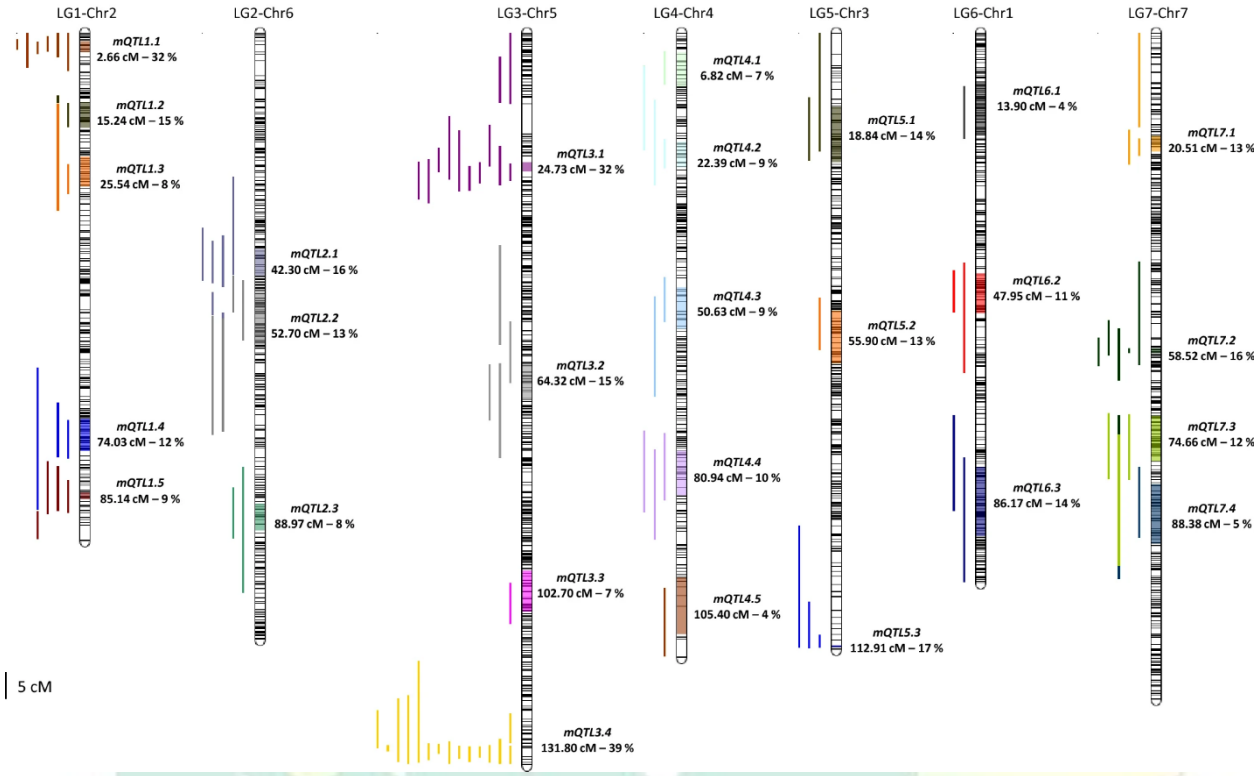
در متاآنالیز مرور تمام منابع و مطالعه هایی که فرضیه را آزمون کرده اند امری ضروری است (سلطانی و سلطانی، ۱۳۹۳) و جستجو منابع برای یک آنالیز متاQTL شامل پایگاه‌های اطلاعات عمومی، گزارش‌های فنی، دست نوشته‌های تحقیقاتی و حتی تحقیقاتی که در حال انجام هستند، می‌باشد (شکل ۱). در این راستا نباید تنها به مقالات منتشر شده کفایت نمود چون اکثر مجلات تمایل به انتشار مقالاتی دارند که از آنها نتایج معنی‌دار حاصل شده است و استفاده از مقالات به تنهایی منجر به نتایج اریب و غیر دقیق خواهد شد. به همین دلیل مطالعات انتخاب شده در یک متاآنالیز به اندازه کافی نمایانگر کل تحقیقات نخواهند بود و چنانچه این قسمت به خوبی صورت نگیرد باعث بروز خطا در نتایج میگردد . یک راه عملی برای کاهش اریبی در نتایج متاآنالیز استفاده از اطلاعات و داده های مکان‌یابی QTL است که منتشر نشده است. Egger و همکاران (۱۹۹۷) و Sterne و همکاران (۲۰۰۱) زمینه‌های تشخیص و تصحیح مقدار اریبی در مورد متاآنالیز را ارائه دادند. عموما جستجو در زمینه مطالعات مکان یابی QTL با بررسی نمایه استنادی علوم PubMed (http://www ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) و (/e.g., http://apps.isiknow/ledge. com.ezproxy.library.wisc.edu) آغاز می‌شود. برای جستجو در این پایگاه‌های اطلاعاتی مستلزم مشخص کردن عبارت جستجو و شیوه جستجو هستیم. اکثر کتابخانه‌های تحقیقاتی اصطلاحات و واژگان کلیدی را به اسناد خود اضافه می کنند. همچنین اصطلاحاتی که در عناوین یا چکیده‌ها ظاهر می‌شوند. یک عبارت جستجو برای متا آنالیز QTL معمولا دو اصطلاح را شامل می‌شود. برای مثال، اگر بخواهیم در PubMed، جستجویی برای تحقیقات مکان‌یابی QTL روی وزن بدن انجام دهیم می‌بایست عبارات QTL و وزن بدن را جستجو کنیم.



شکل۱: فرایند یک تحلیل متا در برنامه های اصلاحی

.نوع اطلاعاتی که در یک متاآنالیز جمع‌آوری می‌شوند شامل ویژگی‌های آن گزارش مانند نویسنده، سال و منبع انتشار آن است. همچنین تعداد نمونه، نوع جمعیت، نوع گونه و نژاد، مکان انجام آزمایش و اندازه اثر QTL (اندازه نمونه، آمار نتیجه، برآورد و خطای استاندارد) است. برای مثال یک نمونه از مطالعات QTL، مطالعه ای Klein و همکاران (۲۰۲۰) است که بر روی نخود انجام دادند، تعداد ۲۷ MetaQTL برای صفات مرتبط با عملکرد و محتوای پروتئین دانه (وزن دانه (SW)، تعداد دانه (SN)، وزن هزار دانه (TSW) و محتوای پروتئین دانه (SPC)) شناسایی کردند موقعیت (cM) و حداکثر واریانس فنوتیپی توضیح داده شده برای هر metaQTL (MQTL) در سمت راست گروه پیوندی (LG) نشان داده شده است. فواصل اطمینان با رنگ در گروه پیوند نشان داده می شود. خطوط سمت چپ در گروه پیوند، هر موقعیت QTL را در نقشه توافقی نشان می دهد. رنگ خط نشان دهنده عضویت در metaQTL است (شکل ۲).

سپس معیارهایی را برای پذیرش یا رد یک مطالعه برای فراتحلیل تعیین می کنیم (Sands and Murphy, 1996) . در یک مطالعه QTL، اگر عواملی غیر از QTL ها بر بروز یک صفت در نظر گرفته شده باشد، انتظار می رود اعتبار پژوهش تحت تأثیر قرار گیرد.



شکل ۲: یک نقشه ژنتیکی منفرد در مطالعات مکان یابی QTL

۳.نتایج و بحث

ترکیب نتایج چندین آزمایش نقشه برداری QTL با در نظر گرفتن آنها روی یک نقشه مشترک توافقی ، تصویر کامل تری از کنترل ژنتیکی یک صفت نسبت در هر مطالعه ای ارائه می دهد. این کار را می توان با استفاده از یکی از بسته های نرم افزاری مانند بسته MetaQTL (Veyrieras et al., 2007) انجام داد. قبل از ساختن نقشه توافقی، باید همپوشانی بین نام نشانگرها در نقشه های جداگانه مشخص شود. نشانگرهایی که ترتیب آنها در نقشه های مستقل یکسان نیست، باید از تجزیه بعدی حذف شوند. در یک متاآنالیز، یک نقشه توافقی معمولاً بر اساس روش حداقل مربعات وزنی ساخته می‌شود که فواصل بین نشانگرها را در هر نقشه جداگانه در نظر می‌گیرد (با استفاده از تابع Haldane). دقت هر مطالعه بر اساس اندازه و نوع جمعیت تعیین می‌شود. در این روش پارامتر میزان تناسب λ برای مدل توافقی محاسبه شده و برای هر کروموزوم ارائه می‌شود:

$$\lambda = \sum_{i=1}^{n} \sum_{jk} \frac{[dijk - (\gamma k - \gamma j)]2}{\gamma 2ijk}$$

که در آن n تعداد آزمایش های نقشه برداری QTL است، d_{ijk} برابر است تخمین در نقشه i فاصله بین نشانگرهای مجاور j

و k در cM، γ^2_{ijk} واریانس مورد انتظار مربوطه است برآورد فاصله بر اساس نوع جمعیت و اندازه آن، γ_k و γ_j به ترتیب موقعیت (بر حسب cM) نشانگرهای j و k در نقشه consensus هستند. مقدار بالای λ در اینجا مربوط به سطح پایین سازگاری بین فواصل نشانگر در نقشه های مختلف می باشد. بر اساس فرضیه صفر (با فرض نقشه‌های واقعی یکسان برای همه آزمایش ها)، ارزش مناسب نقشه consensus برای هر گروه پیوندی تنها تحت تأثیر خطاهای نمونه‌گیری در نقشه‌های جداگانه قرار می گیرد و از توزیع χ^2 پیروی می‌کند: $\lambda \sim \chi^2_{q-m+1}$ که در آن q تعداد کل فواصل نشانگر در n نقشه مستقل و m تعداد کل نشانگرها برای کروموزوم است. بنابراین، می توان یک آزمون آماری انجام داد، در نهایت، تخمینی از موقعیت‌های QTL و فواصل اطمینان آنها (CI) را می‌توان بر مبنای یک قانون مقیاس بندی بین موقعیت های نشانگرهای مجاور این QTL در نقشه اصلی و موقعیت نشانگرها بر روی نقشه consensus پیش‌بینی کرد.

پس از جمع آوری مطالعات اولیه، فرد باید مقاله را مطالعه کرده و سپس نتایج حاصل از این مطالعات را ترکیب کند. در زمینه مطالعات QTL، معیارهای مهم مکان QTL، اندازه اثر، مقدار LOD و حتی سطح معنیداری محاسبه شده در مطالعات اولیه است. انتخاب معیار ها بسیار مهم هستند زیرا اکثر تفسیرها ها براساس آنچه در مطالعات اولیه موجود است، انجام می شود.

شماره QTL و موقعیت ان در یک متاآنالیز بسیار مهم است. فرض کنید که در مجموع n مطالعه وجود دارد که هر کدام یک QTL را در یک کروموزوم خاص گزارش می کنند. اولین سوال این است که چه تعداد QTL روی نقشه توافقی (که از این به بعد به عنوان متا-QTL نیز گفته می شود) قرار خواهد گرفت. به طور بالقوه، می تواند یک متا-QTL، دو متا-QTL تا n متا-QTL مجزا وجود داشته باشد. ارزیابی تعداد QTL ها را می توان با انتخاب از بین بهترین مدل ها با ۱، ۲ ... n QTL بر اساس آزمون نسبت درستنمایی (LRT)، محتوای اطلاعاتی آکائیک Akaike (AIC)، یا AIC تصحیح شده (AIC*) انجام داد. به طور خلاصه، این روش موقعیت‌های QTL و CI مربوطه را در آزمایش‌های مستقل، پس از طرح روی نقشه توافقی در نظر می‌گیرد. برای تعداد معینی از QTL های فرضی (متا)، یک مدل Gaussian mixture را می توان برای انجام یک خوشه بندی کمی از QTL فردی به متا-QTL های مختلف مورد استفاده قرار داد. مدل هایی با تعداد متا QTL های مختلف به عنوان مدل های مختلف در نظر گرفته می شوند و تعداد متا-QTL ها با انتخاب محتمل ترین مدل بر اساس برخی معیارها تعیین می شود. با توجه به مکان‌های QTL که در مطالعات اولیه گزارش شده‌اند، ممکن است خطاهای استاندارد آن‌ها در دسترس نباشد، اما می‌تواند تخمین زده شود. بنابراین، برای اینکه یک گزارش در متاآنالیز لحاظ شود، به طور ایده آل نقشه ژنتیکی ان باید فراهم شود. علاوه بر ارائه تخمین‌هایی از مکان QTL ($\hat{d}_j$)، خطای استاندارد برای مکان QTL، $\sigma_j = se(\hat{d}_j)$، تخمین زده می شود (در صورتی که مستقیماً گزارش نشده باشد). در بسیاری از مقالات مقدار CI بطور مستقیم گزارش شده و در دسترس است. در صورت عدم دسترسی مقدار ان را می توان به صورت درصدی از واریانس توجیه شده توسط QTL (R^2) با استفاده از فرمول تجربی زیر به دست آورد:

جدول۲: تعیین حدود اطمینان براساس نوع جمعیت مورد استفاده

فرمول	نوع جمعیت
$CI = \frac{530}{N \times R2}$	F2

Backcross	$\mathrm{CI} = \frac{530}{N \times R2}$
RILs	$\mathrm{CI} = \frac{163}{N \times R2}$
DH lines	$\mathrm{CI} = \frac{287}{N \times R2}$

که در آن N اندازه جمعیت است. در عمل، این فرمول نسبت به آنچه در مطالعات اولیه گزارش شده است، CI بزرگتر (محافظه کارانه تر) را نشان می‌دهد.

از انواع روش های آماری برای مطالعه متاآنالیز آزمایش QTL استفاده می‌شود. مدل اثرات ثابت، مدل اثرات تصادفی، مدل ترکیبی دو نقطه‌ای و مدل ناپارامتری Bayesian با استفاده از فرآیند Dirichlet (DPP) را می‌توان نام برد. انتخاب یک مدل مناسب به فرض تفاوت بین مطالعات و اهداف مطالعه بستگی دارد.

۴.نتیجه گیری

گزارش های متاآنالیز ممکن است با اهداف مطالعات متفاوت باشد. حداقل، یک گزارش شامل یک چکیده و بخش اصلی گزارش است. چکیده بطور معمول اهداف مطالعه، تعاریف عملیاتی معیارهای نتیجه، جمعیت ها، متاآنالیز، طراحی، استراتژی های جستجو، نتایج، و نتیجه گیری و مفاهیم را خلاصه می کند. در متن گزارش، روش‌های جمع‌آوری داده ها، و همچنین میزان اریبی احتمالی در بررسی منابع باید بطور مفصل توضیح داده شوند. تمام مطالعات ممکن باید جمع آوری شود. عناصر کلیدی هر مطالعه اولیه معمولاً در یک جدول فهرست می‌شود با هم مقایسه می شوند. اغلب، پلاتها و نمودارها برای نشان دادن اندازه اثر برآورد شده توسط متاآنالیز، برای انتشار و تجزیه و تحلیل مفید هستند. بررسی و بحث در مورد نتایج بعد از انجام متاآنالیز انجام میشود و باید به متجانس بودن یا نبودن مطالعه های مورد استفاده توجه نمود. همچنین توجه به این نکته که نمیتوان گفت انجام یک متاآنالیز کاملا جامع است و به سادگی با نتیجه آن به یک نتیجه کلی دست یافت، حائز اهمیت می باشد (سلطانی و سلطانی، ۱۳۹۳). نتایج متاآنالیز باید تا حد امکان مناسب باشد و اهمیت (یا عدم وجود آن) نتایج آماری باید به وضوح بیان شود. پیامدهای نتایج برای تحقیقات آینده و احتمالاً مطالعات بعدی نیز باید بیان شود. در نهایت، محدودیت های مرتبط با روش ها و نتایج باید ذکر شود.

منابع

۱. رزجی آ.، پاک نژاد ف.، معرفی م.، مهدوی دامغانی ع و ایلکایی م. ۱۳۹۹. مطالعه فراتحلیلی تاثیر تنش خشکی بر عملکرد و اجزای عملکرد پنبه در ایران. نشریه علمی اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی، جلد چهاردهم، شماره ۲(۵۴)، ۱۵۷-۱۷۲.

۲. مختاری م.، کوچکی ع و نصیری محلاتی م. ۱۳۹۶. فراتحلیل پژوهشهای زراعی زعفران *(Crocus sativus L.)* با تأکید بر مصرف کودهای آلی و عملیات زراعی در ایران. نشریه زراعت و فناوری زعفران، جلد ۵، شماره ۴، ۳۱۱-۳۲۷.

۳. سلطانی ا و سلطانی ا. ۱۳۹۳. لزوم استفاده از فرا تحلیل (متاآنالیز) در پژوهشهای علوم زراعی، مجله تولید گیاهان زراعی، جلد هفتم، شماره سوم، ۲۱۶-۲۰۳.

٤. شجاعی س.، راوش ر.، شیران ب و ابراهیمی ا. ۱۳۹۹. شناسایی تعدادی از ژنهای با الگوی بیان متفاوت بین ارقام مقاوم و حساس گندم در پاسخ به تنش خشکی با استفاده از روش متاآنالیز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، دوره ۱۲، شماره ۳، ۱۵۷-۱۷۶.

۵. عزیزی ف. ۱۳۹۳. مقالات متاآنالیز در پزشکی: توانایی ها و محدودیت ها. مجله غدد درون ریز و متابولیسم ایران، دوره شانزدهم، شماره ۲، ۷۷-۸۰.

۶. نورالهی ح.، توکل ا و شریعتی و. ۱۳۹۳. آنالیز متا برای QTL های مرتبط با بذر روی گروه کروموزومی ۵ گندم (*Triticum aestivum .L*). اولین کنگره بین المللی و سیزدهمین کنگره ژنتیک ایران.

7. Arcade A., Labourdette A., Falque M., Mangin B., Chardon F., Charcosset A & Joets J. 2004. Biomercator: integrating genetic maps and QTL towards discovery of candidate genes. Bioinformatics, 20,2324–2326.

8. Ball RD. 2005. Experimental designs for reliable detection of linkage disequilibrium in unstructured random population association studies. Genetics, 170:859–873.

9. Ballini E., Morel J., Droc G., Price A., Courtois B., Notteghem J & Tharreau D. 2008. A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provided new insights into partial and complete resistance. Mol Plant Microbe Interact, 21,859–868.

10. Chardon F., Virlon B., Moreau L., Falque M., Joets J., Decousset L., Murigneux A & Charcosset A. 2004. Genetic architecture of flowering time in maize as inferred from quantitative trait loci meta-analysis and synteny conservation with the rice genome. Genetics, 168, 2169–2185.

11. Egger M., Smith GD., Schneider M & Minder C. 1997. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. BMJ 315:629–634.

12. Etzel CJ and Guerra R. 2002. Meta-analysis of genetic-linkage analysis of quantitative-trait loci. Am J Hum Genet, 71:56–65.

13. Glass GV. 1976. Primary, secondary and metaanalysis of research. Educ Res, 5:3–8.

14. Goffinet B and Gerber S. 2000. Quantitative trait loci: a meta-analysis. Genetics, 155:463–473.

15. Goldstein DR and Guerra R. 2010. A brief introduction to meta-analysis, genetics and genomics. In: Guerra R, Goldstein DR (eds) Meta-analysis and combining information in genetics and genomics. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton.

16. Gurevitch J., Koricheva J., Nakagawa S.H & Stewart. 2018. Meta-analysis and the science of research synthesis. Nature, 555, 175–182.

17. Habibi M., Fadaei Z.N., Najafi M and Fadaei Z. 2009. Confirmatory factorial structure, reliability and validity of the Achenbuch youth self-report scale (YSR): monozygotic and dyziygotic twins. Journal of Clinical Psychology, 1, 1-18. (In Persian)

18. Hanocq E., Laperche A., Jaminon O., Laine A-L and Le Guis J. 2007. Most significant genome regions involved in the control of earliness traits in bread wheat, as revealed by QTL meta-analysis. Theor Appl Genet, 114:569–584.

19. Hayes B and Goddard ME. 2001. The distribution of the effects of genes affecting quantitative traits in livestock. Genet Sel Evol, 33:209–229.

20. Hedges LV and Olkin I. 1985. Statistical methods for meta-analysis. Academic, New York.

21. Hu ZL., Dracheva S., Jang W., Maglott D., Bastiaansen J., Rothschild MF and Reecy JM. 2005. A QTL resource and comparison tool for pigs: PigQTLDB. Mamm Genome, 16:792–800.

22. Hu ZL., Fritz ER and Reecy JM. 2007. AnimalQTLdb: a livestock QTL database tool set for positional QTL information mining and beyond. Nucleic Acids Res, 35:D604–D609.

23. Ioannidis JP., Ntzani EE., Trikalinos TA and Contopoulos-Ioannidis DG. 2001. Replication validity of genetic association studies. Nat Genet, 29:306–309.

24. Khahani B., eTavakol E., Shariati V & Rossini L. 2021. Meta-QTL and ortho-MQTL analyses identifed genomic regions controlling rice yield, yield-related traits and root architecture under water defcit conditions. Scientifc Reports. 11:6942.
25. Khatkar MS., Thomson PC., Tammen I and Raadsma HW. 2004. Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. Genet Sel Evol, 36:163–190.
26. Klein A., Houtin H., Rond-Coissieux C., Naudet-Huart M., Touratier M., Marget P & Burstin J. 2020. Meta-analysis of QTL reveals the genetic control of yield-related traits and seed protein content in pea. Scientific Reports, 10, 15925.
27. Li W., Liu C.H., Liu Y., Pu ZH., Dai S.H., Wang J., Lan X., Zheng Y & Wei Y. 2013. Meta-analysis of QTL associated with tolerance to abiotic stresses in barley. Euphytica, 189, 31–49.
28. Mao S.L., Wei Y.M., Cao W.G., Lan X.J., Yu M., Chen Z.M., Chen G.Y & Zheng Y.L. 2010. Confirmation of the relationship between plant height nd Fusarium head blight resistance in wheat (Triticum aestivum L.) by QTL meta-analysis. Euphytica, 174,343–356.
29. Ni J., Pujar A., Youens-Clark K., Yap I., Jaiswal P., Tecle I., Tung CW., Ren L., Spooner W., Wei X., Avraham S., Ware D., Stein L and McCouch S. 2009. Gramene QTL database: development, content and applications. Database (Oxford), 2009:bap005.
30. Normand ST. 1999. Meta-analysis: formulating, evaluating, combining, and reporting. Stat Med, 18:321–359.
31. Rong J., Feltus FA., Waghmare VN., Pierce GJ., Chee PW., Draye X., Saranga Y., Wright R.J, Wilkins TA., May OL., Smith CW., Gannaway JR., Wendel JF and Paterson AH (2007) Meta-analysis of polyploid cotton QTL shows unequal contributions of subgenomes to a complex network of genes and gene clusters implicated in lint fiber development. Genetics, 176:2577–2588.
32. Salih H and Adelson DL. 2009. QTL global metaanalysis: are trait determining genes clustered? BMC Genomics, 10:184.
33. Sands ML and Murphy JR. 1996. Use of kappa statistic in determining validity of quality filtering for meta-analysis: a case study of the health effects of electromagnetic radiation. J Clin Epidemiol, 49:1045–1051.
34. Shinozuka H., Cogan N.OI., Spangenberg G.C & Forster J.W. 2012. Quantitative Trait Locus (QTL) metaanalysis and comparative genomics for candidate gene prediction in perennial ryegrass (*Lolium perenne L.*). BMC Genetics, 13, 101.
35. Star KV., Song Q., Zhu A and Bo¨ttinger EP. 2006. QTL MatchMaker: a multi-species quantitative trait loci (QTL) database and query system for annotation of genes and QTL. Nucleic Acids Res, 34(Database issue), D586–D589.
36. Sterne JA., Egger M., Smith GD. 2001. Investigating and dealing with publication and other biases in meta-analysis. BMJ, 323:101–105.
37. Truntzler M., Barriere Y., Sawkins MC., Lespinase D., Betran J., Charcosset A and Moreau L. 2010. Meta-analysis of QTL involved in silage quality of maize and comparison with the position of candidate genes. Theor Appl Genet, 121:1468–1482.
38. Veyrieras J-B., Goffinet B and Charcosset A. 2007. MetaQTL: a package of new computational methods for the meta-analysis of QTL mapping experiments. BMC Bioinformatics, 8:49.
39 - Wu, X. L., Hu, Z. L. 2012. Meta-analysis of QTL Mapping Experiments. Scott A. Rifkin (ed.), Quantitative Trait Loci (QTL): Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 871, DOI 10.1007/978-1-61779-785-9_8, # Springer Science+Business Media New York 2012
40. Xiang K., Zhang ZM., Reid LM., Zhu XY., Yuan GS & Pan GT. 2010. A meta-analysis of QTL associated with ear rot resistance in maize. Maydica, 55,281–290.
41. Zhang L.Y., Liu D.C., Guo X.L., Yang W.L., Sun J.Z., Wang D.W & Zhang A. 2010. Genomic distribution of quantitative trait loci for yield and yield-related traits in common wheat. Journal of Integrative Plant Biology, 52 (11): 996-1007.

Path coefficient analysis and correlation of fruit weight related traits in different olive genotypes

Ali Tanhaei[1*], Ahmad Reza Dadras[2], Hossein Sabouri[3], Ebrahim Gholamalipour Alamdari[4]
Sayed Javad Sajadi[4], Hossein Hosseini Moghaddam[4]

[*]1. M.Sc. Student Biotechnology Agriculture, Department of Plant Production, College of Agriculture Science and Natural Resources, Gonbad Kavous University
2. Research Assistant Professor of Olive Research Station of Tarom, Crop and Horticultural Science Research Department, Zanjan Agricultural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Zanjan, Iran.
3 Associate Professor Department of Plant Production, College of Agriculture Science and Natural Resources, Gonbad Kavous University
4. Associate Professor Plant Production Department, College of Agriculture and Natural Resources of Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous

Corresponding Author Email address: tanhaee.ali17@gmail.com

Abstract

In order to determine the relationship between different traits and olive fruit weight, 150 fruits from 98 olive genotypes were randomly selected The results of correlation showed that fruit weight with fruit flesh weight, stone weight and fruit length (0.994 **), (0.843 **) and (0.763 **) had the highest correlation 1% level probability, respectively. The fruit flesh weight regression results were 87.9% on fruit weight and fruit length 55.3% was effective on fruit flesh weight. Fruit length had a 61% effect on stone weight. According to the results of path coefficient analysis, the indirect effect of fruit flesh weight through stone weight and the indirect effect of stone weight through fruit flesh weight were 0.115 and 0.697 on fruit weight, respectively. The most indirect effect of flesh to stone ratio through fruit length was 0.230 and fruit length through Flesh to stone ratio was 0.210. The indirect effect of size of lenticels through fruit length was 0.103. The results of this study showed the importance of fruit flesh weight and olive fruit length in the final weight of olive fruit. The results of this research can be used in olive breeding programs.

Keywords: Regression analysis, Path coefficient analysis, Selection index, Olives

تجزیه علیت و همبستگی صفات مرتبط با وزن میوه در ژنوتیپ‌های مختلف زیتون

علی تنهائی*[۱]، احمدرضا دادرس[۲]، حسین صبوری[۳]، ابراهیم غلامعلی پورعلمداری[۴]، سید جواد سجادی[۴]، حسین حسینی‌مقدم[۴]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی‌کشاورزی، گروه تولیدات‌گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس.

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

۳. دانشیار گروه تولیدات‌گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس

۴. استادیار گروه تولیدات‌گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی tanhaee.ali17@gmail.com

چکیده

به منظور تعیین ارتباط بین صفات مختلف با وزن میوه زیتون، ۱۵۰ عدد میوه از ۹۸ ژنوتیپ زیتون به‌طور تصادفی انتخاب شد. نتایج حاصل از همبستگی نشان داده است که وزن میوه با وزن گوشت میوه، وزن هسته و طول میوه به ترتیب به میزان (**۰/۹۹۴)، (**۰/۸۴۳) و (**۰/۷۶۳) بیشترین میزان همبستگی در سطح احتمال یک درصد دارند. نتایج رگرسیون وزن گوشت میوه ۸۷/۹ درصد بر روی وزن میوه و همچنین طول میوه ۵۵/۳ درصد بر روی وزن گوشت میوه تأثیرگذار بودند. طول میوه به میزان ۶۱ درصد بر روی وزن هسته تأثیر داشت. طبق نتایج حاصل از تجزیه علیت اثر غیرمستقیم وزن گوشت میوه از طریق وزن هسته و اثر غیرمستقیم وزن هسته از طریق وزن گوشت میوه به ترتیب ۰/۱۱۵ و ۰/۶۹۷ بر روی وزن میوه اثر داشتند. بیشترین اثر غیرمستقیم نسبت گوشت به هسته از طریق طول میوه ۰/۲۳۰و طول میوه از طریق نسبت گوشت به هسته ۰/۲۱۰ اثر داشته است. اثر غیرمستقیم اندازه عدسک از طریق طول میوه به میزان ۰/۱۰۳ بود. نتایج این پژوهش اهمیت صفات وزن گوشت میوه و طول میوه زیتون را در وزن نهایی میوه زیتون نشان داد. از این پژوهش می‌توان در برنامه‌های اصلاحی زیتون استفاده کرد.

واژگان کلیدی: تجزیه رگرسیون، تجزیه علیت، شاخص انتخاب، زیتون

۱.مقدمه

زیتون با نام علمی (Olea europaea L.) از مهم‌ترین گیاهان حوزه مدیترانه بوده و شامل ارقام متعددی با تفاوت‌های معنی‌دار فنوتیپ و ژنتیکی است. بنابراین شناسایی ارقام زیتون باکیفیت عملکرد بالا از مهم‌ترین روش در مدیریت بهتر ذخایر ژنتیکی محسوب می‌شود. (Milotic et al., 2005) ۱۰۰هزار هکتار در ایران زیر کشت زیتون است و ایران را به بزرگ‌ترین کشورهای تولیدکننده زیتون و حافظ ذخایر ژنتیکی تبدیل کرده است. ایران می‌تواند به میزان بسیار زیادی روغن تولید کند، بنابراین انجام تحقیقات و شناسایی ژنوتیپ‌های

متفاوت و مفید ازنظر ژنتیکی امری بسیار مهم می‌باشد (Motaghi et al., 2012). درختان زیتون به دلیل دگرگشنی سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در درختان زیتون وجود دارد. تنوع ژنتیکی عامل کلیدی در جهت حفظ ذخایر ژنتیکی و ایجاد ژنوتیپ‌هایی با عملکرد بهتر باشد (Albertini et al., 2011). عملکرد درخت زیتون به‌وسیله تعداد بسیار زیادی از ژن‌ها کنترل می‌شود. بنابراین جزو صفات پیچیده و شدیداً تحت تأثیر محیط قرار می‌گیرد و به همین دلیل وراثت‌پذیری پایینی دارد. اندازه‌گیری مستقیم عملکرد درخت‌کار پرهزینه و وقت‌گیر می‌باشد. بنابراین شناسایی اجزا مؤثر بر عملکرد و اندازه‌گیری آن‌ها که به راحتی صورت می‌گیرد و همین‌طور وراثت‌پذیری بالایی نیز دارند. برای اصلاح‌گران بسیار حائز اهمیت است (پور اسکندری و همکاران، ۱۳۹۰). تجزیه علیت روابط علت و معلولی را نشان می‌دهد با تجزیه علیت می‌توان به اطلاعات تکمیلی دست یافت که در همبستگی ساده مشاهده نمی‌شود. بنابراین تجزیه علیت می‌تواند تصویر کاملی از همبستگی بین صفات را نشان دهد و همبستگی بین دو متغیر را به اثرات مستقیم و غیرمستقیم تفکیک نماید (آهنگر و صبوری، ۱۳۹۶). پور اسکندری و همکاران(۱۳۹۰) روی ۲۰ رقم زیتون از ایستگاه تحقیقات گیلوان در سال ۱۳۹۰ جهت بررسی تنوع ژنتیکی و روابط بین صفات اثرگذار و تجزیه علیت کارکردند. نتایج همبستگی حاکی از مثبت و معنی‌داری بین صفات تشکیل میوه اولیه و نهایی، وزن خشک و تر میوه، نسبت گوشت به هسته، طول گل‌آذین و درصد روغن وجود دارد. نتایج رگرسیون و تجزیه علیت نشان داد صفات تشکیل میوه نهایی، نسبت گوشت به هسته بیشترین تأثیر را بر روی عملکرد و صفات نسبت گوشت به هسته و تعداد گل نر بر روی وزن خشک میوه بیشترین تأثیر را دارند. عبادی و همکاران(۱۳۹۸) به منظور بررسی تنوع ژنتیکی زیتون و تجزیه ارتباط بین صفات مؤثر بر عملکرد روی ۳۰ ژنوتیپ زیتون خارجی و ۳ ژنوتیپ بومی مطالعه کردند. نتایج رگرسیون گام به گام نشان داد زمان تغییر رنگ و رسیدن میوه بر روی درصد روغن در ماده‌تر اثر بسیار بالایی دارد. همچنین خصوصیات گل و درصد گل سهم بالایی بر روی عملکرد دارند. هدف از این پژوهش بررسی همبستگی و تجزیه علیت بین صفات و شناسایی صفات تأثیرگذار بر روی وزن میوه، جهت گزینش ژنوتیپ‌های برتر بود.

۲.مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۴۰۰-۱۳۹۹ بر روی ۹۸ ژنوتیپ زیتون(جدول۱) تهیه‌شده از ایستگاه تحقیقات زیتون طارم استان زنجان در دانشگاه گنبد انجام گرفت. به‌منظور ارزیابی روابط بین صفات و تجزیه علیت از هر ژنوتیپ ۱۵۰ عدد میوه به‌طور تصادفی انتخاب شد و صفات وزن میوه، وزن گوشت میوه و وزن هسته با استفاده از ترازو ۰/۰۱ و جهت اندازه‌گیری طول میوه، قطر میوه و طول هسته از کولیس دیجیتال برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری صفات شکل میوه، اندازه عدسک و تعداد شیار با توجه به دستورالعمل ملی آزمون‌های تمایز، یکنواختی و پایداری در زیتون با توجه به کد قرارگرفته در کتابچه و صفت تعداد شیار به‌صورت شمارش تعداد شیار روی هسته انجام گرفت.

جدول۱: لیست ژنوتیپ‌های زیتون جهت انجام آزمایش

ژنوتیپ	شماره ژنوتیپ	ژنوتیپ	شماره ژنوتیپ	ژنوتیپ	شماره ژنوتیپ	ژنوتیپ	شماره ژنوتیپ	ژنوتیپ	شماره ژنوتیپ
Mosabi	1	Hamed	21	Cornicabra	43	تخم کبکی	67	Ds14	91
Caridolia	2	Koroneiki	23	Zard golooleh	44	سویلانا	68	Ds17	92
Corfolia	3	Leccino	24	Souri	45	D1	69	GW1	93

Baladi	4	Amygdalolia	25	Frantoio	46	آمفی سیس رودبار	70	KH-10	94
Oblonga	5	Arbequina	26	Cipressino	47	فیشمی رودبار	71	KH-13	95
Kalamon	6	Konservolia	27	Piramidal	48	اوزینه ۲	72	T-H2	96
Cailetier	7	Mission	28	Dakal	49	اوزینه ۳	73	T-H4	97
Manzanilla F	8	Valanolia	29	Coratina	50	توسکستان	74	T1	100
Mavi	9	Grossane	30	Dezful	51	گرگان۳	75	T2	101
Dan	10	Lucques	31	Manzanilla	54	KH-BA	80	T6	103
Jlot	11	Toffahi	32	Clonavis	55	T-MO1	81	T7	104
Khodeiri	12	Kaissy	33	Gordal	56	T-MO3	82	T9	105
Verdial de Jaén	13	Sorani	34	Agromanaki	58	T-MO4	83	T10	106
Piculin	14	Doebli	35	Tiaiki	60	T-MO12	84	T14	109
Nabali	15	Abou-satl	36	Patrini	61	Tmn2	85	T17	112
Voliotiki	16	Picual	37	Chalkidikis	62	QG3	86	T19	114
Zard	17	Picudo	38	Direh	63	QG8	87	T21	116
Rowghani	18	Manzanilla de sevilla	39	Amin	64	Bn1	88	T23	118
Mari	19	Manzanilla Cacereña	40	Meshkat	65	Bm5	89		
Shengeh	20	Lechin de granada	42	دراک	66	Ds7	90		

طبق شکل شماره ۱ دو صفت شکل میوه و اندازه عدسک طبق دستورالعمل ملی آزمون‌های تمایز، یکنواختی و پایداری در زیتون آمده است. در صفت شکل میوه حالت کشیده آن طبق شکل کد شماره یک. برای حالت شکل میوه حالت تخم‌مرغی داشته باشد کد دو و برای حالت کروی کد شماره سه داده شد. صفت اندازه عدسک طبق شکل مشخص می‌شود عدسک‌ها نقطه‌های برجسته بر روی میوه هستند. طبق شکل هر چه بزرگ‌تر باشد کد شماره هفت و متوسط و کوچک به ترتیب کد شماره پنج و سه داده می‌شود. صفت تعداد شیار هسته طبق شکل خط‌هایی بر روی هسته وجود دارد با شمارش این خط‌ها از تمامی نواحی هسته تعداد آن ثبت شد. کلیه محاسبات با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد.



شکل۱: توضیحات مربوط به صفات اندازه‌گیری شده زیتون طبق دستورالعمل

۳.نتایج و بحث

نتایج حاصل از همبستگی(جدول۲) نشان داد وزن میوه با وزن گوشت میوه، وزن هسته و طول میوه به ترتیب به میزان (**۰/۹۹۴)، (**۰/۸۴۳) و (**۰/۷۶۳) بیشترین میزان همبستگی در سطح احتمال یک درصد دارند. همچنین وزن گوشت میوه با صفات وزن هسته(**۰/۷۹۴)، طول میوه(**۰/۷۵۸) و نسبت گوشت به هسته(**۰/۷۴۲) در سطح احتمال یک درصد معنی دار هستند. شکل میوه با طول میوه به میزان(*۰/۲۵۰-) در جهت منفی در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد در واقع نشان می‌دهد با گرد شدن شکل میوه با توجه به دستورالعمل ملی زیتون عدد بزرگ‌تری به آن داده می‌شود بنابراین با افزایش شکل میوه(گرد) طول میوه روند کاهشی خواهد داشت. پور اسکندری و همکاران(۱۳۹۲) برای ارزیابی خصوصیات ریخت‌شناسی و گروه‌بندی برخی ارقام زیتون در سال ۱۳۹۲ در استان زنجان پژوهشی را انجام دادند. نتایج به دست آمده از همبستگی بین صفات نشان داد وزن خشک میوه، وزن هسته، وزن گوشت میوه و نسبت گوشت به هسته با وزن میوه همبستگی مثبت و معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد دارند. همچنین بین صفات طول و قطر میوه با طول و قطر هسته نیز همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشته است.

جدول۲: همبستگی بین صفات زیتون

صفات	وزن میوه	وزن گوشت میوه	وزن هسته	طول میوه	شکل میوه	اندازه عدسک	نسبت گوشت به هسته
وزن میوه	۱						
وزن گوشت میوه	۰/۹۹۴**	۱					
وزن هسته	۰/۸۴۳**	۰/۷۹۴**	۱				
طول میوه	۰/۷۶۳**	۰/۷۵۸**	۰/۶۵۸**	۱			
شکل میوه	۰/۰۰۹	۰/۰۱۷	-۰/۰۰۸	-۰/۲۵۰*	۱		
اندازه عدسک	۰/۳۱۲**	۰/۲۹۴**	۰/۳۸۸**	۰/۱۶۹	۰/۰۹۷	۱	
نسبت گوشت به هسته	۰/۶۸۳**	۰/۷۴۲**	۰/۲۲۱*	۰/۴۳۳**	۰/۰۳۹	۰/۰۸۱	۱

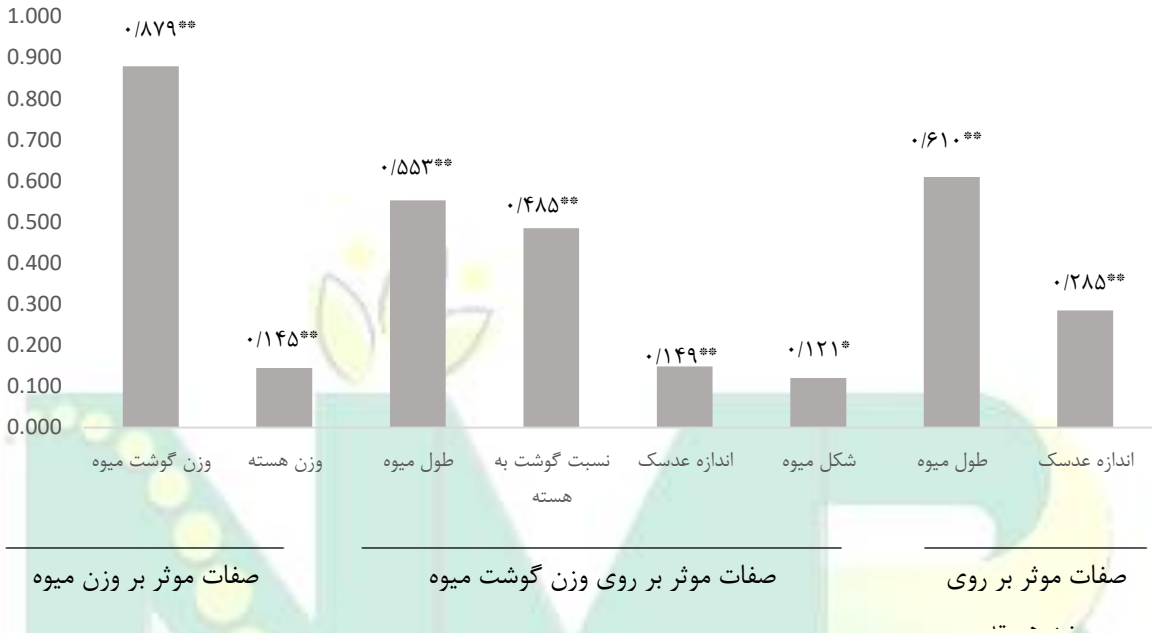
** و * معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد و پنج درصد

۳-۱- تجزیه رگرسیون

با استفاده از تجزیه رگرسیون جداگانه سهم هر یک از صفات مؤثر بر وزن میوه، وزن گوشت میوه و وزن هسته که به‌عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شد تعیین گردید. در مرحله اول وزن میوه به‌عنوان متغیر وابسته و بقیه صفات به‌عنوان متغیر مستقل وارد مدل شدند که نتایج نشان داد وزن گوشت میوه به میزان ۸۷/۹ درصد بیشترین تأثیر بر وزن میوه دارد و بعد از آن صفت وزن هسته به میزان ۱۴/۵ درصد بر روی وزن میوه تأثیر دارد(شکل۲).

در مرحله دوم برای بررسی سهم هر یک از صفات بر روی وزن گوشت میوه به‌عنوان متغیر وابسته و بقیه صفات به‌عنوان متغیر مستقل وارد مدل شدند. نتایج تجزیه رگرسیون نشان داد صفات طول میوه به میزان ۵۵/۳ درصد و نسبت گوشت به هسته ۴۸/۵ درصد، اندازه عدسک ۱۴/۹ درصد، شکل میوه ۱۲/۱ درصد بر روی وزن گوشت میوه اثر دارد(شکل۲). در حالت سوم رگرسیون صفت وزن هسته به عنوان متغیر وابسته در نظر گرفت شد و بقیه صفات به‌عنوان متغیر مستقل وارد مدل شدند. طبق شکل ۲ طول میوه به میزان ۶۱ درصد و صفت اندازه عدسک به میزان ۲۸/۵ درصد بر روی وزن هسته تأثیرگذار بودند.

شکل ۲: ضرایب رگرسیونی زمانی که وزن میوه، وزن گوشت میوه و وزن هسته به‌عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شد.



به منظور بررسی تجزیه رگرسیون و تجزیه علیت پور اسکندری و همکاران(۱۳۹۰) بر روی ۲۰ رقم زیتون کارکردند. نتایج حاصل از بررسی رگرسیون نشان داد صفت عملکرد میوه توسط صفات تشکیل میوه نهایی، نسبت گوشت به هسته و طول گل‌آذین در مجموع ۸۲ درصد از تغییرات عملکرد را تحت تأثیر قراردادند. در مرحله دوم رگرسیون وزن خشک میوه به‌عنوان متغیر وابسته وارد مدل شد و صفات نسبت گوشت به هسته، تعداد گل‌آذین، گل نر و شاخص خود ناسازگاری به‌عنوان متغیر مستقل وارد مدل شدند و به میزان ۵۸ درصد از تغییرات وزن خشک میوه را توجیه کردند.

۳-۲- تجزیه علیت

برای بررسی میزان اثر مستقیم و غیرمستقیم صفات بر روی وزن میوه از تجزیه علیت که در واقع تصویر کاملی از روابط بین صفات و اثر آن‌ها بر روی عملکرد میوه را نشان می‌دهد می‌توان استفاده کرد. با توجه به نتایج حاصل از تجزیه علیت (جدول۳) اثر مستقیم صفات وزن گوشت میوه و وزن هسته بر روی وزن میوه به ترتیب ۰/۸۷۹ و ۰/۱۴۵ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار می‌باشد. اثر غیرمستقیم وزن گوشت میوه از طریق وزن هسته و اثر غیرمستقیم وزن هسته از طریق وزن گوشت میوه به ترتیب ۰/۱۱۵ و ۰/۶۹۷ بر روی وزن میوه می‌باشد.

جدول ۳: اثرات مستقیم و غیرمستقیم تجزیه علیت صفات بر روی وزن میوه زیتون

صفات	اثر مستقیم	اثر غیرمستقیم		همبستگی با وزن میوه
		وزن گوشت میوه	وزن هسته	
وزن گوشت میوه	۰/۸۷۹**	------	۰/۱۱۵	۰/۹۹۴**
وزن هسته	۰/۱۴۵**	۰/۶۹۷	------	۰/۸۴۳**
		اثر باقی‌مانده		R= ۰/۱۸۸

زمانی که صفت وزن گوشت میوه به‌عنوان متغیر وابسته و بقیه صفات به‌عنوان متغیر مستقل وارد مدل شدند. (جدول ۴) صفت طول میوه بیشترین اثر مستقیم ۰/۵۵۳ بر روی وزن گوشت میوه را داشت. اثر غیرمستقیم نسبت گوشت به هسته از طریق طول میوه ۰/۲۳۰، طول میوه از طریق نسبت گوشت به هسته به میزان ۰/۲۱۰ و اثر غیرمستقیم شکل میوه از طریق طول میوه به میزان ۰/۱۳۸- را داشت. نشان می‌دهد شکل میوه در جهت منفی بر روی طول میوه تأثیر می‌گذارد، هر چه میوه کروی‌تر باشد طول میوه کاهش خواهد یافت.

جدول ۴: اثرات مستقیم و غیرمستقیم تجزیه علیت صفات بر روی وزن گوشت میوه زیتون

صفات	اثر مستقیم	اثر غیرمستقیم				همبستگی با وزن گوشت میوه
		طول میوه	نسبت گوشت به هسته	اندازه عدسک	شکل میوه	
طول میوه	۰/۵۵۳**	------	۰/۲۱۰	۰/۰۲۵	-۰/۰۳۰	۰/۷۵۸**
نسبت گوشت به هسته	۰/۴۸۵**	۰/۲۳۰	--------	۰/۰۱۲	۰/۰۰۴	۰/۷۴۲**
اندازه عدسک	۰/۱۴۹**	۰/۰۹۳	۰/۰۳۹	------	۰/۰۱۱	۰/۲۹۴**
شکل میوه	۰/۱۲۱*	-۰/۱۳۸	۰/۰۱۸	۰/۰۱۴	------	۰/۰۱۷
اثر باقی‌مانده						R= ۰/۴۷۱

زمانی که صفت وزن هسته به‌عنوان متغیر وابسته و بقیه صفات به عنوان متغیر مستقل وارد مدل شدند(جدول۵) اثر مستقیم صفات طول میوه به میزان ۰/۶۱۰ و اندازه عدسک ۰/۲۸۵ بر روی وزن هسته می‌باشد. اثر غیرمستقیم طول میوه از طریق اندازه عدسک به میزان ۰/۰۴۸۱ و اثر غیرمستقیم اندازه عدسک از طریق طول میوه ۰/۱۰۳ بود.

جدول ۵: اثرات مستقیم و غیرمستقیم تجزیه علیت صفات بر روی وزن هسته زیتون

صفات	اثر مستقیم	اثر غیرمستقیم		همبستگی با وزن هسته
		طول میوه	اندازه عدسک	
طول میوه	۰/۶۱۰**	------	۰/۰۴۸۱	۰/۶۵۸**
اندازه عدسک	۰/۲۸۵**	۰/۱۰۳	------	۰/۳۸۸**

اثر غیرمستقیم	R=۰/۸۴۹

نتایج پور اسکندری و همکاران(۱۳۹۰) نشان داد صفات تشکیل میوه نهایی و نسبت گوشت به هسته برای افزایش عملکرد میوه و صفات نسبت گوشت به هسته و تعداد گل نر برای افزایش وزن خشک میوه اثرگذار هستند. در نتیجه می‌توان از این صفات تحت عنوان شاخص‌های پراهمیت در جهت افزایش عملکرد و وزن خشک میوه (درصورتی‌که وراثت‌پذیری آن‌ها بالا باشد) استفاده نمود.

۴.نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده طبق جدول همبستگی بیشترین میزان همبستگی در بین صفات وزن میوه با وزن گوشت میوه، وزن هسته و طول میوه می‌باشد. نتایج رگرسیون نشان داد بیشترین اثر بر روی وزن میوه مربوط به صفت وزن گوشت میوه و بیشترین اثر مستقیم بر روی وزن گوشت میوه مربوط به طول میوه است. همچنین طول میوه بر روی وزن هسته نیز اثر مستقیم بالایی دارد. برای بررسی دقیق روابط بین صفات از تجزیه علیت استفاده شد. نتایج نشان داد وزن هسته از طریق وزن گوشت میوه بیشترین اثر غیرمستقیم بر روی وزن میوه دارد. همچنین نسبت گوشت به هسته از طریق طول میوه به میزان ۰/۲۳۰ بیشترین اثر غیرمستقیم بر روی وزن گوشت میوه را دارد. اندازه عدسک نیز از طریق طول میوه بر روی وزن هسته بیشترین اثر غیر مستقیم را داشت. در این پژوهش مهم‌ترین صفات تأثیرگذار بر روی وزن میوه و میزان اثر هرکدام از این صفات تعیین شد. نتایج این تحقیق می‌تواند برای بهبود عملکرد میوه در برنامه اصلاحی زیتون مورداستفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از همکاری ایستگاه تحقیقات زیتون شهرستان طارم جهت تأمین مواد گیاهی پژوهش حاضر تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

۱- آهنگر ل. و صبوری ح. ۱۳۹۶. روابط همبستگی و تجزیه علیت برخی صفات مؤثر بر عملکرد دانه در ژنوتیپ‌های برنج. پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی، جلد ۱۰، شماره ۲۸، ص: ۱۰۰-۹۳

۲- پور اسکندری ا.، سلیمانی ع، صبا ج، طاهری م. و احمدی ز. ۱۳۹۰. تجزیه رگرسیون و علیت اجزاء عملکرد در ۲۰ رقم زیتون. اولین کنگره ملی علوم و فناوری‌های نوین کشاورزی، زنجان، https://civilica.com/doc/146201

۳- پور اسکندری ا.، سلیمانی ع. صبا ج. و طاهری م. ۱۳۹۲. ارزیابی خصوصیات پومولوژیکی و گروه‌بندی برخی ارقام زیتون در استان زنجان. مجله به‌نژادی نهال و بذر، جلد ۱-۲۹ شماره ۴. ص: ۶۳۶ – ۶۲۳

۴- عبادی ر.، بی‌همتا م ر. و بهمنی ر. ۱۳۹۸. بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه رگرسیون برخی صفات در ۳۰ رقم زیتون ایرانی و خارجی با استفاده از

۵- صفات کمی و کیفی. علوم باغبانی ایران، جلد ۴۹، شماره ۴، ص: ۸۵۸-۸۴۵

6- Albertini E., Torricelli R. Bitocchi E. Raggi L. Marconi G. Pollastri L. Di Minco G. Battistini A. Papa R.and Veronesi F. 2011. Structure of genetic diversity in Olea europaea L. cultivars from central Italy. Mol Breeding, 27:533–547

7- Motaghi L., Mazinani S.M. and Jabari H. 2012. Evaluation of genetic diversity in some Iranian olive cultivars using RAPD markers. Plant Ecology Systematics, 33:91-104

8- Milotic A., Setic E. Persuric D. Poljuha, D. Sladonja B. and Brscic K. 2005. Identification and characterization of autochthonous olive varieties in Istria. Ann. Ser. Hist. Nat 15 (2): 251-256.

Ecological and quantitative characteristics of Persian cypress habitat in Zarrin Gol

Shaaban Ghalandarayeshi

Assistant Professor, Department of Mathematics and Statistics, Faculty of Engineering and Basic Science, University of Gonbad Kavous,

Sh.ghalandar@gmail.com

Abstract

Having sufficient knowledge of the ecological conditions of forest ecosystems is required for scientific management of these ecosystems. For this purpose, the first step is to study the habitat characteristics of the species. The aim of this study was to investigate some habitat and stand characteristics of Persian cypress in the Zarrin Gol reserve. The study area is located 15 km from southeast of Ali Abad city and 5 km from Zarrin Gol village. To study the topographic characteristics of the area, a digital elevation map was used and to investigate the quantitative characteristics of Persian cypress trees, a systematic random sampling network with dimensions of 150 × 200 m was used. According to the results, more than 60% of the reserve is located at an altitude of less than 600 meters above sea level and the largest area is located on a slope between 30 to 70%. The average number of cypress trees per hectare was 210 and the average number of seedling per hectare was 513. The arithmetic mean diameter of cypress trees was 20.43 cm and the quadratic mean diameter was 27.97 cm. About 50% of the area was covered by this species, however, deciduous trees have prevailed.in the rest of the area due to the competition. In general, it can be said that cypress trees have formed an uneven-aged structure in specific topographic and soil conditions of this habitat in interaction with deciduous trees.

Keywords: Basal area, regeneration, uneven-aged, Topographic, competition

خصوصیات اکولوژیک و کمی رویشگاه زربین زرین گل

شعبان قلندرآیشی

استادیار، گروه ریاضی و آمار، دانشکده فنی و علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس

sh.ghalandar@gmail.com

چکیده

داشتن شناخت کافی از شرایط اکولوژیک اکوسیستمهای جنگلی لازمه مدیریت علمی این اکوسیستمها می باشد. برای این منظور اولین قدم بررسی ویژگیهای رویشگاهی گونه ها می باشد. هدف این مطالعه بررسی برخی حصوصیات رویشگاهی و توده ای سرو زربین در ذخیره گاه سرو زربین زرین گل می باشد. منطقه مورد مطالعه در پانزده کیلومتری جنوب شرقی شهرستان علی آباد و پنج کیلو متری روستای زرین گل قرار دارد. برای بررسی وضعیت توپوگرافیک منطقه از نقشه رقومی ارتفاع استفاده شد و برای بررسی وضعیت کمی درختان زربین از شبکه آماربرداری منظم تصادفی با ابعاد ۱۵۰×۲۰۰ متر استفاده شد. بر اساس نتایج، بیش از ۶۰ درصد ذخیره گاه در ارتفاع کمتر از ۶۰۰ متر و بیشترین مساحت ذخیره گاه در شیب بین ۳۰ تا ۷۰ درصد واقع شده است. میانگین تعداد در هکتار درختان زربین ۲۱۰ اصله در هکتار و میانگین زادآوری ۵۱۳ اصله نهال زربین در هکتار برآورد گردید. میانگین حسابی قطر درختان زربین ۲۰/۴۳ سانتی متر و قطر سطح مقطع متوسط ۲۷/۹۷ بدست آمد. در حدود ۵۰ درصد عرصه واجد این گونه است و در بقیه مساحت عرصه به دلیل رقابت، درختان پهن برگ غالب شده اند. بطور کلی می توان گفت که درختان زربین یک ساختار ناهمسال را در شرایط خاص توپوگرافیک و خاکی این رویشگاه در رقابت با درختان پهن برگ تشکیل داده اند.

واژگان کلیدی: سطح مقطع، زادآوری، ناهمسال، توپوگرافیک ، رقابت

۱.مقدمه

داشتن شناخت کافی از شرایط اکولوژیک اکوسیستمهای جنگلی لازمه مدیریت علمی این اکوسیستمها می باشد. برای این منظور اولین قدم بررسی ویژگیهای رویشگاهی گونه ها می باشد. جوامع زربین در شمال ایران بر روی رشته کوههای مارن آهکی در ارتفاعی بین ۳۰۰-۱۱۰۰ متر از سطح دریا با شرایط خاص اکولوژیک که مختص جوامع مدیترانه است گسترش یافته و انتشار آن در مناطق رودبار گیلان، دره اشکور رحیم آباد، حسن آباد چالوس، زرین گل گرگان، رامیان گرگان به صورت گسسته و در بعضی رویشگاهها به صورت جامعه یک دست زربینستان دیده می شود (ثابتی، ۱۳۵۵). از نظر تاریخی و جغرافیای گیاهی سرو زربین (Cuppressus sempervirens .var horizontalis) بمنزله باقیمانده جنگلهای انبوه قدیمی محسوب می شود که خواهش آن نسبت به باران کمتر بوده و با گونه های دیگری که احتیاج آنها نیز نسبت به باران متوسط است، آمیخته می باشد (مبین، ۱۳۶۰). هدف این مطالعه بررسی برخی حصوصیات رویشگاهی و توده ای سرو زربین در ذخیره گاه سرو زربین زرین گل می باشد.

۲. مواد و روشها

منطقه مورد مطالعه در پانزده کیلومتری جنوب شرقی شهرستان علی آباد و پنج کیلو متری روستای زرین گل قرار دارد. بر اساس داده های هواشناسی، میانگین بارندگی سالانه ۹۳۵/۵ mm در سال گزارش گردیده است. بهمن سردترین ماه سال و مرداد ماه گرمترین ماه سال می باشد. متوسط دمای سالیانه ۱۴/۶ درجه سانتی گراد می باشد. با توجه به منحنی آمبروترمیک، این منطقه در طول سال حدود ۲/۵ ماه فصل خشک دارد. و اقلیم منطقه بر اساس روش آمبرژه از نوع مرطوب معتدل می باشد.

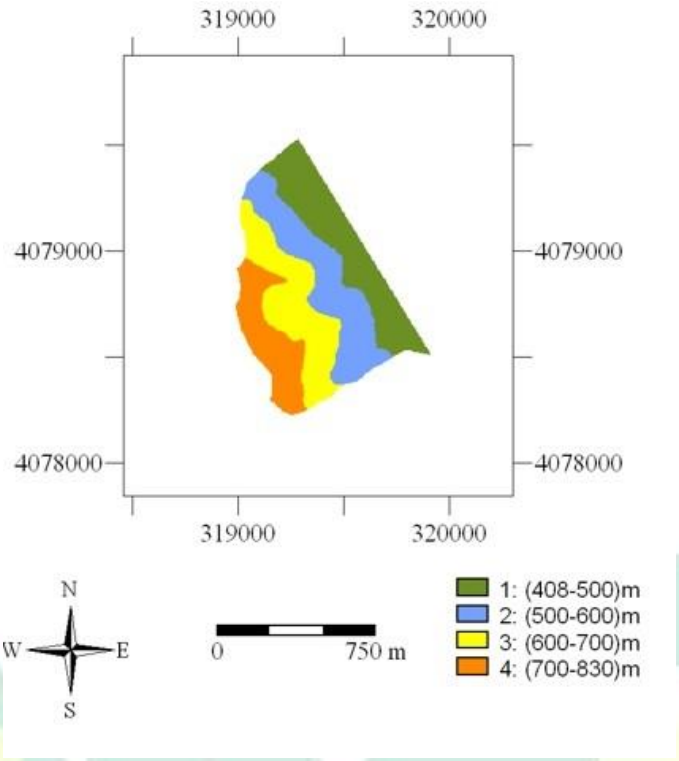
نقشه های طبقات ارتفاعی، شیب و جهت جغرافیایی با اتفاده از نقشه های رقومی توپوگرافی در محیط GIS تهیه شد. سپس آماربرداری جهت بررسی کمی درختان زربین با استفاده از روش منظم تصادفی با ابعاد شبکه ۱۵۰×۲۰۰ متر انجام شد. در کل منطقه، ۲۰ قطعه نمونه ۱۰۰۰ متر مربعی برداشت گردید. در هر پلات کلیه گونه های چوبی و همچنین مشخصه های قطر و ارتفاع درختان زربین اندازه گیری و ثبت شد. پس از آماربرداری جهت تجزیه و تحلیل دقیق داده های آماری با توجه به اینکه گونه هدف گونه سرو زربین بوده است، قطعات نمونه در مرحله اول بر اساس حضور و عدم حضور این گونه تفکیک شدند و محاسبات آماری بر اساس قطعات نمونه واجد این گونه انجام شد.

۳.نتایج و بحث

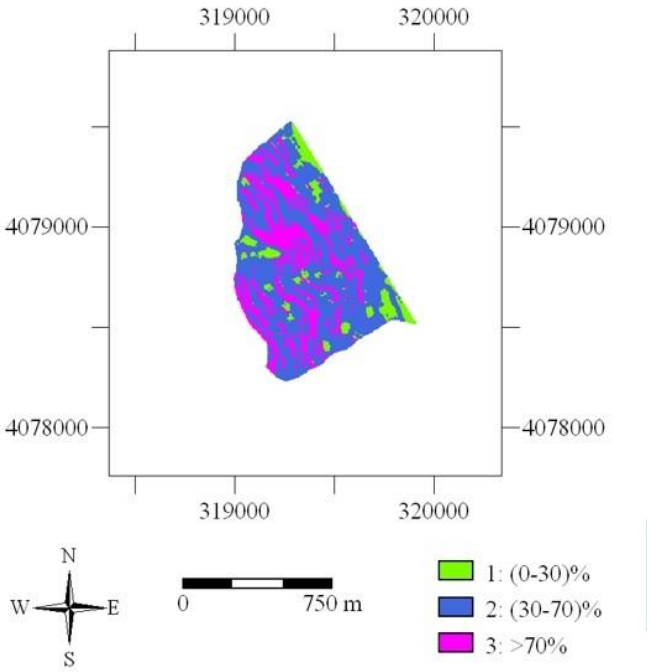
۳-۱- وضعیت فیزیوگرافیک منطقه

عامل پستی و بلندی بدلیل تاثیرگذاری در ظهور شرایط محیطی یکی از عوامل مهم بوم شناختی است.که خصوصیات آن در تجزیه و تحلیل عوامل محیطی مورد بررسی قرار می گیرد (مروی مهاجر، ۱۳۸۴). حداقل ارتفاع محدوده ذخیره گاه ۴۰۸ متر و حداکثر آن ۸۳۰ متر از سطح دریا می باشد. شکل ۱ وضعیت منطقه را از نظر طبقات ارتفاعی نشان می دهد. بر اساس نتایج، بیش از ۶۰ درصد ذخیره گاه در ارتفاع کمتر از ۶۰۰ متر از سطح دریا واقع شده است.

نقشه طبقات شیب منطقه در شکل ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج، بیشترین مساحت ذخیره گاه در شیب بین ۳۰ تا ۷۰ درصد واقع شده است. نکته حائز اهمیت این است که شیب نمی تواند عامل محدود کننده ای برای گونه سرو زربین باشد و این گونه قادر است در شیب های بالا که عمق خاک کمی دارند نیز ظاهر شود.

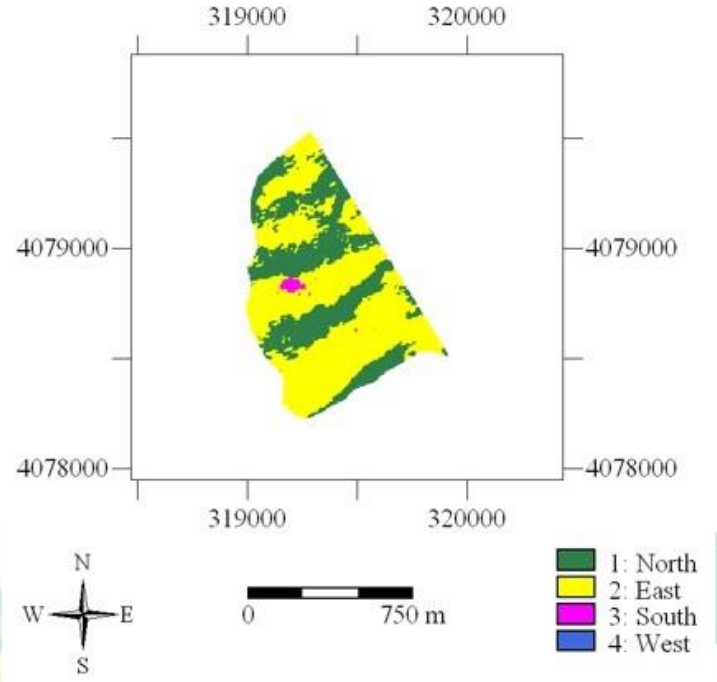


شکل ۱: طبقات ارتفاعی منطقه مورد مطالعه



شکل ۲: نقشه طبقات شیب منطقه مورد مطالعه

جهات جغرافیایی نیز از عوامل بسیار مهم موثر بر پوشش گیاهی از طریق میزان انرژی دریافتی در واحد سطح و میزان خشکی خاک می باشد. بر اساس شکل ۲ بیشترین سطح منطقه دارای جهت شرقی و بعد از آن جهت شمالی است که مجموعا ۹۸ درصد مساحت منطقه را تشکیل می‌دهند. بنظر می رسد درختان زربین در اثر رقابت با پهن برگان عمدتا در جهات شرقی که خشکی خاک بیشتر و عمق خاک کمتر می باشد، مستقر شده اند.



شکل ۳: نقشه جهات چغرافیایی منطقه مورد مطالعه

۳-۲- ویژگیهای کمی توده سرو زربین

مشخصات کمی توده جنگلی سرو زربین در جدول ۱ نشان داده شده است. مساحت تحت پوشش درختان زربین بر اساس نسبت قطعات نمونه واجد زربین به تعداد کل نمونه ها بدست آمد که بر این اساس مساحت تحت پوشش زربین در حدود ۳۲ هکتار برآورد شد. تعداد درختان در هکتار ۲۱۰ اصله در هکتار برآورد گردید که در مقایسه با نتایج رضایی (۱۳۷۱) که تراکم درختان را ۱۴۴ اصله در هکتار برآورد نموده بود، افزایش نشان می دهد. که مهمترین دلیل آن را می توان به رشد قطری پایه های جوان و ورود آنها به حد شمارش مخصوصا در بخش های جنگل کاری شده نسبت داد.

در جنگلهای ناهمسال، قطر سطح مقطع متوسط نسبت به میانگین حسابی کاربرد بیشتری دارد چون در محاسبه قطر سطح مقطع متوسط، درختان قطورتر با وزن بیشتری در نظر گرفته می شوند (زبیری، ۱۳۷۳). مقدار این مشخصه برابر ۲۷/۹۷ سانتی متر بدست آمد.

جدول ۱: ویژگیهای کمی توده سرو زربین

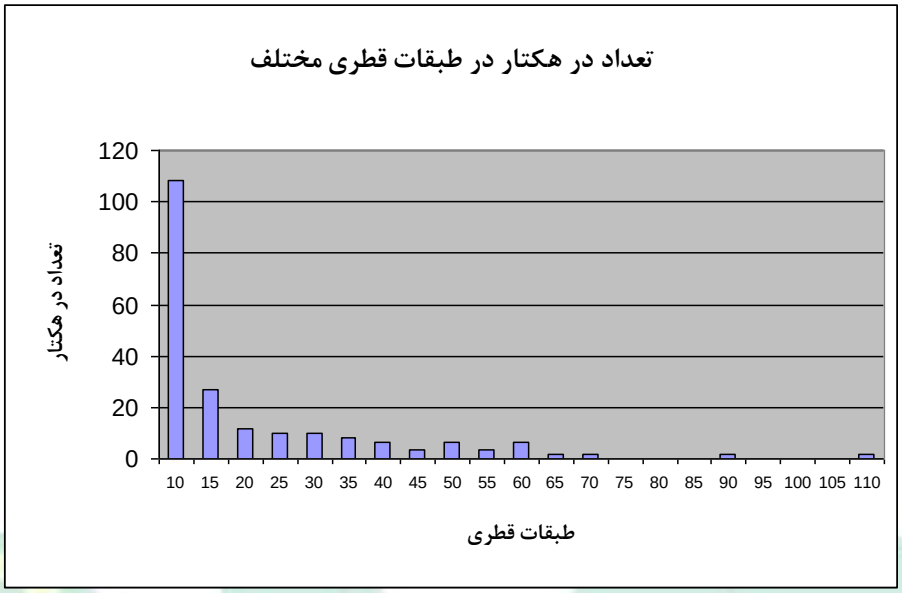
نوع مشخصه توده جنگلی زربین	مقدار مشخصه
مساحت تحت پوشش	۵۰٪
تعداد در هکتار	۲۱۰
تعداد نهال در هکتار	۵۱۳
میانگین حسابی قطر برابر سینه (سانتی متر)	۲۰/۴۳
قطر سطح مقطع متوسط (سانتی متر)	۲۷/۹۷
سطح مقطع در هکتار (متر مربع در هکتار)	۱۲/۸
ارتفاع درختان زربین (متر)	۱۰/۶

سطح مقطع در ارتفاع برابر سینه نیز فاکتور مناسبی برای کنترل تغییرات مخصوصاً در جنگلهای احیایی و ذخیره گاهها می باشد (زبیری و همکاران، ۱۳۶۸، قلندرآیشی، ۱۳۸۲). مقدار این فاکتور ۱۲/۸ متر مربع در هکتار بدست آمد که در مقایسه با نتایج. رضایی (۱۳۷۱) با مقدار ۷/۵ متر در هکتار، افزایش یافته است که دلیل عمده آنرا می توان ورود پایه های جوان به حد شمارش ذکر نمود.

میانگین حسابی ارتفاع درختان ۱۰/۶ متر محاسبه گردیده است که البته هر چه شرایط اکولوژیک سخت تر باشد یعنی بیرون زدگی سنگی بیشتر، عمق خاک کمتر و فرسایش بیشتر باشد، ارتفاع درختان کمتر می شود (رضایی، ۱۳۷۱).

میانگین تجدید حیات در هکتار ۵۱۳ اصله نهال در هکتار بدست آمد. بر اساس بررسی های رضایی (۱۳۷۱) میزان تجدید حیات ۵۶۵ اصله نهال در هکتار بوده که عامل اصلی کاهش آن را می توان رویش نهالها و خروج آنها از مرحله نهالی ذکر نمود.

همانطور که هیستوگرام تعداد در طبقات قطری نشان می دهد (شکل ۴) ساختار این ذخیره گاه ناهمسال جوان است که علت عمده آن، فراوانی بالای پایه های جوان جنگل کاری شده در این رویشگاه می باشد.



شکل ۴: تعداد در هکتار درختان زربین بر حسب طبقات قطری ۵ سانتی متری

۴. نتیجه گیری

بر اساس نتایج، اگرچه مساحت رویشگاه در حدود ۶۴ هکتار برآورد گردید اما تنها حدود ۵۰ درصد عرصه واجد این گونه است و در بقیه مساحت عرصه به دلیل رقابت درختان پهن برگ غالب شده اند. بیش از ۶۰ درصد ذخیره گاه در ارتفاع کمتر از ۶۰۰ متر و بیشترین مساحت ذخیره گاه در شیب بین ۳۰ تا ۷۰ درصد واقع شده است. در جامعه آمیخته سرو زربین، گونه سرو زربین همراه با برخی گونه های خشکی پسند درختی و درختچه ای حضور دارند که عامل رقابت سهم عمده ای در تعیین مرز این دو جامعه دارد. مرز فوقانی این رویشگاه حالت زیگزاگ به خود گرفته است به طوری که شاهد پیشروی زربین روی یالها و پیشروی پهن برگان بر روی دره ها هستیم. به این طریق که هر جا شرایط خاک از نظر عمق و رطوبت مناسب شود، مخصوصا جهت های شمالی بلافاصله آن عرصه بوسیله گونه های پهن برگ که نسبت به سرو زربین قدرت رویشی بیشتری دارند، اشغال می شود. بطور کلی می توان گفت که درختان زربین یک ساختار ناهمسال را در شرایط خاص توپوگرافیک و خاکی این رویشگاه در رقابت با درختان پهن برگ تشکیل داده اند.

منابع

۱- ثابتی، ح. ۱۳۵۵. درختان و درختچه های ایران، انتشارات سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، ۷۸۴ ص.
۲- پولادیان، م. و کهندل، ا.، .مترجمین. ۱۳۸۳، درختان و درختچه ها، موسسه انتشاراتی آیه، چاپ اول، ۲۷۲ ص.

۳- رضایی، ا.، ۱۳۷۱. بررسی اکولوژیک رویشگاههای طبیعی زربین در شمال ایران (حسن آباد چالوس، رامیان، و زرین گل)، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
٤- زبیری، م. و بیگلربیگی، ب.، ۱۳۶۸. اندازه گیری سطح مقطع بجای برآورد حجم در جنگلهای احیائی، مجله منابع طبیعی ایران، شماره۴۳، ص:۵۱-۴۵
٥- زبیری،م.، ۱۳۹۸. آماربرداری در جنگل(اندازه گیری درخت و جنگل)، انتشارات دانشگاه تهران، چاپ ششم، ۴۰۱ ص.
٦- قلندرآیشی، ش.، ۱۳۸۲، بررسی تغییرات پوشش درختی و ارتباط آن با خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک در شمشادستان چشمه بلبل، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران.
۷- مبین، ص.، ۱۳۶۰. جغرافیای گیاهی، انتشارات دانشگاه تهران، چاپ دوم، ۲۷۱ ص.
۸- مروی مهاجر، م.، ۱۳۸۴، جنگل شناسی و پرورش جنگل، انتشارات دانشگاه تهران،۳۸۷ ص.

Effect of Conservation tillage on Soil Biodiversity: (a review)

Laleh Parvin*[1]; Aydin Khodaei Joghan[2]; Ahmad Khanifarzadeh[1]

1- Ph.D. Student of Agrotechnology, Department of Plant Production and Genetics, Agriculture Faculty, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan
2- Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Agriculture Faculty, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan

**Corresponding Author Email address: (phd.parvin@asnrukh.ac.ir)*

Abstract

One way to increase sustainability and resilience of agricultural ecosystems is to improve soil biodiversity. Tillage management affects soil organisms and soil biodiversity. Due to changes in fertility, tillage affects the diversity and abundance of soil organisms. The results of various researches show that the diversity of species and activity of soil organisms in conservation tillage systems is higher and more populations of bacteria, fungi and earthworms have been reported in this system. However, more sustainable systems do not always lead to an increase in the abundance and diversity of soil animals, and decisions about the use of tillage systems must be made according to local conditions.

Keywords: Ecosystem services, Sustainable agriculture, Reduced tillage

مروری بر تأثیر خاک‌ورزی حفاظتی بر تنوع زیستی خاک

لاله پروین[1*]؛ آیدین خدایی جوقان؛[2] احمد خنیفرزاده[1]

۱- دانشجوی دکتری اگروتکنولوژی گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

۲- استادیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: phd.parvin@asnrukh.ac.ir

چکیده

یکی از راهکارهای افزایش پایداری و انعطاف پذیری اکوسیستم‌های زراعی بهبود تنوع زیستی خاک است. مدیریت خاکورزی بر تنوع موجودات خاک اثر گذار می‌باشد و سنجش تنوع زیستی خاک می‌تواند بطور موفقیت آمیزی برای مقایسه عملیات خاک‌ورزی در مقابل بی خاکورزی به کار برده شود. خاکورزی به دلیل تغییر حاصلخیزی، تنوع و فراوانی موجودات خاک را تحت تاثیر قرار می‌دهد. نتایج تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که تنوع گونه‌ای و فعالیت موجودات خاکزی در سامانه‌های خاک‌ورزی حفاظتی بیشتر است و جمعیت بیشتری از باکتری‌ها، قارچها و کرم‌های خاکی در این سامانه گزارش شده است. با این حال، سیستم هایی با پایداری بیشتر، همیشه منجر به افزایش فراوانی و تنوع جانوری خاک نمی‌شوند و تصمیم گیری در اعمال سامانه‌های خاک ورزی باید با توجه شرایط محلی صورت پذیرد.

واژگان کلیدی: خدمات اکوسیستمی، کشاورزی پایدار، کم خاک ورزی

۱. مقدمه

۱-۱-تنوع زیستی

تنوع زیستی به معنی تنوع بین موجودات زنده اکوسیستم‌های خشکی، دریایی و سایر اکوسیستم‌های آبی و همچنین مجموعه‌های اکولوژیک می‌باشد. این مفهوم شامل تنوع درون گونه‌ای، بین گونه‌ای و تنوع اکوسیستم‌ها می‌باشد. تنوع زیستی دارای اجزای ضروری برای تمام خدماتی است که باعث پایداری و تنظیم محیط زیست می‌شوند و منابع، سرپناه و مزایای معنوی و روانشناختی به انسان ارائه می‌دهند. با از بین رفتن اجزای تنوع زیستی از قبیل گونه‌ها و زیستگاه‌ها، انعطاف‌پذیری اکوسیستم کاهش می‌یابد و خدمات ارائه شده توسط آن، مختل می‌گردد. به همین دلیل با انقراض یک گونه یا گروهی از گونه‌ها به دلایلی مانند بهره‌برداری بیش از حد یا تخریب زیستگاه، ممکن است خدمات ارزشمند ارائه‌شده توسط آن گونه یا فرصت‌هایی که آن گونه برای بهبود زندگی در اختیار ما قرار می‌داد، حذف شود (زند و همکاران، ۲۰۱۶).

۱-۲-کشاورزی و تنوع زیستی

کشاورزان در واکنش به دامنه وسیعی از فشارهای فیزیکی، تغییرات جمعیتی، اقتصادی، اجتماعی و فناوری، عملیات زراعی را تغییر می‌دهند که این تغییرات معمولا تحت عنوان فشرده‌سازی نظام کشاورزی مطرح بوده و مهم‌ترین اصل آن افزایش در مصرف نهاده و تداوم استفاده از زمین زراعی است. البته فشرده‌سازی علاوه بر تداوم در به کارگیری از زمین، شامل افزایش استفاده از منابع محیطی، تغییر از شکل غالبیت نهاده‌های داخلی به نهاده‌های خارجی، تغییر در عملیات مدیریتی و همچنین افزایش توجه به رابطه بین تولید و تجارت نیز می‌باشد. اگر چه ویژگی کشاورزی فشرده، تخصصی‌تر شدن فرایندهای تولید محصولات کشاورزی است، اما نتیجه آن، کاهش در تعداد و تنوع گونه های گیاه زراعی و یا دام مورد استفاده خواهدبود (قلی نژاد، ۱۳۸۹). محیط زندگی موجودات خاکزی، از روش‌های مدیریت زراعی از قبیل شخم، کاربرد آفتکش‌ها و کودها، تراکم خاک در طی برداشت و حذف توده زنده گیاهی تاثیر می‌پذیرد (Kamczyk and Gwazdowicz, 2009). پاسخ جوامع خاکزی به مدیریت زمین‌های کشاورزی، تغییر در فراوانی، غنای گونه‌ای و شاخص‌ها ی تنوع زیستی می‌باشد (Chust et al, 2003).

۱-۳-خاک‌ورزی و تنوع زیستی

خاک‌ورزی، بسیاری از ویژگی های محیط فیزیکی خاک، مانند آب و هوای خاک، فشردگی، تخلخل و نیز دمای خاک را تغییر می‌دهد. به علاوه با افزایش آسیب پذیری خاک در برابر فرسایش‌های آبی و بادی تلفات ماده آلی و نیتروژن لایه سطحی خاک نیز افزایش می یابد. گسترش توجه به مساله خاک‌ورزی حفاظتی اساسا ناشی از نگرانی‌های موجود در مورد فرسایش فیزیکی و زیستی خاک، همراه با مزایای اقتصادی این راهکار است. افزایش کمی و کیفی گیاهان وحشی و غیر زراعی و جمعیت برخی بی مهرگان و مهره داران اثرات مثبت، و کاربرد علف کش، اثر منفی خاک ورزی های حفاظتی بر تنوع زیستی می‌باشند. از سوی دیگر، اجرای خاک‌ورزی در محیط‌های طبیعی با پرچین‌های مجاور مزارع (که دارای مجموعه متنوعی از جوامع گیاهی و جانوری می باشند) باعث تخریب پناهگاه‌های طبیعی و کاهش تنوع زیستی کل مناطق چشم انداز کشاورزی خواهدشد. متأسفانه، زمان اجرای بسیاری از عملیات کشاورزی هم زمان با فعالیت طیف وسیعی از موجودات طبیعی است (قلی نژاد، ۱۳۸۹).

۱-۴-خاک‌ورزی حفاظتی

خاک‌ورزی حفاظتی به هر گونه خاکورزی و سیستم کاشت اطلاق می‌گردد که در آن بیش از انجام کشت، سطح مزرعه حداقل ۳۰ درصد از بقایای گیاهی باقی مانده پوشیده می شود. درخاکورزی حفاظتی نیاز است تا حداقل به هم خوردگی خاک با در نظر گرفتن تولید پایدار و همچنین حداکثر کردن پوشش بقایای گیاهی در سطح خاک به وسیله مدیریت محصول و چراندن بقایا به وسیله دام را در نظر گرفت (Derpsch *et al*., 2014). چهارده نام مختلف برای خاکورزی کاهش یافته توسط بیکر و همکارانش مشخص شده که شامل خاکورزی صفر، شخم شیمیایی، بستر بذر آماده، آیش شیمیایی، بی‌خاکورزی، کشت مستقیم، کشت با دیسک، کشت متهای، هیرم کاری، حداقل خاکورزی یا خاکورزی کاهش یافته، خاکورزی نواری یا منطقه‌ای، خاکورزی پشته‌ای و کشت در بقایا می‌شود (Baker *et al*., 2002).

عامل اصلی برای رسیدن به پایداری در کشاورزی جهانی، تلفیق بی‌خاک‌ورزی با تنوع محصولات است (Anderson, 2015). در دو دهه گذشته، خاکورزی در دنیا به میزان قابل توجهی کاهش یافته‌است و گاها به صورت کامل حذف شده است آن هم در سطوح وسیعی که جهت گندم و کلزا مورد استفاده قرار می‌گرفتند و بی‌خاک‌ورزی به عنوان موفق‌ترین تکنولوژی حفاظتی در دشت‌ها قلمداد شده است (Fao, 2016).

مزایای مهم کشاورزی حفاظتی شامل کاهش فرسایش خاک، حفظ رطوبت خاک، افزایش تنوع زیستی، افزایش مواد آلی، بهبود خواص فیزیکی و شیمیای و بیولوژیک خاک، افزایش پدیده تثبیت کربن و کاهش گازهای گلخانه‌ای، کاهش مصرف سوخت به میزان ۵۰ تا ۸۰ درصد، کاهش نیروی کارگری به میزان ۳۰ تا ۵۰ درصد، کاهش هزینه‌های سرویس و نگهداری ماشین آلات، کاهش تلفات عناصر غذایی به خصوص نیتروژن و صرفه جویی در مدت زمان عملیات خاکورزی می‌باشد (Meijer and Jordan, 2010 ؛ Horowitz *et al*., 2010). در مقابل، ریسک ظهور و طغیان برخی آفات، بیماری‌ها و علف های هرز جدید، وابستگی به مصرف بیشتر آفت کش‌ها به خصوص علف‌کش‌ها، کاهش دمای خاک و امکان

تاخیر در رشد و نمو گیاه، افزایش فشردگی و کاهش میزان تهویه خاک و نیاز بیشتر به کودهای نیتروژنی در اوایل فصل رشد از مهم‌ترین معایب سامانه‌های کشت حفاظتی می‌باشند (Horowitz *et al*., 2010).

۲- مواد و روش ها

۲-۱-اثرات خاک ورزی حفاظتی بر تنوع زیستی

خاک‌ورزی حفاظتی که با مدیریت مناسب بقایای گیاهی همراه می‌گردد راهکاری مناسب در جهت جلوگیری از حذف یا سوزاندن بقایا در کشاورزی پایدار به شمار می‌رود و نقشی مهم در بهبود خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک دارد و در نتیجه می‌تواند منجر به افزایش و یا بهبود عملکرد گیاه زراعی گردد (Bani-Asadi *et al*., 2014). بنا بر عقیده ورهالست و همکاران تنوع گونه ای و فعالیت موجودات خاکزی در این سامانه‌ها به مراتب بیشتر است و جمعیت بیشتری از باکتری‌ها، قارچ‌ها و کرم‌های خاکی در آنها وجود دارد (Verhulst *et al*., 2011). در پژوهش مک گوایر (۲۰۰۰) فراوانی جمعیت، نوع گونه‌ها و میزان زیست توده حلزون‌ها در مزارع کشت حفاظتی گندم (کم خاک ورزی) بیش تر از کشت رایج بود (McGuire, 2000). نعمتی و پژمان تاثیر سامانه های بی خاک‌ورزی و متداول را بر فراوانی و تنوع بندپایان در زراعت گندم مورد مطالعه قرار داده و گزارش کردند که بیشترین تأثیر سامانه خاک‌ورزی بر گونه‌هایی مشاهده شد که تمام یا بخشی از چرخه زندگی خود را در خاک و یا بقایای گیاهی می‌گذرانند و از مهمترین آنها، کنه قهوه ای گندم، تریپس گندم، زنبور ساقه خوار، سوسک های کارابیده و عنکبوت‌ها را می‌توان نام برد (نعمتی و پژمان، ۱۳۹۳).

وانکاپل و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی متون علمی منتشر شده در شش دهه گذشته در آلمان در طیف گسترده‌ای از خاک‌های مختلف و عمدتا در مناطق معتدل، تأثیر کشاورزی رایج، کم‌خاکورزی و بدون خاک‌ورزی را بر *lumbricids* (کرم‌های حلقوی)، *collembolans* (پادمان یا دم فنری‌ها)، کنه‌ها، *enchytraeids* (کرم‌های خاکی)، نماتدها و میکروب‌ها مورد تجزیه و تحلیل قراردادند. آن‌ها نشان‌دادند که بیوتای خاک (موجودات زنده خاک) به طور خاص به سیستم‌های خاکورزی پاسخ می‌دهند. فراوانی، تنوع و فعالیت موجودات زنده خاک، عمدتاً به صورت مستقیم، تحت تأثیر توزیع مواد آلی به عنوان منبع غذایی اساسی، ساختمان خاک و توزیع اندازه منافذ خاک به عنوان فضای موجود برای زندگی، تحرک، و حرکت هوا و آب به عنوان محیط زیست قرار می‌گیرد و به طور غیرمستقیم به فعل و انفعالات بهبودیافته در شبکه غذایی خاک، پاسخ مثبت نشان می‌دهند. دراگرواکوسیستم‌های پایدار، کرم‌های خاکی و پادمان، به‌ترتیب فراوان‌ترین گروه‌های ماکروفونا و مزوفونا هستند؛ هر دو گروه، اندازه نسبتاً بزرگی دارند، در منافذ پر از هوا زندگی می‌کنند، به شبکه‌ای از مسیرها برای حرکت نیاز دارند و بنابراین نسبت به اختلال و آشفتگی در شبکه‌های منافذ خاک، حساس‌تر می‌باشند. با توجه به نتایج این پژوهش، انتظار می‌رود که اتخاذ شیوه‌های کم‌خاکورزی و بی‌خاکورزی به نفع موجودات زنده خاک و باعث افزایش مشارکت آن‌ها در ارائه خدمات اکوسیستم باشد، با این حال، سیستم‌هایی با پایداری بیشتر، همیشه منجر به افزایش فراوانی و تنوع جانوری خاک نمی‌شوند، به طوری‌که فراوانی و تنوع گونه ای *lumbricids* (کرم‌های حلقوی) در اثر کاهش شدت خاکورزی به طور قابل توجهی افزایش یافت، اما با این‌حال تراکم فردی و تنوع گونه‌ای *collembolans* (پادمان یا دم فنری‌ها) با کاهش شدت خاکورزی به طور قابل توجهی کاهش یافت. علت تفاوت اثرات خاک ورزی بر روی پادمان و کرم‌های حلقوی به نوع بافت خاک وابسته است، در حالی که در مورد نماتدها و جوامع میکروبی، عمق خاک زراعی تعیین کننده اثر مثبت یا منفی خاکورزی می‌باشد. بنابراین بررسی شش دهه پژوهش به وضوح نشان می‌دهد که تصمیم گیری در مورد انتخاب سیستم خاکورزی باید برای هر منطقه با در نظر گرفتن ویژگی های محلی خاک آن منطقه گرفته شود.(Van Capelle *et al*., 2015)

کولیبالی و همکاران در مطالعه خود در شمال فرانسه به بررسی شرایط زیستی وغیرزیستی خاک در انواع سیستم‌های خاکورزی در کوتاه مدت(هفت ماه) پرداختند. یافته‌های آن‌ها نشان‌داد که کاهش جزئی شدت آشفتگی مکانیکی خاک، یعنی کم‌خاکورزی، به نفع جانوران خاک

نیست. اما در بی‌خاکورزی، اندازه جمعیت کرم خاکی و پادمان یا دم فنری‌ها افزایش یافت، که البته این امر به بهبود توزیع و دسترسی به مواد آلی به عنوان منبع غذایی اساسی (قابل اندازه‌گیری توسط شاخص‌های ذخایر ماده آلی، زیست توده میکروبی و قارچی و توانایی معدنی‌سازی کربن آنها)، ساختمان فیزیکی خاک و توزیع اندازه منافذ آن به عنوان فضایی برای زندگی(قابل اندازه‌گیری توسط شاخص‌های چگالی ظاهری، میانگین وزنی قطر خاکدانه‌ها و اندازه خاکدانه‌ها) مربوط بود. این مطالعه نشان‌داد که موجودات زنده خاک به طور متفاوتی به آشفتگی مکانیکی خاک واکنش نشان می‌دهند. به طور کلی، خاکورزی حفاظتی می‌تواند یکی از خدمات متعدد ارائه شده توسط خاک، یعنی تنوع زیستی خاک را تقویت کند و در نتیجه کیفیت و سلامت خاک را بهبود بخشد (Coulibaly *et al*., 2021).

هنرون و همکاران اثرات دراز مدت انواع خاکورزی و کشاورزی ارگانیک را به مدت ۱۴ سال بر تنوع زیستی خاک بررسی کردند. نتایج پژوهش آن‌ها نشان می‌دهد که هر دو سیستم حفاظتی و ارگانیک، فراوانی و زیست توده همه موجودات خاک را به جز نماتدهای شکاری افزایش دادند. به عنوان مثال، ماکروفون از ۱۰۰ درصد به ۲۵۰۰ درصد، نماتدها از ۱۰۰ درصد به ۷۰۰ درصد و میکروارگانیسم ها از ۳۰ درصد به ۷۰ درصد افزایش یافت. کشاورزی حفاظتی به طور کلی اثرات مثبت بیشتری را نسبت به کشاورزی ارگانیک نشان‌داد. کشاورزی حفاظتی باعث افزایش تعداد بسیاری از موجودات زنده مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، کرم‌های خاکی عمق‌زی و بندپایان گیاهخوار و ریزوفاژها شد اما کشاورزی ارگانیک عمدتاً مسیر باکتریایی شبکه غذایی خاک و کرم‌های خاکی میانه‌زی و عمق‌زی را بهبود بخشید و به طور کلی، در طولانی‌مدت، بی‌خاکورزی و محصولات پوششی برای موجودات زنده خاک بهتر از کودهای سبز دوره‌ای حبوبات بود (Henneron *et al*., 2015).

۳. نتیجه‌گیری

تنوع و فعالیت موجودات زنده خاک، به دو عامل توزیع مواد آلی به عنوان منبع غذایی اساسی، و نیز ساختمان خاک به عنوان فضای موجود برای زندگی آن‌ها بستگی دارد و به طور مستقیم تحت تاثیر مدیریت خاک ورزی قرار می‌گیرد. در شرایطی که بقایای گیاهی در سامانه خاک - ورزی حفاظتی نسبت به خاکورزی رایج حفظ می‌گردد، فعالیت موجودات خاکزی به مراتب بیشتر می باشد به گونه ای که دارای تنوع گونه ای بیشتر بوده و جمعیت بیشتری از باکتری‌ها، قارچ‌ها و کرم‌های خاکی در آنها وجود دارد. در مورد انتخاب سیستم خاکورزی باید برای هر منطقه با در نظر گرفتن ویژگی‌های محلی خاک آن منطقه صورت گیرد چرا که نوع بافت خاک و میزان عمق خاک زراعی در تعیین نوع اثرات نهایی بی‌خاک‌ورزی بر موجودات زنده خاک، اثر مستقیمی دارند.

منابع

۱- زند ا.، صوفی زاده س. میقانی ف. و صادقیان س.ی. ۱۳۹۴. تنوع زیستی: مفاهیم، کنوانسیون، ساختار. سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، وزارت جهاد کشاورزی. ۱۵۸ ص.

۲- عسگری م.ج.، قرینه م. ضیائیان ع. و آسودار م.ا. ۱۳۹۶. اثر نظام‌های خاکورزی و کود نیتروژن در تنش‌های مختلف رطوبتی بر رشد و عملکرد گندم. رساله دکتری. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان. ص ۴.

۳- قلی نژاد، ا. تاثیر کشاورزی بر تنوع زیستی. ۱۳۸۹. همایش ملی تنوع زیستی و تاثیر آن بر کشاورزی و محیط زیست.

۴- نعمتی س. و پژمان ح. ۱۳۹۳. مقایسه فونستیک و تعیین گونه های غالب آفات گندم و دشمنان طبیعی آنها در سامانه های کشت بی - خاکورزی و متداول در منطقه مرودشت فارس. پژوهشهای کاربردی در گیاه پزشکی، جلد سوم، شماره اول، ص: ۱۷-۱.

5- Anderson R.L. 2015. Integration a Complex Rotation with No-Till Improves weed management in organic farming. A Review. Agronomy for Sustainable Development, 35: 967 -974.

6- Baker C.J., Saxton k.E. and Ritchei W.R. 2002. No- Tillage Seeding: Science and Practice. 2nd ed. Oxford, Uk: CAB International.

7- Bani-Asadi R., Tohidi-Nejad A.A. and Mohammadi-Nejad Gh. 2014. Evaluation of effects of tillage methods and barley residues management on corn production. Agricultural Science and Sustainable Production, 24: 4. 61-69. (In Persian)

8- Chust G., Pretus J.L. Ducrot D. Bedos A. and Deharveng L. 2003. Response of soil fauna to landscape
9- Coulibaly S., Aubert M. Brunet N. Bureau F. Legras M. and Chauvat M. 2021. Short-term dynamic responses of soil properties and soil fauna under contrasting tillage systems. Soil and Tillage Research. 215.
10- Derpsch R., Franzluebbers S.W. Duiker D.C. Reicosky K. Sturny W.G. Sa J.C.M. and Weiss K. 2014. Why do we need to standardize no- tillage research? Soil and Tillage Research, 137: 16-22.
11- Food and Agriculture Organization (FAO), 2016. Save and Grow in practice: maize, rice, wheat, A Guide to Sustainable Cereal Production. Available at Web site www.fao.org/publications/save-and-grow/maize-rice-wheat/en/ (verified 18 January 2016).
12- Henneron L., Bernard L. Hedde M. Pelosi C. Villenave C. Chenu C. Bertrand M. Cyril G. and Blanchart E. 2015. Fourteen years of evidence for positive effects of conservation agriculture and organic farming on soil life. Agronomy for Sustainable Development, 35, 169-181.
13- heterogeneity: determining optimal scales for biodiversity modeling. Conservation Biology, 17(6): 1712-1723.
14- Horowitz J., EBEL R. and UEDA K. 2010. No-Till Farming is a Growing Practice. Economic information Bulletin, (70) USDA.
15- Kamczyk J. and Gwazdowicz D.J. 2009. Soil mites (Acari, Mesostigmata) from Szczeliniec Wielki in the Stołowe Mountains National Park (SW Poland). Biological Letters, 46: 21-27.
16- McGuire A. 2000. The Effects of Reducing Tillage on Pest Management, Washington State Univ. Extension, Grant-Adams Area, Lauzier Agricultural Systems Educator. 4p.
17- Meijer A.D. and Jordan D.L. 2010. Conservation Tillage use in peanut production. North Carolina Cooperative Extension, 4 pp.
18- Pezhman H., Jokar L. and ZareMoayedi M. 2017. Comparison of abundance and species diversity of herbivorous arthropods in wheat fields under conservation and conventional tillage systems in Zarghan region (Fars province, Iran). Entomology and Phytopathology. 85: 2. 139-154. (In Persian)
19- Van Capelle C., Schrader S. and Brunotte J. 2012. Tillage-induced changes in the functional diversity of soil biota – A review with a focus on German data. European Journal of Soil Biology, 50: 165–181.
20- Verhulst N., Govaerts B. Nelissen V. Sayre K.D. Crossa J. Raes D. and Deckers J. 2011. The effect of tillage crop rotation and residue management on maize and wheat growth and development evaluated with an optical sensor. Field Crops Research, 120:58-67.

Pollination syndrome in Nonea lutea (Boraginaceae)

Mohaddeseh Karimi[1]; Mohammad Fatemi[*2]; Azam Ghaviandam[3]

1- M.Sc. Student, Biology Department, Faculty of Sciences, Golestan University
2- Assistant Professor, Biology Department, Faculty of Sciences, Golestan University
3- Technical Officer, Biology Department, Faculty of Sciences, Golestan University

*s.m.fatemi@gu.ac.ir

Abstract

Pollination syndrome is an important factor in maintaining biodiversity in plants. Understanding the reproductive system and pollination in plants is of particular importance. Extensive studies have been performed on the reproductive and pollination systems in different groups of plants, but this type of study has been rare in members of the Boraginaceae family. In this study, we investigated pollination and the role of pollinators in the reproduction of *Nonea lutea*. Controlled pollination experiments were performed on 15 randomly selected samples from two populations and the seed production rate in each treatment was calculated. The results of this study show that seed production in the *N. lutea* is not completely dependent on pollinators. However, attracting pollinating insects by attractive yellow flowers leads to complete pollination of the flowers and more seeds are produced.

Keywords: Pollinators, self-fertilization, floral visitors, seed set

گرده‌افشانی در گیاه چشم‌گربه‌ای زرد (*Nonea lutea*: Boraginaceae)

محدثه کریمی[1]، سید محمد فاطمی[*2]، اعظم قوی‌اندام[3]

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

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

۳- کارشناس گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان

* *s.m.fatemi@gu.ac.ir*

چکیده

نشانگان گرده‌افشانی از عوامل مهم حفظ گوناگونی زیستی در گیاهان است. درک سیستم تولیدمثل و گرده‌افشانی در گیاهان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بررسی‌های گسترده‌ای بر روی سیستم تولیدمثل و گرده‌افشانی در گروه‌های مختلف گیاهان انجام شده است، ولی این نوع مطالعات در اعضای تیره گاوزبانیان اندک و کم‌شمار بوده است. در این مطالعه به بررسی گرده‌افشانی و نقش گرده‌افشان‌ها در تولیدمثل گیاه چشم‌گربه‌ای زرد (*Nonea lutea*) پرداخته‌ایم. آزمایشات کنترل‌شده گرده‌افشانی بر روی ۱۵ نمونه تصادفی از دو جمعیت انجام و نرخ تولید دانه در هر تیمار محاسبه شد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تولید دانه در گیاه چشم‌گربه‌ای زرد، کاملا وابسته به عوامل گرده‌افشان نیست. ولی جلب حشرات گرده‌افشان توسط گل‌های زردرنگ و جذاب منجر به گرده‌افشانی کامل گل‌ها شده و دانه‌های بیشتری تولید می‌شود.

کلیدواژه‌ها: گرده‌افشان، خودسازگاری، ملاقات‌کننده‌های گل، تولید دانه

۱.مقدمه

چشم‌گربه‌ای زرد (*Nonea lutea*) گیاهی است یک‌ساله، علفی، به ارتفاع ۱۰ تا ۶۰ سانتی‌متر، پوشیده از موهای زبر با قاعده برجسته همراه با کرک‌های ریز. ساقه‌های گیاه افراشته و منشعب است و برگ‌های آن بدون دمبرگ یا با دمبرگ کوتاه، به شکل مستطیلی-نیزه‌ای با حاشیه ساده یا کمی موج‌دار به طول ۳۰ تا ۵۰ و عرض ۵ تا ۱۲ میلی‌متر. هر دو سطح برگ با موهای زبر با قاعده برجسته و کرک‌های ریز پوشیده شده است. گل‌های آن زرد رنگ و به شکل لوله‌ای-استکانی است و زمان گلدهی آن در فصل بهار بوده که در استان گلستان بسته به آب‌وهوای منطقه، این گیاه از اواخر بهمن ماه تا اواسط اردیبهشت گل می‌دهد. این گونه از عناصر متعلق به منطقه خزری است و پراکندگی جغرافیایی آن، در اروپا، ترکیه، ایران و قفقاز است. در ایران، پراکندگی گونه بیشتر در شمال و مرکز کشور متمرکز است. در برخی نواحی اروپایی از این گونه به عنوان گونه‌ی مهاجم یاد می‌شود (خاتم‌ساز ۱۳۸۱؛ امیدبیگی ۱۳۹۳).

نشانگان گرده‌افشانی از عوامل مهم حفظ گوناگونی زیستی در گیاهان است (Knopp et al., 2017; Delle-Vedoveet al., 2017). با برهم خوردن سازوکارهای گرده‌افشانی ممکن است گونه‌های گیاهی از تولید مثل جنسی بازمانده و در نهایت گوناگونی زیستی آنها کاهش یابد، که به نوبه خود توان رقابت با گونه‌های دیگر و مقابله با فشار عوامل انتخاب طبیعی را از دست بدهند. در این حالت گونه وارد گرداب انقراض می‌شود (Larson et al., 2000). با کاهش ذخایر ژنتیکی، مقاومت جمعیت‌های زیستی در برابر عوامل گوناگون انتخاب طبیعی کاهش می‌یابد که ممکن است توان بقای گونه‌های زیستی را تحت تأثیر قرار داده و منجر به انقراض گونه شود (Barrett and Harder, 2017).

بوید (۲۰۰۴) با مطالعه سیستم تولیدمثلی و اثر گرده‌افشانی حشرات ملاقات‌کننده گل، ارتباط بین تنوع در نوع گرده‌افشان و اندازه گل در گونه *Macromeria viridiflora* از تیره Boraginaceae را بررسی کرد. وی با بررسی دو جمعیت مختلف از این گونه دریافت که با وجود اینکه این گیاه خودسازگار است و از طریق خودلقاحی می تواند بذر تولید کند، ولی وجود گرده افشان‌ها برای افزایش درصد موفقیت گیاه در فرایند تولید مثل اهمیت بالایی دارد. وی با بررسی فراوانی ملاقات‌کننده‌ها و مقدار دانه‌های گرده بر روی کلاله‌های گل به عنوان معیارهایی برای اثربخشی گرده افشان، دریافت که مگس‌مرغ‌ها موثرترین گرده‌افشان در هر دو جمعیت هستند. البته نوعی پروانه هم گرده‌افشانی این گل‌ها را انجام می‌دهد ولی هم درصد بازدید کمتری دارد و هم دانه گرده کمتری را جابه‌جا می‌کند. نتایج وی با این فرضیه سازگار است که تنوع جغرافیایی در اندازه جام گل، نتیجه انتخاب توسط گونه‌های مختلف مگس‌مرغ‌ها است (Boyd, 2004).

از سوی دیگر برخی از گونه‌های گیاهی با استفاده از سازوکارهای متنوع گرده‌افشانی تولید دانه را تضمین کرده و از این راه به موفقیت در تولید مثل جنسی دست یافته و توان رقابتی بیشتری در مقایسه با گونه‌های وابسته به عوامل گرده‌افشان خاص پیدا می‌کنند (Cohen, 2014; Cohen et al., 2012).

از این رو شناسایی سازوکارهای گرده‌افشانی و عوامل موثر بر تولید مثل جنسی در این گونه می‌تواند به درک چرخه زندگی آن کمک کند. هدف از این مطالعه یافتن ارتباط بین تغییر در نوع گرده‌افشان و تغییر در شکل و اندازه گل در *Nonea lutea* است. در گام نخست به بررسی نقش گرده‌افشان‌ها در میزان موفقیت‌آمیز بودن تولید دانه می‌پردازیم.

در این مطالعه فرضیه ما این است که چشم‌گربه‌ای زرد با داشتن گل‌های زردرنگ و جذاب باعث جلب حشرات از جمله زنبورها شده و به این ترتیب توسط آنها گرده‌افشانی می‌کند. در این صورت گیاه تمایل بیشتری به دگرگرده‌افشانی داشته و سازوکارهایی برای پیش‌گیری از خودلقاحی خواهد داشت. فرضیه دیگر آنست که با حذف گرده‌افشان‌ها، گیاه می‌تواند میوه و دانه تشکیل دهد که می‌تواند با استفاده از سازوکار تحلیل خودناسازگاری و گرایش به خود سازگاری انجام شده و یا از سازوکارهای دیگری مانند آپومیکسی استفاده کند. پرسشی که مطرح می‌شود این است که آیا جذب گرده‌افشان برای این گیاه مهم است؟ اگر موفقیت باروری به طور قابل توجهی توسط بازدیدکنندگان گل افزایش یابد، پس گرده‌افشان‌ها عوامل مهمی در موفقیت تولید مثل حتی در گیاهان خود سازگار است (Boyd 2004).

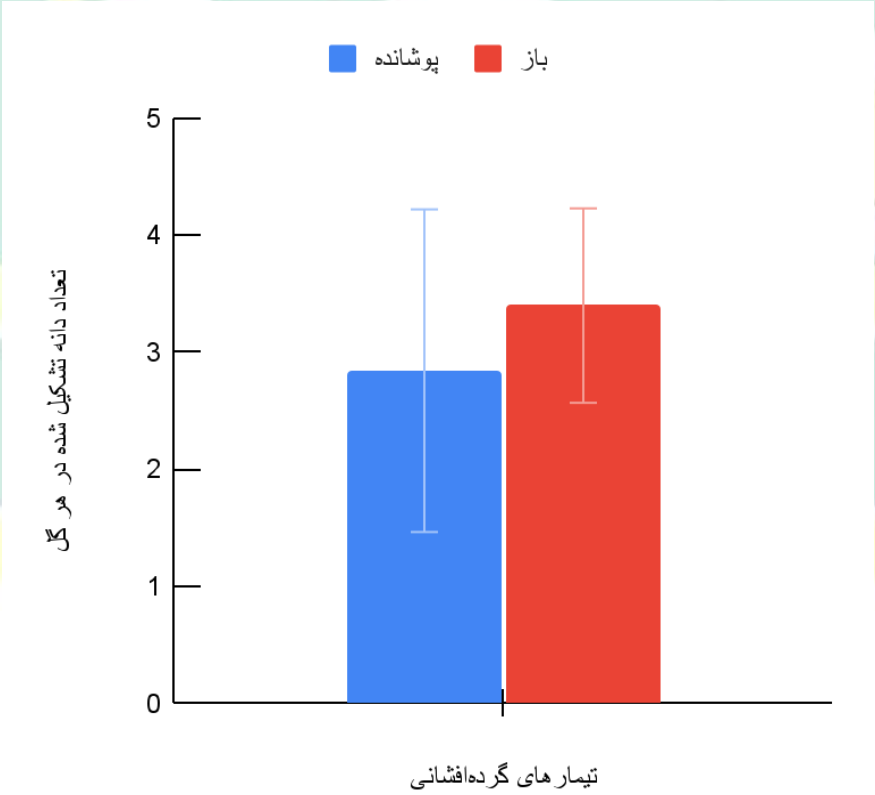
۲.مواد و روش‌ها

دو سایت متفاوت برای انجام آزمایشات میدانی انتخاب شد. سایت اول در محوطه فضای سبز دانشگاه گلستان، گرگان و سایت دوم در جاده شصت‌کلا، گرگان. گیاهان در سایت اول یک ماه زودتر از گیاهان سایت دوم وارد مرحله گلدهی می‌شوند. در هر یک از سایت‌ها ۱۵ نمونه گیاهی به صورت تصادفی انتخاب و برای انجام آزمایش مشخص شدند. دو ساقه‌ی گل‌دار بر روی هر گیاه انتخاب شدند. یکی از ساقه‌های گل‌دار توسط توری پوشانده شد تا مانع رسیدن گرده‌افشان‌ها به گل‌ها شود. ساقه‌ی گل‌دار دیگر تنها

نشانه‌گذاری شده و در شرایط طبیعی قرار داشت و حشرات بدون هیچ مانعی می‌توانستند از گل‌ها بازدید کرده و گرده‌افشانی کنند. پس از دو هفته، ساقه‌های گل‌دار مورد آزمایش جمع‌آوری و برای بررسی تولید دانه در گل‌هایی که در بازه زمانی دو هفته‌ای شکوفا شده بودند، به آزمایشگاه منتقل شدند. تعداد گل‌ها و دانه‌های تولید شده در هر یک شمرده و ثبت شد. داده‌ها در کاربرگ اکسل وارد شده و سپس با استفاده از آزمون t-test اختلاف میانگین تولید دانه در دو تیمار سنجیده شد.

۳.نتایج و بحث

در این مطالعه به بررسی ارتباط بین ساختار و اندازه گل در گیاه چشم‌گربه‌ای زرد با ملاقات‌کنندگان گل پرداختیم. آزمایشات مربوط به گرده‌افشانی در دو زیستگاه متفاوت انجام شد. نتایج اولیه نشان می‌دهد که این گیاهان خودسازگار بوده و می‌توانند بدون حضور گرده‌افشان نیز بذر تولید کنند (شکل ۱). آزمون t-test نشان داد که تفاوت معناداری بین دو تیمار باز و پوشانده در تولید دانه وجود ندارد ($t=0.07$, $n=240$). نتایج همچنین نشان می‌دهد گل هایی که توسط گرده‌افشان‌ها بازدید شدند، دانه‌های کامل‌تری تولید کردند و اغلب به صورت فندقه ۴ تایی بودند (۱۲۸ از ۲۱۷ گل)؛ ولی گل‌هایی که به وسیله توری پوشانده شده بودند، تعداد کمتری فندقه ۴ تایی تولید کردند (۹۸ گل از ۲۲۳ گل). حتی در بین آنها گل‌های بدون دانه هم وجود داشت (۲۶ گل). در حالیکه در گل‌های با گرده‌افشانی باز به ندرت گل بدون دانه دیده شد (۳ گل).



شکل ۱۳ : نرخ میانگین (± انحراف معیار) تولید دانه در هر گل در دو تیمار آزاد و پوشانده شده گرده‌افشانی در چشم‌گربه‌ای زرد.

۴.نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تولید دانه در گیاه چشم‌گربه‌ای زرد (*Nonea lutea*)، کاملا وابسته به عوامل گرده‌افشان نیست. ولی جلب حشرات گرده‌افشان توسط گل‌های زردرنگ و جذاب منجر به گرده‌افشانی کامل گل‌ها شده و دانه‌های بیشتری تولید می‌شود. در صورت حذف عوامل گرده‌افشان، گیاه از طریق خودلقاحی می‌تواند تجدید نسل کرده و با تولید بذر به حیات خود ادامه دهد. این نتایج با این فرضیه که تولید موفق دانه نیازی به گرده‌افشان ندارد، مطابقت دارد. هر چند برای تولید کامل دانه حضور گرده‌افشان‌ها لازم است (Boyd 2004).

در مرحله بعدی این مطالعه به بررسی کیفیت دانه‌های تولید شده از طریق خود لقاحی و مقایسه آنها با دانه‌های تولید شده در فرآیند دگرلقاحی می‌پردازیم. در بررسی کیفیت دانه‌ها این فرضیه‌ها را مورد آزمون قرار خواهیم داد: (۱) دانه‌های تولید شده از طریق دگرلقاحی قوه نامیه بهتری دارند. (۲) نرخ جوانه‌زنی دانه‌های تولید شده از طریق دگرلقاحی بیشتر است. (۳) نرخ بقای گیاهچه‌های تولید شده از دانه‌های حاصل از دگرلقاحی بیشتر است.

منابع

۱. امیدبیگی، ر. (۱۳۹۳) تولید و فرآوری گیاهان دارویی.
۲. خاتم ساز، م (۱۳۸۱) فلور ایران،جلد ۳۹، تیره گل‌گاوزبان. موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع
3. Barrett, S. C. H. and Harder, L. D. (2017) The Ecology of Mating and Its Evolutionary Consequences in Seed Plants. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 48.
4. Boyd, A. (2004) Breeding system of Macromeria viridiflora (Boraginaceae) and geographic variation in pollinator assemblages. American Journal of Botany. 91: 1809-1813
5. Cohen, J. I. (2011) A phylogenetic analysis of morphological and molecular characters of Lithospermum L. (Boraginaceae) and related taxa: evolutionary relationships and character evolution. Cladistics 27, 559–580.
6. Cohen, J. I. (2014) A phylogenetic analysis of morphological and molecular characters of Boraginaceae: Evolutionary relationships, taxonomy, and patterns of character evolution. Cladistics 30, .
7. Cohen, J. I., Litt, A. and Davis, J. I. (2012) Comparative floral development in Lithospermum (Boraginaceae) and implications for the evolution and development of heterostyly. Am. J. Bot. 99, 797–805.
8. Delle-Vedove, R., Schatz, B. and Dufay, M. (2017) Understanding intraspecific variation of floral scent in light of evolutionary ecology. Annals of Botany 120.
9. Knop, E. et al. (2017) Artificial light at night as a new threat to pollination. Nature 548.
10. Larson, B. M. H. & Barrett, S. C. H. (2000) A comparative analysis of pollen limitation in flowering plants. Biol. J. Linn. Soc. 69, 503–520.
11. Spigler, R. B. and Kalisz, S. (2017) Persistent pollinators and the evolution of complete selfing. Am. J. Bot. 104, 1783–1786.
12. Sun, M., Schlüter, P. M., Gross, K. & Schiestl, F. P. (2015) Floral isolation is the major reproductive barrier between a pair of rewarding orchid sister species. J. Evol. Biol. 28.
13. Yan, J., Wang, G., Sui, Y., Wang, M. and Zhang, L. (2016) Pollinator responses to floral colour change, nectar, and scent promote reproductive fitness in Quisqualis indica (Combretaceae). Sci. Rep. 6.
14. Zhou, W. et al. (2017) Phylogeographic insights on the evolutionary breakdown of heterostyly. New Phytol. 214.

Effect of biological fertilizer on growth of tomato seedlings cv. Termeh

Hadi Abbasian[1], Mehdi Zarei[2*], Seyed Javad Mousavizadeh[3], Kambiz Mashayekhi[4]

[1]M.Sc. Student, Department of Horticulture Science, Faculty of Plant Production, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Gorgan
[2]Assistant Professor, Department of Plant Production, Faculty of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gonbad Kavous University
[3]Assistant Professor, Department of Horticulture Science, Faculty of Plant Production, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Gorgan
[4]Associate Professor, Department of Horticulture Science, Faculty of Plant Production, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Gorgan

**Corresponding Author: mehdizarei@gonbad.ac.ir*

Abstract

In sustainable agriculture, bio-fertilizers are considered as a suitable alternative to chemical fertilizers and can improve the quantitative and qualitative yield of plants. The study was carried out in a randomized complete design with 6 treatments (Mycorrhiza, Trichomix, Humic acid, Amino acid, NPK and non-fertilizer) and 4 replications. The evaluated parameters were such as: total fresh and dry weight, fresh and dry weight of leaf, diameter and height of seedling, and leaf area. According to the results, fertilizer treatments were used in this study had a significant effect on all measured traits. The highest amount of total fresh and dry weight were observed for NPK treatment (0.47 and 0.057 g, respectively) while the lowest one in Trichomix treatment (0.28 and 0.041 g, respectively). The highest levels of fresh and dry weight of leaf were recorded NPK treatment (0.36 and 0.045 g, respectively) and the lowest one in Trichomix treatment (0.18 and 0.03 g, respectively). According to the comparison of the mean of the data, the highest amount of seedling height was observed for NPK treatment (54.12 mm) while the lowest one in Mycorrhiza treatment (42.20 mm). Also, the highest level of leaf are was recorded NPK treatment (5.62 cm^2) and the lowest one in non-fertilizer treatment (1.68 cm^2). According to data, biological fertilizer had the effect of positive and significant on the all measured traits.

Keywords: Amino acid, Biological, Plant, Properties, Mycorrhiza

تاثیر کودهای زیستی بر رشد نشاء گوجه‌فرنگی رقم ترمه

هادی عباسیان[۱]، مهدی زارعی[۲*]، سید جواد موسوی‌زاده[۳]، کامبیز مشایخی[۴]

۱- دانشجو کارشناسی‌ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- استادیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس
۳- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۳- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

*نویسنده مسئول: mehdizarei@gonbad.ac.ir

چکیده

در کشاورزی پایدار، کودهای زیستی به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای کودهای شیمیایی به شمار می‌آیند و می‌توانند باعث بهبود عملکرد کمی و کیفی گیاهان شوند. بدین منظور آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ تیمار کودی (مایکوریزا، تریکومیکس، اسیدهیومیک، اسیدآمینه، NPK و شاهد (بدون کود)) در ۴ تکرار انجام شد. صفات اندازه‌گیری شده شامل وزن‌تر و خشک کل اندام هوایی، وزن‌تر و خشک برگ، قطر نشاء، ارتفاع نشاء و سطح برگ بودند. براساس نتایج به‌دست آمده تیمارهای کودی استفاده شده بر همه صفات اندازه‌گیری شده اثر معنی‌داری داشتند. بیشترین وزن‌تر و خشک کل اندام هوایی مربوط به تیمار NPK (به ترتیب ۰/۴۷ و ۰/۰۵۷ گرم) و کمترین میزان آن‌ها مربوط به تیمار تریکومیکس (به ترتیب ۰/۲۸ و ۰/۰۴۱ گرم) بودند. بیشترین وزن‌تر و خشک برگ در تیمار NPK (به ترتیب ۰/۳۶ و ۰/۰۴۵ گرم) و کمترین مقدار در تیمار تریکومیکس (به ترتیب ۰/۱۸ و ۰/۰۳ گرم) مشاهد شد. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که، بیشترین قطر ساقه مربوط به تیمار اسیدهیومیک (۷/۷۵ میلی‌متر) و کمترین میزان آن مربوط به تیمار NPK (۵ میلی‌متر) می‌باشد. بیشترین ارتفاع نشاء در تیمار NPK (۵۴/۱۲ میلی‌متر) و کمترین مقدار آن در تیمار میکوریزا (۴۲/۲۰ میلی‌متر) مشاهد شد. همچنین بیشترین سطح برگ در تیمار NPK (۵/۶۲ سانتی‌مترمربع) و کمترین سطح برگ در تیمار شاهد (۱/۶۸ سانتی‌متر مربع) بدست آمد. مطابق با نتایج، کودهای زیستی اثرات مثبت و معنی‌داری بر تمامی صفات اندازه‌گیری شده داشتند.

واژگان کلیدی: اسیدآمینه، بیولوژیکی، گیاه، خصوصیات، مایکوریزا

۱. مقدمه

وابستگی بیش از حد به نهاده‌های شیمیایی در کشاورزی رایج، اصول کشاورزی پایدار را در معرض تهدید قرار داده است (نصیری محلاتی و همکاران، ۱۳۹۵) در این میان، مصرف دراز مدت و فراوان کودهای شیمیایی رایج، علاوه بر افزایش آلودگی و صدمات زیست‌محیطی می‌تواند عواقبی همچون بر هم خوردن تعادل اسیدیته، تجمع عناصر سنگین در خاک، کاهش حلالیت عناصر ریزمغذی و تخریب ساختمان خاک را در پی داشته باشد (Miao et al., 2011; Khan et al., 2018). در سال‌های اخیر، افزایش بی‌رویه مصرف کودها و مواد شیمیایی در تولید محصولات کشاورزی، سلامت خاک، آب، هوا و همچنین محصـــولات تولیدی را به خطر انداخته و نگرانی‌های روزافزونی را برای محیط زیست جهانی و سلامت بشـر به وجود آورده اسـت. در همین راسـتا، بحث کشـاورزی ارگانیک

و توسعه کشاورزی پایدار و بوم‌سازگار جهت مقابله با معضلات مذکور در سراسر جهان مطرح شده و اهمیت فزآینده‌ای یافته است (جوانمردی، ۱۳۸۹). در کشاورزی ارگانیک برای حاصلخیزی خاک و تأمین عناصر غذایی مورد نیاز گیاهان از نهاده‌های طبیعی همچون کودهای زیستی و آلی استفاده می‌گردد (Bruulsema et al., 2012).

کودهای زیستی توانایی تبدیل عناصر غذایی اصلی را از حالت غیرقابل دسترس به قابل دسترس در طی فرآیند بیولوژیکی دارا می‌باشند (Vessey, 2003; Rajendran and Devaraj, 2004)، و منجر به توسعه سیستم ریشه‌ای و جوانه‌زنی بهتر بذور می‌گردند (Chen, 2006). این کودها علاوه‌بر افزایش فراهمی زیستی عناصر خاک از طریق تثبیت زیستی نیتروژن، افزایش حلالیت فسفر و پتاسیم و مهار عوامل بیماری‌زا، با تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه باعث افزایش عملکرد گیاهان زراعی می‌شوند (Sturz and Christie, 2003). از این‌رو استفاده از کودهای زیستی (بیولوژیک) می‌تواند در بهبود استفاده از عناصر غذایی موجود در خاک و تحریک رشد گیاهی نقش مهمی داشته و جایگزین مناسبی برای افزایش تولید با کمترین آثار مخرب زیست محیطی باشد (Hermosa et al., 2012).

گوجه‌فرنگی با نام علمی Solanum lycopersicum L. یکی از گیاهان بسیار مهم از نظر اقتصادی و تغذیه‌ای می‌باشد که به‌طور وسیعی در جهان کشت می‌شود. گوجه‌فرنگی یکی از سبزی‌هایی است که هم می‌تواند به‌صورت مستقیم و هم به‌صورت نشاکاری کشت گردد. علی‌رغم سخت‌تر و پرهزینه‌تر بودن کشت از طریق نشاء، با توجه به اینکه این گیاه نسبت به نشاکاری عکس‌العمل مثبت نشان می‌دهد یکی از معروف‌ترین گیاهان نشایی است. لذا تولید نشاء باکیفیت بالا، نقش عمده‌ای در تولید این محصول ایفا می‌کند (Adigun et al., 2018; Asgedom et al., 2011). گوجه‌فرنگی به خاک حاصلخیز و عناصر غذایی مناسب و متعادل نیاز فراوان دارد. از این‌رو در تأمین نیازهای غذایی این گیاه، استفاده از کودهای آلی و کود دامی و همچنین کودهای زیستی نقش مهمی در کاهش استفاده از مواد شیمیایی و تولید ارگانیک این محصول خواهد داشت (Wang et al., 2011).

کشت و تولید گوجه‌فرنگی به‌دلیل افزایش تقاضا برای فرآورده‌های متعدد آن رو به افزایش است که این امر باعث تداوم مصرف کودهای شیمیایی در تولید این محصول می‌گردد. استفاده بی‌رویه از کودهای شیمیایی به‌واسطه برجای ماندن در طبیعت باعث آلودگی منابع آب و خاک شده و از این طریق منجر به صدمات زیست محیطی و مشکلات سلامت و بهداشت از جمله سرطان و متهموگلوبینمیا در انسان می‌شوند ضمن این که هزینه تولید آن‌ها نیز بسیار بالاست (Ghorbani, 2006). استفاده از منابع بیولوژیک به‌جای منابع شیمیایی، نقش مهمی در باروری و حفظ فعالیت‌های بیولوژیک خاک، افزایش کیفیت محصولات کشاورزی و سلامت اکوسیستم دارد (Zaied et al., 2003). از طرف دیگر مصرف کودهای زیستی کم هزینه‌تر بوده و موجب مسمومیت یا آلودگی اکوسیستم زراعی نمی‌شوند (Boghdady et al., 2012). بنابراین هدف از این تحقیق بررسی اثر کاربرد مایکوریزا بر صفات رشدی نشاء گوجه‌فرنگی رقم ترمه می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

این آزمایش در گلخانه و آزمایشگاه گروه علوم باغبانی واقع در پردیس دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. ابتدا در هر سینی نشاء ۵۰ عدد بذر گوجه فرنگی رقم (ترمه) کشت، و بستر بذرها با پرلیت و کوکوپیت پوشیده شد. تیمارها شامل گروه‌های کود بیولوژیک: ۱- مایکوریزا دو گرم در یک لیتر آب (نحوه مصرف ریشه) ۲- تریکومیکس یک گرم در یک لیتر آب (نحوه مصرف ریشه) ۳- اسید هیومیک یک گرم در یک لیتر آب (نحوه مصرف ریشه و برگ) ۴- اسید آمینه یک گرم در یک لیتر آب (نحوه مصرف برگی) ۵- NPK یک گرم در یک لیتر آب (نحوه مصرف برگی) ۶- شاهد بدون استفاده از کود بود. زمان کاشت بذر یک اردیبهشت ۱۳۹۹، تاریخ سبز شدن ۱۰ اردیبهشت ۱۳۹۹ زمان محلول‌پاشی بعد از ظهور اولین برگ حقیقی ۳۱ اردیبهشت ۱۳۹۹

در پنج مرحله و در فاصله زمانی یک هفته صورت گرفت. در مرحله اول از همه کودها استفاده شد ولی در مراحل بعدی فقط از اسید آمینه، اسید هیومیک، NPK استفاده شد. داده‌برداری در زمان سومین برگ حقیقی انجام شد.

وزن‌تر و وزن خشک اندام هوایی، وزن‌تر و خشک برگ، قطر نشاء در نزدیکی سطح محیط کاشت، ارتفاع نشاء و سطح برگ اندازه‌گیری شدند. اندازه‌گیری وزن‌تر و خشک اندام هوایی و برگ با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱، قطر نشاء با کولیس دیجیتالی و ارتفاع نشاء با خط‌کش انجام گرفت. اندازه‌گیری سطح برگ با نرم‌افزار انجام گرفت. آزمایش بر پایه طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار همراه با ۱۰ مشاهده انجام شد. داده‌های به‌دست آمده به‌وسیله نرم افزار SAS (نسخه ۹/۱) آنالیز و مقایسه‌ی میانگین‌ها نیز با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت.

۳. نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که، تیمارهای کودی استفاده شده بر صفات وزن تر و خشک کل اندام هوایی، و وزن تر و خشک برگ اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد را داشتند (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بین تیمارهای مورد آزمایش از نظر وزن تر کل اندام هوایی اختلاف معنی‌داری وجود دارد به طوری که بیشترین وزن تر کل اندام هوایی مربوط به تیمار NPK (۰/۴۷ گرم) و کمترین میزان آن مربوط به تیمار تریکومیکس (۰/۲۸ گرم) می‌باشد (جدول ۲). از نظر وزن خشک کل اندام هوایی بیشترین مقدار در تیمار NPK (۰/۰۵۷ گرم) و کمترین مقدار آن در تیمار تریکویکس (۰/۰۴۱ گرم) مشاهده شد (جدول ۲). براساس نتایج به‌دست آمده بیشترین میزان وزن تر و خشک برگ در تیمار کودی NPK (به ترتیب با ۰/۳۶ و ۰/۰۴۵ گرم) بدست آمد (جدول ۲). همچنین کمترین مقدار وزن تر و خشک برگ در تیمار تریکومیکس (به ترتیب با ۰/۱۸ و ۰/۰۳ گرم) مشاهد شد (جدول ۲).

جدول ۱: تجزیه واریانس تأثیر کودهای زیستی مختلف بر صفات رشدی نشاء گوجه فرنگی رقم ترمه

منبع تغییرات	درجه آزادی	وزن تر کل اندام هوایی	وزن خشک کل اندام هوایی	وزن تر برگ	وزن خشک برگ
تیمار (نوع کود)	۵	۰/۰۳**	۰/۰۰۰۲**	۰/۰۲۵ **	۰/۰۰۰۱**
خطا	۱۸	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۰۴	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۰۴
ضریب تغییرات (درصد)		۱۰/۵	۱۲/۸	۱۲/۹۶	۱۶/۳۹

ns، * و **: به‌ترتیب عدم وجود اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد.

جدول ۲: مقایسه میانگین تأثیر کودهای زیستی مختلف بر صفات رشدی نشاء گوجه فرنگی رقم ترمه

تیمارها (نوع کود)	وزن تر کل اندام هوایی (گرم)	وزن خشک کل اندام هوایی (گرم)	وزن تر برگ (گرم)	وزن خشک برگ (گرم)
شاهد	۰/۳۸ b	۰/۰۵۱ a	۰/۲۷ b	۰/۰۴ab
NPK	۰/۴۷ a	۰/۰۵۷ a	۰/۳۶ a	۰/۰۴۵ a
اسید هیومیک	۰/۳۵ bc	۰/۰۵۲ a	۰/۲۴ b	۰/۰۳۸ abc
اسید آمینه	۰/۳۴ bc	۰/۰۵۳ a	۰/۲۶ b	۰/۰۳۶ bc
میکوریزا	۰/۳۴ c	۰/۰۵۵ a	۰/۲۵ b	۰/۰۴ ab
تریکومیکس	۰/۲۸ d	۰/۰۴۱ b	۰/۱۸ c	۰/۰۳ c

میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حداقل حرف مشترک می‌باشند، براساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

مطابق با نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها، تیمارهای کودی مورد آزمایش بر قطر نشاء، ارتفاع نشاء و سطح برگ اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد نشان دادند (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که، بیشترین قطر ساقه مربوط به تیمار اسید هیومیک (۷/۷۵ میلی‌متر) و کمترین میزان آن مربوط به تیمار NPK (۵ میلی‌متر) می‌باشد (جدول ۴). از نظر ارتفاع نشاء بیشترین مقدار در تیمار NPK (۵۴/۱۲ میلی‌متر) و کمترین مقدار آن در تیمار میکوریزا (۴۲/۲۰ میلی‌متر) مشاهد شد (جدول ۴). براساس نتایج به‌دست آمده بیشترین سطح برگ در تیمار کودی NPK (۵/۶۲ سانتی‌مترمربع) و کمترین سطح برگ در تیمار شاهد (۱/۶۸ سانتی‌متر مربع) بدست آمد (جدول ۴).

جدول ۳: تجزیه واریانس تأثیر کودهای زیستی مختلف بر صفات رشدی نشاء گوجه فرنگی رقم ترمه

منبع تغییرات	درجه آزادی	قطر طوقه	ارتفاع نشاء	سطح برگ
تیمار (نوع کود)	۵	۸/۰۲**	۱۴۲/۸**	۱۵/۲**
خطا	۱۸	۰/۷۸	۲۵/۱	۰/۱۸
ضریب تغییرات		۱۳/۳	۱۰/۶	۱۴/۷

ns، * و **: به‌ترتیب عدم وجود اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد.

جدول ۴: مقایسه میانگین تأثیر کودهای زیستی مختلف بر صفات رشدی نشاء گوجه فرنگی رقم ترمه

تیمارها (نوع کود)	قطر طوقه (میلی‌متر)	ارتفاع نشا (میلی‌متر)	سطح برگ (سانتی‌مترمربع)
شاهد	۷/۵ a	۴۶/۶ bc	۱/۶۸ d
NPK	۵ c	۵۴/۱۲ a	۵/۶۲ a
اسید هیومیک	۷/۷۵ a	۴۹/۶ ab	۲/۲۵ c
اسید آمینه	۶/۳۷ b	۴۲/۸ cd	۲/۴۳ bc
میکوریزا	۶/۲۵ b	۴۲/۲ bc	۲/۸۷ b
تریکومیکس	۷ ab	۴۳/۶ c	۲/۷۵ b

میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حداقل حرف مشترک می‌باشند، براساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

فیض‌آبادی و همکاران (۱۳۸۹) در آزمایشی به بررسی تأثیر سطوح مختلف ورمی‌کمپوست و تغذیه نیتروژن بر شاخص‌های رشدی نشاء گوجه‌فرنگی رقم Rio Grande پرداختند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که با مصرف ورمی‌کمپوست، وزن تر و خشک اندام هوایی، طول ساقه و سطح برگ گیاه نیز افزایش یافته است. تالار پشتی و همکاران (۱۳۹۵) گزارش نمودند که کودهای آلی باعث بهبود و افزایش صفات رشدی، عملکرد و اجزای عملکرد گوجه‌فرنگی می‌شوند. در بررسی اثرات کودهای زیستی بر عملکرد و اجزای عملکرد گیاه گوجه فرنگی در یک خاک آلوده به کادمیوم مشخص شده است که کاربرد کودهای زیستی باعث بهبود و افزایش صفات رشدی گیاه می‌شوند (نعمتی و همکاران، ۱۳۹۴). حقیقی و نجفی (۱۳۹۸) اظهار داشتند که کابرد اسیدهیومیک باعث کاهش اثرات منفی تنش خشکی در گیاه گوجه فرنگی می‌شود.

۴. نتیجه‌گیری

به‌طورکلی می‌توان در مورد تیمارهای کودی چنین نتیجه گرفت که کودهای زیستی اسید هیومیک، اسید آمینه، میکوریزا و تریکومیکس هم به سبب فراهمی نیتروژن از رشد گیاه در اوایل فصل رشد حمایت می‌کنند و هم از اثرات مثبت همزیستی در جذب بهتر عناصر غذایی و گسترش سیستم ریشه‌ای نشاء را بهره‌مند می‌کند.

منابع

۴- تالار پشتی. ر، رستمی. م. ۱۳۹۵. تاثیر کودهای آلی و شیمیایی بر ویژگی‌های رشدی عملکرد و اجزای عملکرد گوجه فرنگی. نشریه پژوهش‌های زراعی ایران، ۱۴(۴): ۶۸۵-۶۷۵.

۵- جوانمردی، ج. ۱۳۸۹. کشت ارگانیک سبزیها. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۳۴۹ صفحه.

۶- حقیقی. م، نجفی. ح. ۱۳۹۸. اثر اسید هیومیک بر کاهش تنش خشکی در گیاه گوجه فرنگی ۱۳۹۸. فصلنامه علمی- پژوهشی علوم سبزی ها، ۳(۶): ۱۵۸-۱۴۷.

۷- فیض‌آبادی. م، قهرمانی. ز، برزگر. ط و گلچین. ا. ۱۳۸۹ تاثیر سطوح مختلف ورمی کمپوست و تغذیه نیتروژن بر شاخص های رشدی نشای گوجه فرنگی رقم Rio Grande. ۲(۳): ۹۶-۸۹.

۸- نصیری محلاتی، م.، کوچکی، ع.، رضوانی، پ. و بهشتی، ع. ۱۳۹۵. اگرواکولوژی ترجمه. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۴۶۰ صفحه.

۹- نعمتی. ا، گلچین. ا و بشارتی. ح. ۱۳۹۴. بررسی اثرات کودهای زیستی بر عملکرد و اجزای عملکرد گیاه گوجه فرنگی در یک خاک آلوده به کادمیوم نشریه پژوهش های خاک (علوم خاک و آب)، ۲(۱): ۱۲۰-۱۱۵.

10- Adigun J.A., Daramola O.S., Adeyemi O.R., Olorunmaiye P.M. and Osipitan O.A. 2018. Nitrogen and weed management in transplanted tomato in the Nigerian forest-savanna transition zone. Annals of Agrarian Science, 16(3): 281-285.

11- Asgedom S., Struik P.C., Heuvelink E. and Araia W. 2011. Opportunities and constraints of tomato production in Eritrea. African Journal of Agricultural Research, 6(4): 956-967.

12- Boghdady Rania M.S., Nassar M.A. and Ahmed F.A. 2012. Response of sesame plant (*Sesamum orientale* L.) to treatments with mineral and bio-fertilizers. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 8(2): 127-137.

13- Bruulsema T.W., Heffer P., Welch R.M., Cakmak I. and Moran K. 2012. Fertilizing crops to improve human health: a scientific review. International Plant Nutrition Institute, 3: 119p.

14- Chen, J. 2006. The combined use of chemical and organic fertilizers and/or biofertilizer for crop growth and soil fertility. International Workshop on Sustained Management of the Soil-rhizosphere System for Efficient Crop Production and Fertilizer Use, Bangkok, Thailand, Pp: 16-20.

15- Ghorbani H. 2006. A review of biofertilizers in Iran and their role in keeping the community. Proceeding of the 2th national conference of Ecological Agriculture in Iran (Gorgan), 17-18 October. 2004. (In Persian with English abstract).

16- Hermosa R., Viterbo, A., Chet I. and Monte E. 2012. Plant-beneficial effects of trichoderma and of its genes. Microbiology, 158: 17-25.

17- Khan M.N., Mobin M., Abbas Z.K. and Alamri S.A. 2018. Fertilizers and their contaminants in soils, surface and groundwater. Encyclopedia of Anthropocene, 5: 225-240.

18- Miao Y., Stewart B.A. and Zhang F. 2011. Long-term experiments for sustainable nutrient management in China-A review. Agronomy for Sustainable Development, 31: 397-414.

19- Rajendran K. and Devaraj P. 2004. Biomass and nutrient distribution and their return of *Casuarina equisetifolia* inoculated with biofertilizers in farm land. Biomass and Bioenergy, 26: 235-249.

20- Sturz A.V., and Christie B.R. 2003. Beneficial microbial allelopathies in the root zone: The management of soil quality and plant disease with rhizobactria. Soil and Tillage Research, 72: 107-123.

21- Vessey J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil, 255: 571-586.

22- Wang F., Kang S.Z., Du T.S., Li, F.S. and Qiu R.J. 2011 Determinationof comprehensive quality index for tomato and its response to different irrigation treatments. Agriculture Water Manage. doi:10.1016/j.agwat.2011.03.004.
23- Zaied K.A., Abd El -Hady A.H., Afify Aida H. and Nassef M.A. 2003. Yield and nitrogen assimilation of winter wheat inoculated with new recombinant inoculants of rhizobacteria. Pakistan Journal of Biological Sciences, 6(4): 344-358.

Evaluation of hydrolysis degree of hydrolyzed protein of Sargasom brown algae (Sargassum angustifoliom) at different times of hydrolysis

Saba zare[1]; Sakineh yeganeh[2*]; Mina esmaeili khariki[3]

1- Master student of fishery processing in Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources
2- Department of Fisheries, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources

*skyeganeh@gamil.com; s.yeganeh@sanru.ac.ir

Abstract

Given the growing need for protein resources in communities, the search for new and renewable sources is crucial. The use of algae has been common in Asian countries for a long time and now we are witnessing an increase in people's desire to use such resources in Western countries. Algae are one of the main producers of organic matter in the aquatic ecosystem. These prokaryotic or eukaryotic phototrophic organisms have the ability to live in a variety of environments, including the sea, rivers, soil, and even the surface, which are at the base of the food chain and play an important role in the fertility of the seas and oceans. Due to the fact that algae are relatively well distributed in the coasts of Iran, it is recommended to use them as much as possible for research projects. In this study, the degree of hydrolysis of the hydrolyzed protein of Sargassum brown algae (*Sargassum angustifoliom*) in 15 minutes, 2, 4, 6 and 8 hours by alkalase enzyme was investigated. Enzyme type and test conditions are factors affecting the degree of hydrolysis. The length of the resulting peptide chain depends on the degree of hydrolysis and the higher the degree of hydrolysis, the shorter the chain length will be. As the hydrolysis time increases, the degree of hydrolysis increases, but its intensity and rate decrease. According to the obtained results, the highest degree of hydrolysis was 69.06% in the eighth hour and the lowest level was 29.95% in the fifteenth minute. The results show that the hydrolyzed protein of sargassum brown algae can be hydrolyzed by alkalase enzyme and its functionality in food formulation can be determined by examining its functional properties.

Keywords: Hydrolyzed protein, Sargasom, Algae, Degree of hydrolysis

بررسی درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده جلبک قهوه‌ای سارگاسوم (*sargassum angustifoliom*) در زمان های مختلف هیدرولیز

سبا زارع[۱]، سکینه یگانه*[۲]، مینا اسمعیلی خاریکی[۲]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد رشته فرآوری محصولات شیلاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲. گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

skyeganeh@gamil.com; s.yeganeh@sanru.ac.ir

چکیده

با توجه به نیاز روز افزون جوامع به منابع پروتئینی جستجو برای یافتن منابع جدید و تجدید شدنی بسیار حیاتی و حائز اهمیت می‌باشد. استفاده از جلبک‌ها در کشورهای آسیایی از دیرباز مرسوم بوده و اکنون در کشورهای غربی نیز شاهد افزایش میل مردم به استفاده از چنین منابعی هستیم. جلبک‌ها از تولیدکنندگان اصلی مواد آلی در اکوسیستم آبی به شمار می‌روند. این موجودات فتواتروفی پروکاریوتی و یا یوکاریوت توانایی زندگی در محیط‌های مختلف اعم از دریا، رودخانه‌ها، خاک و حتی سطح زمین را دارند که در پایه زنجیره غذایی قرار گرفته اند و نقش به سزایی در حاصلخیزی دریاها و اقیانوس‌ها دارند. باتوجه به اینکه جلبک‌ها در سواحل ایران از پراکنش نسبتا خوبی برخوردارند استفاده هرچه بیشتر از آن‌ها جهت انجام طرح های تحقیقاتی توصیه می‌شود. در این پژوهش به بررسی درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده جلبک قهوه ای سارگاسوم (Sargassum angustifoliom) در زمان‌های ۱۵ دقیقه، ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت، توسط آنزیم آلکالاز پرداخته شد. نوع آنزیم و شرایط آزمایش از عوامل تأثیرگذار بر درجه هیدرولیز هستند. طول زنجیره پپتیدی حاصل به درجه هیدرولیز وابسته بوده و هر چه درجه هیدرولیز بیشتر باشد از طول زنجیره کاسته خواهد شد. با افزایش زمان هیدرولیز درجه هیدرولیز افزایش، اما شدت و نرخ آن کاهش می‌یابد. بر اساس نتایج به‌دست آمده بیش‌ترین میزان درجه هیدرولیز ۶۹/۰۶ درصد در ساعت هشتم و کمترین میزان آن ۲۹/۹۵ در دقیقه پانزدهم مشاهده شد. نتایج نشان می‌دهد پروتئین هیدرولیز شده جلبک قهوه‌ای سارگاسوم می‌تواند توسط آنزیم آلکالاز هیدرولیز شده و با بررسی خواص عملکردی آن، قابلیت استفاده از در فرمولاسیون مواد غذایی تعیین گردد.

واژگان کلیدی: پروتئین هیدرولیز شده، سارگاسوم، جلبک، درجه هیدرولیز

۱.مقدمه

امروزه با توجه به افزایش جمعیت و کاهش منابع تولید پروتئین، یک نیاز اجتناب‌ناپذیر برای یافتن منابع جدید و غنی از پروتئین وجود دارد که پاسخگوی نیاز مصرف‌کنندگان و تقاضای جهانی پروتئین برای زمان حال و آینده باشد. همچنین نگرانی‌های روزافزون

به‌دلیل مقادیر بسیار زیاد چربی‌های اشباع و کلسترول موجود در غذاهای با پایه‌ی جانوری که موجب بیماری‌های قلبی عروقی و دیابت می‌شوند، سبب افزایش علاقه‌مندی به استفاده از منابع پروتئینی با منشاء گیاهی و جلبکی شده است (FAO, 2019). علف‌های دریایی و جلبک‌ها از منابع مناسب پروتئینی به شمار می‌روند. پروتئین موجود در بعضی از ریزجلبک‌ها و گیاهان دریایی مشابه پروتئین تخم مرغ، گوشت، دانه سویا و شیر می‌باشد (Bleaky et al., 2017). استفاده از جلبک‌های دریایی در کشورهای آسیایی مرسوم بوده و همچنین میزان مصرف آن در کشورهای غربی رو به افزایش می‌باشد (Muray et al., 2018). به طور میانگین سالانه ۸ میلیون تن جلبک دریایی در سراسر دنیا جمع آوری می‌شود که بیشتر آن‌ها از ساحل جمع‌آوری می‌شوند (McHugh, 2003). جلبک‌های دریایی در سواحل جنوبی ایران (پسابندر تا انتهای استان بوشهر) وجود دارند که شامل هر سه گروه جلبک‌ها از جمله سبز، قرمز و قهوه‌ای می‌باشد (حافظیه و همکاران، ۱۳۹۵). جلبک سارگاسوم یکی از بزرگ‌ترین اعضای خانواده جلبک‌های قهوه‌ای است که دارای خاصیت بالای آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (سیدالنگی و همکاران، ۱۳۹۵) و در سواحل ایران پراکنش خوبی دارد. از این رو می‌توان با انجام فرآیند هیدرولیز از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موجود در این جلبک‌ها برای مصارف دارویی، صنایع غذایی و آرایشی استفاده کرد. خلیج فارس که در عرض‌های پایین جغرافیایی قرار دارد، دارای گونه‌های جلبکی متفاوتی می‌باشد که در این میان خانواده سارگاسوم‌ها که جزو رده جلبک‌های قهوه‌ای هستند و شامل بیش از ۴۰۰ گونه می‌باشند، به چشم می‌خورد (باباخانی و همکاران، ۱۳۹۱). هیدرولیز پروتئین جلبک در واقع فرآیندی برای تولید محصولی با ارزش افزوده است (Zhang et al., 2019). هدف از هیدرولیز پروتئین، شکستن باندهای پپتیدی و تشکیل پپتیدهای با وزن مولکولی متفاوت می‌باشد. عوامل مختلفی از جمله دما، زمان، شرایط واکنش و مواد افزودنی بر روی هیدرولیز تأثیرگذار هستند. هیدرولیز می‌تواند به‌صورت شیمیایی که شامل واکنش‌های اسیدی و قلیایی می‌باشد، انجام شود یا به صورت بیولوژیکی و توسط آنزیم‌ها صورت گیرد (Fountoulakis et al., 1998). مهم‌ترین معیار برای سنجش میزان پروتئین هیدرولیز شده، درجه هیدرولیز می‌باشد. با توجه به مطالب بیان شده، در تحقیق حاضر، پروتئین جلبک سارگاسوم (Sargassum angustifoliom) با آنزیم آلکالاز در زمان‌های مختلف هیدرولیز شده و درجه هیدرولیز آن مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

۲.مواد و روش ها

عملیات نمونه‌برداری در مهر سال ۱۳۹۹ از سواحل منطقه چابهار انجام شد. جلبک‌های به ساحل ریخته شده پس از شناسایی (بر اساس شکل و ظاهر) و جمع‌آوری از منطقه‌ی چابهار، با استفاده از آب شیرین شسته شده تا از جانداران اپیفیت و شن و ماسه پاکسازی گردد. بعد از شستشو و گرفتن آب اضافه جلبک‌ها درون جعبه یونولیتی حاوی یخ نگهداری و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. در آزمایشگاه نیز جلبک‌ها دوباره با استفاده از آب مقطر و به‌منظور خارج شدن املاح در سه مرحله و هر مرحله به‌مدت یک ساعت غوطه وری در آب مقطر شست و شو و با استفاده از خشک‌کن انجمادی خشک شدند. پس از خشک شدن کامل جلبک‌ها توسط آسیاب برقی پودر گردیدند (Siangu et al., 2019). پودر جلبک خشک شده از فیلتر با اندازه چشمه ۴۰ میلی‌متر عبور داده شد و در هر ۴۰۰ میلی‌لیتر محلول فسفات بافر (۰/۰۵ مولار و اسیدیته ۰/۵ ± ۸/۲)، ۲۰ گرم پودر جلبک اضافه گردید و به‌مدت یک شب در دمای محیط نگهداری و حل گردید، پس از آن محلول به‌دست آمده به مدت ۶ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شده و سپس در دمای اتاق یخ‌زدایی گردید، عمل انجماد-یخ زدایی برای ۶ بار تکرار گردید، سپس با شدت ۴۵۰ وات، برای ۲۰ دقیقه و هر بار به‌مدت ۶ ثانیه با فاصله زمانی در هر تکرار، ۹ ثانیه در حمام یخ اولتراسوند گردید. در آخر محلول حاصل از اولتراسوند در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، به‌مدت ۳۰ دقیقه با دور ۷۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد (Mao et al., 2017).

به‌منظور تولید پروتئین هیدرولیز از روش Kang و همکاران، (۲۰۱۱) استفاده شد، بر اساس این روش پروتئین استخراج شده در محلول بافر ۱ میلی‌مولار حل گردید، به این منظور ۵۰ گرم از نمونه‌ها به همراه ۱۰۰ میلی‌لیتر فسفات بافر یک میلی‌مولار (با نسبت ۲:۱) در ظرف ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته سپس نمونه‌ها در شیکر انکوباتور در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از اینکه دمای نمونه‌ها به ۵۰ درجه سانتی‌گراد رسید و درجه حرارت انکوباتور عددی ثابت را نشان داد آنزیم آلکالاز (شرکت نووزایم) (با غلظت یک درصد بر اساس میزان پروتئین موجود در بیوماس،pH ۸/۲) به ظرف نمونه‌ها اضافه شد. سپس نمونه‌گیری در زمان‌های ۱۵دقیقه، ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت انجام گردید (پارسازاده و همکاران، ۱۳۹۷). پس از انجام هیدرولیز، فعالیت آنزیم‌ها با قرار دادن ظروف حاوی نمونه در حمام آبی با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه متوقف گردید. پروتئین هیدرولیز شده به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور g × ۱۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی با خشک‌کن انجمادی خشک گردید و در دمای ۲۰- سانتی‌گراد برای استفاده‌های بعدی نگهداری شد. محتوی پروتئین محلول در هیدرولیزات آنزیمی نیز بر اساس روش لوری سنجش شد (Lowry et al., 1951).

درجه هیدرولیز بر اساس روش Hoyle و Merritt (۱۹۹۴) سنجش شد. به این منظور بعد از اتمام فرآیند هیدرولیز ۵۰۰ میکرولیتر از پروتئین آبکافت شده با ۵۰۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید ۲۰ درصد مخلوط شده و محلول حاصل با دور g × ۸۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. طی این عمل پروتئین‌های شکسته شده از پروتئین‌های سالم جدا شدند. مقدار پروتئین در فاز محلول به روش لوری تعیین و درجه هیدرولیز نیز با معادله زیر محاسبه گردید.

درجه هیدرولیز (درصد) = (میزان نیتروژن در محلول ۱۰ درصد تری کلرواستیک اسید/ میزان نیتروژن در نمونه) × ۱۰۰

۳.نتایج و بحث

برای اندازه‌گیری درجه هیدرولیز به میزان شکسته شدن پیوندهای پپتیدی پس از عملکرد آنزیم توجه می‌شود. از جمله عوامل موثر در افزایش درجه هیدرولیز می‌توان به افزایش دما، میزان آنزیم و مدت زمان هیدرولیز اشاره کرد (Fountoulakis et al., 1998). نوع آنزیم و شرایط آزمایش از عوامل تأثیرگذار بر درجه هیدرولیز است. طول زنجیره پپتیدی حاصل به درجه هیدرولیز وابسته است و هر چه درجه هیدرولیز بیشتر باشد طول زنجیره کمتر خواهد بود. یکی دیگر از موارد مهم در هیدرولیز بازیافت پروتئین می‌باشد که به معنای نسبت پروتئین هیدرولیز شده به پروتئین موجود در سوبسترا می‌باشد و رابطه‌ی مستقیمی با میزان قدرت آنزیم مورد استفاده دارد و با افزایش آن، درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد (ریحانی پول و همکاران، ۱۳۹۵). با افزایش زمان هیدرولیز درجه هیدرولیز افزایش، اما شدت و نرخ آن رو به کاهش می‌رود، زیرا با افزایش زمان هیدرولیز تعداد پیوندهای پپتیدی که در دسترس آنزیم قرار دارند و همچنین میزان فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد (ریحانی پول و جعفرپور، ۱۳۹۵). افزایش مقدار آنزیم منجر به شکستن بیشتر پیوندهای پپتیدی می‌شود. همچنین افزایش دما در افزایش درجه هیدرولیز با افزایش سرعت شکستن پیوندهای پپتیدی موثر است (رودباری و همکاران، ۱۳۸۹).

نتایج مربوط به درجه هیدرولیز پروتئین جلبک قهوه‌ای سارگاسوم در جدول زیر آورده شده است. بر اساس نتایج حاصل، با افزایش زمان هیدرولیز، درجه هیدرولیز به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$)، به طوری که کمترین درجه هیدرولیز ۱/۶۲ ± ۲۹/۹۵ درصد مربوط به جلبک هیدرولیز شده در زمان ۱۵ دقیقه و بیشترین آن ۰/۷۹ ± ۶۹/۰۹ درصد مربوط به ساعت ۸ می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

جدول۱: درجه هیدرولیز پروتئین جلبک قهوه‌ای سارگاسوم با آنزیم آلکالاز در زمان‌های مختلف هیدرولیز

زمان هیدرولیز (ساعت)	(۱۵ دقیقه)	۲	۴	۶	۸
درجه هیدرولیز (درصد)	۲۹/۹۵ ± ۱/۶۲[e]	۴۹/۹۶ ± ۰/۷۹[d]	۶۱/۰۲ ± ۰/۸۰[c]	۶۶/۲۳ ± ۱/۰۰[b]	۶۹/۰۹ ± ۰/۷۹[a]

حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است.

برای اندازه‌گیری درجه هیدرولیز به میزان شکسته شدن پیوندهای پپتیدی پس از عملکرد آنزیم توجه می‌شود. از جمله عوامل موثر در افزایش درجه هیدرولیز می‌توان به افزایش دما، میزان آنزیم و مدت زمان هیدرولیز اشاره کرد (Fountoulakis et al., **1998**). نوع آنزیم و شرایط آزمایش از عوامل تأثیرگذار بر درجه هیدرولیز است. طول زنجیره پپتیدی حاصل به درجه هیدرولیز وابسته است و هر چه درجه هیدرولیز بیشتر باشد طول زنجیره کمتر خواهد بود. یکی دیگر از موارد مهم در هیدرولیز بازیافت پروتئین می‌باشد که به معنای نسبت پروتئین هیدرولیز شده به پروتئین موجود در سوبسترا می‌باشد و رابطه‌ی مستقیمی با میزان قدرت آنزیم مورد استفاده دارد و با افزایش آن، درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد (ریحانی پول و همکاران، ۱۳۹۵). با افزایش زمان هیدرولیز درجه هیدرولیز افزایش، اما شدت و نرخ آن رو به کاهش می‌رود، زیرا با افزایش زمان هیدرولیز تعداد پیوندهای پپتیدی که در دسترس آنزیم قرار دارند و همچنین میزان فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد (ریحانی پول و جعفرپور، ۱۳۹۵). در پژوهش انجام شده توسط اسمعیلی و همکاران (۱۳۹۶) درجه هیدرولیز سر ماهی هوور مسقطی با آنزیم آلکالاز ۱/۳۲±۱۶/۵۵ درصد و در پایان چهار ساعت ۰/۱۱±۴۷/۷۸ درصد گزارش گردید. روند افزایش اولیه سرعت هیدرولیز و در نهایت روند کند مشاهده شده در ساعات پایانی، در این پژوهش نیز مشاهده شده و نویسندگان بیان نمودند که سازوکار واکنش آهسته در مراحل پایانی ممکن است به دلیل کاهش در فعالیت آنزیم، اشباع شدن سوبسترا و یا بازدارندگی محصول باشد. همچنین بیان نمودند که کاهش در سرعت افزایش درجه هیدرولیز می‌تواند به دلیل کاهش درغلظت ماده اولیه نیز باشد (اسمعیلی و همکاران، ۱۳۹۶). افزایش مقدار آنزیم منجر به شکستن بیشتر پیوندهای پپتیدی می‌شود. همچنین افزایش دما در افزایش درجه هیدرولیز با افزایش سرعت شکستن پیوندهای پپتیدی موثر است (رودباری و همکاران، ۱۳۸۹). درجه هیدرولیز بر تمام خواص عملکردی پروتئین هیدرولیز شده تاثیر خواهد داشت. حسینی و همکاران (۱۳۹۱) گزارش نمودند که با افزایش زمان هیدرولیز، درجه هیدرولیز برای پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء و سر ماهی فیتوفاگ توسط آنزیم آلکالاز و آنزیم‌های داخلی افزایش پیدا می‌کند، اما از شدت و نرخ هیدرولیز کاسته می‌شود. بیشترین میزان هیدرولیز را در ۱۲۰ دقیقه اول گزارش نمودند. براساس گزارش رمضانی و همکاران (۱۳۹۷) با افزایش زمان هیدرولیز درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده ماهی پنجزاری باله نارنجی نیز افزایش می‌یابد. در مطالعه حاضر نیز با افزایش زمان هیدرولیز میزان هیدرولیز نیز افزایش می‌یابد که با نتایج حاصل از پژوهش حسینی و همکاران (۱۳۹۱) رمضانی و همکاران (۱۳۹۷) همخوانی دارد.

۴.نتیجه‌گیری

استفاده از آنزیم آلکالاز برای هیدرولیز جلبک قهوه‌ای (Sargassum angustifoliom) در زمان‌های مختلف هیدرولیز توانست درجه هیدرولیز متفاوتی را نشان دهد، به این صورت که هر چه زمان هیدرولیز افزایش یافت میزان درجه هیدرولیز پروتئین این جلبک نیز افزایش یافت که این روند افزایشی تا ساعت چهارم هیدرولیز سرعت بیشتر و از ساعت چهارم به بعد با شیب ملایم تری مشاهده شد.

با بررسی خواص عملکردی پروتئین هیدرولیز حاصل از زمان‌های مختلف هیدرولیز می‌توان کاربرد این پروتئین هیدرولیز شده را در صنایع غذایی مشخص نمود.

منابع

۱- اسمعیلی، م.، رضایی، م.، خدابنده، ص.، معتمدزادگان، ع. (۱۳۹۶). فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هوور مسقطی. مجله علوم و فنون شیلات، ۷ (۱): ۵۷-۶۴

۲- آقاجانپور سورکوهی، ن.، باباخانی، آ.، و طبرسا، م. (۱۳۹۷). بهینه‌سازی شرایط استخراج رنگدانه‌های جلبک قهوه‌ای Sargassum angustifolium خلیج فارس با استفاده از روش سطح پاسخ. شیلات (منابع طبیعی ایران)، ۷۱(۴): ۴۰۱-۳۹۰

۳- باباخانی لشکان، آ.، رضایی، م.، رضایی، ک.، و سیف آبادی، س. (۱۳۹۱). بهینه‌سازی استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی جلبک قهوه‌ای Sargassum angustifolium خلیج فارس به روش استخراج به کمک مایکروویو. شیلات (منابع طبیعی ایران)، ۶۵(۳): ۲۵۵-۲۴۳

۴- پارسازاده م.، تدینی م.، خدادادی م. (۱۳۹۷). استخراج پروتئین از جلبک قهوه¬ای و بررسی خصوصیات عملکردی آن. علوم و صنایع غذایی، ۱۱۸-۱۰۵.

۵- حافظیه، م.، مرادی، ی.، پورکاظمی، م.، دادگر، ش.، و شریفیان م. (۱۳۹۵). ترکیبات تقریبی-شیمیایی گیاه دریایی سارگاسوم (Sargassumilicifolium) مناطق مختلف ساحلی استان سیتان و بلوچستان. مجله علمی شیلات، ۲۵(۴): ۱۳۳-۱۴۴.

٦- حسینی، ش.، غرقی، ا.، جمال‌زاده، ح.، صفری، ر.، و حسینی، ش. (۱۳۹۱). مقایسه پروتئین هیدرولیز شده از امعاء و احشاء و سر ماهی فیتوفاگ (Hypophthalmichthys molitrix) با استفاده از آنزیم آلکالاز و آنزیم‌های داخلی بافت ، مجله علمی شیلات ایران، ۲۱(۳): ۶۲-۵۵.

۷- ریحانی‌پول، س .، و جعفرپور، ع. (۱۳۹۵). اثر درجه آبکافت بر خواص عملکردی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی تولید شده از فریم و سر ماهی کپور معمولی (Cyprinus carpio). علوم و صنایع غذایی ایران، ١٤(٦٨): ١٢٤-١١٣.

8- Bleaky, S., and Hayes, M. (2017). Algal proteins extraction, application and challenges concerning production. Foods, 6(5): 33

9- Fountoukalis, M., and Lahm, H.W. (1998). Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. Journal of Chromatography, 826(2): 109-134.

10- Heaney, R.P., and Layman, D.K. (2008). Amount and type of protein influences bone health. The American Journal of Clinical Nutrition, 87(5): 1567-1570

11- Hoffman J.R., and Falvo, M.J. (2005). Protein-which is best?. International Society of Sports Nutrition Symposium, 3(3): 118-130

12- Kang, H., Seo, C. and Park, Y. (2015). Marine peptides and their anti-infective activities. Marine drugs, 13(1): 618-654

13- Lowry O.H. Rosebrough N.J. Farr A.L. and Axd Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265-275

14- Marco, G. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. Journal of the AmericanOil Chemists' Society, 45(9): 594-598

15- McHugh, D.J. (2003). A guide to the seaweedindustry. FAO Fisheries Technical Paperno. 441. Rome, FAO, 105P

16- Murray, M., Dordevic, A.L., Ryan, L., and Bonham, M.P. (2018). An emerging trend in functional foods for the prevention of cardiovascular disease and diabetes: Marine algal polyphenols. Critical reviews in food science and nutrition, 58(8): 1342-1358

17- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Experimental Physiology, 82: 291-295.

18- Tubaro, F., Ghiselli, A., Rapuzzi, P., Maiorino, M., Ursini, F. (1998). Analysis of Plasma Antioxidant Capacity by Competition Kinetics. Free Radical Biology and Medicine, 24(7-8): 1228-1234.

19- Zhang, X., Cao, D., Sun, X., Sun, S., and Xu, N. (2019). Preparation and identification of antioxidant peptids from protein hydrolysate of marine algae Gracilariopsis lemaneiformis. Journal of Applied Phycology, 31(4): 2585-2596.

The effect of low consumption, high consumption and animal manure elements on some quantitative traits and elements of cowpea (Sistan cultivar)

Maliha Herati Abdi [1 *]; Isa Khumri [2]; Alireza Sirousmehr [3] and Mehdi Dehmardeh[4]

* 1- Master student of crop physiology, Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, Zabol University.
2- Associate Professor, Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, Zabol University.
3- Assistant Professor, Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, Zabol University.
4- Associate Professor, Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, Zabol University

Corresponding Author Email address: malihe.haratiabdi1370@gmail.com

Abstract

Among the legumes, cowpea is one of the valuable plants due to its rich grains of protein and other nutrients and is a suitable alternative to meat and an important food source.

Counts. In order to investigate the effect of micro-elements, macro-elements and manure along with foliar application of these elements on yield and yield components and quantitative and qualitative agronomic characteristics of cowpea (Sistan local cultivar) this study is a factorial experiment in the form of complete block design A randomization with 3 factors and 3 replications was performed in the Agricultural Research Institute of Zabol University (Chah Nimeh). The first factor in two levels: no use of livestock manure (M1), the use of livestock manure 20 tons per hectare (M2), the second factor in two levels: no foliar application of micro fertilizer (V1), foliar application of micro fertilizer (V2), the third factor in three levels Non-foliar application of macro fertilizer (N1), foliar application of macro fertilizer with a concentration of 1.5 per ml (N2) and foliar application of macro fertilizer with a concentration of 3 ml per liter (N3). Macro fertilizers include nitrogen, phosphorus and potassium, and micro fertilizers include iron, zinc, manganese, molybdenum, magnesium, copper, folic acid and humic acid. Maximum plant length (52.63 cm) from the combination of 20 tons per hectare of manure and 3 ml per liter of macro fertilizer, maximum weight of 100 seeds (19.35 g) from the application of 20 tons per hectare of manure, the highest amount of nitrogen (7.78%) of the treatment composition of 20 tons per hectare of manure +3 ml / l of macro manure + 2 ml / l of micro manure, also the highest amount of grain yield in the treatment of interaction of macro and micro manure (494.48 kg) Per hectare) and due to the interaction of manure and macro fertilizers (498.27 kg per hectare). According to the results, it can be said that the combined application of chemical fertilizers + micronutrients + organic fertilizer has the best results for the cowpea plant of Sistan cultivar and by replacing organic fertilizers with chemical fertilizers can be used to reduce environmental pollution and sustainable agriculture. He also took a step.

Keywords: High consumption elements, Low consumption elements, Local beans, N

تاثیر عناصر غذایی کم مصرف، پرمصرف و کود دامی بر برخی صفات کمی و عناصر لوبیای چشم بلبلی (رقم سیستان)

ملیحه هراتی عبدی [۱*]؛ عیسی خمری[۲]؛ علیرضا سیروس مهر[۳] و مهدی دهمرده

*۱-دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهان زراعی گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل.

۲- دانشیار گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل.

۳-استادیار گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل.

۴- دانشیار گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل.

*ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: malihe.haratiabdi1370@gmail.com

چکیده

ازمیان بقولات لوبیا چشم بلبلی به علت دارابودن دانه های سرشار از پروتئین و سایر مواد غذایی یکی از گیاهان با ارزش محسوب می‌گردد. در راستای کشاورزی پایدارو به منظور بررسی تاثیر عناصرمیکرو، عناصر ماکرو وکود دامی همراه با محلول پاشی این عناصر بر عملکرد و اجزای عملکرد و ویژگی‌های زراعی کمی وکیفی لوبیای چشم بلبلی (رقم محلی سیستان) این تحقیق به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ عامل و ۳ تکرار در پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل (چاه نیمه) اجرا شد. عامل اول کود دامی در دو سطح (۰ و ۲۰ تن در هکتار)، عامل دوم کود میکرو در دو سطح (۰ و ۲ میلی لیتر در لیتر) و عامل سوم کود ماکرو درسه سطح (۰، ۱/۵ و ۳ میلی لیتر در لیتر کود ماکرو). بیشترین طول بوته (۵۲/۶۳ سانتی متر) از ترکیب کودی ۲۰ تن در هکتار کود دامی و ۳ میلی لیتر در لیتر کود ماکرو، بیشترین وزن ۱۰۰ دانه (۱۹/۳۵ گرم) از کاربرد ۲۰ تن در هکتار کود دامی، بیشترین مقدار نیتروزن (۷/۷۸ درصد) از ترکیب تیماری ۲۰ تن در هکتار کود دامی+۳ میلی لیتر در لیتر کود ماکرو+۲ میلی لیتر در لیتر کود میکرو، همچنین بیشترین مقدار عملکرد دانه در تیمار اثر متقابل کود ماکرو و میکرو (۴۹۴/۴۸ کیلوگرم در هکتار) بود. با توجه به نتایج می‌توان بیان کرد که کاربرد تلفیقی کودهای شیمیایی+ریزمغذی ها+کود آلی بهترین نتیجه را برای گیاه لوبیا چشم بلبلی رقم سیستان داشته و با جایگزین کردن کودهای آلی به جای کودهای شیمیایی می‌توان در جهت کاهش آلودگی‌های زیست محیطی و کشاورزی پایدار نیز گام برداشت.

واژگان کلیدی: عناصر پر مصرف، عناصرکم مصرف، لوبیای محلی، نیتروژن

۱.مقدمه

لوبیا چشم بلبلی (Vigna unguiculata L.) جزو تیره بقولات و زیر تیره پروانه‌آساها بوده و علاوه بر مصرف تغذیه‌ای برای انسان به عنوان علوفه برای دام نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (Diouf, 2011). لوبیاچشم بلبلی به علت دارا بودن دانه‌های سرشار از پروتئین و سایر مواد غذایی یکی از گیاهان لگوم با ارزش محسوب می‌شود (Bakry et al., 2009). هدف اصلی کشاورزی پایدار که به وجود آمدن آن برای حیات انسانی یک ضرورت است، کاهش نهاد های مصرفی، افزایش چرخه داخلی عناصر غذایی خاک از طریق کاهش

خاک‌ورزی و استفاده از کودهای زیستی به جای کودهای شیمیایی در جهت افزایش عملکرد محصولات کشاورزی و تولید غذای بیشتر است (Laegreid et al., 1999; Kochaki et al., 2008). امروزه افزایش در عملکرد از طریق افزایش سطح زیر کشت تقریباً غیر ممکن است. بنابراین بهبود کمی و کیفی در اجزای عملکرد به عنوان روشی مفید جهت بالا بردن عملکرد محصولات زراعی و باغی می‌باشد (غلامحسینی و همکاران، ۱۳۸۷). استفاده از کودهای زیستی به عنوان مکمل یا جایگزین کودهای شیمیایی می‌تواند بسیاری از مشکلات ناشی از مصرف کودهای شیمیایی را برطرف سازد. کمبود ریزمغذیها در بسیاری از کشورهای آسیایی به ویژه ایران با توجه به pH بالا و یا پایین خاک، کمبود مواد آلی، خشکسالی‌های مداوم، تنش شوری، محتوای بی‌کربنات بالای آب آبیاری و برنامه نامتعادل مصرف کودهای NPK، به طور گسترده مشاهده میشود (ملکوتی و تهرانی، ۱۳۸۴). خواجه پور (۱۳۸۷) عنوان کرد که در خاک‌های نواحی خشک، به دلیل بالا بودن pH، کمبود آهن، مس، منگنز و روی و در خاکهای نواحی مرطوب به علت پایین بودن pH ، کمبود مولیبدن، کلر و بر محتمل است. نیاز گیاهان زراعی به عناصر غذایی با توجه به شرایط آب و هوایی، نوع خاک و شرایط کشت و کار فرق می‌کند. به عبارت دیگر، مقدار مناسب کودها برای زراعت‌های مختلف به نوع محصول، طرز کشت، زمان کشت، آبیاری و درجه حرارت محیط بستگی دارد. بنابراین اوضاع و عوامل محلی رشد گیاهان از جمله نوع خاک، مواد معدنی، موقعیت جغرافیایی، ارتفاع و امثال آن در تولید آنان نقش‌های متفاوت دارند.

۲.مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال زراعی ۱۴۰۰-۱۳۹۹ در مزرعه آموزشی- پژوهشی پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل (چاه‌نیمه) اجرا شد. محل از نظر آب و هوا، دارای زمستان‌های سرد و خشک و تابستان‌های گرم و خشک می‌باشد. متوسط بارندگی در آن ۵۸/۹ میلی‌متر در سال، متوسط دمای سالانه آن ۲۲ درجه سانتی‌گراد و متوسط تبخیر سالانه آن ۴۸۶۵ میلی‌متر است. مشخصات اقلیمی منطقه در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱:مشخصات اقلیمی منطقه طرح در دوره های شاخص در سال اجرای آزمایش (۱۳۹۹)

ماه/مشخصات	مرداد	شهریور	مهر	آبان	آذر
میانگین دمایی (سانتی‌گراد)	۳۵/۱	۲۹/۴	۲۲/۲	۱۶/۴	۱۲/۵
میانگین بارندگی (mm)	۰	۰	۰	۲/۶	۱/۵
درصد رطوبت	۱۸	۱۹	۱۸	۳۴	۴۱

قبل از اجرای آزمایش اقدام به نمونه‌برداری از خاک مزرعه از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری شد. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک در جدول ۳ آورده شده است. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. طول هرکرت ۳ متر و به عرض ۲ متر در نظر گرفته شده است. عامل اول کود دامی در دو سطح (۰ و ۲۰ تن در هکتار)، عامل دوم کود میکرو در دو سطح (۰ و ۲ میلی لیتر در لیتر) و عامل سوم کود ماکرو درسه سطح (۰، ۱/۵ و ۳ میلی لیتر در لیتر کود ماکرو). کود ماکرو شامل نیروژن، فسفر و پتاسیم (N.P.K) و کود میکرو شامل آهن، روی، منگنز، مولیبدن، منیزیم، مس، اسید فولیک و اسید هیومیک بود. کود دامی در ابتدای عملیات داشت به کرت‌ها اضافه و با خاک مخلوط شد.

جدول ۲:مشخصات کود دامی مورد استفاده

	فسفر (درصد)	پتاسیم (درصد)	نیتروژن (درصد)	pH
کود دامی	۱/۱۵	۱/۴۵	۱/۷	۷/۴۵

در اوایل مرداد ماه ۱۳۹۹عملیات آماده سازی زمین کشت شامل شخم و دیسک، تسطیح، کرت‌بندی و ماله‌کشی انجام شد. بذرکاری به صورت دستی و از مرکز خدمات کشاورزی زابل تهیه شد. فاصله بین ردیف‌ها ۴۵ سانتیمتر و روی ردیف ۲۰ سانتیمتر در نظر گرفته شد. پس از کاشت بذر آبیاری اولیه انجام گرفت و آبیاری‌های بعد بین ۷ الی ۱۰ روز یکبار انجام گرفت. همچنین علفهای هرز در ۴ نوبت وجین شدند.

جدول ۳:خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک

pH	EC (ds/m)	Ca (ppm)	K (ppm)	Na (ppm)	Mg (ppm)	کربن آلی (ppm)	N (٪)	clay (٪)	Silt (٪)	sand (٪)	بافت خاک
۷/۴	۲/۹۳	۱۰/۸۰	۲۸۰/۰۰	۵۷/۵۶	۱۵/۶۳	۰/۷۲	۰/۰۶۰	۱۳	۱۷	۷۰	لوم- شنی

بوته ها در زمان رسیدگی فیزیولوژیکی، ۵ بوته از هر کرت به صورت تصادفی انتخاب و طول بوته، تعداد دانه در نیام و وزن ۱۰۰ دانه آنها محاسبه گردید. تعداد دانه‌های برداشت شده در یک متر مربع (در زمان ۸۰ درصد رسیدگی) با استفاده از ترازوی با دقت ۰/۰۱ محاسبه شده و به عملکرد در هکتار آن بر حسب کیلوگرم بر هکتار محاسبه شد. جهت اندازه گیری نیتروژن از دستگاه کجلدال استفاده شد. برای اندازه گیری عناصر فسفر و پتاسیم و از روش خاکسترگیری خشک استفاده گردید. از نرم افزار Excel برای سازماندهی داده‌ها استفاده کرده و تجزیه تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS (نسخه ۹/۱) و مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد محاسبه گردید.

۳.نتایج و بحث

۳-۱-طول بوته: با توجه به جدول تجزیه واریانس ۴ اثر کود دامی، کود ماکرو، کود میکرو و اثرات متقابل کود دامی×کود ماکرو و اثر متقابل کود دامی×کود میکرو در سطح احتمال یک درصد معنی دار اما اثر متقابل کود ماکرو×کود میکرو و اثرات سه جانبه کود دامی، کود ماکرو و کود میکرو غیر معنی دار شد.

جدول ۴:تجزیه واریانس صفات مورد بررسی لوبیا چشم بلبلی تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی

	میانگین مربعات								
منابع تغییر	درجه آزادی	طول بوته	تعداد دانه نیام	وزن ۱۰۰ دانه	عملکرد دانه	نیتروژن	فسفر	پتاسیم
تکرار	۲	۵۳/۹۲**	۴/۵۲**	۰/۳ns	۸۰۶۰/۶۴*	۰/۰۴ns	۰/۰۰۱ns	۷۶۰/۴ns

کود دامی	۱	۴۸۵/۴۶**	۲/۷۷*	۵۹/۶۷**	۷۹۸۱۰/۹۵**	۱/۸**	۰/۰۲**	۴۲۱/۹ns
کود ماکرو	۲	۱۵۸/۰۴**	۴/۳۶**	۱۱/۵۳**	۱۳۴۳۱۹/۱۵**	۳۱/۵**	۰/۰۴*	۸۳۴/۰۴**
کود میکرو	۱	۱۱۸/۸۱**	۹/۰۰**	۱۱/۳۲**	۸۵۲۰۰/۷۴**	۵/۴**	۰/۰۱۲**	۶۲۵/۰۶**
دامی×ماکرو	۲	۱۹/۴۳**	۰/۰۲ns	۰/۲ns	۸۱۵۵/۰۹*	۰/۷۱**	۰/۰۰۰*	۷۸/۲ns
دامی×میکرو	۱	۲۰/۸۵**	۱/۰۰ns	۱/۵۶ns	۴۸۱/۴۳ns	۰/۰۰۰ns	۰/۰۰۰ns	۰/۷ns
ماکرو×میکرو	۲	۰/۱۴ns	۱/۰۸ns	۱/۰۴ns	۶۶۶۰/۰۰*	۰/۴**	۰/۰۰۴ns	۳۶/۳۸ns
دامی×ماکرو×میکرو	۲	۰/۱۴ns	۰/۰۸ns	۰/۱۸ns	۱۵۰۰/۱۸ns	۰/۶۳**	۰/۰۰۱ns	۱۹/۳۶ns
اشتباه آزمایشی	۲۲	۲/۰۱	۰/۴۹	۰/۵۱	۱۸۹۶/۰۴	۰/۰۵	۰/۰۰۰	۱۲/۰۷
CV (٪)		۳/۱۷	۷/۰۹	۳/۹۶	۱۴/۲۷	۴/۲۲	۹/۸۲	۷/۱۹

ns، * و **: به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

مقایسه میانگین اثر متقابل کود دامی و کود ماکرو در جدول ۵آورده شده است، همانطور که مشاهده می شود بیشترین طول بوته (۵۲/۶۳ سانتی متر) از ترکیب کودی ۲۰ تن در هکتار کود دامی و ۳ میلی لیتر در لیتر کود ماکرو و کمترین آن (۳۸/۳۶ سانتی متر) مربوط به عدم کاربرد کود دامی و کود ماکرو می باشد. اصلی ترین منبع ذخیره مواد غذایی ساقه بوده و این ذخایر در پرشدن دانه‌ها تاثیر می‌گذارند. نتایج بسیاری از محققان نشان می دهد که مصرف عناصر ریزمغذی تأثیر معنی‌داری در افزایش قطر ساقه، ارتفاع بوته و عملکرد ماده خشک دارد (Sayyari-zahan et al., 2009). افزایش طول بوته به به دلیل کاربرد کودهای میکرو مربوط به نقش آن در فتوسنتز (از جمله عنصر آهن) است که باعث افزایش تنظیم کننده‌های رشد و افزایش ساخت کلروفیل در برگ‌های جوان می‌شود، در نتیجه فتوسنتز افزایش یافته و مواد فتوسنتزی بیشتری به نقاط مختلف گیاه از جمله ساقه‌ها وارد شده و در نهایت، ارتفاع گیاه افزایش می‌یابد (Cakmak, 2008). همچنین به دلیل تاثیر این کودها از جمله عنصر روی که در سنتز اکسین دخیل بوده است. سبب افزایش اکسین شده و این امر افزایش طول گیاه را به همراه داشته است (Estiri et al., 2014).

جدول ۵: اثر متقابل کود دامی×کود ماکرو در صفت طول بوته لوبیا چشم بلبلی تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی

سطوح کود دامی (تن در هکتار)	سطوح کود ماکرو (میلی لیتر در لیتر)	طول بوته (سانتی متر)	عملکرد دانه (کیلوگرم در هکتار)	فسفر (میلی گرم در لیتر)
۰	۰	۳۸/۳۶d	۱۸۲/۷۳d	۰/۱۷e
	۱/۵	۴۱/۶۵c	۲۴۶/۹۹c	۰/۱۹de
	۳	۴۲/۹۵c	۳۴۳/۹۲b	۰/۲۷b

	۰	۴۳c	۲۴۵/۳۷c	۰/۲۲cd
۲۰	۱/۵	۴۹/۳۶b	۳۱۲/۵۲b	۰/۲۳c
	۳	۵۲/۶۳a	۴۹۸/۲۷a	۰/۳۴a

سطر هایی که دارای حروف مشترک هستند در سطح احتمال پنج درصد فاقد تفاوت معنی‌دار هستند.

همچنین مقایسه میانگین اثر متقابل کود دامی و کود میکرو نشان داد که با افزایش سطوح کود دامی و کود میکرو طول بوته افزایش پیدا کرد. همانطور که مشاهده می شود بیشترین طول بوته (۵۰/۹۱ سانتی‌متر) از ترکیب کودی ۲۰ تن در هکتار کود دامی و ۲ میلی‌لیتر در لیتر کود میکرو و کمترین آن (۳۹/۹۳ سانتی‌متر) مربوط به عدم کاربرد کود دامی و کود میکرو می‌باشد (جدول ۶).

جدول ۶: اثر متقابل کود دامی×کود میکرو صفات مورد بررسی لوبیا چشم بلبلی تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی

سطوح کود دامی (تن در هکتار)	سطوح کود میکرو (میلی‌لیتر در لیتر)	طول بوته (سانتی‌متر)
۰	۰	۳۹/۹۳d
	۲	۴۲/۰۴c
۲۰	۰	۴۵/۷۵b
	۲	۵۰/۹۱a

سطر هایی که دارای حروف مشترک هستند در سطح احتمال پنج درصد فاقد تفاوت معنی‌دار هستند.

تعداد دانه در نیام

با توجه به نتایج تجزیه داده‌ها (جدول ۴) برای این صفت، اثر کود دامی، کود ماکرو، کود میکرو در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار اما اثرات متقابل کود دامی×کود ماکرو، کود دامی×کود میکرو، کود ماکرو×کود میکرو و اثرات سه جانبه کود دامی × کود ماکرو × کود میکرو معنی‌دار نبود. اثر ساده کود دامی (جدول ۷)، کود ماکرو (جدول ۸) و کود میکرو (جدول ۹) نشان داد که به ترتیب بیشترین تعداد دانه در نیام از ۲۰ تن در هکتار کود دامی، ۳ میلی‌لیتر در لیتر کود ماکرو و ۲ میلی‌لیتر در لیتر کود میکرو به دست می‌آید. محلول‌پاشی کود ماکرو و کود میکرو همچنین کاربرد کود دامی توانست پتانسیل گیاه برای تولید تعداد دانه بیشتر در نیام را تحقق ببخشد. حداکثر تولید دانه در غلاف تحت کنترل عوامل متعددی همچون طویل بودن غلاف‌هاست (ضابط و همکاران، ۱۳۸۳). با توجه به نقش عناصر ریز مغذی در آنزیمهای دخیل در فرآیند فتوسنتزی گیاه، محلول‌پاشی این عناصر باعث بهبود فعالیت فتوسنتزی گیاه شده و از طریق بهبود دسترسی اندام‌های زایشی گیاه به مواد فتوسنتزی تعداد دانه تشکیل شده در غلاف می‌تواند افزایش یابد (سعیدی ابواسحقی و یدوی، ۱۳۹۴).

جدول ۷:اثر ساده کود دامی صفات مورد بررسی لوبیا چشم بلبلی تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی

سطوح کود دامی (تن در هکتار)	تعداد دانه نیام	وزن ۱۰۰ دانه (گرم)
۰	۹/۶۶b	۱۶/۷۷b
۲۰	۱۰/۲۲a	۱۹/۳۵a

سطر هایی که دارای حروف مشترک هستند در سطح احتمال پنج درصد فاقد تفاوت معنی‌دار هستند.

جدول ۸: اثر ساده کود ماکرو صفات مورد بررسی لوبیا چشم بلبلی تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی

سطوح کود ماکرو (میلی لیتر در لیتر)	تعداد دانه نیام	وزن ۱۰۰ دانه (گرم)	پتاسیم (میلی گرم در لیتر)
۰	۹/۲۵b	۱۷/۰۳c	۳۹/۵۳c
۱/۵	۱۰/۲۵a	۱۸/۱۸b	۴۹/۳۶b
۳	۱۰/۳۳a	۱۸/۹۸a	۵۶/۱a

سطر هایی که دارای حروف مشترک هستند در سطح احتمال پنج درصد فاقد تفاوت معنی‌دار هستند.

جدول ۹: اثر ساده کود میکرو صفات مورد بررسی لوبیا چشم بلبلی تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی

سطوح کود میکرو (میلی لیتر در لیتر)	تعداد دانه نیام	وزن ۱۰۰ دانه (گرم)	پتاسیم (میلی گرم در لیتر)
۰	۹/۴۴b	۱۷/۵b	۴۴/۱۶b
۲	۱۰/۴۴a	۱۸/۶۲a	۵۲/۵a

سطر هایی که دارای حروف مشترک هستند در سطح احتمال پنج درصد فاقد تفاوت معنی‌دار هستند.

۳-۲-وزن ۱۰۰ دانه

جدول تجزیه واریانس (جدول ۴) برای صفت وزن ۱۰۰ دانه نشان می‌دهد که، اثر کود دامی، کود ماکرو، کود میکرو در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار اما اثرات متقابل کود دامی×کود ماکرو، کود دامی×کود میکرو، کود ماکرو×کود میکرو و اثرات سه جانبه کود دامی، کود ماکرو و کود میکرو غیر معنی‌دار شد. مقایسه میانگین اثر ساده کود دامی بر میانگین وزن ۱۰۰ دانه نشان داد که بیشترین وزن ۱۰۰ دانه (۱۹/۳۵ گرم) از کاربرد ۲۰ تن در هکتار کود دامی (جدول ۷)، برای کود ماکرو بیشترین وزن ۱۰۰ دانه (۱۸/۹۸ گرم) از سطح ۳ میلی لیتر در لیتر کود ماکرو (جدول ۸) و بیشترین مقدار وزن ۱۰۰ دانه (۱۸/۶۲ گرم) از کاربرد ۲ میلی لیتر در لیتر کود میکرو (جدول ۹) به دست آمد. مصرف کود ماکرو (NPK) باعث افزایش فعالیت های بیوشیمیایی، از جمله فتوسنتز، طول دوره رشد گیاهان، تجمع مادهٔ خشک و اجزای عملکرد و در نتیجه عملکرد شده و تأثیر مثبت این کود بر وزن ۱۰۰ دانه بدیهی می باشد (Jaleel et al, 2008). کاربرد کودهای آلی در محیط ریشه می‌تواند، سبب بهبود نمو گیاه و باعث تحریک

توسعه‌ی ریشه و در نتیجه جذب بهتر آب و مواد غذایی از خاک شوند (Murchie et al., 2002). به علاوه کودهای آلی با کاهش pH خاک، به علت تجزیه مواد آلی موجود در آن توسط میکروارگانیسم‌ها و باکتری‌ها سبب تولید اسیدکربنیک و افزایش میزان هیومیک اسید می‌شوند، که نقش مفید و موثری در افزایش رشد و نمو گیاه و نهایتا پر شدن دانهٔ گیاهان دارند (Hervas et al., 1999).

۳-۳-عملکرد دانه

نتایج جدول ۴ تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که برای وزن خشک اثر کود دامی، کود ماکرو و کود میکرو در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار و برای اثر متقابل کود دامی×کود ماکرو و کود ماکرو×کود میکرو در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار اما برای اثر متقابل کود دامی×کود میکرو و اثرات سه جانبه معنی‌دار نشد. مقایسه اثر متقابل کود دامی و ماکرو نشان داد که بیشترین عملکرد دانه (۴۹۸/۲۷ کیلوگرم در هکتار) از کاربرد ۲۰ تن در هکتار کود دامی و ۳ میلی‌لیتر در لیتر کود ماکرو به دست آمد (جدول ۵). همچنین مقایسه میانگین اثر متقابل کود ماکرو و میکرو (جدول ۱۰) نشان داد که بیشتر عملکرد دانه (۴۹۴/۴۸ کیلوگرم در هکتار) از کاربرد ۳ میلی‌لیتر در لیتر کود ماکرو و ۲ میلی‌لیتر در لیتر کود میکرو به دست آمد. عملکرد دانه و عملکرد زیستی نیازمند موازنه صحیح بین اندازه دستگاه فتوسنتزی و تداوم آن، سرعت انتقال، سرعت فتوسنتز و توزیع مواد فتوسنتزی به اندام‌ها، اندازه و تعداد و دانه و همچنین ظرفیت آن ها از نظر تجمع مواد فتوسنتزی می‌باشد. تحرک اندوخته های ساقه (که شامل تولیدات مازاد مربوط به فتوسنتز پیش از مرحله پرشدن دانه می باشد) تا اندازه زیادی در عملکرد دانه موثر هستند. در صورت افزودن عناصر غذایی به خاک معمولا تعداد مقصدهای فیزیولوژیکی برای ماده خشک در اندام‌های زایشی و رویشی افزایش می‌یابد (Sharafi et al., 2002). گزارش شده است که مصرف همزمان عناصر ریز مغذی مانند روی و آهن (۴۰ کیلوگرم روی و ۱۰ کیلوگرم آهن در هکتار) در گیاه گندم عملکرد دانه را به طور متوسط ۸۶۷ کیلوگرم افزایش داد (Silspoor, 2007). تحقیقات اقدسی و همکاران (۱۳۹۷) و در ارتباط با موثر بودن محلول‌پاشی عناصر ریز مغذی بر عملکرد دانه با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

جدول ۱۰:اثر متقابل کود ماکرو×کود میکرو عملکرد دانه لوبیا چشم بلبلی تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی

سطوح کود ماکرو	سطوح کود میکرو	عملکرد دانه (کیلوگرم در هکتار)
۰	۰	۱۶۷/۹۸c
۱/۵	۰	۲۵۳/۲۷c
۳	۰	۳۴۷/۷b
۰	۲	۲۶۰/۱۲c
۱/۵	۲	۳۰۶/۲۴bc
۳	۲	۴۹۴/۴۸a

سطر هایی که دارای حروف مشترک هستند در سطح احتمال پنج درصد فاقد تفاوت معنی‌دار هستند.

۳-۴-نیتروژن

با توجه به تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۴) برای عنصـــر نیتروژن اثر کود دامی، کود ماکرو، کود میکرو،اثر متقابل کود دامی×کود ماکرو و کود ماکرو×کود میکرو و اثرات ســه جانبه تیمارهای آزمایشــی در ســطح احتمال یک درصــد اما اثر متقابل کود دامی×کود میکرو غیر معنی‌دار شـد. مقایسـه میانگین اثر سـه جانبه تیمارهای آزمایشـی برای عنصـر نیتروژن نشـان داد که بیشـترین مقدار آن (۷/۷۸ درصد) از ترکیب کاربرد هر سه کود مصرفی به دست آمد (جدول ۱۱). لوبیا چشم بلبلی یکی از گیاهان خانواده بقولات است که دارای همزیســتی با باکترهای تثبیت کننده نیتروژن (ریزوبیوم) می باشــد و می‌تواند مقدار در قابل توجهی از نیتروژن مورد نیاز خود را تامین نمایند. در این میان، برای تثبیت نیتروژن ، عنصـــر آهن در ترکیب لگ‌هموگلوبین و واکنش‌های مربوط به تثبیت نیتروژن شرکت دارد. همچنین آهن در ترکیب با آنزیم‌های نیترات (در سیتوپلاسم) و نیتریت ردوکتاز (در کلروپلاست) نیز شرکت دارد، که علاوه بر تثبیت نیتروژن بر روی مقدار احیای نیتروژن در گیاه تاثیر مســـتقیم می گذارد (Marschner, 2002). Yassen و همکاران (۲۰۱۰) از فواید محلول‌پاشی، افزایش جذب عناصر از خاک را عنوان کردند. آنان بیان کردند که محلول‌پاشی باعث ترشح مواد قندی و سایر مواد از ریشه به محلول خاک شده و ترشح این مواد باعث بهبود فعالیت میکروبی در رایزوسفر می شود و قابلیت جذب عناصر غذایی را افزایش می‌یابد.

جدول ۱۱:مقایسه میانگین اثر سه جانبه عناصر لوبیا چشم بلبلی تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی

کود دامی	ماکرو	میکرو	نیتروژن
۰	۰	۰	۳/۰۲h
۰	۱/۵	۰	۵/۰۵e
۰	۳	۰	۵/۹۸d
۰	۰	۲	۳/۲۳h
۰	۱/۵	۲	۵/۴۳e
۰	۳	۲	۷/۶۹a
۲۰	۰	۰	۳/۷۵g
۲۰	۱/۵	۰	۵/۱۱e
۲۰	۳	۰	۶/۵۵c
۲۰	۰	۲	۴/۴۹f
۲۰	۱/۵	۲	۶/۰۵d
۲۰	۳	۲	۷/۷۸a

سطر هایی که دارای حروف مشترک هستند در سطح احتمال پنج درصد فاقد تفاوت معنی‌دار هستند.

۳-۶-فسفر

تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۴) نشان داد که برای عنصر فسفر، اثر کود دامی، کود میکرو در سطح احتمال یک درصد و اثر کود ماکرو و اثر متقابل مود دامی×کود ماکرو در ســطح احتمال ۵ درصــد اما اثر متقابل کود دامی×کود میکرو، کود ماکرو×کود میکرو و اثرات ســه جانبه تیمارهای آزمایشــی غیر معنی‌دار شــد. مقایســه میانگین اثر متقابل کود دامی و ماکرو (جدول ۵) نشــان داد که بیشترین فسفر (۰/۳۴ میلی گرم در لیتر) از سطح ۲۰ تن در هکتار کود دامی و ۳ میلیلی لیتر در لیتر کود ماکرو به حاصل شد.

۳-۷-پتاسیم

با توجه به تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۴) برای عنصر پتاسیم اثر کود ماکرو و کود میکرو در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار اما اثر کود دامی، اثر متقابل کود دامی×کود ماکرو و کود ماکرو×کود میکرو و کود دامی×کود میکرو اثرات سه جانبه تیمارهای آزمایشی غیر معنی‌دار شد. مقایسه میانگین اثر ساده کود ماکرو (جدول ۸) نشان داد که بیشترین پتاسیم (۵۶/۱ میلی گرم در لیتر) از سطح ۳ میلی‌لیتر در لیتر کود ماکرو و مقایسه میانگین اثر ساده کود میکرو (جدول ۹) نشان داد که بیشترین پتاسیم (۵۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) از سطح ۲ میلی‌لیتر در لیتر کود میکرو حاصل شد. یکی از عناصر ضروری برای فعالیت‌های فیزیولوژیک و رشد گیاه، عنصر پتاسیم می‌باشد. در شرایط تنش خشکی، جذب عنصر پتاسیم در گیاه کاهش یافته و با کمبود این یون روبرو می‌شود. Vattaniو همکاران (۲۰۱۲) بیان کردند که کاربرد کودهای دارای آهن در گیاه اسفناج با افزایش جذب پتاسیم و کاهش سدیم باعث کاهش سدیم و پتاسیم برگ و افزایش مقاومت به تنش می‌شود. همچنین در گیاه آفتابگردان افزایش جذب پتاسیم بر اثر مصرف گوگرد همراه با محلول‌پاشی آهن + روی توسط Ravi و همکاران (۲۰۰۸) نیز مطرح شده است.

۴. نتیجه‌گیری

اکثر خاک‌های منطقه سیستان از لحاظ برخی عناصر کم مصرف مانند آهن، روی، منگنز، مس و بر دارای کمبود بوده و این مشکل به دلیل واقع بودن در منطقه خشک، استفاده نادرست از منابع خاکی و عدم مدیریت زراعی است. یکی از مهم‌ترین روش‌های مدیریتی در راستای دستیابی به عملکرد بالا در تولید گیاهان محلول‌پاشی برگی عناصر ریز مغذی می‌باشد. با توجه نتایج فوق استفاده از کود دامی به میزان ۲۰ تن در هکتار، کود ماکرو (۳ میلی‌لیتر بر لیتر) و کود میکرو (۲ میلی‌لیتر بر لیتر) بر اغلب صفات مورد بررسی معنی‌دار بوده و باعث افزایش عملکرد حداکثر به میزان ۴۹۸/۲۷ کیلوگرم در هکتار در تیمار ۲۰ تن در هکتار کود دامی و ۳ میلی لیتر در لیتر کود ماکرو گردید.

منابع

۱- اقدسی، س.، آقا علیخانی، م. مدرس ثانوی، ع. و. کشاورز، ح. ۱۳۹۷. اثر محلولپاشی آهن و منگنز بر عملکرد و اجزای عملکرد ماش سبز در شرایط تنش کمآبی، نشریه دانش آب و خاک، ۲۸(۳): ۱۳-۲۵.

۲- خواجه پور، م. ر. ۱۳۸۷. اصول و مبانی کشاورزی. انتشارات جهاد دانشگاهی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

۳- سعیدی ابواسحقی، ر و یدوی، ع. ۱۳۹۴. اثر سطوح آبیاری و محلول پاشی آهن و روی بر خصوصیات کمی و کیفی لوبیا قرمز (*Phaseolous vulgaris* L)، دو فصلنامه پژوهش های حبوبات ایران. ۶(۱).

٤- ضابط، م.، حسینزاده، ع.، احمدی، ع. و خیالپرست، ف . ۱۳۸۳ .تعیین مهمترین صفات مؤثر بر عملکرد تحت دو شرایط آبیاری با استفاده از روش‌های آماری چند متغیره در ژنوتیپ‌های ماش. مجله علوم کشاورزی ایران. ۳۵: (۴)۸۴۹-۸۳۹.

٥- غلامحسینی، م.، آقا علیخانی، م. و ملکوتی ،م. ج. ۱۳۸۷. تاثیر سطوح مختلف نیتروژن و زئولیت بر عملکرد کمی و کیفی علوفهٔ کلزای پائیزه. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. سال دوازدهم. ۴۵:۵۴۹ ـ۵۳۷.

٦- ملکوتی، م و تهرانی م .۱۳۸۴. نقش ریز مغذی‌ها در افزایش عملکرد و بهبود کیفیت محصولات کشاورزی عناصر خرد با تأثیر کلان). نتشارات دانشگاه تربیت مدرس.

7- Bakry, M ., Soliman., M. 2009. Importance of micronutrients, organic manure and bio fertilizer for improving maize yield and it's components grown in desert sandy soil. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 5: 16-23.

8- Cakmak I. 2008. Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification? Plant Soil 302:1-17.

9- Diouf, D. 2011. Recent advances in cowpea [Vigna unguiculata (L.) Walp.] omics research for genetic improvement. African Journal of Biotechnology. 10(15): 2803-2810
10- Estiri, H., M. Armin, and A. Filehkesh. 2014. Effect of foliar application of different levels of zinc sulfate on the yield and components yield of sunflower (Helianthus annuus L.) under drought stress. Journal of Oilseed Plants. 1(1): 65-76.
11- Hervas, L. & Mazuelos, C. & Sensi, N. and Saiz-Jimenez, C. (1999). Chemical and Physicochemical characterization of vermicompost and their humic acid fractions. Sci. Total Environ. 81/82: 543-55.
12- Jaleel, C. A., Gopi R. and Panneerselvam, R. (2008) Growth and photosynthetic pigments responses of two varieties of Catharanthus roseus to triadimefon treatment. Comptes Rendus Biology 331: 272-277.
13- Kochaki A. Jahan M. and Nassiri Mahallti M, (2008) "Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and free-living nitrogen-fixing bacteria on growth characteristic of corn (Zea mays L.) Under organic and conventional cropping systems." 2nd conference of the international society of organic agriculture research (ISOFAR). Modona. Italia.
14- Laegreid M. Bockman O. C. and Kaarstad E. O, (1999) "Agriculture, Fertilizer and Environment." CABI publishing, pp 294.
15- Marschner H. 2002. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London.
16- Murchie, E.H., J. Yang., S. Hubbart., P. Horton., and S. Peng. 2002. Are there associations between grain-filling rate and photosynthesis in the flag leaves of field grown rice? J. of Eur. Sci. 53: 2217-2224.
17- Ravi, S., H. T. Channal, N. S. Hebsur, B. N. Patil and P. R. Dharmatti. 2008. Effect of sulphur, zinc and iron nutrition on growth, yield, nutrient uptake and quality of safflower (Carthamus tinctorius L.). Karnataka J. Agric. Sci. 32: 382 -385.
18- Sayyari-Zahan M., Sadana, U., Steingrobe, B., and Claassen, N.,2009. Manganese efficiency and Mn uptake kinetics of raya (Brassica juncea L.), wheat (Triticum aestivum L.) and oat (Avena sativa L.) grown in nutrient solution and soil. J. Plant Nutr. Soil Sci. 172, 425-434.
19- Sharafi, S., Tajbakhsh, M., Majidi, M., Pourmirza, A., 2002. Effect of iron and zinc fertilizer on yield and yield components of two forage com cultivars in Urmia. Soil and Water. 12, 85-94.
20- Silspoor, M. 2007. Effect of consumption of iron and zinc elements in quantitative and qualitative characteristics of irrigated wheat. Pajouhesh va Sazandeghi. 76: 123 -133
21- Vattani H., Keshavarz N., and Baghaei N. 2012. Effect of sprayed Soluble different levels of iron chelate Nano fertilizer on nutrient uptake efficiency in two varieties of spinach (Varamin88 and Virofly). International Research Journal of Applied and Basic Sciences, 3(S): 2651-2656.
22- Yassen, A., Abou El-Nour, E. and Shedeed, S. (2010) Response of wheat to foliar spray with urea and
23- micronutrients. Journal of American Science 6: 14-22.

The effect of Bacillus megaterium and Trichoderma simmonsii symbiosis on improving the growth characteristics of soybean under different levels of potassium and zinc in Babol region

Mohammad Kashi Sasi[*1], Hemmatollah Pirdashti[2], Yasser Yaghoubian[3]

1- Msc. Student in Crop Physiology, Department of Agronomy, Sari Agricultural Sciences and Natural Resource University, Sari, Iran
2 & 3- Professor & Assistant Professor, Department of Agronomy, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resource University, Sari, Iran

kashe.1358@yahoo.com

Abstract

Nowadays, the use of biofertilizers is inevitable to reduce the use of chemical fertilizers due to the importance and necessity of sustainable agriculture. This experiment was performed to investigate the effect of plant growth-promoting microorganisms (PGPM) on some growth characteristics of soybean '*cv.* Sari' in a spilt-split plot experiment based on a randomized complete block design (RCBD) with three replications in 2019-2020. The main plot was potassium (K) fertilizer at two levels (50 and 100% of recommended dose) and sub and sub-sub plots were zinc (Zn) fertilizer at three levels (0, 50 and 100% of recommended dose) and PGPM in four levels (control, *Bacillus megaterium*, *Trichoderma simmonsii*, and co-inoculation of bacteria and fungi), respectively. The results showed that the application of K and Zn fertilizers increased the growth of soybean plants. So that, when Zn applied at different levels of PGPM the stem, pod, and plant dry weight was increased by 7-27%.. Also, growth traits showed a significant response to the application of PGPM. The highest plant dry weight (57.23 g plant^{-1}) was recorded in bacterial+fungal inoculation with 100% Zn fertilizer level, which was about 45% higher than the control treatment at zero Zn level. The highest leaf dry weight (4.05 g plant^{-1}) was observed in bacterial+fungal inoculation treatment with 50% K and 100% Zn fertilizer. Therefore, the use of these microorganisms in combination with chemical fertilizers of K and Zn can be suggested as a suitable approach to improve the growth parameters of soybean.

Keywords: Bacillus, growth promoting microorganisms, nutrients, symbiosis, Trichoderma

تاثیر همزیستی Bacillus megaterium و Trichoderma simmonsii بر بهبود ویژگی‌های رشدی سویا در سطوح مختلف پتاسیم و روی در منطقه بابل

محمدکاشی ساسی[1*]، همت‌اله پیردشتی[2]، یاسر یعقوبیان[2]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهان زراعی، گروه زراعت، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲– به‌ترتیب استاد و استادیار گروه زراعت، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

kashe.1358@yahoo.com

چکیده

با توجه به اهمیت و ضرورت کشاورزی پایدار در حال حاضر استفاده از کودهای زیستی جهت تعدیل مصرف کودهای شیمیایی امری اجتناب ناپذیر می‌باشد. با همین هدف، پژوهش حاضر به بررسی اثر ریزجانداران افزاینده رشد بر بهبود برخی ویژگی‌های رشدی سویا رقم JK، به صورت کرت‌های دوبار خردشده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در سال زراعی ۹۹-۱۳۹۸ پرداخته است. عامل اصلی کود شیمیایی پتاسیم در دو سطح (۵۰ و ۱۰۰ درصد توصیه شده) و عامل فرعی کود روی در سه سطح (۰، ۵۰ و ۱۰۰ درصد توصیه شده) و عامل فرعی فرعی ریزجانداران افزاینده رشد در چهار سطح شاهد، باکتری *Bacillus megaterium*، قارچ Trichoderma simmonsii و تلقیح همزمان قارچ و باکتری بودند. نتایج نشان داد که استفاده از کودهای شیمیایی پتاسیم و روی رشد رویشی گیاه سویا را افزایش داد. کاربرد عنصر روی در سطوح مختلف تیمار زیستی نیز افزایش ۲۷-۷ درصدی وزن خشک ساقه، غلاف و بوته را در پی داشت. همچنین صفات رویشی به‌صورت معنی‌داری به کاربرد تیمارهای زیستی واکنش نشان دادند. بیشترین وزن خشک بوته (۵۷/۲۳ گرم در بوته) در تلقیح باکتری+قارچ با سطح ۱۰۰ درصد کود روی ثبت شد که نسبت به تیمار شاهد در سطح روی صفر حدود ۴۵ درصد بیشتر بود. بیشترین وزن خشک برگ (۴/۰۵ گرم در بوته) نیز در تیمار تلقیح باکتری+قارچ با سطح ۵۰ درصد کود پتاسیم و ۱۰۰ درصد کود روی مشاهده شد. بنابراین، استفاده از این ریزجانداران به‌همراه کودهای شیمیایی پتاسیم و روی می‌تواند به‌عنوان راهکاری مناسب جهت افزایش رشد گیاه سویا پیشنهاد گردد.

واژگان کلیدی: باکتری باسیلوس، ریزجانداران افزاینده رشد، عناصر غذایی، قارچ تریکودرما

۱.مقدمه

سویا (*Glycine max* L. [Merrill.]) یکی از مهمترین دانه‌های روغنی جهان است که در بین دانه‌های روغنی در دنیا، با حدود ۱۱۷ میلیون هکتار بیشترین سطح زیرکشت و با عملکرد ۳۰۶ میلیون تن، یک چهارم روغن و دو سوم پروتئین خوراکی را تأمین می‌کند (Abdraimova et al., 2014; FAO, 2017). مقدار کشت و تولید این محصول در ایران در سال زراعی ۹۸-۹۷ حدود ۲۹/۳ هزار هکتار با تولیدی حدود ۶۸ هزار تن بوده است. مازندران باتوجه به شرایط آب و هوایی مناسب برای کشت سویا با سطح زیرکشت حدود ۳/۶۴ هزار هکتار با متوسط عملکرد ۱۷۱۷ کیلوگرم در هکتار نقش مهمی در تأمین نیاز کشور به دانه روغنی را بر عهده دارد (آمارنامه جهاد کشاورزی، ۱۳۹۹).

پتاسیم (K) یکی از عناصر پرمصرف بوده و نقش اساسی در افزایش سرعت فتوسنتز، جذب دی‌اکسیدکربن و تسهیل در فرآیند انتقال کربن از منبع به مخزن دارد (ملکوتی، ۱۳۷۸؛ قاسمی و همکاران، ۱۳۹۲). همچنین این عنصر در گیاهان خاصیت کاتالیزوری داشته و باعث انتقال قندها، استقرار بهتر گیاه در شرایط تنش رطوبتی، تنظیم سرعت و میزان باز و بسته شدن روزنه‌ها، مقاومت به خوابیدگی (ورس) و تحمل به آفات و بیماری‌ها و در نهایت افزایش عملکرد دانه می‌گردد (ملکوتی و غیبی، ۱۳۷۹؛ Hoeft et al., 2000). علاوه بر این، عنصر روی (Zn) نیز در فعال‌سازی آنزیم‌های مختلفی مانند آنزیم‌های فرایند سنتز پروتئین، متابولیسم کربوهیدرات‌ها و نیتروژن و همچنین به عنوان بخشی از ساختمان آنزیمی گیاه در توسعه ریشه و تشکیل نشاسته، گلدهی و میوه‌دهی نیز نقش دارد (ملکوتی، ۲۰۰۷؛ بای‌بوردی، ۱۳۸۵؛ Fageria, 2009). روی یک عنصر مهم در تغذیه گیاه سویا بوده و این گیاه از جمله محصولات حساس به کمبود روی می باشد (Franzen, 1999).

از طرفی، کودهای زیستی ریزجاندارانی چون باکتری‌ها و قارچ‌ها هستند که می‌توانند به صورت‌های مختلف اعم از تلقیح با بذر، کاربرد در سطح گیاه و خاک باعث افزایش دسترسی عناصر غذایی برای گیاه میزبان و در نهایت باعث بهبود رشد گیاه شوند (Yaghoubian et al., 2014; Jan and Boswal, 2015). باکتری باسیلوس و گونه‌های قارچ تریکودرما ازجمله ریزجاندارانی هستند که به‌عنوان کود زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در پژوهش‌های گذشته توانایی بهبود رشد گیاهان مختلف توسط این ریزجاندارن به اثبات رسیده است (تقوی قاسمخیلی و همکاران، ۱۳۹۳؛ فقیه‌عبدالهی و همکاران، ۱۳۹۴؛ Bahari Saravi et al., 2022; Yaghoubian et al., 2019; Preeti et al., 2002). بنابراین، باتوجه به موارد مطرح شده، در این پژوهش اثر تلقیح *Bacillus megaterium* و قارچ *Trichoderma simmonsi* بر رشد گیاه سویا در سطوح مختلف پتاسیم و روی در منطقه بابل با هدف کاهش مصرف کود شیمیایی مورد بررسی قرار گرفت.

۲.مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی کارایی ریزجانداران افزاینده‌ی رشد گیاه در بهبود ویژگی‌های رشدی گیاه سویا رقم ساری، پژوهشی در سال زراعی ۱۳۹۸-۹۹ در مزرعه‌ی ایستگاه تحقیقات دو منظوره گاودشت واقع در شهرستان بابل به صورت کرت‌های دوبار خردشده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار انجام شد. تیمارها شامل دو سطح کود پتاسیم (۷۵ و ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار به‌ترتیب معادل ۵۰ و ۱۰۰ درصد کود توصیه شده، از منبع سولفات پتاسیم) به‌عنوان عامل اصلی و کود روی در سه سطح (۰ و ۱۲/۵ و ۲۵ کیلوگرم در هکتار به‌ترتیب معادل صفر، ۵۰، ۱۰۰ درصد کود توصیه شده، از منبع سولفات روی) به‌عنوان عامل فرعی و چهار تیمار زیستی (شاهد، تلقیح باکتری *Bacillus megaterium*، قارچ *Trichoderma simmonsii* و تلقیح همزمان باکتری و قارچ) به‌عنوان عامل فرعی فرعی در نظر گرفته شدند. قبل از کاشت، تیمارهای کودی پتاسیم و روی اعمال شد. همچنین بذرهای سویا قبل از کاشت با سوسپانسیون ریزجانداران مورد مطالعه و تهیه‌شده از پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تلقیح گردید (محمدی کشکا و همکاران، ۱۳۹۷). کاشت در کرت‌هایی با ابعاد ۴ × ۲ متر به‌صورت دستی در تاریخ ۱۹ اردیبهشت ماه انجام شد. هرکرت شامل ۹ خط کاشت با فاصله ۴۰ سانتی‌متر و فاصله بوته روی ردیف نیز ۸ سانتی متر بود. فاصله بین کرت‌ها ۲ متر و فاصله بین بلوک‌ها ۴ متر در نظر گرفته شد. آبیاری کرت‌ها بسته به شرایط آب و هوایی هر ۱۵ تا ۲۰ روز با استفاده از نوار تیپ انجام شد. برای اندازه‌گیری صفات رشدی در مرحله رسیدگی فیزیولوژیک از هر کرت ۵ بوته به‌طور تصادفی انتخاب و به مدت ۷۲ ساعت در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، پس از خشک شدن نمونه ها، صفات رویشی گیاه از جمله وزن خشک برگ، ساقه، غلاف و بوته با استفاده از ترازوی ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ و مقایسه میانگین‌ها به روش حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

۳. نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی (جدول ۱) نشان داد صفات رویشی از قبیل وزن خشک برگ، ساقه، غلاف در بوته و همچنین وزن خشک بوته به صورت معنی‌داری ($P<0.05$) تحت تأثیر تیمار زیستی قرار گرفت در حالی که این صفات واکنش معنی‌داری به تیمارهای پتاسیم، روی و اثر متقابل پتاسیم و روی نداشتند. اثر برهمکنش پتاسیم و تیمار زیستی بر وزن خشک برگ در سطح احتمال یک درصد و همچنین برهمکنش روی و تیمار زیستی بر وزن خشک ساقه و غلاف در بوته در سطح احتمال پنج و وزن خشک بوته در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. علاوه بر این، وزن خشک برگ تحت تأثیر معنی‌دار ($P<0.05$) برهمکنش سه‌گانه پتاسیم، روی و تیمار زیستی قرار گرفت. هرچند سایر صفات واکنش معنی‌داری نداشتند (جدول ۱).

جدول ۱: تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر وزن خشک اندام‌های گیاه سویا

منابع تغییر	درجه آزادی	وزن خشک برگ	وزن خشک ساقه	وزن خشک غلاف	وزن خشک بوته
بلوک	۲	۰/۰۴	۱۱/۶۸	۱۸۹/۳۷	۲۴۷/۶۲
پتاسیم (K)	۱	۱۳/۳۹ ns	۱۰/۱۴ ns	۳۵/۰۴ ns	۲۹/۶۴ ns
خطای کرت اصلی	۲	۰/۸۴	۵۳/۰۰	۵۵/۰۸	۱۵۳/۳۳
روی (Zn)	۲	۱/۵۰ ns	۲۲/۳۷ ns	۱۰/۴۲ ns	۶۸/۱۱ ns
K×Zn	۲	۰/۵۷ ns	۱۷/۹۶ ns	۱۰/۳۵ ns	۴۶/۹۵ ns
خطای کرت فرعی	۸	۱/۷۳	۲۳/۵۱	۲۱/۳۷	۴۲/۹۶
تیمار زیستی (B)	۳	۳/۵۳**	۱۵/۹۰**	۱۲۹/۹۶**	۲۸۸/۳۳**
K×B	۳	۱/۷۶**	۵/۲۴ ns	۵۴/۱۰	۶۴/۳۰ ns
Zn×B	۶	۰/۱۴ ns	۵/۲۷*	۸۷/۰۹*	۱۲۲/۱۸**
K×Zn×B	۶	۰/۵۵*	۴/۷۷ ns	۸/۴۷ ns	۱۳/۳۵ ns
خطای باقی مانده	۳۶	۰/۲۱	۲/۲۰	۲۶/۱۹	۳۲/۸۷
ضریب تغییرات (درصد)		۲۰/۴	۱۱/۵	۱۵/۳	۱۱/۸

* و ** به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال یک و پنج درصد.

برهم‌کنش کود روی و تیمار زیستی (جدول ۲) بیانگر اثر مثبت کاربرد کود شیمیایی روی بر وزن خشک اندام‌های گیاه سویا بوده و در تیمارهای زیستی شاهد، قارچ و باکتری+قارچ، استفاده از کود روی ۱۰۰ درصد توصیه شده وزن خشک ساقه، غلاف و بوته را به‌ترتیب بین ۱۵-۱۳، ۱۱-۷ و ۲۷-۱۹ درصد افزایش داد. هرچند در گیاهان تلقیح شده با باکتری نتایج متفاوتی به دست آمد. در یک تحقیق گلخانه‌ای و مزرعه‌ای توسط اسدی کنگرشاهی و محمودی (۱۳۸۰) و اسدی کنگرشاهی و ملکوتی (۱۳۸۲) نشان داده شد که مصرف سولفات روی در خاک عملکرد دانه و ماده خشک گیاه را در سویا افزایش داده، به‌طوری که مصرف ۴۰ کیلوگرم سولفات روی موجب افزایش ۱۹ درصدی عملکرد دانه نسبت به شاهد شد.

کاربرد تیمارهای زیستی نیز بر رشد گیاه اثر مثبت داشته و وزن خشک ساقه، غلاف و بوته را در سطوح مختلف کود روی افزایش داد. در شرایط عدم مصرف کود روی، تلقیح با باکتری نسبت به سایر تیمارهای زیستی اثر بهتری داشته و وزن خشک ساقه، غلاف و بوته

را به ترتیب حدود ۳۶، ۴۲ و ۴۰ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش داد، این در حالی است که در مصرف کود روی به میزان ۵۰ و ۱۰۰ درصد توصیه شده، به‌ترتیب تلقیح قارچ و تلقیح همزمان قارچ و باکتری شرایط بهتری را برای رشد گیاه به‌وجود آوردند. بیشترین وزن خشک بوته (۵۷/۲۳ گرم در بوته) در تلقیح باکتری و قارچ با سطح ۱۰۰ درصد کود روی ثبت شد که نسبت به تیمار شاهد در سطح روی صفر حدود ۴۵ درصد بیشتر بود (جدول ۲). کودهای زیستی نقش حیاتی در حفظ و پایداری بلندمدت حاصلخیزی خاک (Mishra et al., 2013) و توانایی انحلال عناصر ازطریق فرایندهای زیستی (Kızılkaya, 2008) داشته و به‌عنوان جایگزینی مناسب برای حفظ و تولید عملکردهای بالاتر به همراه کاهش مخاطرات بوم شناختی عنوان شده‌اند (Hermosa et al., 2012). در پژوهش‌های گذشته، باکتری *Pseudomonas* sp. سبب بهبود رشد، عملکرد و کیفیت برنج (Lavakush et al., 2014)، بهبود رشد اولیه گیاهچه ذرت (Sengupta et al., 2015) و افزایش تعداد پنجه و وزن هزار دانه (Shaharoona et al., 2008)، عملکرد دانه، کاه و کلش (Hossain and Sattar, 2014) گندم شدند. پژوهشگران بهبود ارتفاع بوته (۳۴ درصد)، شاخه‌دهی (۴۱ درصد)، تعداد غلاف در بوته (۸۵ درصد)، عملکرد تر غلاف (۲/۹ درصد) و کاهش ۵۸ درصدی بیماری فوزاریوم (*Fusarium solani*) گیاه لوبیا را پس از تلقیح با قارچ *T. hamatoum* گزارش کردند (Abd-El-Khair et al., 2010).

جدول ۲: مقایسه میانگین برهمکنش کود روی و تیمار زیستی در وزن خشک اندام‌های گیاه سویا

روی (درصد توصیه شده)	تیمار زیستی	وزن خشک ساقه (گرم در بوته)	وزن خشک غلاف (گرم در بوته)	وزن خشک بوته (گرم در بوته)
۰	شاهد	۱۰/۰۱^{d}	۲۷/۶۷^{d}	۳۹/۳۷^{f}
	باکتری	۱۳/۵۷^{abc}	۳۹/۱۷^{a}	۵۴/۹۴^{ab}
	قارچ	۱۲/۵۹^{bcd}	۳۲/۶۳^{bcd}	۴۷/۲۴^{cde}
	باکتری + قارچ	۱۲/۵۳^{bcd}	۳۵/۲۵^{abc}	۵۰/۶۳$^{a-e}$
۵۰	شاهد	۱۱/۸۳^{cd}	۳۰/۹۹^{cd}	۴۴/۳۴^{ef}
	باکتری	۱۲/۷۶$^{a-d}$	۲۹/۴۸^{cd}	۴۴/۵۳^{ef}
	قارچ	۱۲/۷۰$^{a-d}$	۳۷/۲۵^{ab}	۵۲/۰۲$^{a-d}$
	باکتری + قارچ	۱۲/۷۹^{abc}	۳۳/۱۵^{bcd}	۴۸/۳۳$^{b-e}$
۱۰۰	شاهد	۱۲/۷۵$^{a-d}$	۳۰/۶۸^{cd}	۴۵/۳۴^{def}
	باکتری	۱۲/۸۰$^{a-d}$	۳۱/۰۱^{cd}	۴۶/۳۳^{de}
	قارچ	۱۵/۵۱^{a}	۳۵/۰۲^{abc}	۵۳/۱۹^{abc}
	باکتری + قارچ	۱۴/۹۱^{ab}	۳۹/۱۲^{a}	۵۷/۲۳^{a}
عدد LSD		۲/۸۶	۵/۸۵	۶/۸۵

در هر ستون میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

نتایج برهمکنش کودهای پتاسیم، روی و تیمار زیستی بیانگر این بود که کاربرد تیمارهای زیستی همراه با کودهای شیمیایی نقش مثبتی بر رشد برگ سویا داشته است، به‌طوری که بیشترین وزن خشک برگ (۴/۰۵ گرم در بوته) در تیمار تلقیح باکتری + قارچ با سطح ۵۰ درصد کود پتاسیم و ۱۰۰ درصد کود روی مشاهده شد که نسبت به گیاهان تلقیح نشده که تحت تیمار کود پتاسیم ۵۰ درصد و روی ۱۰۰ درصد قرار گرفته بودند بیش از ۶۵ درصد و نسبت به گیاهان تلقیح نشده تحت تیمار کود پتاسیم ۵۰ و روی صفر بیش از ۱۰۰ درصد افزایش داشت (جدول ۳). در پژوهش‌های گذشته نیز، باکتری‌های افزاینده رشد سبب بهبود جوانه‌زنی بذر ذرت (سیدشریفی و خاوازی، ۲۰۱۲) و وزن خشک ریشه، عملکرد کاه و کلش و عملکرد دانه نخود (Verma et al., 2013) و برنج (Bakhshandeh et al., 2015) گردید. از طرفی، نتایج دونی و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که تریکودرما باعث بهبود ارتفاع بوته، تعداد برگ، تعداد پنجه، طول ریشه و وزن تر ریشه برنج شد. در گیاه گندم نیز کاربرد تلفیقی باکتری افزاینده رشد *Entrobacter* sp. و قارچ *T. hamatum* موجب افزایش صفاتی از قبیل طول سنبله، عملکرد دانه و زیست توده شد (محمدی‌کشکا و همکاران، ۱۳۹۵). نتایج پژوهش حاضر نیز حاکی از هم‌افزایش اثر این ریزجانداران در شرایط تلقیح همزمان بود (جدول ۳).

جدول ۳: مقایسه میانگین برهمکنش کودهای پتاسیم و روی و تیمار زیستی در وزن خشک برگ (گرم در بوته) گیاه سویا

پتاسیم (درصد توصیه شده)	روی (درصد توصیه شده)	تیمار زیستی			
		شاهد	باکتری	قارچ	باکتری + قارچ
۵۰	۰	۱/۹۴$^{d-g}$	۲/۸۶$^{b-e}$	۲/۲۷$^{c-g}$	۳/۱۵^{abc}
	۵۰	۱/۴۱^{fg}	۲/۹۲$^{a-d}$	۲/۳۵$^{c-g}$	۲/۸۲$^{b-e}$
	۱۰۰	۲/۴۵$^{c-g}$	۳/۶۴^{ab}	۲/۴۵$^{c-g}$	۴/۰۵^{a}
۱۰۰	۰	۱/۴۲^{fg}	۱/۵۴^{fg}	۱/۷۵^{efg}	۲/۵۴$^{b-f}$
	۵۰	۱/۶۲^{fg}	۱/۶۵^{fg}	۱/۷۷^{efg}	۱/۹۳$^{d-g}$
	۱۰۰	۱/۳۵^{g}	۱/۳۹^{g}	۲/۸۳$^{b-e}$	۲/۱۶$^{c-g}$
عدد LSD		۱/۱۵			

میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

۴. نتیجه‌گیری

در مجموع، در بیشتر صفات مورد مطالعه، بکارگیری همزمان کودهای زیستی باسیلوس و تریکودرما به‌همراه عناصر کم مصرف روی و پرمصرف پتاسیم بهبود صفات رویشی گیاه سویا را به همراه داشت. بنابراین، کاربرد این باکتری و قارچ همراه با کودهای شیمیایی می‌تواند به‌عنوان راهکاری مناسب جهت بهبود رشد سویا معرفی شود.

سپاسگزاری

به‌این‌وسیله از پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان و دانشگاه علوم کشاورزی منابع طبیعی ساری به‌خاطر مساعدت‌ها و حمایت‌های مالی از این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. اسدی کنگرشاهی، ع. م. و ملکوتی، ج. ۱۳۸۲. کالیبراسیون روی در شرایط مزرعه‌ای و اثر آن در عملکرد سویا. مجله علوم خاک و آب، ۱۷(۲): ۱۱۷-۱۲۴.

۲. اسدی کنگرشاهی ع. و محمودی م. ۱۳۸۰. بررسی روند مصرف کودهای شیمیایی و پیامدهای ناشی از آن در استان مازندران. هفتمین کنگره علوم خاک ایران.

۳. آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی. ۱۳۹۹. آمارنامه کشاورزی سال زراعی ۱۳۹۸-۱۳۹۷(محصولات زراعی). دفتر آمار و فناوری اطلاعات.

۴. بای بوردی ا. ۱۳۸۵. نقش روی در تغذیه گیاهی و حاصلخیزی خاک. چاپ اول، ۱۸۰ ص.

۵. تقوی قاسمخیلی،ف.، پیردشتی ه.، تاجیک قنبری م.ع. و بهمنیار م.ع. ۱۳۹۳. تأثیر قارچ تریکودرما (*Trichoderma harzianum*) برعملکرد دانه گندم (*Triticum aestivum* L.) در سطوح مختلف نیترات کادمیوم. نشریه پژوهش‌های زراعی ایران. ۱۲(۳): ۲۵۴ - ۴۶۲.

۶. سیدشریفی، ر. و خاوازی، ک.۱۳۹۰. تاثیر باکتری‌های محرک رشد بر مؤلفه‌های جوانه زنی و رشد گیاه ذرت(*Zea mays* L.). نشریه علمی بوم‌شناسی کشاورزی، ۳: ۵۱۳-۵۰۶.

۷. فقیه‌عبدالهی ل.، پیردشتی ه. یعقوبیان ی. و علوی س.م. ۱۳۹۴. پیامد کاربرد قارچ‌های *Piriformospora indica* و *Trichoderma tomentosum* بر رشد گیاه دارویی ریحان (*Ocimum basilicum* L.) در سطوح مختلف نیترات مس. ۵(۱): ۱۲۷-۱۱۳.

۸. قاسمی م.، مبصر ح.ر.، اسدی‌منش ح. و قلی‌زاده ع. ۱۳۹۲. بررسی اثرات پتاسیم، روی و سیلیسیم بر عملکرد و اجزای عملکرد و جذب آنها در دانه برنج (*Oryza sativa L.*). نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار. ۴ (۲): ۲۴-۱.

۹. محمدی کشکا ف.، پیردشتی ه.، یعقوبیان ی و بخشنده ا. ۱۳۹۵. ارزیابی صفات رشدی و پایداری عملکرد گندم با کاربرد تریکودرما و اینتروباکتر. نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار، ۲۶(۴). ۱۵-۱.

۱۰. محمدی کشکا ف.، پیردشتی ه.، یعقوبیان ی. و بخشنده ا. ۱۳۹۷. نقش تلقیح قارچ تریکودرما و باکتری اینتروباکتر بر بهبود عملکرد گندم (*Triticum aestivum* L.) در سطوح مختلف کود فسفر. نشریه بوم شناسی کشاورزی. ۱۰(۲): ۴۴۳-۴۳۰.

۱۱. ملکوتی م. ۱۳۷۸. روش جامع تشخیص و ضرورت مصرف بهینه کودهای شیمیایی. چاپ چهارم. دفتر نشر آثار علمی دانشگاه تربیت مدرس. ۱۳۱ ص.

۱۲. ملکوتی م. و غیبی م. ۱۳۷۹. تعیین حد بحرانی عناصر غذایی محصولات استراتژیک و توصیهٔ صحیح کودی در کشور .چاپ دوم. نشر آموزش کشاورزی. ۹۲ ص.

13. Abd-El-Khair H., Khalifa R.K.M. and Haggag K.H.E. 2010. Effect of *Trichoderma* species on damping off diseases incidence, some plant enzymes activity and nutritional status of bean plants. Journal of American Science, 6(9): 486-497.
14. Abdraimova N.A., Umbetov A.K., Yeleshev R.E. and Goos R.J. 2014. Effect of mineral and organic fertilizers on the Soybean (*Glycine max* L.) yield and fertility of the irrigated soils. Life Science Journal, 11(11): 256-261.
15. Bahari Saravi, H., Gholami, A., Pirdashti, H., Firouzabadi, M.B., Asghari, H. and Yaghoubian, Y., 2022. Improvement of salt tolerance in Stevia rebaudiana by co-application of endophytic fungi and exogenous spermidine. Industrial Crops and Products, 177: 114443. doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114443
16. Bakhshandeh E., Rahimian H., Pirdashti H. and Nematzadeh Gh.A. 2015. Evaluation of phosphate solubilizing bacteria on the growth and grain yield of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in northern Iran. Journal of Applied Microbiology, 119:1371-1382.
17. Doni F., Isahak A., Zain C.R.C.M. and Yusoff W.M.W. 2014. Physiological and growth response of rice plants (*Oryza sativa* L.) to *Trichoderma* spp. inoculants. Amb Express,, 4: 2-7.
18. Fageria N.K. 2009. The Use of Nutrients in Crop Plants. CRC Press, Publisher Taylor and Francis Group, New York.
19. FAOSTAT Production Statistics of Crops. Available at: http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E.

20. Franzen D.W. 1999. Soybean soil fertility. North Dakota State University Publication, SF-1164.
21. Hermosa R., Viterbo A., Chet I. and Monte E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology, 158: 17-25.
22. Hoeft R.G., Nafziger E.D., Johnson R.R. and Aldrich,. R. 2000. Modern Corn and Soybean Production, MCSP Publications, USA.
23. Hossain M.B. and Sattar M.A. 2014. Effect of inorganic phosphorus fertilizer and inoculants on yield and phosphorus use efficiency of wheat. Journal of Environmental Science and Natural Resources, 7: 75-79.
24. Jan K., Boswal M.V. 2015. Effect of biofertilizer and organic fertilizer on physiological characteristics of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). International Journal of Scientific Research and Management, 3 (2): 2073-2089.
25. Kızılkaya R. 2008. Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. Ecological Engineering, 33: 150-156.
26. Lavakush Y.J., Verma J.P., Jaiswal D.K., and Kumar A. 2014. Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa* L.). Ecological Engineering 62: 123-128.
27. Malakouti M.J., 2007. Zinc is a neglected element in the life cycle of plants. Middle Eastern and Russian Journal of Plant Science and Biotechnology, 1 (1):1-12.
28. Mishra D.J., Rajvir S., Mishra U.K. and Kumar S.S., 2013. Role of bio-fertilizer in organic agriculture: a review. Research Journal of Recent Sciences, 2: 39-41.
29. Preeti V., Reddy M.S. and Kavitha, S. 2002. Role of biological preparations in enhancement of rice seedling growth and grain yield. Plant Biology, 44: 503-507.
30. Sengupta C., Bhosale A. and Malusare S. 2015. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on seed germination and seedling development of *Zea mays*. International Journal of Research in Advent Technology Special Issue, National Conference on Advances and Chalenges in Green Technology, Pune, India, 13-14 February p. 32-40.
31. Shaharoona B., Naveed M., Arshad M. and Zahir Z.A., 2008. Fertilizer-dependent efficiency of Pseudomonads for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). Applied Microbiology and Biotechnology, 79: 147-155.
32. Shahid M., Hameed S., Imran A., Ali S. and Van Elsas, J.D. 2012. Root colonization and growth promotion of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by phosphate solubilizing *Enterobacter* sp. Fs-11. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28: 2749-2758.
33. Verma J.P., Yadav J., Tiwari K.N. and Kumar A. 2013. Effect of indigenous Mesorhizobium spp. and plant growth promoting rhizobacteria on yields and nutrients uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under sustainable agriculture. Ecological Engineering, 51: 282-286.
34. Yaghoubian Y., Mohammadi Goltapeh E., Pirdashti H., Esfandiari E., Feiziasl V., Kari Dolatabadi H., Varma A. and Haryani Hassim M. 2014. Effect of *Glomus mossea* and *Piriformospora indica* on defense mechanism and lipid peroxidation of wheat under drought stress. Agricultural Research, 3(3): 239-245.
35. Yaghoubian Y., Siadat S.A., Moradi Telavat M.R., Pirdashti H., and Yaghoubian, I. 2019. Bio-removal of cadmium from aqueous solutions by filamentous fungi: *Trichoderma* spp. and *Piriformospora indica*. Environmental Science and Pollution Research, 26(8): 7863-72. https://doi.org/10.1007/s11356-019-04255-6

Effect of salinity stress on yield and some fruit quality characteristics of Iranian melon under soilless culture

Behrooz Sarabi[1,2*]; Sahebali Bolandnazar[3]

1- Department of horticultural sciences and engineering, Faculty of agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
2- Research center of medicinal plants breeding and development, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
3- Department of horticultural sciences, Faculty of agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

*b.sarabi@uok.ac.ir

Abstract

Adverse effects of salinity on plant growth are associated with low osmotic potential of the solution, nutritional imbalance and special ionic effects. Qualitative characteristics play a vital role in the acceptance and marketing of various products. Environmental stresses, including salinity stress, can affect fruit yield and quality. *C. melo* is the most diverse species of the genus *Cucumis* and even vegetables, which has a wide variety in shape and size. About 50% of vegetable production in Iran belongs to Cucurbitaceae. In order to investigate the effect of salinity stress on yield and quality characteristics of Iranian melon fruits, a factorial experiment was conducted in a completely randomized design with three replications in the research greenhouse of the Faculty of Agriculture, University of Kurdistan. Experimental treatments included four salinity levels (0, 30, 60 and 90 mM NaCl) and five Iranian Melon (Khatouni, Suski-e-Sabz, Ghobadlu, Samsuri, Kashan, and Galia F1 cultivar). The results of analysis of variance (ANOVA) showed that the effects of salinity and population on all studied traits (except fruit firmness) were statistically significant at the level of 1% probability. With increasing salt concentration, a significant increase in acidity, Brix degree, electrical conductivity of fruit juice, vitamin C, total phenol content and antioxidant capacity of fruits were recorded. However, increasing the level of salt stress caused a significant decrease in pH, fruit weight, number of fruits per plant and yield. Among the studied genotypes, Galia F1 cultivar had the highest pH and highest degree of brix, electrical conductivity of fruit juice, vitamin C content, phenol content, fruit number and yield. The highest acidity and firmness of the fruit was observed in Khatouni population. Also, Suski-e-Sabz population had the highest antioxidant capacity and fruit weight.

Keywords: Melon, population, greenhouse

اثر تنش شوری بر عملکرد و برخی خصوصیات کیفی میوه توده‌های خربزه و طالبی ایران تحت کشت بدون خاک

بهروز سرابی[۱و۲*]؛ صاحبعلی بلندنظر[۳]

۱- استادیار گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
۲- مرکز پژوهشی اصلاح و توسعه گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
۳- استاد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

b.sarabi@uok.ac.ir

چکیده

اثرات زیانبار شوری بر رشد گیاه در ارتباط با پتانسیل اسمزی پایین محلول، عدم تعادل تغذیه‌ای و اثرات ویژه یونی است. خصوصیات کیفی نقش حیاتی را در پذیرش و بازارپسندی محصولات مختلف بازی می‌کنند. تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری می‌توانند عملکرد و کیفیت میوه را تحت تأثیر قرار دهند. *C. melo* متنوع‌ترین گونه سرده *Cucumis* و حتی سبزی‌ها می‌باشد که تنوع وسیعی از نظر شکل و اندازه دارد. نزدیک به ۵۰ درصد تولید سبزی‌ها در ایران مربوط به کدوییان است. به منظور بررسی اثر تنش شوری بر عملکرد و خصوصیات کیفی میوه طالبی و خربزه بومی ایران آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل چهار سطح شوری (صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی مولار کلرید سدیم) و پنج توده خربزه و طالبی بومی (خاتونی، سوسکی سبز، قبادلو، سمسوری، کاشان و رقم گالیا F1) بود. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثرات ساده شوری و توده بر همه صفات مورد بررسی (به جز سفتی میوه) در سطح احتمال آماری ۱ درصد معنی‌دار شده بود. با افزایش غلظت نمک افزایش معنی‌دار اسیدیته، درجه بریکس، هدایت الکتریکی عصاره میوه، ویتامین ث، محتوای فنل کل و ظرفیت ضداکسایشی میوه‌ها ثبت گردید. در صورتی که افزایش سطح تنش شوری باعث کاهش معنی‌دار pH، وزن میوه، تعداد میوه در بوته و عملکرد گردید. در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، رقم گالیا F1 بالاترین pH و بیشترین درجه بریکس، هدایت الکتریکی عصاره میوه، محتوای ویتامین ث، محتوای فنل، تعداد میوه و عملکرد را دارا بود. بیشترین میزان اسیدیته و سفتی میوه هم در توده خاتونی مشاهده گردید. همچنین توده سوسکی سبز بیشترین ظرفیت ضداکسایشی و وزن میوه را دارا بود.

واژگان کلیدی: ملون، توده، گلخانه

۱. مقدمه (طرح مسئله، اهمیت و سوابق پژوهش)

به دلیل محدود بودن زمین‌های قابل کشت و تقاضای فراوان برای محصولات در سراسر جهان، گیاهان به دفعات تحت شرایط نامساعد خاک کشت می‌شوند. این شرایط شامل شوری، قلیاییت، فلزات سنگین و مقادیر زیادی عناصر کم مصرف می‌باشد. گیاهان در معرض شرایط نامساعد شیمیایی خاک، نابسامانی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلفی را نشان می‌دهند که منجر به توقف رشد و کاهش

شدید عملکرد می‌گردد. طبق تعریف آزمایشگاه خاکشناسی آمریکا، وقتی که هدایت الکتریکی (EC[۴۴۲]) محلول بدست آمده از خاک در حالت اشباع آبی آن بیشتر از ۴ ($dS\ m^{-1}$) و درصد سدیم قابل تبادل کمتر از ۱۵ باشد، خاک را به عنوان شور در نظر می‌گیرند. شوری هم در زمین‌های آبی و هم دیم در نتیجه تبخیر و تعرق آب‌های شور زیرزمینی و یا در نتیجه استفاده از آب آبیاری با کیفیت پایین بوجود می‌آید. شورشدن خاک بویژه در نواحی خشک و نیمه خشک که میزان بارندگی برای آبشویی کافی نیست، معمول می‌باشد. فرآیند شورشدن به طور ویژه در شرایط گلخانه که نبود آبشویی توسط بارندگی و کاربرد زیاد کودها منجر به افزایش چشم‌گیر در میزان هدایت الکتریکی می‌گردد (بویژه وقتی که آب با کیفیت پایین استفاده می‌شود)، مشهود است (Darwish et al., 2005). اثرات زیانبار شوری بر رشد گیاه در ارتباط با پتانسیل اسمزی پایین محلول خاک، عدم تعادل تغذیه‌ای و اثرات ویژه یونی است (Marschner, 1995). نتیجه این عوامل می‌تواند به دلیل توقف رشد و خسارت مولکولی، باعث مرگ گیاه شود. به طور کلی شوری عملکرد سبزی‌ها را کاهش می‌دهد ولی در بسیاری موارد کیفیت آنها را بهبود می‌بخشد (Francois and Maas, 1994). بررسی‌های متعددی نشان داده‌اند که افزایش شوری، میوه‌هایی با محتوای بالاتر از قندها، اسیدهای آلی و ماده خشک تولید می‌کند که موجب طعم بهتر و ارزش غذایی بالاتر می‌گردد.

C. melo متنوع‌ترین گونه سرده *Cucumis* و حتی سبزی‌ها می‌باشد که تنوع وسیعی از نظر شکل و اندازه دارد. نزدیک به ۵۰ درصد تولید سبزی‌ها در ایران مربوط به کدوییان است. در ایران که از مراکز تنوع و نیز اهلی‌شدن ملون‌ها در جهان به شمار می‌آید و امروزه انواع گوناگون آن در سطح گسترده‌ای کشت می‌شوند، پنج نوع ملون متمایز و شناخته‌شده وجود دارد که شامل خربزه، طالبی، گرمک، دستنبو و خیار چنبر است. گروه‌های اصلی ملون‌های کشت شده در ایران خربزه و طالبی هستند. مناطق زیر کشت خربزه و طالبی در ایران اغلب در نواحی خشک و نیمه‌خشک هستند که معمولاً دچار مشکل شوری نیز هستند. توده‌های بومی این گیاهان مقاومت‌های مختلفی نسبت به شوری از خود نشان می‌دهند و مطالعات بیانگر این مسئله هستند که توده‌های موجود از حساس تا نیمه‌متحمل نسبت به شوری می‌باشند، منتهی اطلاعات کمی بر اساس پژوهش‌های علمی در مورد میزان تحمل به شوری توده‌های خربزه و طالبی وجود دارد. با توجه به این موارد، پژوهشی با هدف کشت توده‌های خربزه و طالبی در محیط گلخانه تحت تنش شوری در شرایط کشت بدون خاک و اندازه‌گیری صفات کیفی میوه‌های تشکیل شده (از جمله pH، اسیدیته، مواد جامد محلول، محتوای فنل، ویتامین ث، ظرفیت آنتی اکسیدان، سفتی) و همچنین عملکرد آنها انجام گردید.

۲.مواد و روش‌ها

این پژوهش در گلخانه تحقیقاتی و آزمایشگاه فیزیولوژی باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان اجرا شد. بذر توده‌های خربزه و طالبی بومی ایران، از کشاورزان محلی جمع‌آوری شد و بذر خربزه رقم گالیا F1 نیز از شرکت New American Seed Company (آمریکا) تهیه گردید. برای کاشت گیاهان در گلخانه، ابتدا بذرهای هر رقم به طور جداگانه با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ده دقیقه، ضدعفونی سطحی شده و سپس با آب مقطر به میزان کافی شسته شدند. بعد از این مرحله، بذرهای هر رقم به طور جداگانه در ظرف محتوی آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت آبنوشی انجام دادند. سپس بذرها داخل پتری‌دیش و درون انکوباتور جوانه‌دار شدند. بعد از سه روز بذرهای جوانه‌زده در اوایل اردیبهشت ماه به طور مستقیم در محیط کشت اصلی کشت شدند. آزمایش به صورت کشت بدون خاک در بستر مخلوطی از پرلیت (۵۰٪) و کوکوپیت (۵۰٪) در کیسه‌های پلاستیکی ۵ لیتری انجام شد. کیسه‌های پلاستیکی طبق طرح آزمایشی فاکتوریل دو عاملی شامل توده (پنج توده خربزه و طالبی بومی ایران به همراه یک رقم خارجی) و عامل شوری

[442] . Electrical conductivity

(به صورت یک سطح شاهد و سه سطح شوری) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار (هر تکرار با چهار کیسه پلاستیکی) در گلخانه توزیع شدند. گیاهان در گلخانه، تحت نور طبیعی و دمای روز و شب ۳۵ - ۱۸ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی روز و شب بین ۵۵ تا ۷۵ درصد و طول روز طبیعی رشد کردند. دوره رشد گیاهان از اوایل اردیبهشت لغایت اوایل مهرماه ۱۳۹۳ بود. محلول‌دهی گیاهان بر اساس نصف غلظت فرمول غذایی هوگلند صورت گرفت. در ادامه رشد، ساقه اصلی بوته بعد از ظهور دو ساقه فرعی قطع (هرس) و به‌وسیله نخ‌های پلاستیکی دو ساقه فرعی به داربست تهیه شده در بالای گیاهان وصل گردیدند. تیمار تراش به صورت حذف تمام ساقه‌های فرعی ثانویه و گل‌ها تا گره ششم انجام شد و گل‌های ماده تشکیل‌شده بین گره‌های ششم تا هشتم به تدریج و روزانه بین ساعت ۹ تا ۱۲ قبل از ظهر به صورت دستی گرده‌افشانی گردیدند. میوه‌های تشکیل شده را زمانی که قطر آنها به حدود پنج سانتیمتر رسید، داخل تورهای پلاستیکی قرار داده و به داربست تهیه شده برای گیاهان آویزان شدند. اعمال تیمارهای شوری به صورت افزودن نمک (غلظت‌های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) به محلول غذایی هوگلند و پس از استقرار گیاهان (یک ماه بعد از کشت بذر) به صورت روزانه تا انتهای آزمایش صورت گرفت. محلول‌های شاهد، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به ترتیب دارای هدایت الکتریکی ۱/۱۸۶، ۳/۶۷، ۶/۵۲ و ۹/۲۳ دسی‌زیمنس بر متر بودند. در این تحقیق جهت ارزیابی صفات کیفی میوه در پایان دوره کشت، سه بوته از هر تیمار مربوط به توده‌ها انتخاب و خصوصیات زیر اندازه‌گیری گردید. اندازه‌گیری اسیدیته با استفاده از روش تیتراسیون با هیدروکسید سدیم، مواد جامد محلول (درجه بریکس) با استفاده از رفراکتومتر، pH آبمیوه نیز با استفاده از دستگاه پی‌اچ متر و EC آن با استفاده از یک هدایت‌سنج الکتریکی اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری ویتامین ث از روش تیتراسیون با محلول ۲ و ۶ دی کلروفنل ایندوفنل (DCPIP) استفاده شد. (AOAC, 2005). محتوای فنل میوه به روش فولین - سیکالتیو اندازه‌گیری و از اسید گالیک به عنوان محلول استاندارد استفاده شد (Slinkard and Singleton, 1977). ظرفیت ضد اکسایشی کل با استفاده از روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی به کمک ۲،۲- دی فنیل- ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان خنثی‌کردن رادیکال‌های آزاد به صورت درصد گزارش گردید (Kulkarni and Aradhya, 2005). برای اندازه‌گیری سفتی گوشت میوه از دستگاه فشارسنج مدل (Santam, STM-1, Iran) استفاده و میزان سفتی بر حسب نیوتن گزارش گردید. همچنین میوه‌های برداشت شده از هر بوته شمارش و وزن هر میوه بوسیله ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام گرفت.

۳. نتایج و بحث

۳-۱- اسیدیته، pH و درجه بریکس میوه

اثرات ساده شوری و توده بر اسیدیته، pH و درجه بریکس میوه در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد. در صورتی که اثرات متقابل تنش شوری در توده برای این صفات معنی‌دار نشد (جدول ۳-۱). با افزایش غلظت نمک کلرید سدیم میزان اسیدیته بیشتر شده بود و این افزایش از تیمارهای ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به شکل معناداری ثبت گردید و میزان اسیدیته این تیمارها نسبت به سطح شاهد به ترتیب ۱/۴ و ۲ برابر شده بود. توده‌های قبادلو و خاتونی بیشترین و توده کاشان هم کمترین محتوای اسیدیته را دارا بودند (جدول ۳-۲). کاهش pH میوه همراه با افزایش غلظت کلرید سدیم به شکل معنی‌داری گزارش گردید. رقم گالیا بالاترین pH را دارا بود و بعد از آن توده‌های کاشان و سمسوری قرار داشتند. توده‌های سوسکی سبز، خاتونی و قبادلو هم به ترتیب کمترین pH میوه را نشان دادند (جدول ۳-۲). با افزایش غلظت کلرید سدیم، غلظت مواد جامد محلول (درجه بریکس) هم بیشتر شده بود. رقم گالیا به صورت معنی‌داری بیشترین درجه بریکس را دارا بود و بعد از آن به ترتیب توده‌های قبادلو، سوسکی سبز و کاشان که اختلاف آماری معنی‌داری با هم نداشتند، قرار گرفتند. در توده‌های سمسوری و خاتونی هم کمترین میزان درجه بریکس ثبت شد (جدول ۳-۲).

طعم میوه عمدتاً به وسیله عواملی مانند مقدار قند (فروکتوز و گلوکز) و مقدار اسید آلی (اسید سیتریک، اسید مالیک و اسیدیته کل) اندازه‌گیری می‌شود. هر چه مقدار قند و اسید در میوه افزایش یابد، طعم میوه بهتر خواهد شد. شوری می‌تواند از طریق افزایش مقدار اسید و قند، سبب بهبود کیفیت و طعم میوه شود. برخی از محققین همچنین بیان کرده‌اند که کاهش انتقال آب ناشی از شوری محیط رشد گیاه سبب واکنش فیزیولوژیک گیاه در ساخت اسیدهای آلی از اگزالواستات‌ها طی چرخه اسید سیتریک می‌شود که منجر به افزایش برخی از اسیدهای آلی از جمله اسید سیتریک می‌گردد (Sato et al., 2006). افزایش میزان قند و اسید ناشی از تنش شوری توسط سایر نویسندگان برای برخی میوه‌های دیگر از جمله توت‌فرنگی (Keutgen and Pawelzik, 2008)، نیز گزارش شده است. دلشاد و همکاران (۱۳۹۲) بهبود شیرینی میوه‌ها را در دو توده خربزه ایرانی تحت تنش کم آبی مشاهده کردند. در آزمایش زینلی و همکاران (۱۳۹۱) نیز اثر مثبت تنش آبی تعدیل یافته بر میزان قند میوه (گلوکز، فروکتوز و ساکارز) دو ژنوتیپ دستنبوی ایرانی و یک رقم طالبی سمسوری ورامین مشاهده شد.

۲-۳- هدایت الکتریکی

بر اساس تجزیه واریانس، مشخص گردید که اثرات ساده تنش شوری و توده در سطح احتمال ۱٪ و اثرات متقابل تنش شوری در توده بر این صفت در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود. با بیشتر شدن غلظت کلرید سدیم میزان هدایت الکتریکی میوه به صورت کاملاً مشخصی افزایش یافته بود. طبق جدول، افزایش ۲۰/۱۸، ۳۵/۴۷ و ۶۱/۷۷ درصدی هدایت الکتریکی میوه در تیمارهای ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در مقایسه با سطح شاهد ثبت شد (جدول ۳-۱). رقم گالیا، توده‌های قبادلو و سوسکی سبز به ترتیب بیشترین و توده‌های کاشان و سمسوری هم که اختلاف آماری معنی‌داری با هم نداشتند، کمترین مقدار هدایت الکتریکی را نشان دادند (جدول ۳-۲). به نظر می‌رسد که کاهش مقادیر آب میوه به واسطه پتانسیل پایین آب در گیاه و برگ و همچنین افزایش غلظت برخی از عناصر مانند سدیم و کلر در میوه، نقش مهمی در افزایش هدایت الکتریکی عصاره میوه داشته باشند (De Pascale et al., 2003).

۳-۳- ویتامین ث

طبق جدول، اثرات ساده شوری، توده و همچنین اثرات متقابل شوری در توده بر این صفت در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار نشان داد. میزان ویتامین ث همگام با افزایش غلظت کلرید سدیم به صورت معنی‌داری بیشتر شده بود. به صورتی که در تیمارهای ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در مقایسه با سطح شاهد، محتوای ویتامین ث به ترتیب ۷/۲۸، ۴۵/۱۵ و ۷۹/۱۳ درصد افزایش نشان داد (جدول ۳-۱). رقم گالیا بیشترین ویتامین ث را دارا بود و بعد از آن به ترتیب توده‌های کاشان و سمسوری قرار داشتند (جدول ۳-۲).

دلیل افزایش میزان ویتامین ث (اسید آسکوربیک) که تحت تنش شوری رخ داده بود، ممکن است مرتبط با نقش کلیدی اسید آسکوربیک به عنوان یک سیستم غیرآنزیمی و یک آنتی‌اکسیدان قوی در پاسخ به خسارت ناشی از شوری باشد. مشخص شده است که اسید آسکوربیک جز مهمی است که با اکسیژن‌های منفرد و سایر رادیکال‌های آزاد واکنش داده و مانع پراکسیداسیون می‌گردد (Dorais et al., 2008). در نتایج مشابهی، Malash et al. (2002) گزارش کردند که افزایش شوری در محلول غذایی منجر به افزایش میزان ویتامین ث در میوه‌های گوجه‌فرنگی گردیده است و این امر را نتیجه کاهش مقادیر آب میوه به دنبال کاهش پتانسیل آب گیاه دانستند. Cuartero and Fernandez-Munoz (1999) نیز تأثیر مثبت افزایش شوری در محلول غذایی بر افزایش مقادیر ویتامین ث گوجه‌فرنگی را به تجمع مونوساکاریدها در میوه مرتبط دانستند.

۳-۴- ترکیبات فنلی کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی میوه

اثرات ساده شوری و توده بر ترکیبات فنلی کل در سطح احتمال آماری ۱٪ معنی‌دار شده بود ولی اثرات متقابل تنش شوری در توده بر این صفت غیرمعنی‌دار بود. همراه با افزایش غلظت کلرید سدیم، ترکیبات فنلی کل میوه هم افزایش یافت. این افزایش در تیمارهای ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در مقایسه با سطح شاهد و تیمار ۳۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به صورت معنی‌دار گزارش گردید. طبق مقایسه میانگین سطوح مختلف شوری، در تیمارهای ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در مقایسه با سطح شاهد ترکیبات فنلی کل میوه به ترتیب ۱/۹۳ و ۱/۸۸ برابر شده بود (جدول ۳-۱). بیشترین میزان فنل در رقم گالیا ثبت شد و بعد از آن توده‌های قبادلو، سوسکی سبز و کاشان قرار داشتند. توده سمسوری هم کمترین محتوای فنل را دارا بود (جدول ۳-۲).

نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از آزمایش، اثرات ساده تنش شوری و توده بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی میوه را در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار نشان داد در صورتی که اثرات متقابل تنش شوری در توده معنی‌دار نشد. با وجودی که اختلاف آماری بین تیمارهای ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار معنی‌دار نبود ولی به طور کلی همراه با افزایش سطح تنش شوری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی توده‌ها بیشتر شده بود. بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در تیمار ۶۰ میلی‌مولار ثبت شد (جدول ۳-۱). توده‌های سوسکی سبز، سمسوری، رقم گالیا و توده قبادلو هم با وجودی که اختلاف آماری معناداری با هم نداشتند، به ترتیب بیشترین فعالیت ضداکسایشی میوه را دارا بودند (جدول ۳-۲).

ترکیبات فنلی به عنوان متابولیت‌های ثانویه نقش اساسی را در تنظیم رشد و نمو گیاه ایفا می‌کنند و می‌توانند به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های قوی در بافت‌های گیاهی تحت تنش‌های مختلف از جمله شوری افزایش یابند (Dixon and Paiva, 1995). نتایج ما از این تئوری حمایت می‌کند که پلی‌فنل‌ها به عنوان متابولیت‌های ثانویه، بافت‌های گیاهی را بر علیه تنش اکسایشی ناشی از شوری محافظت می‌کنند و در تحمل گیاه به شوری نقش دارند. ترکیبات فنلی میوه به عنوان آنتی‌اکسیدان در سلامتی انسان نیز نقش دارند (Kroon and Williamson, 1999).

۳-۵- سفتی میوه

اثر مستقل تنش شوری و همچنین اثرات متقابل تنش شوری در توده برای سفتی میوه غیر معنی‌دار نشان داد ولی اثر مستقل توده‌ها در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شده بود (جدول ۳-۱). بین گیاهان مورد مطالعه، توده‌های خاتونی و قبادلو به ترتیب بیشترین سفتی میوه را دارا بودند. توده‌های کاشان و سمسوری هم به صورت کاملاً مشخصی کمترین سفتی میوه را نشان دادند (جدول ۳-۲). می‌توان بیان کرد که با افزایش غلظت نمک، به طور کلی سفتی میوه روند افزایشی داشته است که این امر در توده سمسوری و رقم گالیا به خوبی مشخص است. در آزمایش مشابهی، Botia et al. (2005) گزارش کردند که تنش شوری در خربزه سفتی گوشت میوه را افزایش می‌دهد. برزگر و همکاران (۱۳۹۰) هم اختلاف در سفتی گوشت میوه خربزه را تحت تنش خشکی، به دلیل تفاوت‌های ژنتیکی در این توده‌ها عنوان کردند.

۳-۶- وزن میوه، تعداد میوه در بوته و عملکرد

اثرات ساده تنش شوری، توده و اثرات متقابل تنش شوری در توده بر وزن میوه، تعداد میوه در بوته و عملکرد در هکتار در سطح احتمال ۱٪ معنادار نشان داد. افزایش غلظت کلرید سدیم موجب کاهش معنی‌دار وزن میوه شده بود. به صورتی که در تیمارهای ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در مقایسه با سطح شاهد به ترتیب ۳/۰۳، ۱۷/۷۷ و ۲۵/۲۹ درصد کاهش ثبت شد (جدول ۳-۱).

بین کلیه توده‌ها اختلاف معنی‌داری از نظر وزن میوه وجود داشت. بیشترین وزن میوه به ترتیب در توده‌های سوسکی سبز، قبادلو، خاتونی، گالیا، کاشان و سمسوری مشاهده شد (جدول ۳-۲). تعداد میوه به ازای بوته همراه با افزایش سطح تنش شوری به شکل معنی‌داری کمتر شده بود و در تیمارهای ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در مقایسه با سطح شاهد به ترتیب ۹/۴، ۱۸/۷ و ۲۷/۵۷ درصد کاهش ثبت گردید. رقم گالیا بیشترین تعداد میوه به ازای بوته را دارا بود و بعد از آن به ترتیب توده‌های سمسوری، کاشان، سوسکی سبز، خاتونی و قبادلو قرار داشتند. به غیر از توده‌های سوسکی سبز و خاتونی که فاقد اختلاف آماری بودند، بین سایر گیاهان مورد مطالعه اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت. همراه با افزایش تنش شوری، کاهش قابل ملاحظه‌ای در عملکرد رخ داده بود. به نحوی که در تیمارهای ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در مقایسه با سطح شاهد به ترتیب ۱۲/۴۴، ۳۳/۵۳ و ۴۶/۸۴ درصد کاهش ثبت شد. در گیاهان مورد مطالعه، رقم گالیا و توده سوسکی سبز بیشترین عملکرد در هکتار دارا بودند و بعد از آنها به ترتیب توده‌های سمسوری، خاتونی، کاشان و قبادلو قرار داشتند.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که با افزایش هدایت الکتریکی محلول غذایی، میانگین وزن میوه‌ها کاهش یافت. هر گیاهی جهت تولید میوه بیشتر و رشد مناسب و به عبارتی دستیابی به عملکرد بالا، نیازمند رشد رویشی قوی و داشتن ذخایر غذایی کافی است. این رشد مناسب در صورتی میسر خواهد شد که جذب بهینه و کافی آب و عناصر غذایی توسط ریشه‌ها انجام شود (Turhan and Eris, 2004). از آنجا که افزایش هدایت الکتریکی و به عبارتی افزایش شوری در محلول غذایی، اثر شگرفی روی پتانسیل اسمزی محلول دارد و می‌تواند پتانسیل آب را در گیاه و به دنبال آن در برگ کاهش دهد (Elia et al., 2001)، لذا به واسطه چنین مکانیزمی آب کمتری توسط گیاه جذب شده و در نتیجه جریان آب به سمت میوه نیز کاهش می‌یابد (Ehret and Ho, 1986). به دلیل اینکه که بیش از ۹۰ درصد از وزن میوه ملون را آب تشکیل می‌دهد، پس وزن میوه‌ها در ملون تابعی از مقدار آب موجود در آن است. بنابراین با محدود شدن جریان آب به سمت میوه، اندازه و وزن آن کاهش خواهد یافت (Hohjo et al., 2001). همچنین به دنبال افزایش هدایت الکتریکی محیط ریشه، کاهش نفوذپذیری ریشه رخ می‌دهد که منجر به کاهش جذب آب توسط گیاه و متعاقباً میوه می‌شود (Cuartero and Fernandez-Munoz, 1999). اگرچه گیاهان ممکن است با شوری متوسط و پایین آب، سوخت و ساز معمولی داشته باشند و تنش را نشان ندهند، ولی برای حفظ این وضعیت احتیاج به مصرف انرژی بیشتری برای فعالیت متابولیسمی و چرخه فتوسنتز دارند که در نهایت منجر به کاهش رشد و عملکرد محصول می‌شود. لذا افزایش میزان مصرف انرژی به دنبال تنش شوری به علت مکانیزم گیاه برای تحمل شوری می‌باشد. برای مثال جهت ترمیم و نگهداری سلول‌هایی که به علت حضور زیاد نمک در ناحیه ریشه آسیب دیده‌اند، احتیاج به ترشح یون‌های بیشتری به داخل سلول می‌باشد (Munns, 1993). Cabello et al. (2009) در تحقیقی که بر روی خربزه انجام دادند نتیجه گرفتند که در شرایط کمبود آب میوه‌های کوچکتر تولید شده و عملکرد کاهش می‌یابد. Fabeiro et al. (2002) هم بیان کردند که تنش خشکی در مرحله گلدهی اساساً بر عملکرد طالبی مؤثر بود و موجب کمترین عملکرد می‌شود. ایشان بیان کردند که کاهش وزن میوه به دلیل کاهش فتوسنتز همراه با پیری برگ‌ها در اثر تنش می‌باشد. Huang et al. (2012)، Tedeschi al. (2011) و Colla et al. (2006) گزارش کردند که کاهش عملکرد ملون‌ها تحت تنش شوری به دلیل کاهش تعداد و متوسط وزن میوه‌ها رخ می‌دهد. در آزمایش برزگر و همکاران (۱۳۹۰) هم کاهش وزن متوسط میوه و عملکرد دو توده خربزه ایران تحت تنش کم‌آبی رخ داده بود.

۴. نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که تأثیر تنش شوری بر بیشتر صفات مورد مطالعه معنی‌دار بوده است و بین توده‌های خربزه و طالبی هم اختلاف قابل توجهی مشاهده شد. وجود تنوع ژنتیکی بین توده‌های مورد مطالعه از نظر صفات مورد بررسی، نوید

بخش به کارگیری آنها در برنامه‌های بهنژادی آینده می‌باشد. همچنین رقم گالیا به دلیل دارا بودن بیشترین میزان پی اچ، درجه بریکس، هدایت الکتریکی، ویتامین ث، فنل، تعداد میوه به ازای بوته و عملکرد در هکتار نسبت به توده‌های خربزه و طالبی ایران از برتری قابل توجهی برخوردار بود.

سطح تنش شوری	اسیدیته	pH میوه	درجه بریکس	هدایت الکتریکی	ویتامین ث	ترکیبات فنلی کل	ظرفیت ضداکسایشی	سفتی	وزن میوه	تعداد میوه در بوته	عملکرد در هکتار
شاهد	0/1 c	5/89 a	8/59 c	3/27 d	2/06 c	9/05 b	46/46 b	10/07 ab	1171/85 a	1/128 a	41/81 a
30 mM NaCl	0/11 c	5/69 b	8/94 bc	3/93 c	2/21 c	10/33 b	53/63 a	9/74 b	1136/3 b	1/022 b	36/61 b
60 mM NaCl	0/14 b	5/56 bc	9/76 ab	4/43 b	2/99 b	17/48 a	55/47 a	11/4 a	963/59 c	0/917 c	27/79 c
90 mM NaCl	0/2 a	5/45 c	10/53 a	5/29 a	3/69 a	17/09 a	55/23 a	10/68 ab	875/46 d	0/817 d	22/23 d
تنش شوری	**	**	**	**	**	**	**	ns	**	**	**
توده	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
تنش شوری × توده	ns	ns	ns	*	*	ns	ns	ns	**	*	**
ضریب تغییرات (%)	28/08	4/74	16/68	99/12	36/91	21/54	11/25	21/19	2/52	8/75	8/46

میانگین‌های صفات که در هر ستون دارای حروف مشابه هستند، فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ هستند.

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، *: معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ns: معنی‌دار نیست.

جدول ۳-۱- :مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف تنش شوری بر اسیدیته (درصد اسید سیتریک)،pH ، درجه بریکس، هدایت الکتریکی (dS/m)، ویتامین ث (میلی‌گرم در صد گرم وزن تر)، ترکیبات فنلی کل (میلی‌گرم اسید گالیک در صد گرم وزن تر)، ظرفیت ضداکسایشی (درصد)، سفتی (نیوتن)، وزن میوه (گرم)، تعداد میوه در بوته و عملکرد (تن) توده‌های خربزه و طالبی.

جدول ۳-۲- :مقایسه میانگین اسیدیته (درصد اسید سیتریک)، pH، درجه بریکس، هدایت الکتریکی (dS/m)، ویتامین ث (میلی‌گرم در صد گرم وزن تر)، ترکیبات فنلی کل (میلی‌گرم اسید گالیک در صد گرم وزن تر)، ظرفیت ضداکسایشی (درصد)، سفتی (نیوتن)، وزن میوه (گرم)، تعداد میوه در بوته و عملکرد (تن) توده‌های خربزه و طالبی تحت تنش شوری.

توده	اسیدیته	pHمیوه	درجه بریکس	هدایت الکتریکی	ویتامین ث	ترکیبات فنلی کل	ظرفیت ضداکسایشی	سفتی	وزن میوه	تعداد میوه	عملکرد در هکتار
سمسوری	0/12 bc	5/7 b	7/68 c	3/41 c	3/66 b	7/81 d	59/07 a	4/27 d	763/61 f	1/19 b	31/48 b
خاتونی	0/16 a	5/34 c	7/61 c	4/42 b	1/67 c	12/24 c	41/34 b	15/82 a	1182/08 c	0/78 d	30/66 b
کاشان	0/11 c	5/71 b	9/13 b	3/53 c	3/68 b	13/49 bc	42/63 b	5/21 d	821/39 e	1/08 c	29/7 bc
گالیا	0/12 bc	6/33 a	12/54 a	4/91 a	5/12 a	17/81 a	57/81 a	9/29 c	870/39 d	1/28 a	37/21 a
سوسکی سبز	0/15 ab	5/52 bc	9/79 b	4/53 ab	1/25 c	14/66 bc	60/28 a	12/9 b	1342/22 a	0/8 d	35/75 a
قبادلو	0/17 a	5/3 c	9/98 b	4/58 ab	1/06 c	14/94 b	55/06 a	15/34 a	1241/11 b	0/69 e	27/86 c

میانگین‌های صفات که در هر ستون دارای حروف مشابه هستند، فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ هستند.

منابع

۱. برزگر، ط.، دلشاد، م.، مجدآبادی، ع.، کاشی، ع.ا. و قشقایی، ژ. ۱۳۹۰. اثر تنش کم‌آبی بر رشد، عملکرد و برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی خربزه ایرانی. مجله علوم باغبانی ایران، ۴۲ (۴): ۳۶۳-۳۵۷.

۲. دلشاد، م.، برزگر، ط.، کاشی، ع.ا. و حق‌بین، ک.ا. ۱۳۹۲. مطالعه اثر محل نگهداری میوه روی ساقه بر خصوصیات کمی و کیفی میوه در دو توده خربزه ایرانی تحت شرایط عادی و تنش کم آبی. مجله علوم باغبانی ایران، ۴۴ (۲): ۱۷۸-۱۶۹.

۳. زینلی، ن.، دلشاد، م.، کاشی، ع.ا. و حق‌بین، ک.ا. ۱۳۹۱. اثر تنش آبی بر عملکرد و برخی خصوصیات کیفی سه ژنوتیپ دستنبو و طالبی ایران. مجله علوم باغبانی ایران، ۴۳ (۴):۴۱۰-۴۰۳.

4. A.O.A.C. 2005. Official methods of analysis. Association of official analytical chemists, Washington DC, USA, pp. 1141.
5. Botia, P., Navarro, J.M., Cerda, A. and Martinez, V. 2005. Yield and fruit quality of two melon cultivars irrigated with saline water at different stages of development. European Journal of Agronomy, 23 (3): 243-253.
6. Cabello, J.M., Castellanos, M.T., Romojaro, F., Martnez-madrid, M.C. and Ribas, F. 2009. Yield and quality of melon grown under different irrigation and nitrogen rates. Agricultural water management, 96 (5): 866-874.
7. Colla, G., Rouphael, Y., Cardarelli, M., Massa, D., Salerno, A. and Rea, E. 2006. Yield, fruit quality and mineral composition of grafted melon plants grown under saline conditions. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 81 (1): 146-152.
8. Cuartero, J. and Fernandez-Munoz, R. 1999. Tomato and salinity. Scientia Horticulturae, 78: 83-125.

9. Darwish, T., Atallah, T., Moujabber, M.E. and Khatib, N. 2005. Salinity evolution and crop response to secondary soil salinity in two agro-climatic zones in Lebanon. Agricultural Water Management, 78: 152–164.
10. De Pascale, S., Maggio, A., Angelino, G. and Graziani, G. 2003. Effect of salt stress on water relations and antioxidant activity in tomato. Acta Horticulturae, 613: 39-46.
11. Dixon, R.A. and Paiva, N.L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. The Plant Cell, 7 (7): 1085-1097.
12. Dorais, M., Ehret, D.L. and Papadopoulos, A.P. 2008. Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: from the seed to the consumer. Phytochemistry Reviews, 7: 231-250.
13. Ehret, D.L. and Ho, L.C. 1986. The effect of salinity on dry matter partitioning and fruit growth in tomatoes grown in nutrient film culture. Journal of Horticultural Science, 61 (3): 361-367.
14. Elia, A., Serio, F., Parente, A., Santamaria, P. and Ruiz-Rodriguez, G. 2001. Electrical conductivity of nutrient solution, plant growth and fruit quality of soilless grown tomato. Acta Horticulturae, 559: 503-508.
15. Fabeiro, C., Martin de Santa Olalla, F. and de Juan, J.A. 2002. Production of muskmelon (*Cucumis melo* L.) under controlled deficit irrigation in a semi-arid climate. Agricultural Water Management, 54 (2): 93-105.
16. Francois, L.E. and Maas, E.V. 1994. Crop response and management of salt-affected soils. In: Ahmad, P., Azooz, M.M. and Prasad, M.N.V. 2013. Salt Stress in Plants, Signalling, Omics and Adaptations. Springer Publishing, 517 pp.
17. Hohjo, M., Ganda, M., Maruo, T., Shinohara, Y. and Ito, T. 2001. Effect of NaCl application on growth, yield and fruit quality in NFT-tomato plants. Acta Horticulturae, 548: 469-475.
18. Huang, C.H., Zong, L., Buonanno, M., Xue, X., Wang, T. and Tedeschi, A. 2012. Impact of saline water irrigation on yield and quality of melon (*Cucumis melo* cv. Huanghemi) in northwest china. European journal of agronomy, 43: 68-76.
19. Keutgen, A.J. and Pawelzik, E. 2008. Quality and nutritional value of strawberry fruit under long term salt stress. Food Chemistry, 107 (4): 1413-1420.
20. Kroon, P.A. and Williamson, G. 1999. Hydroxycinnamates in plants and food, current and future perspectives, review. Journal of the Science of Food and Agriculture 79 (3): 355-361.
21. Kulkarni, A.P. and Aradhya, S.M. 2005. Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. Food Chemistry, 93: 319-324.
22. Malash, N., Ghaibeh, A., Yeo, A., Ragab, R. and Cuartero, J. 2002. Effect of irrigation water salinity on yield and fruit quality of tomato. Acta Horticulturae, 573: 415-423.
23. Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press. London, Second edition, pp. 889.
24. Munns, R. 1993. Physiological processes limiting plant growth in saline soil: some dogmas and hypotheses. Plant, Cell & Environment, 16 (1): 15-24.
25. Sato, S., Sakagochi, S., Furucawa, H. and Ikeda, H. 2006. Effects of NaCl application to hydroponic nutrient solution on fruit characteristics of tomato (*Lycopersion esculentum* Mill.). Scientia Horticulturae, 109 (3): 248-253.
26. Slinkard, K. and Singleton, V.L. 1977. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28: 49-55.
27. Tedeschi, A., Lavini, A., Riccardi, M., Pulvento, C. and d'Andria, R. 2011. Melon crops (*Cucumis melo* L., cv Tendral) grown in a Mediterranean environment under saline-sodic conditions: part 1. Yield and quality. Agricultural water management, 98: 1329-1338.
28. Turhan, E. and Eris, A. 2004. Effects of sodium chloride applications and different growth media on ionic composition in strawberry plant. Journal of Plant Nutrition, 27 (9): 1653-1665.

The Effect of Pre-harvest Treatment of Ascorbic Acid on Shelf Life of Strawberries

Razieh Karimi Ghahfarokhi[1*]; Gholamreza Rabiei[2]; Morteza Reisi[3]

1- M.Sc. Student, Department of Horticultural Science, Shahrekord University
2- Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Shahrekord University
3- Assistant Professor, Department of Physics, Shahrekord University

*Corresponding Author Email address; raziehkarimi95@gmail.com

Abstract

This study was carried out to investigate the effect of the pre-harvest application of Ascorbic Acid (AA) on shelf life of strawberries kept at 4±1 °C and 90% relative humidity. Hydroponically grown Albion strawberries were chosen for the study. The plants were of the same age and free from any signs and symptoms of diseases and pests and received identical nutrition and management. Foliar sprays were conducted at two stages. The first one was performed after the pollination of first-grade flowers had completed and the second spray was 30 days later. Treatments included control (sprayed with distilled water) or the application of 1000 ppm AA, each with three replications and then stored with temperature and relative humidity controlled. Assessment of the traits was carried out on weekly intervals for up to four weeks after the storage. During the storage fruit weight, fruit firmness, vitamin C content, pH, total acidity (TA) and total soluble solids (TSS) were assessed. Results showed that, in general, during the storage, fruit weight, fruit firmness and vitamin C had decreased, while, pH, total acidity and TSS had increased. It was shown that fruit weight loss, fruit softening and the loss of vitamin C were diminished by the use of AA. There were significant differences observed 21 days after storage for fruit weight loss for the control and AA treatment. Fruit weight loss was 66% for the control, while it was 21% for AA. Also it was noticed that, in general, fruit firmness was decreased during the storage, but it was significantly lower for the control, compared with for AA treatment. Similarly, vitamin C content of the fruits was lower for the control. On the other hand, AA treatment had no significant effect on TSS or pH. The effect of storage time appeared to be significant for TSS, pH, and TSS/TA, while, it was not significant for TA. It was noticed that AA treatment could prevent fruit decay for up to two weeks after storage, but later on there was no significant difference observed between AA and the control. It was concluded that the application AA may increase the shelf life of strawberries under the studied conditions.

Keywords: Vitamin C, Postharvest, Shelf life

اثر تیمار پیش از برداشت اسید اسکوربیک بر انبارمانی توت فرنگی

راضیه کریمی قهفرخی[1*]؛ غلامرضا ربیعی[2]؛ مرتضی رئیسی[3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

۲- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

۳- استادیار گروه فیزیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: raziehkarimi95@gmail.com

چکیده

این پژوهش به منظور بررسی تاثیر محلول پاشی پیش از برداشت اسیداسکوربیک بر ماندگاری میوه توت فرنگی نگهداری شده در دمای ۱°C±۴ و رطوبت نسبی ۹۰٪ انجام گرفت. توت فرنگی رقم آلبیون کشت شده درون گلخانه به صورت هیدروپونیک برای این آزمایش انتخاب شد. گیاهان همگی هم‌سن و بدون علائم بیماری یا آفت و تحت مدیریت تغذیه و نگهداری یکسان بودند. محلول پاشی در دو مرحله انجام شد. اولین محلول پاشی پس از گرده افشانی اولین گل‌های درجه یک و دومین مرحله ۳۰ روز پس از آن انجام شد. تیمارها شامل شاهد (محلول پاشی با آب مقطر) و اسید اسکوربیک با غلظت ۱۰۰۰ ppm هرکدام با سه تکرار و سپس انبارداری با کنترل دما و رطوبت انجام شد. ارزیابی صفات مورد نظر در فواصل یک هفته‌ای تا مدت ۲۱ روز پس از برداشت انجام شد (هفت، ۱۴ و ۲۱ روز). در طی انبارمانی صفات وزن میوه، میزان سفتی بافت میوه و میزان ویتامین ث کاهش و میزان pH، اسیدیته کل و مواد جامد محلول بررسی شد. نتایج نشان داد در طول انبارمانی بطور کلی وزن میوه، میزان سفتی بافت میوه و میزان ویتامین ث کاهش و میزان pH، اسیدیته کل و مواد جامد محلول در میوه افزایش یافت. تیمار اسیداسکوربیک کاهش وزن و میزان نرم شدن بافت میوه، و روند از دست دادن مقدار ویتامین ث را کاهش داد. تفاوت معنی داری بین تیمارهای شاهد و اسید اسکوربیک از نظر کاهش وزن میوه ۲۱ روز پس از انبارداری دیده شد. در تیمار شاهد کاهش وزن میوه ۶۶٪ بود در حالی‌که این مقدار برای تیمار اسید اسکوربیک ۲۱٪ بود. همچنین مشاهده شد که اگرچه سفتی میوه بطورکلی در طول انبارداری کاهش یافته، اما در تیمار شاهد به طور معنی داری کمتر از تیمار اسید اسکوربیک بود. به طور مشابه، میزان ویتامین ث میوه های تیمار شاهد کمتر از تیمار اسید اسکوربیک بود. از طرف دیگر تیمار اسید اسکوربیک بر صفات مقدار قند میوه (TSS) و pH تاثیر معنی داری نداشت. اثر مدت زمان انبارداری بر صفات قند میوه، pH، و شاخص طعم معنی دار اما بر میزان اسیدیته قابل تیتر غیرمعنی دار بود. تیمار اسیداسکوربیک تا روز ۱۴ انبارداری موجب کاهش درصد پوسیدگی میوه شده است، اما پس از آن تیمار شاهد و اسید اسکوربیک تفاوت معنی داری نشان ندادند. می‌توان چنین استنباط نمود که کاربرد اسید اسکوربیک می‌تواند انبارمانی توت فرنگی را در شرایط آزمایش شده افزایش دهد.

واژگان کلیدی: ویتامین ث، پس از برداشت، عمر انباری

۱.مقدمه

توت فرنگی یک میوه مهم اقتصادی است که سراسر جهان مصرف می شود و به دلیل رنگ، شکل، عطر، طعم و بافت لذیذ خود شناخته شده است. توت فرنگی دارای مواد مغذی مختلفی از جمله مواد معدنی و ویتامین‌ها، آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک است که از سلول ها در برابر سرطان، اکسیدان‌ها، التهاب و اختلالات عصبی محافظت می‌کند (Shahzad salem et al., 2021). همچنین توت فرنگی منبع اسید اسکوربیک، پتاسیم، کلسیم و فسفر است (Jesus Filhoa et al., 2018). توت فرنگی رقم آلبیون (*Fragaria anannasa* Duch CV Albion) ، رقمی روز خنثی است. این میوه به دلیل سرعت تنفس بالا و استحکام کم دیواره سلولی بسیار فاسد شدنی است و مستعد ابتلا به آلودگی‌های پس از برداشت است. تخمین زده می شود که تلفات ناشی از قارچ کپک خاکستری به ۲۵ تا ۵۵ درصد در طول برداشت برسد و تلفات اصلی تا ۸۹ درصد پس از برداشت رخ می دهد (Vanti et al, 2021). کپک خاکستری ناشی از *Botrytis cinerea* است. که یک پاتوژن نکروتروف همه جازی است و دارای طیف میزبانی بسیار گسترده ای از گونه‌های گیاهی است . کپک خاکستری روی توت فرنگی می تواند باعث تلفات قابل توجهی به خصوص در دوره پس از برداشت شود. فرآیند آلودگی در مرحله رشد آغاز می شود. پیش از برداشت این بیماری گاهی به صورت پنهان باقی مانده و علائم آن نامشخص است (Soliman et al, 2021). به همین دلیل اغلب برای حل این مشکل بسیاری از تولیدکنندگان از سموم شیمیایی استفاده می‌کنند. باقیمانده این مواد برای انسان زیان بار است همچنین احتمال ایجاد مقاومت در برابراین آفت کش‌های شیمیایی وجود دارد. علاوه بر این استفاده از اقدامات کنترل شیمیایی تأثیر منفی بر محیط زیست و انسان دارد و نیاز به اقدامات کنترلی جایگزین در برابر کپک خاکستری را نشان می دهد (Vanti et al, 2021). لذا نیاز به استفاده از مواد طبیعی برای کنترل عامل پوسیدگی میوه و افزایش انبارمانی آن در سال های اخیر حس شده است.

اسید اسکوربیک از جمله مواد طبیعی است که در تولید محصولات ارگانیک دارای اهمیت ویژه می باشد (اله ویرن، ۱۳۹۵). اسید اسکوربیک یکی از رایج ترین آنتی اکسیدان‌هایی است که در نگهداری میوه‌ها و سبزی‌ها مورد استفاده قرار می گیرد (فاتح و همکاران، ۱۳۹۸). مشخص شده است که اسید اسکوربیک مجموعه‌ای از نقش‌ها را در رشد گیاهان مانند تقسیم و بزرگ شدن سلول‌ها، توسعه دیواره سلولی و دیگر فرایندهای نموی بازی می‌کنند (Pignocchi, 2003). ویتامین ث یا اسید اسکوربیک یک ویتامین محلول در آب است و مصرف آن به عنوان یک آنتی اکسیدان برای سلامت انسان ضروری است. ویتامین ث در سبزیجات و میوه ها یافت می شود. در میان میوه ها، توت فرنگی یکی از غنی ترین میوه ها از نظر اسید اسکوربیک است. که محتوای ویتامین ث در توت فرنگی تازه تا ۸۰ میلی گرم در ۱۰۰ گرم است (Sapei ,2014). با بررسی اثر محلول پاشی اسیداسکوربیک بر درختان سیب رقم رد اسپار نشان داده شده، که استفاده از غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر اسید اسکوربیک افزایش معنی داری در میزان مواد جامد محلول کل و آنتوسیانین کل میوه می شود و افزایش غلظت اسید اسکوربیک باعث افزایش میزان اسیدیته قابل تیتر، ویتامین ث، و آنتی‌اکسیدان کل شده اما pH آب میوه کاهش معنی داری داشته (اله ویرن و همکاران، ۱۳۹۵). تیمار فلفل دلمه با اسیداسکوربیک با غلظت های ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر باعث بهبود عملکرد، وزن، و تعداد میوه شد و همچنین باعث افزایش میزان ویتامین ث، مواد جامد محلول و فعالیت آنتی اکسیدانی شد (فاتح و همکاران ، ۱۳۹۸). محلول پاشی برگی اسیداسکوربیک در گیاه سیب زمینی ارتفاع بوته، وزن خشک برگ، میزان کلروفیل، عملکرد کل و همچنین وزن تر و خشک غده، مواد جامد محلول کل و ویتامین ث را افزایش داد (El- Banna, 2006). در این مطالعه اثر محلول پاشی اسید اسکوربیک بر عمر پس از برداشت میوه-های توت فرنگی بررسی شد.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱- توت فرنگی

این مطالعه در گلخانه هیدروپونیک توت فرنگی در شهرستان بروجن روی بوته های توت فرنگی تازه کشت شده رقم آلبیون و به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار و دو غلظت صفر و ppm۱۰۰۰ اسید اسکوربیک انجام گرفت. نگهداری بوته‌های توت فرنگی در تمام مرحله رشد شامل تغذیه و آبیاری بر اساس برنامه‌های معمول انجام گرفت. محلول پاشی با اسید اسکوربیک در مرحله گلدهی و سپس به فاصله ۳۰ روز پس از آن در ساعات خنک روز توسط سمپاش دستی انجام شد. ردیف هایی ازکشت که به عنوان شاهد در نظر گرفته شده بود با آب مقطر اسپری شد. در تاریخ ۱۴۰۰/۰۴/۰۱ برداشت توت فرنگی‌های رسیده در مرحله برداشت تجاری در ساعات اولیه صبح انجام گرفت و تمام تیمارها وزن شد و بلافاصله به آزمایشگاه دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد انتقال یافت. در آزمایشگاه درون یخچال با دمای ۱±۴ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۹۰٪ نگهداری شدند. فاکتورهای وزن، سفتی بافت، میزان اسیدیته قابل تیتر، میزان مواد جامد محلول، pH برآورد درصد پوسیدگی ظاهری در زمان های صفر، هفت و ۱۴ روز اندازه گیری شدند.

۲-۲- اسید اسکوربیک

محلول پاشی اسید اسکوربیک (L-Ascorbic acid, 99% Sigma) با غلظت ppm۱۰۰۰ (محلول سازی در آب مقطر) در دو مرحله رشد گیاه با سم پاش دستی صورت گرفت. مرحله اول بلافاصله پس از گرده افشانی گل‌های درجه یک و مرحله دوم محلول پاشی در فاز فندقی بودن گلهای درجه یک و در هر دو مرحله در ساعات اولیه روز انجام شد.

۲-۳- کاهش وزن

وزن میوه در هر مرحله ثبت شد. کاهش وزن تجمعی به صورت درصد کاهش وزن تازه اولیه بیان شد.

۲-۴- سفتی

سفتی بافت میوه با استفاده از یک دستگاه سفتی سنج‌میوه (EFFEGI) مجهز به یک پروب با قطر ۵ میلی متر ارزیابی شد. اندازه گیری در بخش میانی میوه انجام شد.

۲-۵- اسیدیته قابل تیتر (TA) ، pH و مواد جامد محلول (TSS)

برای این منظور از هر نمونه تعداد پنج میوه به صورت تصادفی برداشت و آبگیری شده و آب نمونه را صاف کرده در ابتدا یک قطره از عصاره صاف شده را در دمای آزمایشگاه (۲۲ درجه سانتی گراد) روی دستگاه رفراکتومتر (ATAGO PAL3) قرار داده و میزان مواد جامد محلول (TSS) اندازه گیری شد. و سپس اسیدیته باقی مانده عصاره را ابتدا با دستگاه pH متر کالیبره شده، اندازه گیری کرده و سپس از این نمونه ۱۰ میلی لیتر به نسبت ۱/۱۰ تهیه شده و با محلول سود NaOH ۰/۱ نرمال تیتر شده تا جایی که pH نمونه به ۸/۱ برسد و سپس بر اساس درصد معادل اسید سیتریک محاسبه شد (Sogvar et al, 2016).

۲-۶- میزان ویتامین ث

اندازه گیری بر اساس روش تیتراسیون با ۲-۶ دی کلروفنل ایندوفنل ۰/۲۵ درصد انجام شد (AOAC, 2000). در این روش ابتدا وزن اولیه نمونه ها تعیین شد (FW) و عصاره آن استخراج و پس از سانتریفیوژ و صاف شدن نمونه وزن عصاره اندازه گیری گردید برای اندازه گیری مقدار ویتامین ث موجود در نمونه ها به روش زیر عمل شد.

الف) مقدار ۱۰ میلی لیتر از محلول اسید اسکوربیک را درون یک ارلن ریخته و پس از اضافه شدن ۵ قطره متافسفریک اسید (به عنوان معرف) با ۲-۶-دی کلروفنل ایندول تیتر کرده تا رنگ محلول پوسته پیازی شود، در این زمان میزان ایندوفنل مصرفی را یادداشت کرده (D_1)

ب) یک سی سی از عصاره میوه با ۹ میلی لیتر آب مقطر رقیق شده و درون ارلن ریخته، پس از اضافه نمودن ۵ قطره متافسفریک اسید به روش قبلی تیتر شده و مقدار ایندوفنل مصرفی یادداشت گردید (D2)

برای بدست آوردن مقدار ویتامین ث موجود در نمونه ها از روابط زیر استفاده شد.

$H = C_1 / D_1$ (1)

H = مقدار ویتامین ث موجود به ازای ۱ میلی لیتر ایندوفنل (میلی گرم)

C1 = مقدار ویتامین ث موجود در محلول استاندارد (در این آزمایش ۲۵۰ میلی گرم)

D1 = مقدار ایندوفنل تیتر شده برای محلول استاندارد ویتامین) C بر حسب میلی لیتر(

$H * F = D2$ (2)

F = مقدار ویتامین ث موجود در نمونه تیتر شده (بر حسب میلی گرم)

D2 = مقدار ایندوفنل تیتر شده برای نمونه (میلی لیتر)

$G = F * (Jw / J1) * (1 / Fw)$ (3)

G = مقدار ویتامین ث موجود در یک گرم میوه (بر حسب میلی گرم)

J1 = حجم نمونه تیتر شده (بر حسب میلی لیتر)

Jw = حجم کل عصاره (بر حسب میلی لیتر)

Fw = وزن میوه (بر حسب گرم)

-7-2درصد پوسیدگی میوه

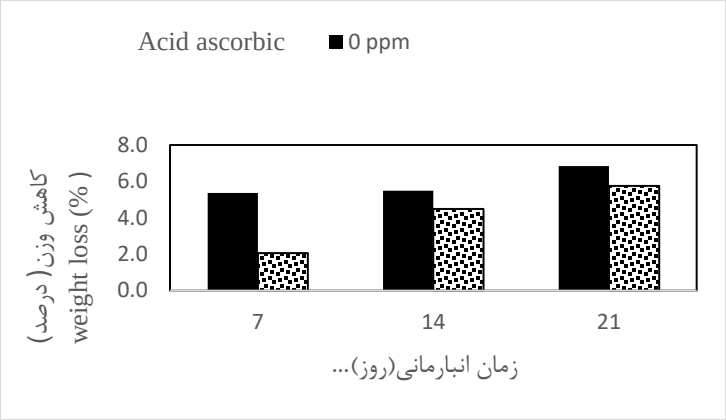
بروز پوسیدگی در روز ۷ و۱۴و۲۱ با تقسیم تعداد میوه پوسیده بر تعداد کل میوه در هر تکرار تعیین شد. نتایج به درصد بیان شده (Saleem et al, 2021).

درصد میوه پوسیده = تعداد میوه پوسیده)/ (تعداد کل میوه–ها * ۱۰۰

.3نتایج و بحث

-1-3کاهش وزن

در طی دوره انبارداری کاهش وزن در تمام نمونه ها دیده شده. نتایج نشان دهنده اثر تیمار اسیداسکوربیک بر کنترل کاهش وزن در طی انبارداری می¬باشد (شکل ۳-۱). عامل اصلی کاهش وزن افزایش تنفس و تعرق است. میزان از دست دادن آب به شیب فشار آب بین بافت میوه و اتمسفر اطراف آن بستگی دارد و زمانی که اختلاف فشار آب بین بافت و محیط بیرونی میوه افزایش یابد، میزان از دست دهی وزن هم زیاد شده .(Sogvar et al, 2016) در مطالعاتی که بر روی اثر پوشش میوه توت فرنگی با اسیداسکوربیک در انبار صورت گرفته نتایج مشابهی دیده شده .(Shahzad et al, 2021)



شکل ۳-۱- تاثیر تیمار اسیداسکوربیک بر درصد کاهش وزن میوه توت فرنگی در طول انبارمانی (روز).

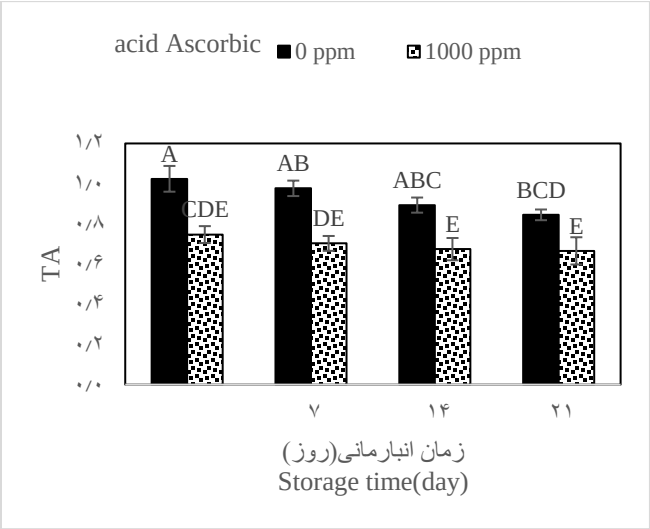
۳-۲-اسیدکل و pH

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳-۱) نشان داد که تیمار اسیداسکوربیک اختلاف معنی داری در سطح یک درصد درمیزان اسیدیته کل نشان داد. مطابق شکل ۳-۳ در طی انبارداری کاهش اسیدیته کل در تمام نمونه ها دیده شد. در نمونه های شاهد میزان اسیدیته کل بیشتر از نمونه های تیمار شده با اسیداسکوربیک بود. با گذشت زمان میزان اسیدیته نسبت به زمان برداشت در نمونه های تیمار شده با اسیداسکوربیک تغییرات چشمگیری نشان نداد. در بررسی اثر پوشش اسید اسکوربیک و کیتوزان نتایج مشابه دیده شد (salem et al, 2021). در پژوهشی بر روی سیب در اثر تیمار با اسیداسکوربیک نتایجی خلاف بر نتایج بدست آمده مشاهده شد (Jesus Filho et al, 2018).

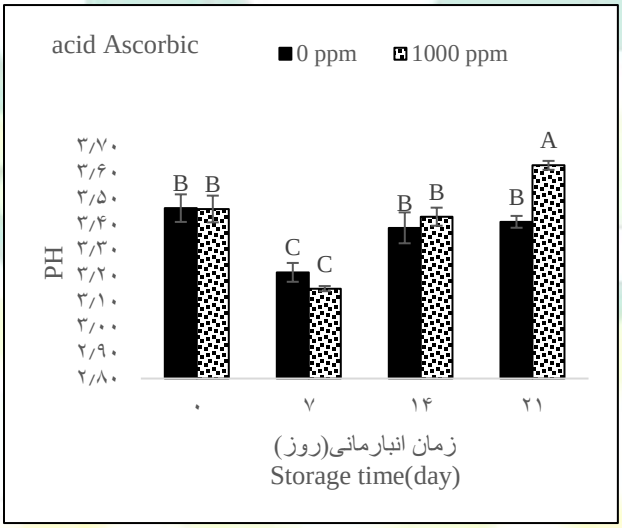
بررسی نتایج تغییرات pH (شکل ۳-۲) نشان می دهد که بیشترین میزان pH مربوط به تیمار اسیداسکوربیک پس از ۲۱ روز پس از برداشت بوده. نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۳-۱) نشانگر اثر معنی دار زمان در سطح یک درصد و اثر متقابل زمان و اسید در سطح پنج درصد بر میزان pH میوه ها می باشد در حالیکه بین نمونه ها در تیمار اسیداسکوربیک اختلاف معنی داری دیده نشد.

جدول ۳-۱- نتایج تجزیه واریانس اثر تیمار اسیداسکوربیک در طول انبار داری بر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی میوه توت فرنگی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		pH	TSS	TA	شاخص طعم
زمان	۳	۰/۱۳**	۹**	۰/۰۰۳ ns	۱۲/۰۱**
اسیداسکوربیک	۱	۰/۰۱ ns	۱/۹۲ ns	۰/۳۳**	۷/۹*
زمان * اسیداسکوربیک	۳	۰/۰۲*	۲/۶۹**	۰/۰۲ ns	۵/۱۸*
خطا	۱۶	۰	۰/۴۴	۰	۱/۲۳



شکل ۳-۳- تاثیر تیمار اسید اسکوربیک بر میزان اسیدیته کل در میوه توت فرنگی در طول انبارمانی (روز).

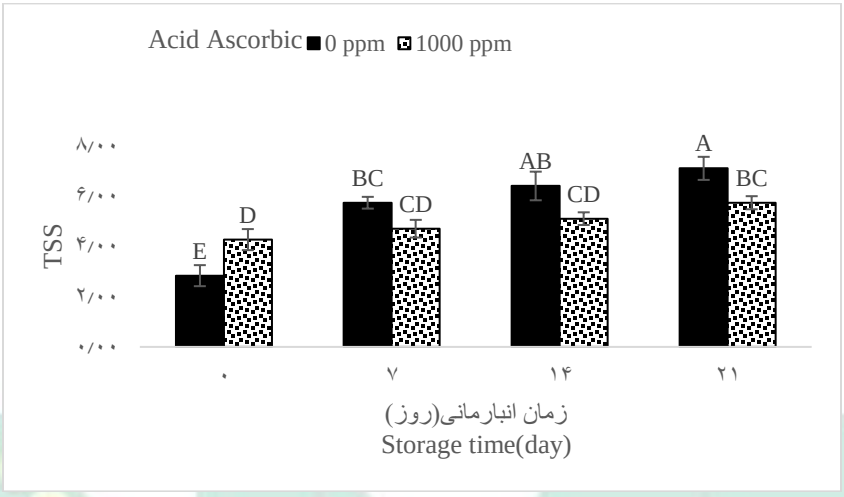


در میوه توت فرنگی در طول انبارمانی (روز).PHشکل ۳-۲- تاثیر تیمار اسید اسکوربیک بر میزان

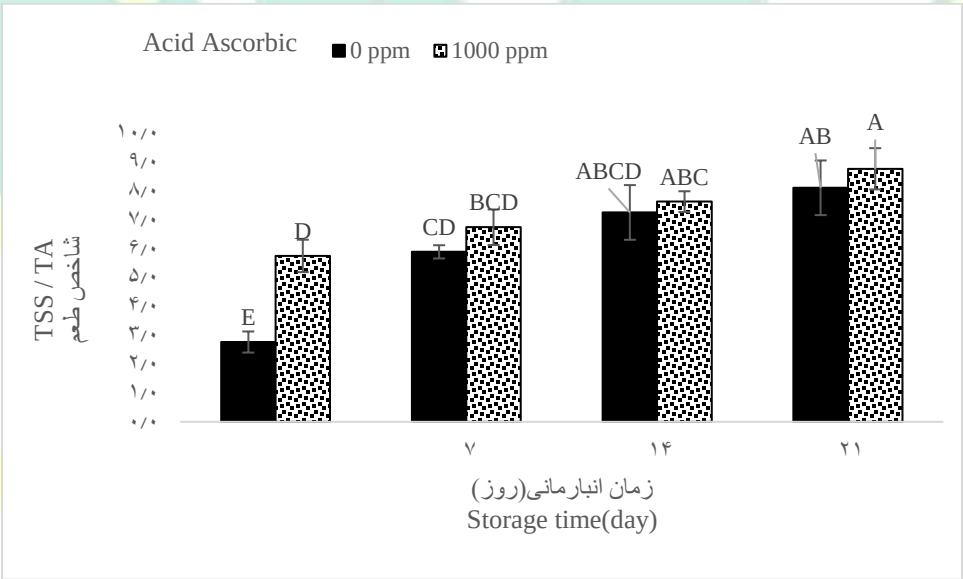
۳-۲-مواد جامد محلول (TSS)

نتایج حاصل از تجزیه واریانس حاکی از آن است که تیمار اسیداسکوربیک بر میزان مواد جامد محلول اثر معنی داری نداشت در صورتی که زمان و اثر متقابل زمان و تیمار اسیداسکوربیک در سطح یک درصد اختلاف معنی دار بین داده ها مشاهده شد (جدول ۳-۱). مطابق شکل (۲-۳) در طول زمان انبارداری افزایش میزان مواد جامد محلول دیده شده. تیمار اسید اسکوربیک در کنترل کاهش میزان مواد جامد محلول موثر واقع شده است. دلیل افزایش میزان مواد جامد محلول پس از ۲۱روز بعد از برداشت می تواند به دلیل از دست دادن رطوبت باشد (Hernandez etal, 2008). نتایج مشابهی در میوه گیلاس دیده شده است (Petriccion et al, 2015). بررسی نتایج تغییرات شاخص طعم (نسبت TSS به TA) در طی انبارداری نشان داد که بیشترین درصد تغییرات مربوط به نمونه های شاهد می باشد که بخصوص در چهارده روز پس از برداشت مشهود می باشد. نمونه های تیمار شده با اسیداسکوربیک

درصد تغییرات شاخص طعم در آنها کنترل شده (شکل ۳-۵). نتایج حاصل از تجزیه واریانس بیانگر اختلاف معنی دار بین داده ها در تیمار زمان در سطح احتمال یک درصد است و تیمار اسیداسکوربیک و اثر برهمکنش زمان و اسید اسکوربیک در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار شد.



شکل ۳-۴- تاثیر تیمار اسید اسکوربیک بر میزان مواد جامد محلول در میوه توت فرنگی در طول انبارمانی (روز).

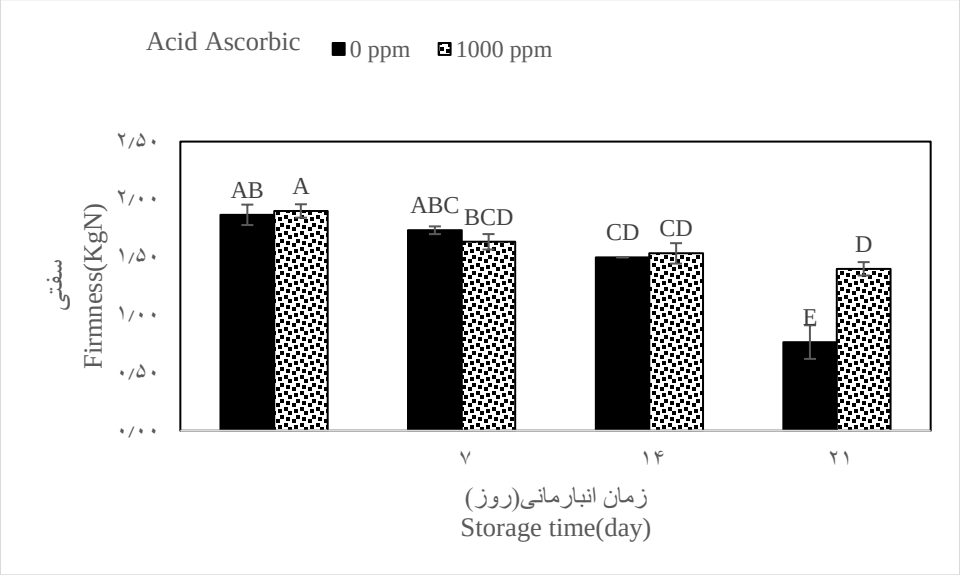


شکل ۳-۵- تاثیر تیمار اسید اسکوربیک بر شاخص طعم در میوه توت فرنگی در طول انبارمانی (روز).

۳-۵-سفتی

بررسی نتایج تغییرات سفتی بافت در انبارداری نشان دهنده این بود که بیشترین سفتی بافت میوه مربوط به نمونه های تیمار شده با اسیداسکوربیک با غلظت ppm۱۰۰۰ می باشد و در طی مدت انبار داری کاهش میزان سفتی بافت میوه در تمام نمونه ها دیده شد اما این تغییرات در میوه های تیمار شده نسبت به نمونه های شاهدکنترل شده (شکل ۳-۶). با توجه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس

بین نمونه های تیمار شده با اسید اسکوربیک در سطح پنج درصد اخلاف معنی داری دیده شد و در حالی که در طول زمان و اثر تقابل زمان و اسیداسکوربیک اختلاف معنی دار در سطح یک درصد مشاهده شد (جدول ۳-۲).
کاهش سفتی را می توان به دلیل تخریب پکتین و سلولز توضیح داد، زیرا شکسته شدن زنجیره های پلیمری ناشی از تشعشعات یونیزان با تبدیل پروتوپکتین به پکتین، باعث از بین رفتن بافت سلولی می شود (Franko and Landgraf, 2008).



شکل ۳-۶- تاثیر تیمار اسید اسکوربیک بر میزان سفتی بافت میوه توت فرنگی در طول انبارمانی (روز).

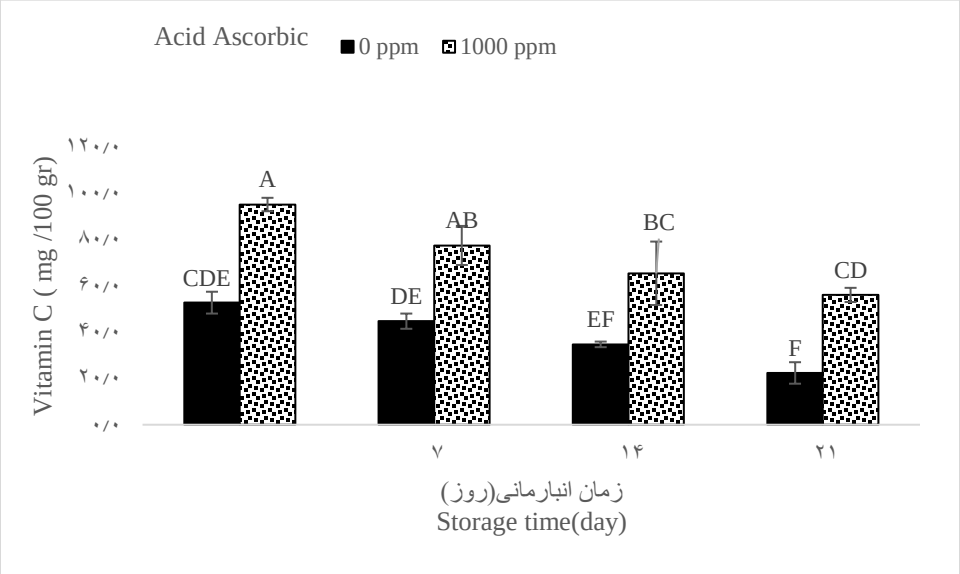
جدول ۳-۲- نتایج تجزیه واریانس اثر تیمار اسیداسکوربیک در طول انبار داری بر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی میوه توت فرنگی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		سفتی بافت میوه	ویتامین C	پوسیدگی
زمان	۳	۰/۶۹**	۱۲۰۹/۶۶**	۲۴۹۱/۰۲**
اسیداسکوربیک	۱	۰/۱۳*	۷۲۸۰/۱۶**	۳۶۲/۷ ns
زمان * اسیداسکوربیک	۳	۰/۱۶**	۱۵۴/۹۴ ns	۱۴۴/۸ ns
خطا	۱۶	۰/۰۱	۱۲۴/۱۲	۱۴۲/۳۵

۳-۶-ویتامین ث

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳-۲) نشان داد که انجام تیمار اسیداسکوربیک و زمان در سطح یک درصد اختلاف معنی دار داشت ولی بین برهمکنش زمان نگهداری و تیمار اسیداسکوربیک اخلاف معنی داری وجود ندارد. بررسی نتایج حاصل از مقایسه میانگین ها

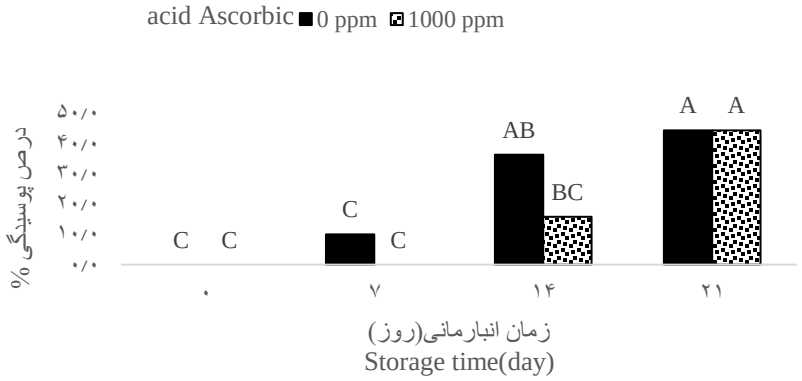
حاکی از افزایش میزان ویتامین ث در نونه های تیمار شده با اسیداسکوربیک است. در طی دوره انبارداری کاهش میزان ویتامین ث در همه نمونه ها دیده میشود. (شکل ۳-۷). تیمار اسیداسکوربیک بر میزان ویتامین ث میوه به طور چشمگیری موثر بوده.
ویتامین ث توانایی از بین بردن رادیکال های آزاد را دارد و باعث افزایش ارزش غذایی میوه توت فرنگی شده. کاهش ویتامین ث در طول انبارداری در پژوهش های دیگر هم گزارش شده (Gol et al,2013). کاهش ویتامین ث در طول انبارداری به دلیل فعالیت آنزیم اسیداسکوربیک اکسیداز است و همچنین به دلیل ترکیب شدن اسیداسکوربیک با اکسیژن هوا و اتواکسیداسیون ویتامین ث می باشد (Sogvar et al,2016).



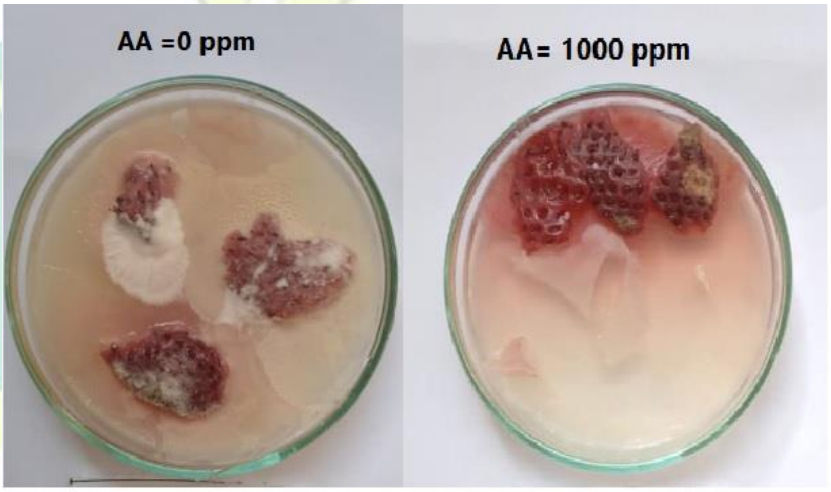
شکل ۳-۷- تاثیر تیمار اسید اسکوربیک بر میزان ویتامین C درمیوه توت فرنگی در طول انبارمانی (روز).

۳-۷-پوسیدگی میوه

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳-۲) نشان داد که زمان در سطح یک درصد اثر معنی دار داشت. تیمار اسیداسکوربیک تا روز ۱۴ انبارداری موجب کاهش درصد پوسیدگی میوه شده است، اما پس از آن تیمار شاهد و اسید اسکوربیک تفاوت معنی داری نشان ندادند. اثر برهمکنش زمان و اسیداسکوربیک اختلاف معنی دار نشان نداد. با توجه به شکل ۳-۸ در نمونه های تیمار شده پوسیدگی از روز ۱۴ ام انبارداری دیده شده و تیمار اسیداسکوربیک بر کنترل میزان پوسیدگی تا روز ۱۴ موثر بوده است. همچنین ۲۱ روز پس از انبارداری از نمونه ها بر روی محیط کشت آگار کشت شد و پس از ۲۴ ساعت به صورت چشمی پوسیدگی بر آنها بررسی شد (شکل ۳-۹) مشاهده می شود که بر روی نمونه تیمار شده با اسید اسکوربیک آثار بسیار جزیی از پوسیدگی به چشم می آید.



شکل ۳-۸-تاثیر تیمار اسید اسکوربیک بر میزان پوسیدگی درمیوه توت فرنگی میوه در طول انبارمانی (روز).



شکل ۳-۹-تاثیر تیمار اسید اسکوربیک بر میزان پوسیدگی درمیوه توت فرنگی ناشی از بوتریتیس در طول انبارمانی (-روز-).

۴. نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که محلول پاشی اسیداسکوربیک با غلظت ۱۰۰۰ ppm باعث بهبود انبارمانی توت فرنگی می‌شود که از طریق کنترل کاهش وزن، کاهش سفتی بافت میوه و افزایش میزان ویتامین ث میوه در طول انبارداری شد و در نتیجه سبب حفظ کیفیت میوه های توت فرنگی در انبار گردید. در مجموع محلول پاشی اسیداسکوربیک با غلظت ppm۱۰۰۰ با افزایش دوره انبارداری میوه توت فرنگی رقم آلبیون به مدت ۲۱ روز در بسته بندی درب دار و در دمای ۱±۴ و رطوبت نسبی ۹۰٪ نسبت به تیمار شاهد در همین شرایط، ماندگار میوه را به طور معنی داری افزایش داد. دلیل محافظت مشاهده شده برای تیمار اسیداسکوربیک می‌تواند ناشی از ویژگی ضد میکروبی آن باشد (Ali et al, 2021). نتیجه مشابهی در سیب درختی با استفاده از پوشش های حاوی اسیداسکوربیک (Nokwazi C. Mbili et al, 2017) و توت فرنگی (salem et al, 2021) مشاهده شد.

منابع

۱. اله ویرن ا.، فرخزاد ع. و اصغری م. ۱۳۹۵. تاثیر محلول پاشی اسیداسکوربیک بر برخی ویژگی های کیفی و بهبود رنگ گیری میوه سیب رقم رد اسپار. مجله تولیدات گیاهی، جلد ۳۹، شماره۳.
۲.فاتح م.، برزگر ط. و رضوی ف. تاثیر محلول پاشی اسیداسکوربیک و لاکتات کلسیم بر رشد، عملکرد و کیفیت میوه فلفل دلمه ای. نشریه علوم باغبانی، جلد ۳۳، شماره ۱، ص: ۷۹-۸۷

3. AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. 17th Edition, The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA. Methods 925.10, 65.17, 974.24, 992.16.
4. Ceredi G., Mari M., Antoniacci L., Montuschi C., De Paoli E. and Gengotti S. 2009. Ten years of field trials on grey mold control on strawberries.Acta Hort. 842:
327–330.
5. El- Banna E, and Abd E. 2006. Effect of foliar application with organic compounds on growth yield and tubers quality of potato (*Solanum tuberosum* L.). Journal of Agricultural Science Mansoura University, 31(2): 1165-1173.
6. Gol N., Patel P. and Rao T. 2013. Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. Postharvest Biology and Technology, 85: 185-195.
7.Filhoa M., Scolforoa K., Saraivaa S.H., Pinheirob Ch., Silvaa P. and Della Luciaa S. 2018. Physicochemical , microbiological and sensory acceptance alterations of strawberries caused by gamma radiation and storage time. Scientia Horticulture, 238: 187-194.
8. Franco B. and Landgraf M. 2008. Microbiologia dos Alimentos .Atheneu, São Paulo, Ateneu, 182p
9.Munoz P., Almenar E., Valle V., Velez D. and Gavara R. 2008. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria ananassa*) quality during refrigerated storage. Food Chem, 110: 428–435.

10. Nokwazi C.,Umezuruike L., Cheryl L. and Filicity A. 2017. Citrus and lemongrass essential oils inhibit Botrytis cinerea on ‘Golden Delicious’, ‘Pink Lady’ and ‘Granny Smith’ apples. Plant Dis Prot, 124: 499-511.

11. Pignocchi C., and Foyer C.H. 2003. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signaling. Current Opinion in Plant Biology, 6: 379-389.
12.Petriccione M., De Sanctis F., Pasquariello M., Mastrobuoni F., Rega P., Scortichini M. and Mencarelli F. 2015. The effect of chitosan coating on the quality and nutraceutical traits of sweet cherry during postharvest life. Food Bioprocess Technol, 8: 394–408.

13.Saleem M., Anjum M., Naz S., Ali S,Hussain S., Azam M., Sardar H., Ghulam Khaliq C., Canan D. and Ejaz Sh. 2021. Incorporation of ascorbic acid in chitosan-based edible coating improves postharvest quality and storability of strawberry fruits. International Journal of biological Mocromolecules, 189: 160-169.

14.Soliman M.S., Khafagi E.Y., Ahmed Y., Mekawi E.M. and Abdel-Rahman, F.A. 2021. Exogenous Application of Some Acids Enhanced the Antioxidant Activities in Strawberry Fruits and Induced the Resistance against Gray Mold Disease. 49 (1) : 49-62.

15. Sapei L and Hwa L. 2014. Study on the Kinetics of Vitamin C Degradation in Fresh Strawberry Juices. 9: 62-68
16. Sogvar O., Kousheshsaba M. and Emamifar A. 2016. Aloe vera and ascorbic acid coatings maintain postharvest quality and reduce microbial load of strawberry fruit. Postharvest Biology and Technology, 114: 29-35.

Effect of different media on yield and some growth parameters of strawberries in greenhouse conditions

Pargol Rasouli[1*]

1- Asistant professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture Islamic Azad University of Takestan Branch

* *P.Rasooli@tiau.ac.ir*

Abstract

The optimal production of strawberries requires the essential nutrients and suitable media for vegetative and reproductive growth. This study determines the effectiveness of growth parameters and fruit yield of strawberries in different media growing under a greenhouse. Four treatments such as control soil (CS), bio plus compost (T1), the combination of bio plus compost, and synthetic nutrient applied media/integrated media (T2) and synthetic nutrient applied soil media (T3) were assayed. Morphology parameters like plant height, fresh weight, dry weight of roots were measured in each stage after eight weeks and sixteen weeks and yield attributing parameter as the number of fruits set per plant and number of fruits per plant were measured at the beginning and end of the reproductive stage eight and sixteen weeks respectively. The data were analyzed using a completely randomized block design and through the data were analyzed using a completely randomized block design and analysis of variance at the level of $p < 0.05$. Plants in T2 substrate in vegetative and reproductive stage showed maximum plant height, fresh root weight, root dry weight, number of fruit set and number of fruits per plant and showed the lowest data in CS. This study showed that combined compost with synthetic nutrition provides a better source for growing and producing strawberries under greenhouse conditions

Keywords: compost, synthetic nutrition, vegetative, reproductive

اثر بسترهای مختلف بر عملکرد و برخی پارامترهای رشد توت فرنگی در شرایط گلخانه ای

پرگل رسولی *[۱]

۱- گروه باغبانی، واحد تاکستان، دانشگاه آزاد اسلامی، تاکستان، ایران

* P.Rasooli@tiau.ac.ir

چکیده

تولید مناسب توت فرنگی نیاز به مواد غذایی ضروری و بستر مناسب برای رشد رویشی و زایشی دارد. در این تحقیق به تعیین اثر بسترهای مختلف بر عملکرد و خصوصیات رشدی گیاه توت فرنگی در شرایط گلخانه ای پرداخته شده است. چهار بستر رشد به عنوان تیمار شامل خاک (CS)، کمپوست زیستی (T1)، ترکیب کمپوست به همراه تغذیه مصنوعی (T2) و تغذیه مصنوعی بستر خاک (T3) در این پژوهش ارزیابی شد. صفات موفولوژی مانند ارتفاع گیاهی، وزن تر ریشه ، وزن خشک ریشه در هر مرحله رشد بعد از هفته هشتم و شانزدهم و صفات مربوط به عملکرد مانند تعداد میوه تشکیل شده در هر گیاه و تعداد میوه در هر گیاه در شروع و پایان مرحله زایشی به ترتیب در هفته ۸ و ۱۶ اندازه گیری شد. آنالیز داده های حاصل با استفاده از طرح بلوک کاملا تصادفی و تجزیه واریانس در سطح $p < 0.05$ انجام شد. گیاهان در بستر T2 در مرحله رویشی و زایشی حداکثر ارتفاع گیاهی، وزن تازه ریشه، وزن خشک ریشه، تعداد میوه تشکیل شده و تعداد میوه در هر گیاه و در بستر CS کمترین داده ها را نشان دادند. این مطالعه نشان داد که کمپوست ترکیبی به همراه تغذیه مصنوعی منبع بهتری برای رشد و تولید توت فرنگی در شرایط گلخانه ای فراهم میکند.

واژگان کلیدی: کمپوست، تغذیه مصنوعی، رویشی، زایشی

۱.مقدمه

در حال حاضر به دلیل افزایش تقاضا برای تولید محصول بیشتر با کیفیت بالاتر و خارج از فصل، تولیدات گلخانه ای روز به روز در حال افزایش هستند (Martinez and Abad, 1992). در گذشته روش عمده ی کشت توت فرنگی، روش خاکی بود ولی امروزه کشاورزان دنیا به تولید توت فرنگی به روش بدون خاک روی آورده اند. مزایای این روش کشت به دلیل کنترل دقیق آب، مواد غذایی و شرایط محیطی است(Core, 2001). کاربرد کمپوست با مواد غذایی مصنوعی به عنوان یک سوبسترا یک راهکار مدیریتی مناسب جهت افزایش عملکرد توت فرنگی گلخانه ای است. بستری از مواد آلی به همراه محلول غذایی رشد و عملکرد و جذب عناصر را افزایش داده و محصول ارقام توت فرنگی را بهبود می بخشد (Wei et al., 2020).

استفاده ازکمپوست فواید بسیار دارد.کاربرد کمپوست خواص فیزیکوشیمیایی خاک را افزایش داده و از دست رفتن مواد غذایی توسط تجزیه مواد آلی کاهش داده شده و اوتریفیکاسیون را به علت کند کردن آزادسازی مواد غذایی در مقایسه با سایر کودهای معدنی و الی کاهش میدهد (Vandecasteele et al., 2018). کیفیت کمپوست به درجه رسیدگی و ثبات و سایر شاخص ها بستگی دارد که نشان دهنده نسبت کربن به نیتروژن و فعالیت میکروبی، مواد هیومیکی، ظرفیت تبادل کاتیونی و شاخص جوانه زنی می

باشد (Azim et al., 2014). همچنین نسبت مناسب کربن به نیتروژن برای افزایش عملکرد کمپوست، رشد و فعالیت جمعیت میکروبی مفید ضروری است (Qasim et al., 2018).

در دهه های اخیر توصیه بر استفاده از مواد پایدار محیطی برای بسترکشت جهت تثبیت کیفیت اکوسیستم به علت اثر کمتر بر گرم شدن کره زمین و بهبود خواص فیزیکوشیمیایی خاک شده است (Tejada et al., 2009). نیتروژن، فسفر و پتاسیم در کودهای غیرآلی از مهمترین ریزمغذی ها هستند و برای تولید بهینه توت فرنگی نیاز است و حاصلخیزی خاک و رشد گیاه را افزایش میدهد (Khan et al., 2019). نیتروژن مهمترین عنصر برای تولید رانرهای توت فرنگی، رشد گیاه و تشکیل جوانه گل است. علاوه بر این کابرد محدود نیتروژن اثر محدودکنندگی بر رشد رویشی گیاهان توت فرنگی دارد (Tejada et al., 2009).

همچنین فسفر یکی از عناصر غذایی مهم برای رشد توت فرنگی و نمو آن است. فسفر نقش مهمی در فتوسنتز، انتقال انرژی، تبدیل قند به نشاسته و انتقال مواد غذایی دارد (Trejo-Tellez and Gomez-Merino, 2014).

پتاسیم در طویل شدن سلول، سنتز کربوهیدرات و قند نقش ضروری دارد (Yoshida et al., 2000). بنابراین تغذیه با NPK برای تولید بهینه میوه توت فرنگی مهم بوده و کیفیت میوه توت فرنگی را نظر شیرینی، سفتی و تجمع آنتوسیانین را افزایش میدهد. پس تغذیه و بستر با رشد و بهره وری گیاه همبستگی دارد و آنالیز پارامترهای رشد، عملکرد اولیه گیاه را بیان میکند که متعاقبا عملکرد و خصوصیات فیزیولوژیکی گیاه را مشخص می شود. پارامترهای رشد بر اساس اندازه گیری داده های خام از قبیل ارتفاع گیاه، وزن خشک و وزن تر ریشه تعیین می شود (Djedidi et al., 1999).

این تحقیق با هدف بهینه سازی بستر رشد توت فرنگی جهت بهبود رشد رویشی گیاه و افزایش عملکردآن با مقایسه چهار بستر خاک (کنترل)، کمپوست ترکیبی (کوکوپیت ۷۰ درصد، پرلیت ۱۱ درصد ، پیت ماس ۱۱ درصد و زئولیت ۹درصد)، کمپوست ترکیبی همراه با محلول هوگلند، بستری از پرلیت با تغذیه مصنوعی (محلول هوگلند) انجام شد.

۲.مواد و روش‌ها

این تحقیق در گلخانه ای واقع در شهرک گلخانه ای پردیسان زنجان که در ارتفاع ۱۶۷۰ متر بالاتر ازسطح دریا، در طول زمستان سال ۱۳۹۹ انجام شد. زمان کل این تحقیق ۱۲۰ روز در زمستان از اوایل دی ماه تا اخر اسفند ماه بود. پارامترهای مهم محیطی شامل دما، غلظت دی اکسید کربن، رطوبت با بکارگیری نمایشگر و کنترلر HD81 (Hooyar with Swedish Co2 sensor) به صورت روزانه کنترل شد.

در این نوع تحقیق ۴ نوع تیمار شامل خاک (کنترل)، کمپوست ترکیبی (کوکوپیت ۷۰ درصد، پرلیت ۱۱ درصد ، پیت ماس ۱۱ درصد و زئولیت ۹درصد)، کمپوست ترکیبی همراه با محلول هوگلند، بستری از پرلیت با تغذیه مصنوعی (محلول هوگلند) بکاربرده شد.

علاوه بر این نسبت C/N خاک (کنترل) و کمپوست ترکیبی توسط آزمایشگاه خصوصی آب و خاک گیاه در زنجان اندازه گیری شده و مقدار آن در این بسترها به ترتیب ۱۲:۰/۳ و ۳۰:۱ است.

تیمارهای بکار رفته در تحقیق در جدول ۱ بیان شده است.

جدول۱: چهارنوع بستر بکاررفته در پرورش توت فرنگی به عنوان تیمار

تیمار	ترکیب بستر
S	خاک (نسبت کربن:نیتروژن ۱۲:۰/۳-)

T1	کمپوست ترکیبی (نسبت کربن:نیتروژن - ۳۰:۱)
T2	کمپوست ترکیبی (نسبت کربن:نیتروژن - ۳۰:۱) + تغذیه مصنوعی (محلول هوگلند)
T3	تغذیه مصنوعی (محلول هوگلند)

در ابتدا ۳۲ گیاه دختری توت فرنگی رقم سابرینا در هر بستر با فاصله نیم متر از هم (Shahzad et al., 2018) کشت شد. تمام پارامترهای رویشی و زایشی از هفته هشتم و هفته شانزدهم بعد از دوره کشت اندازه گیری شد و پارامترهای مربوط به عملکرد شامل تعداد میوه تشکیل شده و تعداد میوه در هرگیاه در شروع و پایان مرحله زایشی (هفته هشتم و شانزدهم بعد از کشت) اندازه گیری شد. ارتفاع گیاه در ۲۸ گیاه از هر تیمار در مراحل مختلف با بکارگیری کولیس اندازه گیری شد (Basak et al., 2019). وزن تازه و وزن خشک ۶ نمونه ریشه گیاه از هر تیمار در دو مرحله مختلف با بکارگیری ترازوی دیجیتال با دقت یک صدم وزن شد و سپس در آون خشک گردید. وزن ریشه ها بعد از خشک شدن در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد برای ۴۸ ساعت مجددا با ترازوی با دقت یک صدم توزین شد (Khan et al., 2019). تعداد میوه تشکیل شده در هر گیاه و تعداد میوه هر گیاه در مرحله زایشی با ۶ تکرار برای هر تیمار محاسبه شد.

جهت محاسبات آماری داده های حاصل از پارامترهای رویشی و زایشی و عملکرد گیاه توت فرنگی جهت از نرم افزار MSTATC استفاده شد .مقایسه میانگینها به روش آزمون دانکن ($p < 0.05$) انجام شد.

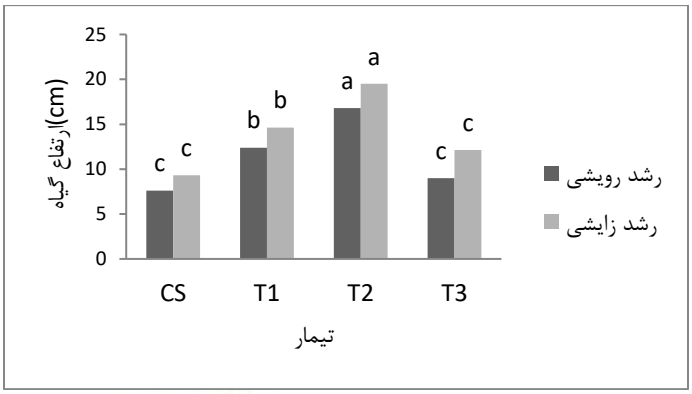
۳. نتایج و بحث

۳-۱- ارتفاع گیاه

بستر رشد T2 در مرحله رویشی منجر به بیشترین ارتفاع گیاهی (۱۶/۸ cm) شده و سپس بستر رشد T1 (۱۲/۴ cm) و T3 (۹/۰۳cm) و کمترین ارتفاع گیاه با تیمار CS (۷/۶۰ cm) حاصل شد. حداکثر ارتفاع گیاهان در تیمار T2 به نگهداری بهتر سطح تغذیه و حفظ توانایی بهتر ذخیره آب که رشد رویشی گیاه را تحریک می کند نسبت داده می شود (Thakur and Shylla, 2018).

تیمار T1 در مقایسه با تیمار T2 منجر به ارتفاع بیشتری در گیاه شد که علت آن افزایش معدنی سازی مواد غذایی و تولید هورمنهای رشد گیاهی و تعدیل کننده ها توسط میکروب ها در این بستر (T1) می باشد (Arancon et al., 2003). عبارت دیگر کمپوست ترکیبی دارای جمعیت میکروبی بیشتری بوده که تکثیر شده و رشد می کنند و کربن و نیتروژن ماده آلی را در طول فرایند تجزیه بکار می گیرند. نیتروژن تقسیم سلولی را تحریک میکند و کربن فرایند فتوسنتز را تسهیل میکند و انرژی برای رشد گیاه را فراهم می کند (Khan et al., 2019). کوکوپیت و پرلیت به دلیل تبادل کاتیونی بهتر برای ریشه مفیدند زیرا توزیع رطوبت در این بستر ها برای رشد ریشه و افزایش ارتفاع گیاهی مناسب است (Raja et al., 2018).

در مرحله زایشی نیز بیشترین افزایش ارتفاع گیاه در گیاهان کشت شده در بستر T2 و سپس بستر T1و کمترین ارتفاع گیاه در بستر CS مشاهده شد.



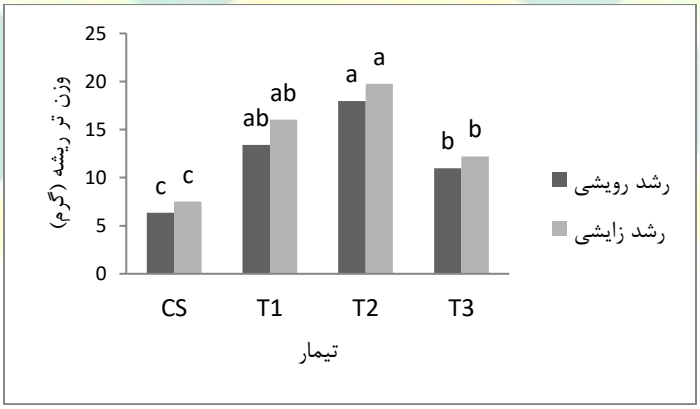
شکل ۱: تاثیر بسترهای مختلف رشد بر ارتفاع گیاه توت فرنگی در مراحل رشد رویشی و زایشی

با مطالعه دقیق داده های حاصل از ارتفاع گیاه مشاهده شد در مرحله رویشی و زایشی رشد گیاه صعودی اما با سرعت سرعت مختلف انجام میگیرد (Koelewijn, 2004). علاوه بر این رشد رویشی پیوسته بوده اما در شروع گلدهی در مرحله ظهور اندامهای زایشی سرعت رشد کاهش می یابد.

۳-۲-وزن تازه ریشه

نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان میدهد که بسترهای مختلف رشد تاثیر متفاوتی بر وزن تازه ریشه می گذارند. بیشترین وزن تازه ریشه در مرحله رشد رویشی در بستر T2 (۱۷/۹۸ g) و سپس در بستر T1 (۱۳/۴۰ g) و بستر T3 (۱۰/۹۸ g) و کمترین وزن تازه ریشه در بستر CS (۶/ ۳۴ g)بدست آمد (شکل ۲).

در مرحله رشد زایشی نیز بیشترین وزن تازه ریشه در گیاهان رشد یافته در بستر T2 (۱۹/۷۵ g) و سپس به ترتیب در بستر T1 (۱۶/ ۰۲g)، T3 (۱۲/ ۲۲ g) و CS (۷/ ۵۰ g) مشاهده شد (شکل ۲).



شکل۲: تاثیر بسترهای مختلف رشد بر وزن تازه ریشه توت فرنگی در مراحل رشد رویشی و زایشی

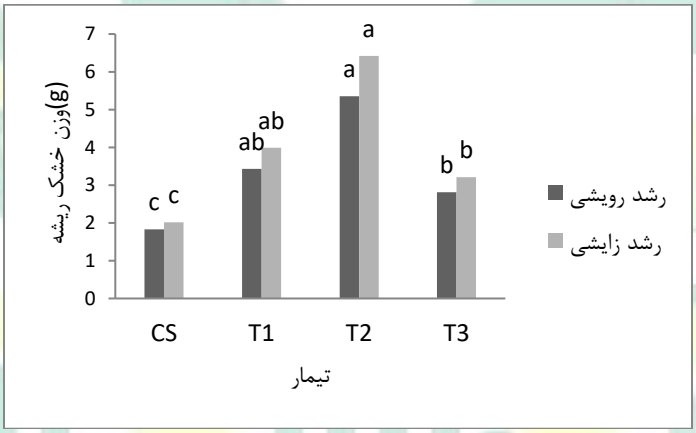
این نتایج ثابت کرده اند که مواد آلی با بیوماس ریشه در ارتباط بوده و رشد ریشه را افزایش میدهند. در طول فرایند کمپوست سازی اسید هیومیک تولید میشود. علاوه بر این اسید هیومیک نقش مهمی در جذب آب و مواد غذایی توسط گیاه، تمایزیابی سلول و

تشکیل ریشه جانبی دارد (Jindo et al., 2012). در نتیجه بیوماس ریشه در بستر T2 در مقایسه با سایر تیمارها در هر دو مرحله رشد افزایش یافت. اما تفاوت معنی داری بین T1 با T2 و T3 به دلیل محلول غذایی مصنوعی حاوی فسفر که مستقیما با تحریک رشد ریشه مرتبط است، وجود نداشت (Barita et al., 2018). علاوه بر این ترکیبات کمپوست همانند پیت و کوکوپیت با افزایش ظرفیت تبادل کاتیونی بالا منجر به ذخیره ی مواد غذایی و بهبود مدیریت آبیاری و در نتیجه افزایش وزن تر ریشه می گردند (Casierra-Posada et al., 2012).

۳-۳-وزن خشک ریشه

حداکثر وزن خشک ریشه در مرحله رشد رویشی در گیاهان رشد یافته در بستر T2 (۵/۳۵ g) و سپس به ترتیب در T1 (۳/۴۳g)، T3 (۲/ ۸۱g) و CS (۱/۸۳g) مشاهده شد. (شکل۳).

طبق گزارشات بالاترین مقدار وزن خشک ریشه در بستر کمپوست ترکیبی به علت مقدار بیشتر فسفر موجود در بقایای آلی بوده است (Preusch et al., 2004). با توجه به نتایج وزن خشک در مرحله رویشی، تفاوت معنی داری بین T1 با T2 و T3 به دلیل مواد غذایی غیرفعال تجزیه شده و آزادسازی تدریجی برای حفظ مقدار قابل دسترس مواد غذایی خاک، وجود نداشت. بنابراین بیوماس ریشه در کمپوست و مواد غذایی مصنوعی در خاک در یک مقدار بود (Hasnain et al., 2020).

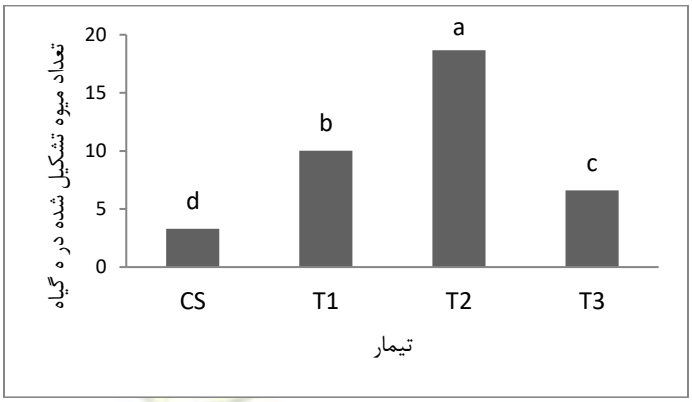


شکل ۳: تاثیر بسترهای مختلف رشد بر وزن خشک ریشه توت فرنگی در مراحل رشد رویشی و زایشی

بیشترین وزن خشک ریشه در مرحله رشد زایشی به ترتیب در تیمارهای T2، T1، T3 و CS مشاهده شد. علاوه بر این مواد هیومیکی منجر به افزایش وزن مولکولی ریشه میشود (Jindo et al., 2012). بنابراین در مقایسه با تغذیه مصنوعی و خاک به عنوان کنترل، ترکیبی از کمپوست ترکیبی و تغذیه مصنوعی، مواد معدنی بیشتری به همراه مواد هیومیکی برای رشد ریشه توت فرنگی فراهم میکند. با وجود این تفاوت معنی داری بین T1 با T2 و T3 در مرحله زایشی دیده نشد به دلیل اینکه خاک دارای کمپوست ترکیبی مقادیر مشابهی از مواد معدنی را در طول فرایند کمپوست سازی همانند تغذیه مصنوعی برای یک خاک فراهم می کند (Jindo et al., 2012) و همچنین بسترهای حاوی کمپوست به دلیل میزان تخلخل و نگهداری بهتر آب زمینه دسترسی به مواد غذایی را برای گیاه فراهم می کنند (Albaho et al., 2009).

۳-۴-تعداد میوه تشکیل شده (fruit set)در هر گیاه

حداکثر تعداد میوه تشکیل شده در هر گیاه در مرحله زایشی به طور معنی داری در گیاهان کشت شده در بستر T2 (۶۶ /۱۸ g) مشاهده شد و در سایر بسترها مطابق شکل ۴ به ترتیب T1 (۱۰/ ۰۳ g)، T3 (۶/ ۶ g) و CS (۴/ ۳ g) بود.

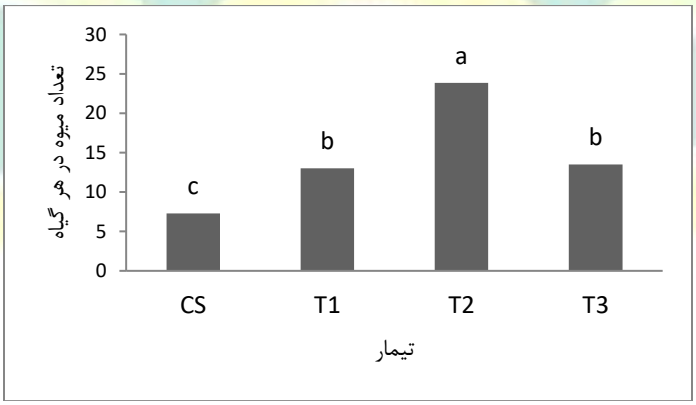


شکل ۴: تاثیر بسترهای مختلف رشد بر تعداد میوه تشکیل شده در هر گیاه توت فرنگی

به نظر میرسد بستر حاوی کمپوست درصد تخلخل و تهویه ای بالاتری داشته باشد که این ویژگی سبب میشود که اکسیژن بیشتری درمحیط ریشه فراهم شود (بای بوردی، ۱۳۵۷) و در نتیجه با افزایش میزان هوای خاک، در کنار تغذیه مصنوعی میزان محصول افزایش پیدا میکند.

۳-۵-تعداد میوه در هر گیاه

با توجه به داده های عملکرد میوه تفاوت بین تیمارهای مختلف در تعداد میوه در هر گیاه به ترتیب در تیمار T2 (۸۷ /۲۳ g) ، T1 (۱۳/۰۱ g)، T3(۱۳/۵۰ g) و CS (۷/۳۰ g) مشاهده شد.



شکل ۵: تاثیر بسترهای مختلف رشد بر تعداد میوه در هر گیاه توت فرنگی

از داده های مرتبط با تعداد میوه توت فرنگی مشاهده شد افزایش در میکروارگانیزمهای خاک منجر به تولید هورمونهایی میگردد که مانند تنظیم کننده رشد گیاهی عمل کرده و نمو ساختارهای زایشی را تحریک میکند (Arancon et al., 2003). به عبارت دیگر

دسترسی کم و کندرهاسازی مواد غذایی از بستر خاک (CS) علت کاهش عملکرد در مقایسه با سایر تیمارها بود (Ayesha et al., 2011).

کاربرد مواد آلی و غیرآلی در مقادیر متناسب ظرفیت نگهداری آب و اکسیژن را بهبود می بخشد. همچنین تهویه منجر به تشکیل بهتر سیستم ریشه شده وجذب بهتر مواد غذایی مورد نیاز برای رشد کافی و تولید میوه توت فرنگی صورت میگیرد. بسترهای T2 و T1 دارای کوکوپیت و پیت ماس که از لحاظ باقیمانده نارگیل و سایر مواد تجزیه پذیر غنی هستند حاصلخیزی خاک و مواد غذایی انرا جهت تولیدکلی میوه توت فرنگی افزایش میدهد (Raja et al., 2018).

۴. نتیجه‌گیری

یافته های حاصل از این مطالعه نشان میدهد بستر رشد مستقیما با رشد و تولید توت فرنگی کشت شده در شرایط گلخانه ای همبستگی دارد. کاربرد کمپوست ترکیبی (کوکوپیت ۷۰ درصد، پرلیت ۱۱ درصد ، پیت ماس ۱۱ درصد و زئولیت۹ درصد) به همراه تغذیه مصنوعی (محلول هوگلند) در بستر کشت به طور معنی دار رشد و عملکرد میوه توت فرنگی را در مقایسه با هرکدام از بسترهای کمپوست ترکیبی به تنهایی ، تغذیه مصنوعی و خاک افزایش میدهد. نتایج نشان داد که افزایش رشد رویشی و زایشی توت فرنگی در بستر رشد ذکر شده با افزایش تعداد میوه تشکیل شده و افزایش تعداد میوه در هر گیاه همبستگی دارد. همچنین بستر T2 بالاترین پتانسیل حاصلخیزی (مواد آلی به همراه مواد غذایی معدنی شده) را داشته و به دلیل کوکوپیت و پیت ماس غنی، مقدار بالای مواد معدنی قابل دسترس به همراه جمعیت میکروبی مفید برای تولید مواد هیومیکی را دارد. این مواد بر تولید تنظیم کننده های رشد گیاهی که رشد و عملکرد توت فرنگی را گلخانه افزایش میدهد، موثر هستند.

منابع

۱- بای بوردی، م. ۱۳۵۷ . فیزیک خاک. انتشارات دانشگاه تهران، صفحه ۴۶۷.

2- Arancon N.Q., Edwards C.A. Bierman P. Metzger J.D. Lee S. and Welch C. 2003. Effects of vermin composts on growth and marketable fruits of field-grown tomatoes, peppers and strawberries: the 7th international symposium on earthworm ecology· Cardiff·Wales· 2002. Pedobiologia 47 (5-6), 731–735.

3-Albaho M., Bhat N. Abo-Rezq H. and Thomas B. 2009. Effect of three different substrates on growth and yield of two cultivars of *Capsicum Annuum*. European Journal of Scientific Research. 28(2): 227-233.

4-Ayesha R., Fatima N. Ruqayya M. Qureshi K.M. Hafiz I.A. Khan K.S. and Kamal A. 2011. Influence of different growth media on the fruit quality and reproductive growth parameters of strawberry (Fragaria ananassa). J. Med. Plants Res. 5 (26), 6224–6232.

5-Azim K., Ouyihya K. Amellouk A. Perissol C. Thami Alami I. and Soudi B. 2014. Dynamic composting optimization through C/N ratio variation as a startup parameter. Build. Org. Brid. 3, 787–790.

6-Barita Y., Prihastanti E. Haryanti S. and Subagio A. 2018. The influence of granting npk fertilizer and nanosilic fertilizers on the growth of Ganyong plant (Canna edulis Ker.). J. Phys. Conf. 1025 (No1), 012054. IOP Publishing.

7-Basak J.K., Qasim W. Okyere F.G. Khan F. Lee Y.J. Park J. and Kim H.T. 2019. Regression analysis to estimate morphology parameters of pepper plant in a controlled greenhouse system. J. Biosyst. Eng. 44 (2), 57–68.

8-Casierra-Posada F., Pena-Olmos J.E. and Ulrichs, C.2012. Basic growth analysis in strawberry plants (Fragaria sp.) exposed to different radiation environments. Agron. Colomb. 30 (1), 25–33.

9- Core P. 2001. Hydroponics as an agricultural production system. Hassall and Associates Pty Ltd.56 pp.

10-Djedidi M., Gerasopoulos D. and Maloupa E. 1999. The effect of different substrates on the quality of F. Carmella tomatoes (*Lycopersicom esculentum Mill*.) grown under protection in a hydroponics system. Cahier Option

11-Hasnain M., Chen J. Ahmed N. Memon S. WangL. Wang Y. and Wang P. 2020. The effects of fertilizer type and application time on soil properties, plant traits, yield and quality of tomato. Sustainability 12 (21), 9065.

12-Jindo K., Martim S.A. Navarro E.C. Perez-Alfocea F. Hernandez T. Garcia C. and Canellas L.P. 2012. Root growth promotion by humic acids from composted and non-composted urban organic wastes. Plant Soil 353 (1), 209–220.

13-Khan F., Okyere F.G. Basak J.K. Qasim W. Park J. Arulmozhi E. and Kim H.T. 2019. Comparison of different compost materials for growing strawberry plants. In: International Symposium on Advanced Technologies and Management for Innovative Greenhouses: GreenSys2019, 1296, pp. 869–876.
14-Koelewijn H.P. 2004. Rapid change in relative growth rate between the vegetative and reproductive stage of the life cycle in Plantago coronopus. New Phytol. 163 (1), 67–76.
15-Martinez P.F. and Abad M. 1992. Soilless culture of tomato in different mineral substrates. Acta Hort. 323: 251-259.
16-Preusch P.L., Takeda F. and Tworkoski T.J. 2004. N and P uptake by strawberry plants grown with composted poultry litter. Sci. Hortic. 102 (1), 91–103.
17-Qasim W., Lee M.H. Moon B.E. Okyere F.G. Khan F. Nafees M. and Kim H.T. 2018. Composting of chicken manure with a mixture of sawdust and wood shavings under forced aeration in a closed reactor system. Int. J. Recycl. Org. Waste Agric. 7 (3), 261–267.
18-Raja W.H., Kumawat K. Sharma O. Sharma A. Mir J. Nabi S.U. and Qureshi I. 2018. Effect of different substrates on growth and quality of Strawberry cv. chandler in soilless culture. Pharma Innov. J 7, 449–453.
19-Shahzad U., Ijaz M. Nauman Noor M.S. Hassan Z. Kahn A.A. and Calica P. 2018. Variations in growing media and plant spacing for the improved production of strawberry (Fragaria ananassa cv. Chandler). Philipp. J. Sci.147 (4), 705–713.
20-Tejada M., Hernandez M.T.and Garcia C. 2009. Soil restoration using composted plant residues: effects on soil properties. Soil Tillage Res. 102 (1), 109–117.
21-Thakur M. and Shylla, B. 2018. Influence of different growing media on plant growth and fruit yield of strawberry (Fragaria_ ananassa Duch.) cv. Chandler grown under protected conditions. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 7 (4), 2724–2730.
22-Trejo-Tellez L.I. and Gomez-Merino F.C. 2014. Nutrient Management in Strawberry: Effects on Yield, Quality and Plant Health. Strawberries: Cultivation, Antioxidant Properties and Health Benefits. In:Malone, Nathan (Ed.). Nova Science Publishers, pp. 239–267.
23-Vandecasteele B., Debode J. Willekens K. and Van Delm T. 2018. Recycling of P and K in circular horticulture through compost application in sustainable growing media for fertigated strawberry cultivation. Eur. J. Agron. 96, 131–145.
24-Wei H., Liu C. Ryong Jeong B. 2020. An optimal combination of the propagation medium and fogging duration enhances the survival, rooting and early growth of strawberry daughter plants. Agronomy 10 (4), 557.
25-Yoshida Y., Goto T. Hirai, M. Masuda M. 2000. Anthocyanin accumulation in strawberry fruits as affected by nitrogen nutrition. In: IV International Strawberry Symposium, 567, pp. 357–360.

Effect of Chitosan Edible Coating and Thyme Essential oil on shelf-life of 'red seedless' table Grape

Pargol Rasouli[1*]

1- Asistant professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture Islamic Azad University of Takestan Branch

* *P.Rasooli@tiau.ac.ir*

Abstract

The aim of this study was to study quantitative and qualitative changes during the storage of grapes "Red seedless" cultivar using chitosan and thyme essential oils with different percentages. The study was conducted as a factorial experiment based on a completely randomized design with 3 replications. Grape fruits were treated with 150 and 300 µl/l of thyme essential oil and concentrations of 1.5 and 2.5% (w/v) chitosan solution and control fruits received no treatments. To prepare the combined solutions, chitosan solution was first prepared and then thyme essential oil with the desired concentrations was added to it. The grapes were packed in 200 g packages and stored at 0-2°C and 90% relative humidity for 90 days. Changes in weight loss, fruit firmness, total acidity, total soluble solid (TSS) and anthocyanin were evaluated after leaving the refrigerator. The results showed that the treatment of 300 µl of thyme essential oil and 1.5% of chitosan significantly reduced the weight loss and firmness of the fruit compared to the control and fruits had a better total acidity, soluble solids and anthocyanin than other fruits.

Keywords: quantitative, qualitative, storage, coating

اثر پوشش خوراکی چیتوزان و اسانس آویشن بر ماندگاری انگور رقم" بیدانه قرمز"

پرگل رسولی *[۱]

۱-گروه باغبانی، واحد تاکستان، دانشگاه آزاد اسلامی، تاکستان، ایران

* P.Rasooli@tiau.ac.ir

چکیده

این تحقیق با هدف مطالعه تغییرات کمی وکیفی در طول انبارمانی انگور رقم "بیدانه قرمز" با استفاده ازپوششهای چیتوزان و اسانس آویشن با درصدهای متفاوت صورت گرفت .آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. میوه های انگور با ۱۵۰و ۳۰۰ میکرولیتر در لیتر اسانس آویشن و غلظت ۱/۵ و ۲/۵ درصد(وزنی به حجمی) محلول چیتوزان تیمار شدند و میوه های شاهد تیماری دریافت نکردند. برای تهیه محلولهای ترکیبی ابتدا محلول چیتوزان تهیه و پس از آن اسانس آویشن با غلظتهای موردنظر به آن اضافه گردید. انگورها در بسته های ۲۰۰ گرمی بسته بندی و به انبار°C ۲±۲و رطوبت نسبی ۹۰ درصد به مدت ۹۰ روز منتقل شدند. تغییرات در وزن، سفتی میوه، اسیدیته کل ، مواد جامد محلول و آنتوسیانین میوه در پس از خروج از سردخانه موردارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تیمار۳۰۰ میکرولیتر اسانس آویشن و ۱/۵ درصد چیتوزان به طور معنی داری در مقایسه با شاهد از کاهش وزن و کاهش سفتی میوه جلوگیری کرده و میوه ها مقدار اسیدیته کل و مواد جامد محلول و انتوسیانین بهتری نسبت به سایر میوه ها داشتند.

واژگان کلیدی: کمی، کیفی، انبارمانی، پوشش دهی

۱.مقدمه

از آنجایی که سطح زیر کشت و میزان تولید انگور در کشور ما نسبت به سایر محصولات باغی بسیار چشمگیر است. این محصول به لحاظ اقتصادی می تواند یکی از اقلام صادراتی کشور را تشکیل دهد (احمدی و همکاران، ۱۳۹۵). انگورهای تولیدی در ایران بنا به دلایلی مانند عدم تغذیه صحیح درخت (Shahabi and Malakuti, 2000)، برداشت محصول در مرحله نامناسب، حمل و نقل، انبارداری و بسته بندی غیر صحیح دچار ضایعاتی می شوند (شیبانی، ۱۳۷۰). پس از برداشت، انگور میوهای بسیار فساد پذیر و نافرازگرا با عمر انبارمانی کوتاه به علت سفتی کم، ریزش حبه ها، قهوهای شدن دم خوشها، از دست دادن آب و پوسیدگی قارچی میباشد (Baldwin, 2002; De Sousa et al., 2013). یکی از روش های جلوگیری از بروز برخی از این مشکلات استفاده از پوشش های خوراکی می باشد. پوشش های خوراکی لایه های نازکی از مواد هستند که سدی در مقابل انتقال رطوبت و اکسیژن بین میوه و محیط اطراف آن ایجاد می کنند (Thumula, 2006) و با کاهش دادن تنفس میوه ها زمان ماندگاری آنها را افزایش می دهند و مصرف آنها نیز برای انسان بی خطر می باشد (Bautista-Banos et al., 2006). در سال های اخیر استفاده از پوشش های خوراکی به عنوان مواد افزودنی مواد غذایی و ترکیبات ضد میکروبی در محصولات تولیدی در بخش

کشاورزی مورد توجه قرار گرفته است (Hassanzadeh et al., 2018). چیتوزان یک پوشش جدید خوراکی و یک پلیمر خطی است که نام آن از کیتین داستیل شده گرفته شده (Anonymous, 1991) و یک ترکیب طبیعی زیست تخریب پذیر و زیست سازگار می باشد که از پوسته سخت پوستانی مانند خرچنگ و میگو به دست می آید (Bautista-Banos et al., 2006). چیتوزان به عنوان یک پوشش نیمه نفوذپذیر با تغییردادن اتمسفر درونی مانند آب، اکسیژن و دی اکسید کربن و نیز کم کردن سرعت تنفس پیری را به تأخیر انداخته و کیفیت میوه های برداشت شده را حفظ می کند (Bautista-Banos et al., 2006). مطالعات قبلی نشان می‌دهد که پوشش چیتوزان به دلیل کاهش سرعت تنفس باعث افزایش طول عمر انبارمانی در میوه های توت فرنگی، گلابی ژاپنی، هلو و کیوی شده است و با مهار رشد قارچ Botrytis cinerea باعث به تأخیر انداختن پوسیدگی می شود (Du et al., 1997). تحقیقات نشان داده است که استفاده از پوشش خوراکی چیتوزان مانع از کاهش مقدار کل مواد جامد محلول و اسیدیته قابل تیتراسیون و باعث افزایش عمر قفسه ای میوه لیچی می شود (Jiang et al., 2005). افزودن اسانسها به پوششهای خوراکی میتواند عمر انبارمانی میوه ها را در صورتی که غلظت مناسبی از اسانس به کار برده شود به علت داشتن فعالیت ضدمیکروبی افزایش دهد، زیرا ترکیبات اسانسها به مرور زمان روی سطح محصول آزاد میشود (Outtara et al., 2000). اسانسها از ترکیبات معطر متعددی ساخته شده اند .به نظر میرسد که اثرات ضدقارچی و ضدمیکروبی آنها در نتیجه عملکرد همزمان ترکیبات متعدد آن است .این بدین معنی است که این ترکیبات به تنهایی مؤثر نیستند(Jobing, 2007). اسانسها اغلب اثر قارچ کشی دارند (Bai et al., 2002)، و تاثیرات مثبت انها بر افزایش انبارمانی در مقالات مختلف به اثبات رسیده است (De Sousa et al., 2013). این بدین معنی است که رشد قارچ با قرار گرفتن در معرض اسانسها متوقف میشود، اما اگر اسانس برداشته شود قارچ به رشد خود ادامه میدهد (Jiang et al., 2005). تاثیر عصاره آویشن و زنیان را در کنترل قارچ آسپرژیلوس در گلابی گزارش نیز شده است (مسکوکی و مرتضوی، ۱۳۸۳). کاربرد اسانس زیره سبز در کنترل قارچ بوتریتیس در توت فرنگی نیز گزارش شده است (رنجبر و همکاران، ۱۳۸۷). عصاره ضد میکروبی حاصل از گیاهان آویشن و مرزنجوش باعث کنترل قارچ بوتریتیس در گل بریده رز شده است (Deferera et al., 2002). این پژوهش در خصوص استفاده همزمان از عصاره گیاهی آویشن و پوشش خوراکی چیتوزان به منظور افزایش عمر انبارمانی و حفظ کیفیت انگور رقم" بیدانه قرمز "بوده و افزایش عمر پس از برداشت میوه انگور رقم بیدانه قرمز بسیار محدود کار شده است. همچنین اثر آنها بر برخی خصوصیات فیزیکی و فیزیکوشیمیایی میوه های انگور ۹۰ روز بعد از بررسی شد

۲.مواد و روش‌ها

جهت انجام این آزمایش انگور رقم بیدانه قرمز در سال ۱۳۹۹ از باغ شخصی واقع در استان زنجان برداشت شد. میوه‌ها در مرحلهٔ رسیدگی تجاری هنگامی که میزان مواد جامد محلول کل میوه ها در حدود ۱۸ درجه بریکس بود، برداشت شد و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل گردید. خوشه‌ها بر پایهٔ اندازه، رنگ و وزن انتخاب و حبه‌های آلوده و زخمی از بین آن‌ها حذف شد. پس از تیمار حبه‌ها با عصاره اویشن (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرولیتر برلیتر) و پوشش خوراکی کیتوزان (۰، ۱/۵ و ۲/۵ درصد) در ظرف‌های پلاستیکی و بسته‌های پلی‌اتیلن به وزن ۲۰۰ گرم قرار گرفته و سپس به سردخانه ۲±۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۹۰درصد منتقل شد. میو ها پس از ۹۰ روز از سردخانه خارج شده و به منظور ایجاد حالت مشابه با خرده فروشی به مدت ۲۴ ساعت در شرایط دمای°C ۲۵ و رطوبت نسبی ۷۰ درصد قرار گرفته و سپس در آزمایشگاه از نظر صفات کمی وکیفی موردبررسی قرار گرفتند.

جهت تهیه غلظتهای مورد نظر چیتوزان خریداری شده از شرکت سیگما آمریکا با درجه استیل زدایی ۸۰ درصد به مقدار لازم در ۱۰۰ سی سی محلول حجمی یک درصد اسید استیک ریخته و با همزن آهنربایی با ۱۰۰۰دور در دقیقه به مدت۵ دقیقه حل گردید. اسانس آویشن مورداستفاده نیز از شرکت تولید و فرآوری گیاهان دارویی زردبند، خریداری شد.

۱-۲-صفات اندازه گیری شده

۱-۱-۲-مواد جامد محلول کل (TSS): اندازه گیری با استفاده از دستگاه رفرکتومتر دستی مدل(VBR-90A) صورت گرفت(مستوفی و نجفی، ۱۳۸۵).

۲-۱-۲-درصد کاهش وزن : میزان افت وزن نسبت به وزن اولیه به صورت درصد بیان می‌شود. (Dehestani Ardakani, 2008)

۳-۱-۲-اسیدیته کل: به روش تیتراسیون با سود ۰/۱ نرمال و برحسب اسید سیتریک محاسبه گردید (علی خانی و همکاران، ۱۳۸۸).

۴-۱-۲-میزان آنتوسیانین: سنجش میزان آنتوسیانین با روش روش وانگر (۱۹۷۹) انجام شد (Wagner, 1979).

۵-۱-۲-سفتی بافت میوه: بر اساس سیستم نمره دهی پنج نقطه ای در مقیاس ۱تا ۵ صورت گرفت: ۱ سفت ، ۲ کمی نرم، ۳ متوسط، ۴ نرم و ۵ خیلی نرم (Xu et al., 2007)

۲-۲-طرح آماری

این آزمایش به صورت اسپلیت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار تکرار اجرا شد. تجزیه و تحلیل داده‌های صفات انگور با استفاده از نرم افزار SAS 9.4 انجام پذیرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۱ انجام شد.

۳. نتایج و بحث

نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد، تنها تیمارساده چیتوزان بر فاکتورهای درصد کاهش وزن، مواد جامد محلول کل، آنتوسیانین معنی‌دار نشده و اثر ساده آویشن و نیز اثر متقابل آویشن و چیتوزان بر صفات مورد مطالعه معنی دار بوده اند.

جدول۱: تجزیه واریانس اثر چیتوزان، اسانس آویشن و اثر متقابل آنها بر برخی صفات مورد بررسی در میوه انگور رقم" بیدانه قرمز"

تیمار	درجه آزادی	درصد کاهش وزن	سفتی بافت	مواد جامد محلول کل	اسیدیته کل %	آنتوسیانین
آویشن	۲	۱۵۸/۲**	۴/۷**	۷۱/۴*	۰/۵۴۳**	۷۸۷/۲*
کیتوزان	۲	۱۷/۵ns	۲/۳*	۴۱/۱ns	۰/۷۱۶**	۱۱/۲ns
آویشن* کیتوزان	۴	۵۶/۶**	۳/۲**	۷۸/۸**	۰/۲۸۰**	۱۴۷/۱**
خطا	۱۸	۵/۴۶۳	۰/۰۶۳	۱۴/۰۴۹	۰/۰۴۲	۲۲/۸۷
ضریب تغییرات		۱۷/۷	۳۳/۷	۲۲/۱	۵۲/۱	۱۴/۳

ns، * و : ** به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار در سطح ۱و ۵ درصد

۱-۳-کاهش وزن

در میان تیمارهای مختلف بیشترین کاهش وزن در نمونه های شاهد (بدون تیمار) به دست آمد (جدول ۲). تیمارهای مختلف همگی نسبت به شاهد منجر به کاهش معنی دار از دست دادن آب نمونه ها شد. به طوریکه کمترین کاهش وزن با تیمار میکرولیتر در لیتر اسانس آویشن+۱/۵ درصد چیتوزان به دست آمد.

نتایج حاصل از پوشش دهی انگورها با چیتوزان و اسانس بذر گریپ فروت نشان داد که میوه های تیمار شده نسبت به شاهد کاهش وزن کمتری داشتند (Xu et al., 2007). همچنین نشان داده شد که با گذشت زمان میزان کاهش وزن، افزایش می یابد (Xu et al., 2007). عمر تازه انگورها تحت تأثیر کاهش وزن حبه ها و دم خوشه ها قرار میگیرد، زمانی که حبه ها وزن خود را از دست میدهند نسبت به فساد قارچی نیز حساسیت بیشتری پیدا میکنند. به طورکلی، اثر مثبت پوششهای خوراکی براساس خواص هیگروسکوپی است، که به عنوان سدی بین میوه و محیط اطراف قرار دارد، بنابراین تبادلات خارجی را کاهش داده و در نهایت جلوی از دست دادن آب میوه ها را میگیرد (Hernandez-Munoz et al., 2006).

جدول۲: مقایسه میانگینهای اثر ساده اسانس آویشن، چیتوزان و اثر متقابل آنها بر برخی صفات کمی و کیفی انگور رقم" بیدانه قرمز"

آنتوسیانین (میلی گرم/بافت گیاه)	اسیدیته کل (درصد)	مواد جامد محلول کل (بریکس)	سفتی بافت	کاهش وزن (درصد)	چیتوزان (درصد)	آویشن (میکرولیتر برلیتر)
۲۳/۲de	۱/۳۱۳a	۱۰/۵d	۵/۰a	۱۹/۷a	۰	۱
۲۰/۱e	۰/۶۰۰b	۱۷/۲bd	۲/۰b	۸/۸de	۱/۵	
۲۵//۲de	۰/۱۷۰cd	۱۹/۸ac	۲/۱b	۱۲/۲ cd	۲/۵	
۲۹/۷cd	۰/۱۴۳d	۱۳/۱cd	۲/۰b	۱۸/۷ab	۰	۱۵۰
۳۵/۵bc	۰/۳۰۰bd	۱۶/۰bd	۱/۷b	۱۷/۸ab	۱/۵	
۳۱/۹cd	۰/۵۳۳bc	۱۵/۳cd	۱/۵b	۱۴/۹bc	۲/۵	
۴۰/۶b	۰/۰۸۷d	۱۲/۸cd	۲/۲b	۹/۳de	۰	۳۰۰
۵۰/۱a	۰/۱۱۷d	۲۳/۹a	۲/۵b	۵/۷e	۱/۵	
۴۳/۱ab	۰/۲۸۳bd	۲۲/۶ab	۲/۱b	۱۱/۴cd	۲/۵	

۳-۲-سفتی بافت میوه

طبق نتایج جدول ۲ سفتی بافت میوه انگور در پایان دوره نگهداری در سردخانه در میوه های تیمار نشده کاهش داشت در صورتیکه در میوه های تیمار شده با عصاره آویشن و چیتوزان سفتی بافت را با وجود کمی نرم شدن در حد مطلوب حفظ شد و بهترین حالت حفظ سفتی میوه با تیمار ۱۵۰ میکرولیتر در لیتر آویشن+ غلظت ۲/۵ درصد چیتوزان بدست آمد. در واقع تیمار پوشش دهی توانست میزان سفتی اولیه میوه ها را حفظ کند .حفظ سفتی بافت میوه ارتباط نزدیکی با کاهش وزن و از دست دادن آب آنها دارد و تیماری که کاهش وزن بیشتری داشته سفتی میوه نیز کاهش بیشتری نشان داد. اضافه کردن اسانس به پوششهای خوراکی میتواند به طور معنی داری سفتی بافت میوه را حفظ کند و خصوصیات بافت میوه توسط آماس سلولی و ساختار و ترکیب پلی ساکاریدهای دیواره سلولی تحت تأثیر قرار میگیرد (Rojas-Grau et al., 2007). همچنین نشان داده شد که انگورهای تیمار شده با اسانس (تیمول و اوگنول) و بسته بندی با اتمسفر تغییر یافته سفتی خود را بهتر از شاهد حفظ کردند (Valero et al., 2006; Rojas-Grau et al., 2007) . تیمارهای کیتوزان و اسانس بذر گریپ فروت، کیفیت میوه‌ها را بهتر حفظ میکنند. به نظر میرسد که تیمار با عصاره آویشن و کیتوزان به دلیل حفاظت از میوه در برابر رشد قارچ و جلوگیری از آب از دست‌دهی آن توانسته رنگ و بو و بافت انگورها را بهتر از شاهد حفظ کند (Xu et al., 2007).

۳-۳-مواد جامد محلول کل

نتایج جدول ۲ نشان داد حفظ مواد جامد محلول کل در پایان دوره انبارمانی در انگور تحت تأثیر کاربرد کیتوزان و عصاره آویشن قرار گرفت. بیشترین میزان مواد جامد محلول کل در انگور با تیمار آویشن ۳۰۰ میکرولیتر در لیتر+ چیتوزان درصد و به میزان ۲۳/۹ بود

که در مقایسه با درجه بریکس ۲۳ در زمان شروع انبارمانی با کمترین تغییر در طول دوره همراه بوده است. کمترین میزان مواد جامد محلول در تیمار شاهد مشاهده شد. همچنین با افزایش غلظت چیتوزان نقش آن در حفظ مواد جامد محلول کل کاهش یافت زیرا ایجاد پوشش ضخیم روی میوه منجر به تنفس غیرهوازی در میوه ها میگردد. تحقیقات نشان داده میزان مواد جامد محلول کل در توت فرنگی های رسیده نگهداری شده در انبار سرد در نتیجه افزایش تنفس کاهش یافت (Hassanzadeh et al., 2018). میزان اندک اکسیژن در اطراف میوه به دلیل پوشش دهی با اسانس و چیتوزان میتواند از مصرف قندها جلوگیری نموده و در نتیجه جلوی متابولیسم تبدیل نشاسته به قند را نیز بگیرد (Outtara et al., 2000). در پژوهش حاضر مشخص شد که اسانس آویشن و چیتوزان نقش مؤثری در حفظ مواد جامد محلول کل داشتند که مربوط به میزان اندک تنفس میوه های پوشش داده شده باشد (Gao et al., 2013). کاهش فرایند پیری در میوه های تیمار شده با چیتوزان و اسانس آویشن باعث کاهش تولید و اثر اتیلن و کاهش تنفس و حفظ دیواره سلولی میشود که نتیجه آن حفظ بهتر مواد جامد محلول واقعی سلولها میباشد (Gao et al., 2013).

۳-۴-اسیدیته کل

در پایان دوره انبارمانی با محاسبه درصد اسیدیته کل مشخص شد در میوه های شاهد اسید کل بیشترین مقدار را داشته و در میوه های تیمار شده کاهش میزان اسیدآلی دیده شد. اما این کاهش در میزان اسید کل در میوه های پوشش داده شده با غلظت ۲/۵ درصد چیتوزان به همراه غلظتهای مختلف آویشن کمتر بود. که به علت کاهش فرایند تنفس به دلیل پوشش ضخیم تر بود. میزان اسیدهای قابل تیتراسیون با رسیدگی میوه در ارتباط می باشد و موجب طعم ترش در میوه میگردند .با رسیدن میوه میزان اسیدها آلی کاهش مییابند (Hernandez-Munoz et al., 2008). میزان اسیدهای آلی در دوره برداشت میوه به مواد جامد قابل حل و سرعت تجزیه اسیدها بستگی دارد. تجزیه اسیدهای آلی در دوره رسیدن میوه به تنفس وابسته است(علی خانی و همکاران، ۱۳۸۸). در تحقیق دیگراختلاف معنی داری بین اسیدیته زردآلوهای پوشش داده شده با چیتوزان و نمونه های شاهد پیدا نکردند و کاهش اسیدیته در پایان دوره نگهداری را به تغییرات متابولیکی میوه یا مصرف شدن اسیدهای آلی در فرآیند تنفس نسبت دادند (Ghasemnezhad et al., 2010). نتایج این پژوهش با تحقیق بر روی کیوی و گلابی اسیایی مطابقت دارد (Du et al., 1997).

۳-۵-مقدار آنتوسیانین

بر اساس داده های حاصل از جدول ۲ بیشترین آنتوسیانین انگور در اثر متقابل تیمار آویشن ۳۰۰ میکرولیتر بر لیتر + کیتوزان ۱/۵ درصد و کمترین میزان آنتوسیانین انگور در تیمار شاهد مشاهده شد. پوشش دهی میوه ها منجر به کنترل مقدار آنتوسیانین میوه در طول دوره انبارمانی شد. فلاونوئیدها نیز از این جمله ترکیب های فنلی گیاهی به شمار می آیند و شامل فلاونها، فلاونولها، ایزوفلاونوئیدها و آنتوسیانینها هستند .این دسته از ترکیب ها، خواص پادویروسی و پادمیکروبی و آنتی اکسیدانی بالایی دارند (Bakhshi and Arakawa, 2006). تغییرات انتوسیانین میوه انگور در طی مدت انباری به دلیل افزایش تنفس و بدون کاهش جذب اکسیژن رخ میدهد (Dehestani Ardakani, 2008) .کنترل ازدست دادن رطوبت از طریق پوشش دهی (چیتوزان) میتواند تغییرات آنتوسیانین در میوه های انگور را به حداقل برساند(Serrano et al., 2006). در تحقیق دیگری اثر چیتوزان ۱/۵ درصد و کسیم گلوکونات ۱ درصد بر میوه توت فرنگی انبار شده در ۲۰ در جه سانتیگراد بررسی شده و جلوگیری از کاهش میزان انتوسیانین در میوه های پوشش دار مشاهده شد (Hernandez-Munoz et al., 2006) که با نتایج تحقیق کنونی مطابقت دارد.

۴. نتیجه‌گیری

این تحقیق با هدف مطالعه تغییرات کمی وکیفی میوه انگور رقم بیدانه قرمز پوشش داده شده با درصدهای مختلفی از پوشش های خوراکی عصاره اویشن و چیتوزان در طی نگهداری در سردخانه انجام شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که پوششهای

خوراکی نقش تعیین کننده‌ای در افزایش انبارمانی انگور دارند و با انتخاب پوشش مناسب میتوان ضمن حفظ تازگی میوه برای مدت طولانیتر، از تغییرات کیفی و کمی محصول نیز جلوگیری کرد، به طوری که با استفاده از ترکیب عصاره آویشن ۳۰۰ میکرو لیتر بر لیتر به همراه غلظت ۱/۵ درصد چیتوزان میتوان به خوبی انگورهای تازه را برای مدت ۹۰ روز در سردخانه نگهداری کرد.

منابع

۱) احمدی ک.، قلیزاده ح. عبادزاده ح. حاتمی ف. حسینپور ر. کاظمی فرد ر. و عبدشاه ه. . آمارنامهٔ کشاورزی، سال زراعی ۹۴-۱۳۹۳ - ۱۳۹۵،ج ۳ :محصولات باغبانی، وزارت جهاد کشاورزی، معاونت برنامه ریزی و اقتصادی، فناوری اطالعات و ارتباطات، ص ۹-۷

۲) رنجبر ح.، فرزانه م. هادیان ج. میر جلیلی م. ح. و شریفی ر. ۱۳۸۷. اثر ضد قارچی چند اسانس گیاهی بر کنترل بیمار های پس از برداشت توت فرنگی. مجله پژوهش و سازندگی در زراعت و باغبانی، ۸۱: ۵۵-۶۵.

۳) شیبانی ح. ۱۳۷۰. باغبانی، جلد ۴، قسمت اول میوه‌های نیمه گرمسیری، چاپ ۲، انتشارات سپهر، صفحه ۲۲۰.

۴) علی خانی م .، شریفانی م. عزیزی م. همتی خ. و موسوی زاده س.ج . ۱۳۸۸ .تاثیر ترکیبات طبیعی گیاهی بر عمر انبار مانی و ویژگی های کیفی میوه گلابی(رقم شاه میوه اصفهان). مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، جلد

۵) مستوفی ی. و نجفی ف. ۱۳۸۵. روشهای آزمایشگاهی تجزیهای در علوم باغبانی، انتشارات دانشگاه تهران. صفحه ۱۸۰.

۶) مسکوکی ع. و مرتضوی س ع. ۱۳۸۳ .تاثیر اسانس های آویشن و زنیان بر کنترل قارچ آسپرژیلوس Aspergilus parasiticus روی گلابی در سردخانه .علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، ۸(۲): ۲۰۷-۲۱۵

7) Anonymous. 1991. General news: chitosan derivative keeps apples fresh. PostharvestNewsInform 2:75.
8) Bai J., Baldwin E.A. and Hagenmaier R.H. 2002. Alternatives to shellac coatings provide comparable gloss, internal gas modification, and quality for ‘Delicious’ apple fruit. HortScience 37:559–63.
9) Bakhshi D. and O Arakawa. 2006. Effect of UV-B irradiation on phenolic compounds accumulation and their antioxidant activity in ‘Jonathan’ apple. Food, Agriculture and Enviroment 4: 75-79.
10) Baldwin E. A. 2002. New Coating Formulations for the Convertion of Tropical Fruit. Departement des productions fruiters horticoles Flhor. Winter Haven, FL, USA.
11) Bautista-Banos S., Hernandez-Lauzardo A. N. Velazquez-del Valle M. G. Hernandez-Lo pezAit M. Barka E. Bosquez-Molina E. and Wilson C. L. 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. Crop Protection 25: 108-118.
12) Deferera D.J., Zigas B.N. and Polission M.G. 2002. The effectiveness of plant essential oils on the growth of Botrytis cinerea, Fusarium sp. and Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis. Crop Protection, 22: 39-44.
13) Dehestani Ardakani M. 2008. The effect of chitosan and thymus extract on storage life and maintaining quality of two Iranian table grape. M.Sc. thesis. Faculty of Agriculture Tehran University, Iran (In Farsi)
14) De Sousa L. L., Andrade S. C. A. Athayde A. J. A. A. Oliveira C. E. V. Sale C. V. Marta Suely Madruga M. S. and Souza E. L. 2013. Efficacy of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils in combination to control postharvest pathogenic *Aspergilli* and autochthonous mycoflora in *Vitis labrusca* L. (table grapes). International Journal of Food Microbiology, 165: 312-318.
15) Du J. M., Gemma H. and Iwahori S. 1997. Effects of chitosan coating on the storage of peach, Japanese pear and kiwifruit. Horticultural Science 66: 15-22.
16) Ghasemnezhad M., Shiri M.A. and Sanavi M. 2010. Effect of chitosan coatings on some quality indices of apricot (Prunus armeniaca L.) during cold storage. Caspian Journal of Environmental Sciences, 8(1), 25-33.
17) Gao P., Zhu Z. and Zhang P. 2013. Effects of chitosan–glucose complex coating on postharvest quality and shelf life of table grapes. Polymer, 95: 371-378.
18) Hassanzadeh P., Moradi M. Vaezi N. Moosavy M.H. and Mahmoudi R. 2018. Effects of chitosan edible coating containing grape seed extract on the shelf-life of refrigerated rainbow trout fillet. Vet Res Forum. 2018 Winter;9(1):73-79.

19) Hernandez-Munoz P., Almenar E. Ocio M. J. and Gavara R. 2006. Effect of calcium dips and chitosan coatings on postharvest life of strawberries (*Fragaria* × *ananassa*). Postharvest Biology and Technology, 39: 247-253.
20) Hernandez-Munoz P., Almenar E. Del Valle V. Velez D. and Gavara D. 2008. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (Fragaria × ananassa) quality during refrigerated storage. Food Chemistry, 110, 428-435.
21) Jiang Y. M., Li J. R. and Jiang W. B. 2005. Effects of chitosan coating on shelf life of cold-stored litchi fruit at ambient temperature. Food Science and Technology 38: 757-761.
22) Jobing J. 2007. Essential oils: Anew idea for postharvest disease controls. Sydney postharvest Laboratory information Sheet.
23) Outtara B., Simard R. E. Piette G. Begin A. and Holley R. A. 2000. Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films. Journal of Food Science, 65: 768-773.
24) Rojas-Grau M. A., Raybaudi-Massilia R. M. Soliva-Fortuny R. C. Avena-Bustillos R. J. McHugh T. H. and Martin-Belloso O. 2007. Apple puree-alginate edible coating as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf-life of fresh-cut apples. Postharvest Biology and Technology, 45: 254-264.
25) Serrano M., Valverde J. M. Guillen F. Castillo S. Martinez – Romero D. and Valero D. 2006. Use of aloe vera gel coating preserves the functional properties of table grapes. J. Agric. Food Chem. 54: 3882 – 3886.
26) Shahabi A. A. and M. G. Malakuti. 2000. Foliar Ca fundamental necessity to improve the quality characteristics of fruit stored in calcareous soils. Soil and Water Research Institute. Iran. (In Farsi).
27) Thumula P. 2006. Studies on Storage Behavior of Tomatoes Coated with Chitosan-Lysozyme Films. M.Sc. thesis. Department of Bioresource Engineering Faculty of Agricultural and Environmental Sciences. McGill University Montreal, Quebec, Canada, 128 pp.
28) Valero D., valverde J. M. Romero D. M. Guillen F. Castillo S. and Serrano M. 2006. The combination of modified atmosphere packaging with eugenol or thymol maintains quality, safety and functional properties of table grapes. Postharvest Biology and Technology, 41: 317-327.
29) Wagner G.J. 1979. Content and vacuole/extra-vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. Plant Physiology 64: 88-93.
30) Xu W. T., Huang K. L. Guo F. Qu W. Yang J. J. Liang Z. H. and Luo Y. B. 2007. Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control Botrytis cinerea. Postharvest Biology and Technology, 46, 86-94.

The Effect of Pre-harvest Treatment of Ascorbic Acid on Shelf Life of Strawberries

Razieh Karimi Ghahfarokhi[1*]; Gholamreza Rabiei[2]; Morteza Reisi[3]

1- M.Sc. Student, Department of Horticultural Science, Shahrekord University
2- Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Shahrekord University
3- Assistant Professor, Department of Physics, Shahrekord University

**Corresponding Author Email address; raziehkarimi95@gmail.com*

Abstract

This study was carried out to investigate the effect of the pre-harvest application of Ascorbic Acid (AA) on shelf life of strawberries kept at 4±1 °C and 90% relative humidity. Hydroponically grown Albion strawberries were chosen for the study. The plants were of the same age and free from any signs and symptoms of diseases and pests and received identical nutrition and management. Foliar sprays were conducted at two stages. The first one was performed after the pollination of first-grade flowers had completed and the second spray was 30 days later. Treatments included control (sprayed with distilled water) or the application of 1000 ppm AA, each with three replications and then stored with temperature and relative humidity controlled. Assessment of the traits was carried out on weekly intervals for up to four weeks after the storage. During the storage fruit weight, fruit firmness, vitamin C content, pH, total acidity (TA) and total soluble solids (TSS) were assessed. Results showed that, in general, during the storage, fruit weight, fruit firmness and vitamin C had decreased, while, pH, total acidity and TSS had increased. It was shown that fruit weight loss, fruit softening and the loss of vitamin C were diminished by the use of AA. There were significant differences observed 21 days after storage for fruit weight loss for the control and AA treatment. Fruit weight loss was 66% for the control, while it was 21% for AA. Also it was noticed that, in general, fruit firmness was decreased during the storage, but it was significantly lower for the control, compared with for AA treatment. Similarly, vitamin C content of the fruits was lower for the control. On the other hand, AA treatment had no significant effect on TSS or pH. The effect of storage time appeared to be significant for TSS, pH, and TSS/TA, while, it was not significant for TA. It was noticed that AA treatment could prevent fruit decay for up to two weeks after storage, but later on there was no significant difference observed between AA and the control. It was concluded that the application AA may increase the shelf life of strawberries under the studied conditions.

Keywords: Vitamin C, Postharvest, Shelf life

اثر تیمار پیش از برداشت اسید اسکوربیک بر انبارمانی توت فرنگی

راضیه کریمی قهفرخی[1*]؛ غلامرضا ربیعی[2]؛ مرتضی رئیسی[3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

۲- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

۳- استادیار گروه فیزیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد

ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: raziehkarimi95@gmail.com

چکیده

این پژوهش به منظور بررسی تاثیر محلول پاشی پیش از برداشت اسیداسکوربیک بر ماندگاری میوه توت فرنگی نگهداری شده در دمای ۴±۱°C و رطوبت نسبی ۹۰٪ انجام گرفت. توت فرنگی رقم آلبیون کشت شده درون گلخانه به صورت هیدروپونیک برای این آزمایش انتخاب شد. گیاهان همگی هم‌سن و بدون علائم بیماری یا آفت و تحت مدیریت تغذیه و نگهداری یکسان بودند. محلول پاشی در دو مرحله انجام شد. اولین محلول پاشی پس از گرده افشانی اولین گل‌های درجه یک و دومین مرحله ۳۰ روز پس از آن انجام شد. تیمارها شامل شاهد (محلول پاشی با آب مقطر) و اسید اسکوربیک با غلظت ۱۰۰۰ ppm هرکدام با سه تکرار و سپس انبارداری با کنترل دما و رطوبت انجام شد. ارزیابی صفات مورد نظر در فواصل یک هفته‌ای تا مدت ۲۱ روز پس از برداشت انجام شد (هفت، ۱۴ و ۲۱ روز). در طی انبارمانی صفات وزن میوه، میزان سفتی بافت میوه و میزان ویتامین ث کاهش و میزان pH، اسیدیته کل و مواد جامد محلول بررسی شد. نتایج نشان داد در طول انبارمانی بطور کلی وزن میوه، میزان سفتی بافت میوه و میزان ویتامین ث کاهش و میزان pH، اسیدیته کل و مواد جامد محلول در میوه افزایش یافت. تیمار اسیداسکوربیک کاهش وزن و میزان نرم شدن بافت میوه، و روند از دست دادن مقدار ویتامین ث را کاهش داد. تفاوت معنی داری بین تیمارهای شاهد و اسید اسکوربیک از نظر کاهش وزن میوه ۲۱ روز پس از انبارداری دیده شد. در تیمار شاهد کاهش وزن میوه ۶۶٪ بود در حالی‌که این مقدار برای تیمار اسید اسکوربیک ۲۱٪ بود. همچنین مشاهده شد که اگرچه سفتی میوه بطورکلی در طول انبارداری کاهش یافته، اما در تیمار شاهد به طور معنی داری کمتر از تیمار اسید اسکوربیک بود. به طور مشابه، میزان ویتامین ث میوه های تیمار شاهد کمتر از تیمار اسید اسکوربیک بود. از طرف دیگر تیمار اسید اسکوربیک بر صفات مقدار قند میوه (TSS) و pH تاثیر معنی داری نداشت. اثر مدت زمان انبارداری بر صفات قند میوه، pH، و شاخص طعم معنی دار اما بر میزان اسیدیته قابل تیتر غیرمعنی دار بود. تیمار اسیداسکوربیک تا روز ۱۴ انبارداری موجب کاهش درصد پوسیدگی میوه شده است، اما پس از آن تیمار شاهد و اسید اسکوربیک تفاوت معنی داری نشان ندادند. می‌توان چنین استنباط نمود که کاربرد اسید اسکوربیک می‌تواند انبارمانی توت فرنگی را در شرایط آزمایش شده افزایش دهد.

واژگان کلیدی: ویتامین ث، پس از برداشت، عمر انباری

۱.مقدمه

توت فرنگی یک میوه مهم اقتصادی است که سراسر جهان مصرف می شود و به دلیل رنگ، شکل، عطر، طعم و بافت لذیذ خود شناخته شده است. توت فرنگی دارای مواد مغذی مختلفی از جمله مواد معدنی و ویتامین‌ها، آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک است که از سلول ها در برابر سرطان، اکسیدان‌ها، التهاب و اختلالات عصبی محافظت می‌کند (Shahzad salem et al., 2021). همچنین توت فرنگی منبع اسید اسکوربیک، پتاسیم، کلسیم و فسفر است (Jesus Filhoa et al., 2018). توت فرنگی رقم آلبیون (Fragaria anannasa Duch CV Albion) ، رقمی روز خنثی است. این میوه به دلیل سرعت تنفس بالا و استحکام کم دیواره سلولی بسیار فاسد شدنی است و مستعد ابتلا به آلودگی‌های پس از برداشت است. تخمین زده می شود که تلفات ناشی از قارچ کپک خاکستری به ۲۵ تا ۵۵ درصد در طول برداشت برسد و تلفات اصلی تا ۸۹ درصد پس از برداشت رخ می دهد (Vanti et al, 2021). کپک خاکستری ناشی از *Botrytis cinerea* است. که یک پاتوژن نکروتروف همه جازی است و دارای طیف میزبانی بسیار گسترده ای از گونه‌های گیاهی است . کپک خاکستری روی توت فرنگی می تواند باعث تلفات قابل توجهی به خصوص در دوره پس از برداشت شود. فرآیند آلودگی در مرحله رشد آغاز می شود. پیش از برداشت این بیماری گاهی به صورت پنهان باقی مانده و علائم آن نامشخص است (Soliman et al, 2021). به همین دلیل اغلب برای حل این مشکل بسیاری از تولیدکنندگان از سموم شیمیایی استفاده می‌کنند. باقیمانده این مواد برای انسان زیان بار است همچنین احتمال ایجاد مقاومت در برابراین آفت کش‌های شیمیایی وجود دارد. علاوه بر این استفاده از اقدامات کنترل شیمیایی تأثیر منفی بر محیط زیست و انسان دارد و نیاز به اقدامات کنترلی جایگزین در برابر کپک خاکستری را نشان می دهد (Vanti et al, 2021). لذا نیاز به استفاده از مواد طبیعی برای کنترل عامل پوسیدگی میوه و افزایش انبارمانی آن در سال های اخیر حس شده است.

اسید اسکوربیک از جمله مواد طبیعی است که در تولید محصولات ارگانیک دارای اهمیت ویژه می باشد (اله ویرن، ۱۳۹۵). اسید اسکوربیک یکی از رایج ترین آنتی اکسیدان‌هایی است که در نگهداری میوه‌ها و سبزی‌ها مورد استفاده قرار می گیرد (فاتح و همکاران، ۱۳۹۸). مشخص شده است که اسید اسکوربیک مجموعه‌ای از نقش‌ها را در رشد گیاهان مانند تقسیم و بزرگ شدن سلول‌ها، توسعه دیواره سلولی و دیگر فرایندهای نموی بازی می‌کنند (Pignocchi, 2003). ویتامین ث یا اسید اسکوربیک یک ویتامین محلول در آب است و مصرف آن به عنوان یک آنتی اکسیدان برای سلامت انسان ضروری است. ویتامین ث در سبزیجات و میوه ها یافت می شود. در میان میوه ها، توت فرنگی یکی از غنی ترین میوه ها از نظر اسید اسکوربیک است. که محتوای ویتامین ث در توت فرنگی تازه تا ۸۰ میلی گرم در ۱۰۰ گرم است (Sapei ,2014). با بررسی اثر محلول پاشی اسیداسکوربیک بر درختان سیب رقم رد اسپار نشان داده شده، که استفاده از غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر اسید اسکوربیک افزایش معنی داری در میزان مواد جامد محلول کل و آنتوسیانین کل میوه می شود و افزایش غلطت اسید اسکوربیک باعث افزایش میزان اسیدیته قابل تیتر، ویتامین ث، و آنتی‌اکسیدان کل شده اما pH آب میوه کاهش معنی داری داشته (اله ویرن و همکاران، ۱۳۹۵). تیمار فلفل دلمه با اسیداسکوربیک با غلظت های ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر باعث بهبود عملکرد، وزن، و تعداد میوه شد و همچنین باعث افزایش میزان ویتامین ث، مواد جامد محلول و فعالیت آنتی اکسیدانی شد (فاتح و همکاران ، ۱۳۹۸). محلول پاشی برگی اسیداسکوربیک در گیاه سیب زمینی ارتفاع بوته، وزن خشک برگ، میزان کلروفیل، عملکرد کل و همچنین وزن تر و خشک غده، مواد جامد محلول کل و ویتامین ث را افزایش داد (El- Banna, 2006). در این مطالعه اثر محلول پاشی اسید اسکوربیک بر عمر پس از برداشت میوه–های توت فرنگی بررسی شد.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱- توت فرنگی

این مطالعه در گلخانه هیدروپونیک توت فرنگی در شهرستان بروجن روی بوته های توت فرنگی تازه کشت شده رقم آلبیون و به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار و دو غلظت صفر و ppm۱۰۰۰ اسید اسکوربیک انجام گرفت. نگهداری بوته‌های توت فرنگی در تمام مرحله رشد شامل تغذیه و آبیاری بر اساس برنامه‌های معمول انجام گرفت. محلول پاشی با اسید اسکوربیک در مرحله گلدهی و سپس به فاصله ۳۰ روز پس از آن در ساعات خنک روز توسط سمپاش دستی انجام شد. ردیف هایی ازکشت که به عنوان شاهد در نظر گرفته شده بود با آب مقطر اسپری شد. در تاریخ ۱۴۰۰/۰۴/۰۱ برداشت توت فرنگی‌های رسیده در مرحله برداشت تجاری در ساعات اولیه صبح انجام گرفت و تمام تیمارها وزن شد و بلافاصله به آزمایشگاه دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد انتقال یافت. در آزمایشگاه درون یخچال با دمای ۱±۴ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۹۰٪ نگهداری شدند. فاکتورهای وزن، سفتی بافت، میزان اسیدیته قابل تیتر، میزان مواد جامد محلول، pH برآورد درصد پوسیدگی ظاهری در زمان های صفر، هفت و ۱۴ روز اندازه گیری شدند.

۲-۲- اسید اسکوربیک

محلول پاشی اسید اسکوربیک (L-Ascorbic acid, 99% Sigma) با غلظت ppm۱۰۰۰ (محلول سازی در آب مقطر) در دو مرحله رشد گیاه با سم پاش دستی صورت گرفت. مرحله اول بلافاصله پس از گرده افشانی گل‌های درجه یک و مرحله دوم محلول پاشی در فاز فندقی بودن گلهای درجه یک و در هر دو مرحله در ساعات اولیه روز انجام شد.

۲-۳- کاهش وزن

وزن میوه در هر مرحله ثبت شد. کاهش وزن تجمعی به صورت درصد کاهش وزن تازه اولیه بیان شد.

۲-۴- سفتی

سفتی بافت میوه با استفاده از یک دستگاه سفتی سنج‌میوه (EFFEGI) مجهز به یک پروب با قطر ۵ میلی متر ارزیابی شد. اندازه گیری در بخش میانی میوه انجام شد.

۲-۵- اسیدیته قابل تیتر (TA) ، pH و مواد جامد محلول (TSS)

برای این منظور از هر نمونه تعداد پنج میوه به صورت تصادفی برداشت و آبگیری شده و آب نمونه را صاف کرده در ابتدا یک قطره از عصاره صاف شده را در دمای آزمایشگاه (۲۲ درجه سانتی گراد) روی دستگاه رفراکتومتر (ATAGO PAL3) قرار داده و میزان مواد جامد محلول (TSS) اندازه گیری شد. و سپس اسیدیته باقی مانده عصاره را ابتدا با دستگاه pH متر کالیبره شده، اندازه گیری کرده و سپس از این نمونه ۱۰ میلی لیتر به نسبت ۱/۱۰ تهیه شده و با محلول سود NaOH ۰/۱ نرمال تیتر شده تا جایی که pH نمونه به ۸/۱ برسد و سپس بر اساس درصد معادل اسید سیتریک محاسبه شد (Sogvar et al, 2016).

۲-۶- میزان ویتامین ث

اندازه گیری بر اساس روش تیتراسیون با ۲-۶ دی کلروفنل ایندوفنل ۰/۲۵ درصد انجام شد (AOAC, 2000). در این روش ابتدا وزن اولیه نمونه ها تعیین شد (FW) و عصاره آن استخراج و پس از سانتریفیوژ و صاف شدن نمونه وزن عصاره اندازه گیری گردید برای اندازه گیری مقدار ویتامین ث موجود در نمونه ها به روش زیر عمل شد.

الف) مقدار ۱۰ میلی لیتر از محلول اسید اسکوربیک را درون یک ارلن ریخته و پس از اضافه شدن ۵ قطره متافسفریک اسید (به عنوان معرف) با ۲-۶-دی کلروفنل ایندول تیتر کرده تا رنگ محلول پوسته پیازی شود، در این زمان میزان ایندوفنل مصرفی را یادداشت کرده (D_1)

ب) یک سی سی از عصاره میوه با ۹ میلی لیتر آب مقطر رقیق شده و درون ارلن ریخته، پس از اضافه نمودن ۵ قطره متافسفریک اسید به روش قبلی تیتر شده و مقدار ایندوفنل مصرفی یادداشت گردید (D2)

برای بدست آوردن مقدار ویتامین ث موجود در نمونه ها از روابط زیر استفاده شد.

$H = C_1 / D_1$ (1)

H = مقدار ویتامین ث موجود به ازای ۱ میلی لیتر ایندوفنل (میلی گرم)

C_1 = مقدار ویتامین ث موجود در محلول استاندارد (در این آزمایش ۲۵۰ میلی گرم)

D_1 = مقدار ایندوفنل تیتر شده برای محلول استاندارد ویتامین C (بر حسب میلی لیتر)

$H * F = D_2$ (2)

F = مقدار ویتامین ث موجود در نمونه تیتر شده (بر حسب میلی گرم)

D_2 = مقدار ایندوفنل تیتر شده برای نمونه (میلی لیتر)

$G = F * (Jw / J_1) * (1 / F_w)$ (3)

G = مقدار ویتامین ث موجود در یک گرم میوه (بر حسب میلی گرم)

J_1 = حجم نمونه تیتر شده (بر حسب میلی لیتر)

J_w = حجم کل عصاره (بر حسب میلی لیتر)

F_w = وزن میوه (بر حسب گرم)

۲-۷- درصد پوسیدگی میوه

بروز پوسیدگی در روز ۷ و۱۴و۲۱ با تقسیم تعداد میوه پوسیده بر تعداد کل میوه در هر تکرار تعیین شد. نتایج به درصد بیان شده (Saleem et al, 2021).

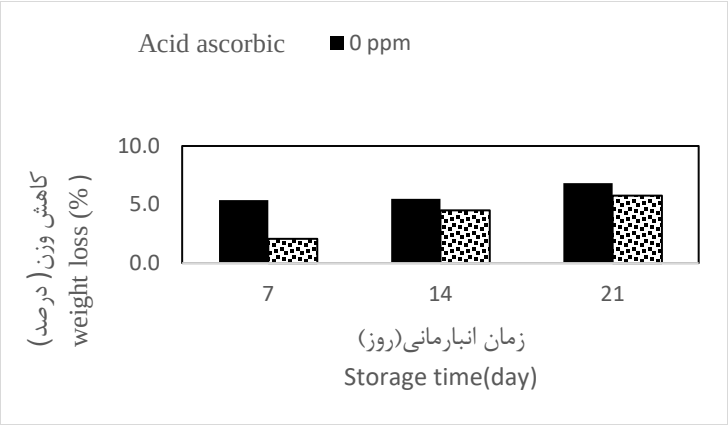
درصد میوه پوسیده =(تعداد میوه پوسیده /تعداد کل میوه‌ها) * 100

۳. نتایج و بحث

۳-۱-کاهش وزن

در طی دوره انبارداری کاهش وزن در تمام نمونه ها دیده شده. نتایج نشان دهنده اثر تیمار اسیداسکوربیک بر کنترل کاهش وزن در طی انبارداری می‌باشد (شکل ۳-۱). عامل اصلی کاهش وزن افزایش تنفس و تعرق است. میزان از دست دادن آب به شیب فشار آب بین بافت میوه و اتمسفر اطراف آن بستگی دارد و زمانی که اختلاف فشار آب بین بافت و محیط بیرونی میوه افزایش یابد، میزان از

دست دهی وزن هم زیاد شده (Sogvar et al, 2016). در مطالعاتی که بر روی اثر پوشش میوه توت فرنگی با اسیداسکوربیک در انبار صورت گرفته نتایج مشابهی دیده شده (Shahzad et al, 2021).



شکل ۳-۱- :تاثیر تیمار اسیداسکوربیک بر درصد کاهش وزن میوه توت فرنگی در طول انبارمانی (روز).

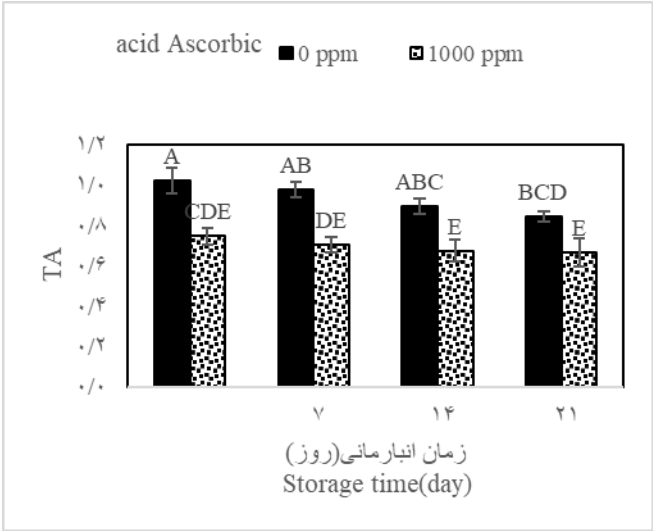
۳-۲-اسیدکل و pH

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳-۱) نشان داد که تیمار اسیداسکوربیک اختلاف معنی داری در سطح یک درصد درمیزان اسیدیته کل نشان داد. مطابق شکل ۳-۳ در طی انبارداری کاهش اسیدیته کل در تمام نمونه ها دیده شد. در نمونه های شاهد میزان اسیدیته کل بیشتر از نمونه های تیمار شده با اسیداسکوربیک بود. با گذشت زمان میزان اسیدیته نسبت به زمان برداشت در نمونه های تیمار شده با اسیداسکوربیک تغییرات چشمگیری نشان نداد. در بررسی اثر پوشش اسید اسکوربیک و کیتوزان نتایج مشابه دیده شد (salem et al, 2021). در پژوهشی بر روی سیب در اثر تیمار با اسیداسکوربیک نتایجی خلاف بر نتایج بدست آمده مشاهده شد (Jesus Filho et al, 2018).

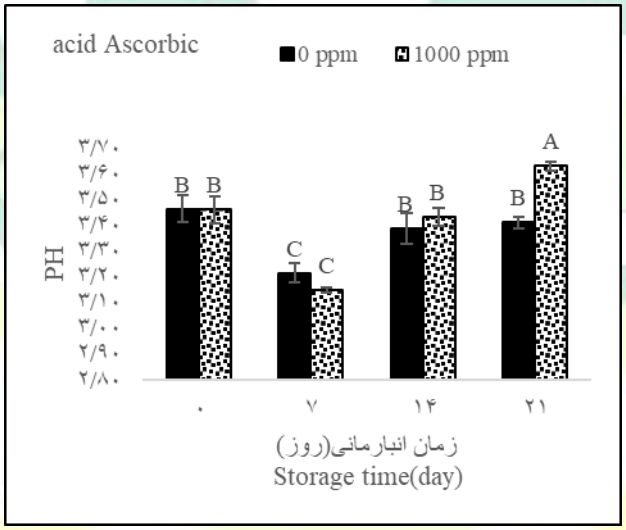
بررسی نتایج تغییرات pH (شکل ۳-۲) نشان می دهد که بیشترین میزان pH مربوط به تیمار اسیداسکوربیک پس از ۲۱ روز پس از برداشت بوده. نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۳-۱) نشانگر اثر معنی دار زمان در سطح یک درصد و اثر متقابل زمان و اسید در سطح پنج درصد بر میزان pH میوه ها می باشد در حالیکه بین نمونه ها در تیمار اسیداسکوربیک اختلاف معنی داری دیده نشد.

جدول ۳-۱- :نتایج تجزیه واریانس اثر تیمار اسیداسکوربیک در طول انبار داری بر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی میوه توت فرنگی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		pH	TSS	TA	شاخص طعم
زمان	۳	۰/۱۳**	۹**	۰/۰۰۳ ns	۱۲/۰۱**
اسیداسکوربیک	۱	۰/۰۱ ns	۱/۹۲ ns	۰/۳۳**	۷/۹*
زمان * اسیداسکوربیک	۳	۰/۰۲*	۲/۶۹**	۰/۰۲ ns	۵/۱۸*
خطا	۱۶	۰	۰/۴۴	۰	۱/۲۳



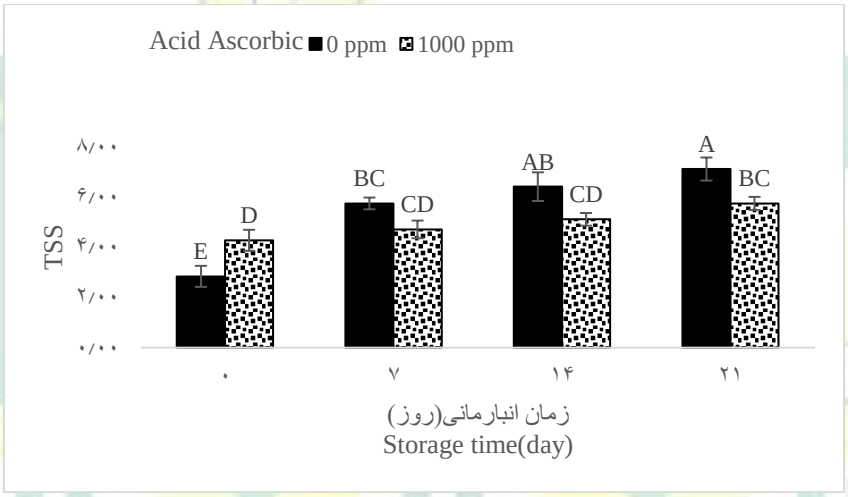
شکل ۳-۲- :تاثیر تیمار اسید اسکوربیک بر میزان PH در میوه توت فرنگی در طول انبارمانی (روز).



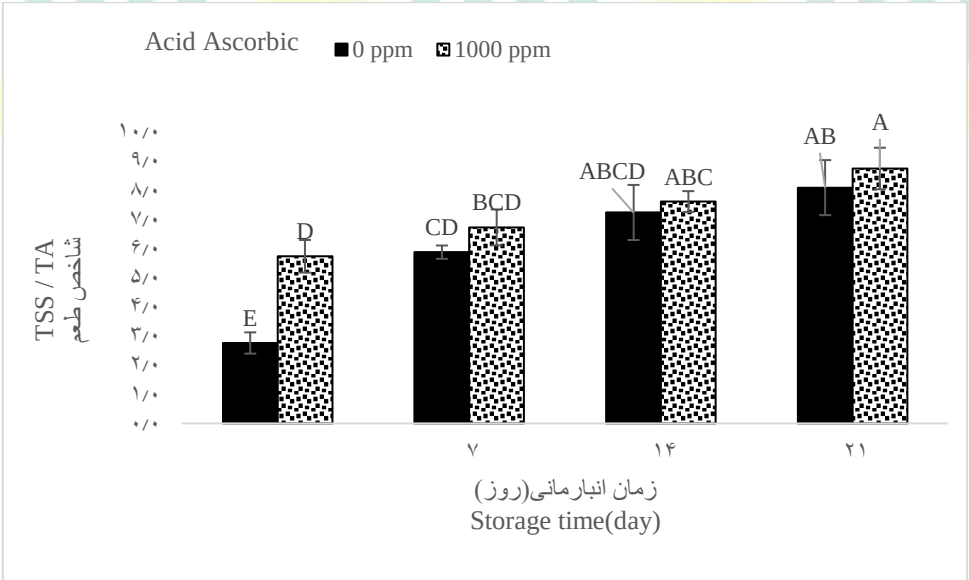
شکل ۳-۳- :تاثیر تیمار اسید اسکوربیک بر میزان اسیدیته کل در میوه توت فرنگی در طول انبارمانی (روز).

۳-۲-مواد جامد محلول (TSS)

نتایج حاصل از تجزیه واریانس حاکی از آن است که تیمار اسیداسکوربیک بر میزان مواد جامد محلول اثر معنی داری نداشت در صورتی که زمان و اثر متقابل زمان و تیمار اسیداسکوربیک در سطح یک درصد اختلاف معنی دار بین داده ها مشاهده شد (جدول ۳-۱). مطابق شکل (۲-۳) در طول زمان انبارداری افزایش میزان مواد جامد محلول دیده شده. تیمار اسید اسکوربیک در کنترل کاهش میزان مواد جامد محلول موثر واقع شده است. دلیل افزایش میزان مواد جامد محلول پس از ۲۱روز بعد از برداشت می تواند به دلیل از دست دادن رطوبت باشد (Hernandez etal, 2008). نتایج مشابهی در میوه گیلاس دیده شده است (Petriccion et al, 2015). بررسی نتایج تغییرات شاخص طعم (نسبت TSS به TA) در طی انبارداری نشان داد که بیشترین درصد تغییرات مربوط به نمونه های شاهد می باشد که بخصوص در چهارده روز پس از برداشت مشهود می باشد. نمونه های تیمار شده با اسیداسکوربیک درصد تغییرات شاخص طعم در آنها کنترل شده (شکل ۳-۵). نتایج حاصل از تجزیه واریانس بیانگر اختلاف معنی دار بین داده ها در تیمار زمان در سطح احتمال یک درصد است و تیمار اسیداسکوربیک و اثر برهمکنش زمان و اسید اسکوربیک در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار شد.



شکل ۳-۴- :تاثیر تیمار اسید اسکوربیک بر میزان مواد جامد محلول در میوه توت فرنگی در طول انبارمانی (روز).

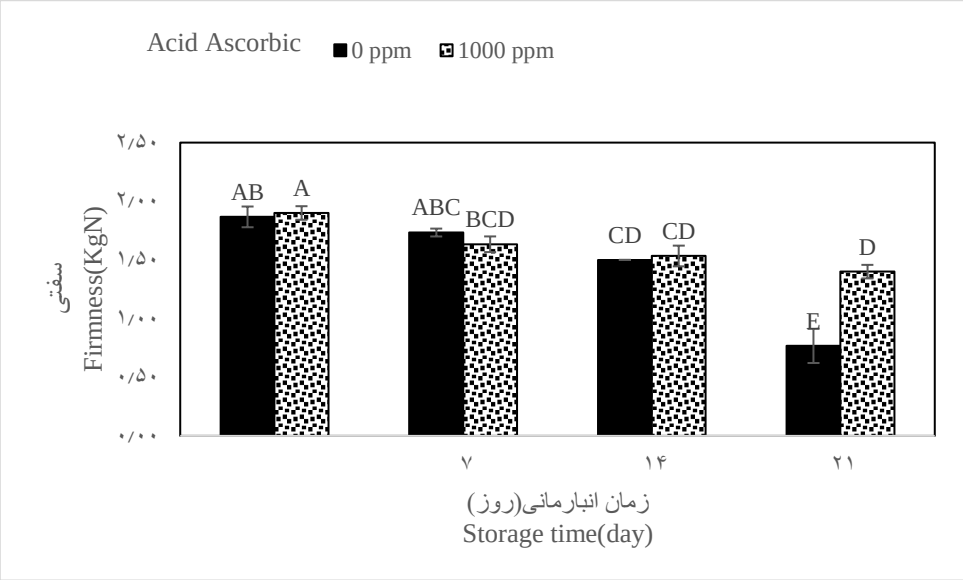


شکل ۳-۵- :تاثیر تیمار اسید اسکوربیک بر شاخص طعم در میوه توت فرنگی در طول انبارمانی (روز).

۳-۵-سفتی

بررسی نتایج تغییرات سفتی بافت در انبارداری نشان دهنده این بود که بیشترین سفتی بافت میوه مربوط به نمونه های تیمار شده با اسیداسکوربیک با غلظت ppm۱۰۰۰ می باشد و در طی مدت انبار داری کاهش میزان سفتی بافت میوه در تمام نمونه ها دیده شد اما این تغییرات در میوه های تیمار شده نسبت به نمونه های شاهدکنترل شده (شکل ۳-۶). با توجه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس بین نمونه های تیمار شده با اسید اسکوربیک در سطح پنج درصد اخلاف معنی داری دیده شد و در حالی که در طول زمان و اثر تقابل زمان و اسیداسکوربیک اختلاف معنی دار در سطح یک درصد مشاهده شد (جدول ۳-۲).

کاهش سفتی را می توان به دلیل تخریب پکتین و سلولز توضیح داد، زیرا شکسته شدن زنجیره های پلیمری ناشی از تشعشعات یونیزان با تبدیل پروتوپکتین به پکتین، باعث از بین رفتن بافت سلولی می شود (Franko and Landgraf, 2008).



شکل ۳-۶- :تاثیر تیمار اسید اسکوربیک بر میزان سفتی بافت میوه توت فرنگی در طول انبارمانی (روز).

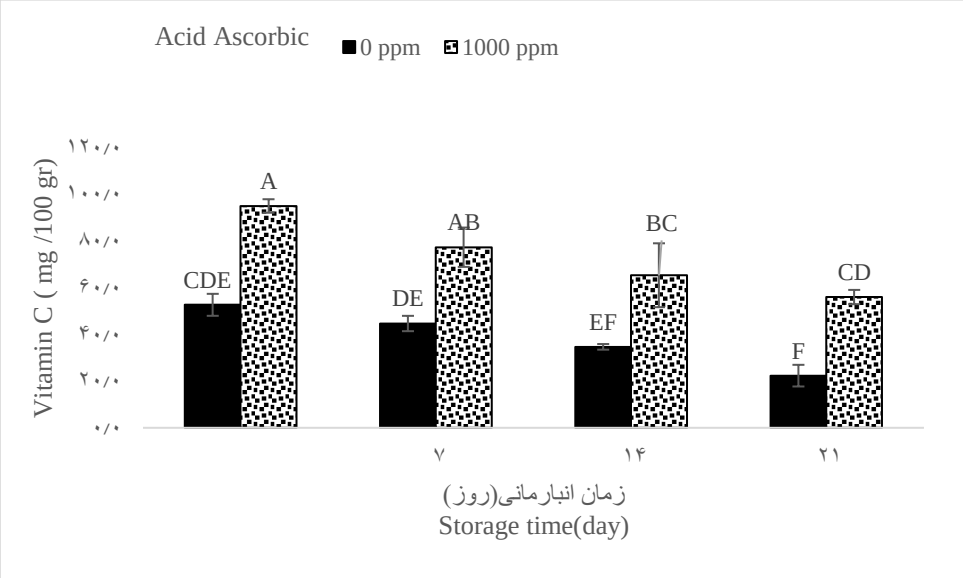
جدول ۳-۲- :نتایج تجزیه واریانس اثر تیمار اسیداسکوربیک در طول انبار داری بر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی میوه توت فرنگی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		سفتی بافت میوه	ویتامین C	پوسیدگی
زمان	۳	۰/۶۹**	۱۲۰۹/۶۶**	۲۴۹۱/۰۲**
اسیداسکوربیک	۱	۰/۱۳*	۷۲۸۰/۱۶**	۳۶۲/۷ ns
زمان * اسیداسکوربیک	۳	۰/۱۶**	۱۵۴/۹۴ ns	۱۴۴/۸ ns
خطا	۱۶	۰/۰۱	۱۲۴/۱۲	۱۴۲/۳۵

۳-۶-ویتامین ث

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳-۲) نشان داد که انجام تیمار اسیداسکوربیک و زمان در سطح یک درصد اختلاف معنی دار داشت ولی بین برهمکنش زمان نگهداری و تیمار اسیداسکوربیک اخلاف معنی داری وجود ندارد. بررسی نتایج حاصل از مقایسه میانگین ها حاکی از افزایش میزان ویتامین ث در نونه های تیمار شده با اسیداسکوربیک است. در طی دوره انبارداری کاهش میزان ویتامین ث در همه نمونه ها دیده میشود. (شکل ۳-۷). تیمار اسیداسکوربیک بر میزان ویتامین ث میوه به طور چشمگیری موثر بوده.

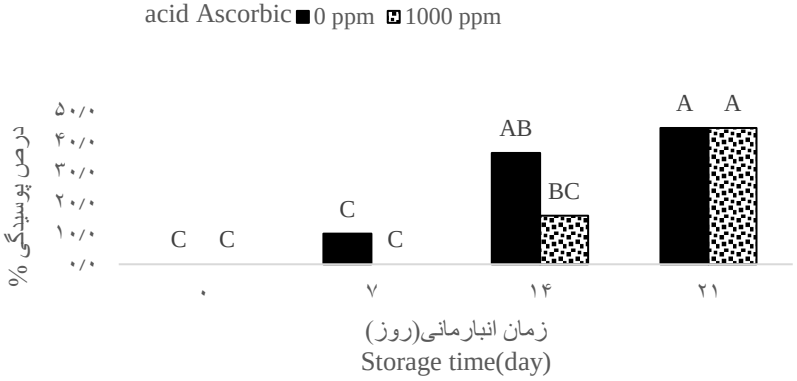
ویتامین ث توانایی از بین بردن رادیکال های آزاد را دارد و باعث افزایش ارزش غذایی میوه توت فرنگی شده. کاهش ویتامین ث در طول انبارداری در پژوهش های دیگر هم گزارش شده (Gol et al,2013). کاهش ویتامین ث در طول انبارداری به دلیل فعالیت آنزیم اسیداسکوربیک اکسیداز است و همچنین به دلیل ترکیب شدن اسیداسکوربیک با اکسیژن هوا و اتواکسیداسیون ویتامین ث می باشد (Sogvar et al,2016).



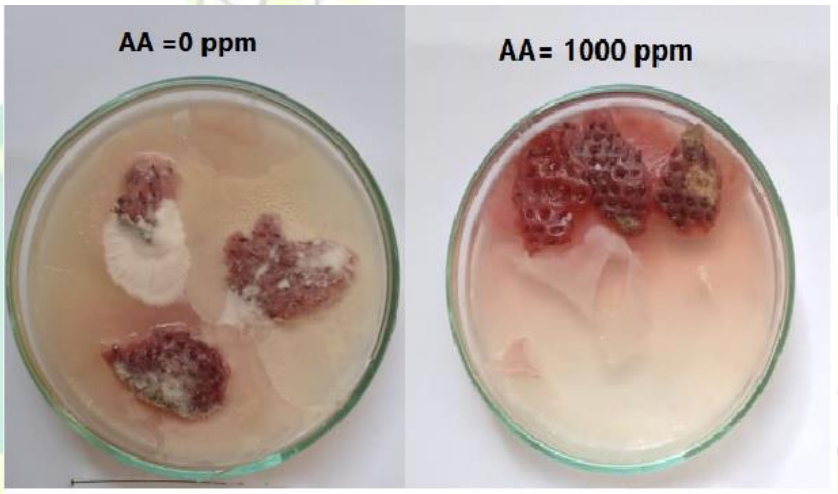
شکل ۳-۷- :تاثیر تیمار اسید اسکوربیک بر میزان ویتامین C درمیوه توت فرنگی در طول انبارمانی (روز).

۳-۷-پوسیدگی میوه

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳-۲) نشان داد که زمان در سطح یک درصد اثر معنی دار داشت. تیمار اسیداسکوربیک تا روز ۱۴ انبارداری موجب کاهش درصد پوسیدگی میوه شده است، اما پس از آن تیمار شاهد و اسید اسکوربیک تفاوت معنی داری نشان ندادند. اثر برهمکنش زمان و اسیداسکوربیک اختلاف معنی دار نشان نداد. با توجه به شکل ۳-۸ در نمونه های تیمار شده پوسیدگی از روز ۱۴ ام انبارداری دیده شده و تیمار اسیداسکوربیک بر کنترل میزان پوسیدگی تا روز ۱۴ موثر بوده است. همچنین ۲۱ روز پس از انبارداری از نمونه ها بر روی محیط کشت آگار کشت شد و پس از ۲۴ ساعت به صورت چشمی پوسیدگی بر آنها بررسی شد (شکل ۳-۹) مشاهده می شود که بر روی نمونه تیمار شده با اسید اسکوربیک آثار بسیار جزیی از پوسیدگی به چشم می آید.



شکل ۳-۸- :تاثیر تیمار اسید اسکوربیک بر میزان پوسیدگی درمیوه توت فرنگی میوه در طول انبارمانی (روز).



شکل ۳-۹- :تاثیر تیمار اسید اسکوربیک بر میزان پوسیدگی درمیوه توت فرنگی ناشی از بوتریتیس در طول انبارمانی (-روز-).

۴. نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که محلول پاشی اسیداسکوربیک با غلظت ۱۰۰۰ ppm باعث بهبود انبارمانی توت فرنگی می‌شود که از طریق کنترل کاهش وزن، کاهش سفتی بافت میوه و افزایش میزان ویتامین ث میوه در طول انبارداری شد و در نتیجه سبب حفظ کیفیت میوه های توت فرنگی در انبار گردید. در مجموع محلول پاشی اسیداسکوربیک با غلظت ppm۱۰۰۰ با افزایش دوره انبارداری میوه توت فرنگی رقم آلبیون به مدت ۲۱ روز در بسته بندی درب دار و در دمای ۱±۴ و رطوبت نسبی ۹۰٪ نسبت به تیمار شاهد در همین شرایط، ماندگار میوه را به طور معنی داری افزایش داد. دلیل محافظت مشاهده شده برای تیمار اسیداسکوربیک می‌تواند ناشی از ویژگی ضد میکروبی آن باشد (Ali et al, 2021). نتیجه مشابهی در سیب درختی با استفاده از پوشش های حاوی اسیداسکوربیک (Nokwazi C. Mbili et al, 2017) و توت فرنگی (salem et al, 2021) مشاهده شد.

منابع

۱. اله ویرن ا.، فرخزاد ع. و اصغری م. ۱۳۹۵. تاثیر محلول پاشی اسیداسکوربیک بر برخی ویژگی های کیفی و بهبود رنگ گیری میوه سیب رقم رد اسپار. مجله تولیدات گیاهی، جلد ۳۹، شماره۳.

۲.فاتح م.، برزگر ط. و رضوی ف. تاثیر محلول پاشی اسیداسکوربیک و لاکتات کلسیم بر رشد، عملکرد و کیفیت میوه فلفل دلمه ای. نشریه علوم باغبانی، جلد ۳۳، شماره ۱، ص: ۷۹-۸۷

3. AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. 17th Edition, The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA. Methods 925.10, 65.17, 974.24, 992.16.

4. Ceredi G., Mari M., Antoniacci L., Montuschi C., De Paoli E. and Gengotti S. 2009. Ten years of field trials on grey mold control on strawberries.Acta Hort. 842:
327–330.

5. El- Banna E, and Abd E. 2006. Effect of foliar application with organic compounds on growth yield and tubers quality of potato (*Solanum tuberosum* L.). Journal of Agricultural Science Mansoura University, 31(2): 1165-1173.

6. Gol N., Patel P. and Rao T. 2013. Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. Postharvest Biology and Technology, 85: 185-195.

7.Filhoa M., Scolforoa K., Saraivaa S.H., Pinheirob Ch., Silvaa P. and Della Luciaa S. 2018. Physicochemical , microbiological and sensory acceptance alterations of strawberries caused by gamma radiation and storage time. Scientia Horticulture, 238: 187-194.

8. Franco B. and Landgraf M. 2008. Microbiologia dos Alimentos .Atheneu, São Paulo, Ateneu, 182p

9.Munoz P., Almenar E., Valle V., Velez D. and Gavara R. 2008. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria ananassa*) quality during refrigerated storage. Food Chem, 110: 428–435.

10. Nokwazi C.,Umezuruike L., Cheryl L. and Filicity A. 2017. Citrus and lemongrass essential oils inhibit Botrytis cinerea on ‘Golden Delicious’, ‘Pink Lady’ and ‘Granny Smith’ apples. Plant Dis Prot, 124: 499-511.

11. Pignocchi C., and Foyer C.H. 2003. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signaling. Current Opinion in Plant Biology, 6: 379-389.

12.Petriccione M., De Sanctis F., Pasquariello M., Mastrobuoni F., Rega P., Scortichini M. and Mencarelli F. 2015. The effect of chitosan coating on the quality and nutraceutical traits of sweet cherry during postharvest life. Food Bioprocess Technol, 8: 394–408.

13.Saleem M., Anjum M., Naz S., Ali S,Hussain S., Azam M., Sardar H., Ghulam Khaliq C., Canan D. and Ejaz Sh. 2021. Incorporation of ascorbic acid in chitosan-based edible coating improves postharvest quality and storability of strawberry fruits. International Journal of biological Mocromolecules, 189: 160-169.

14.Soliman M.S., Khafagi E.Y., Ahmed Y., Mekawi E.M. and Abdel-Rahman, F.A. 2021. Exogenous Application of Some Acids Enhanced the Antioxidant Activities in Strawberry Fruits and Induced the Resistance against Gray Mold Disease. 49 (1) : 49-62.

15. Sapei L and Hwa L. 2014. Study on the Kinetics of Vitamin C Degradation in Fresh Strawberry Juices. 9: 62-68

16. Sogvar O., Kousheshsaba M. and Emamifar A. 2016. Aloe vera and ascorbic acid coatings maintain postharvest quality and reduce microbial load of strawberry fruit. Postharvest Biology and Technology, 114: 29

Study of the effect of different UV treatments on the amount of lipid peroxide and hydrogen peroxide of red clover (Trifolium pratense)

Farahnaz Farahdel[1*]; Mahnaz Aghdasi[1]; Pooyan Mehraban joubani[2]

1- Department of Science, Golestan University, Gorgan, Iran
2- Department of Basic Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

*Corresponding Author Email address farahnaz.f76@gmail.com

Abstract

Trifolium pratense (Fabaceae family) cultivated as a forage crop plant in some parts of the world, including Iran and Middle East, Europe and Africa. In addition to livestock fodder, this species plant have many medicinal properties such as high antioxidant properties, cancer prevention (with anti-tumor activity), blood purification, control of menopause in women and blood pressure, treatment and prevention of osteoporosis and other the diseases skin like acne and eczema. The red clover plant and its isoflavonoid are used in mesotherapy to prevent hair loss. This plant has 13 types of isoflavonoids that make red clover plant have unique medicinal properties such as antioxidant and phytoestrogenic activities and can be used as a chemical protective agent against cancer and cardiovascular disease. These secondary metabolites play a major role in plant adaptation to environmental stresses such as UV radiation, high light, drought, salinity, and heavy metals. Since the effects of UV radiation are always present due to the plants continuous need for sunlight, the plant is constantly exposed to reactive oxygen species, oxidizing the cell's biological components, including lipids and damaging cell integrity and permeability. The aim of this study was to evaluate the effect of ultraviolet (UV-C) treatments on the malondialdehyde (MDA) content as an index of lipid peroxidation and the concentration of hydrogen peroxidation. The experiment was performed on red clover in a completely randomized design and UV-C treatments in 3 time intervals (15, 30 and 45 minutes compare to without UV treatment plants) for 1 week. The results showed that 45 minutes of UV treatment increased the content of malondialdehyde by about 70% and the amount of hydrogen peroxide more than doubled compared to plants without UV stress. These results showed that UV-C treatment causes severe damage to the plant by increasing the level of hydrogen peroxide, followed by peroxidation of lipids in membrane.

Keywords**:** Red clover, UV, Lipid peroxidation, Hydrogen peroxidation

مطالعه ی اثر تیمارهای مختلف اشعه فرابنفش بر میزان پراکسید لیپید و پراکسید هیدروژن گیاه شبدر قرمز (Trifolium pratense)

فرحناز فرح دل[۱*]؛ مهناز اقدسی[۱]؛ پویان مهربان جوبنی[۲]

۱- گروه علوم پایه، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه گلستان
۲- گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

*ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: Farahnaz.f76@gmail.com

چکیده

شبدر قرمز با نام علمی *Trifolium pratense* گیاهی چندساله علوفه‌ای از خانواده باقلائیان است که در بعضی از نقاط دنیا از جمله، ایران به‌عنوان گونه زراعی علوفه‌ای مورد کشت قرار می‌گیرد. این گونه علاوه بر اینکه در قدیم مورد استفاده‌ی چرای دام‌ها قرار می‌گرفت، دارای خواص دارویی بسیاری مانند خاصیت بالای آنتی‌اکسیدانی، جلوگیری از سرطان (دارای فعالیت ضد توموری)، تصفیه‌ی خون، مقابله با اثرات یائسگی در خانم‌ها و فشار خون، درمان و جلوگیری از پوکی استخوان و سایر بیماری‌های پوستی نظیر آکنه و اگزما می‌شود. از گیاه شبدر قرمز و ایزوفلاونوئید موجود در آن در مزوتراپی‌ها جهت جلوگیری از ریزش مو استفاده می‌شود. در مجموع این گیاه شامل ۱۳ نوع ایزوفلاونوئید می‌باشد که به همین جهت باعث می‌شود که گیاه شبدر قرمز دارای خواص دارویی منحصر بفردی مانند فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و فیتواستروژنی باشد و به عنوان یک عامل محافظ شیمیایی در برابر سرطان‌ها و بیماری‌های قلبی و عروقی کاربرد داشته باشد. این متابولیت‌های ثانویه نقش اصلی در سازگاری گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی از جمله تابش اشعه UV، نور زیاد، خشک سالی، شوری زیاد، فلزات سنگین دارد. از آنجایی که آثار اشعه UV بر گیاهان به علت نیاز دائمی آن‌ها به نور خورشید اجتناب‌ناپذیر است، بنابراین گیاه دائما در معرض گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌باشد که موجب اکسیداسیون ترکیبات زیستی سلول از جمله لیپیدها می‌شود و یکپارچگی سلول و نفوذپذیری آن را مختل می‌کند. این مطالعه با هدف اثر تیمارهای اشعه فرابنفش (UV-C) بر مقدار مالون‌دی‌الدهید (MDA) به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید و مقدار پراکسیداسیون هیدروژن انجام شد. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی و تیمارهای اشعه فرابنفش (UV-C) در ۳ بازه زمانی (۱۵، ۳۰ و ۴۵ دقیقه در مقایسه با گیاهان بدون تیمار UV) به مدت ۱ هفته بر گیاه شبدر قرمز اعمال گردید. نتایج نشان داد که تیمار ۴۵ دقیقه اشعه فرابنفش، مقدار مالون دی‌آلدهید را در حدود ۷۰ درصد و مقدار پراکسید هیدروژن را بیش از دو برابر نسبت به گیاهان بدون تنش اشعه فرابنفش افزایش داد. این نتایج نشان داد که تیمار اشعه فرابنفش (UV-C) سبب آسیب شدید به گیاه از طریق افزایش سطح پراکسیدهیدروژن و به دنبال آن پراکسیده شدن لیپیدهای غشایی می‌شود.

واژگان کلیدی: شبدر قرمز، اشعه‌ی فرابنفش، پراکسیداسیون لیپید، پراکسیداسیون هیدروژن

۱. مقدمه

شبدر قرمز با نام علمی *Trifolium pratense* گونه علوفه‌ای چند ساله‌ای است که در بعضی از نقاط دنیا از جمله، ایران به‌عنوان گونه زراعی علوفه‌ای مورد کشت قرار می‌گیرد. شبدر قرمز گیاهی از خانواده بزرگ Leguminosae است که سازگاری

گستردهای با شرایط مختلف خاک و آب و هوا دارد. حداکثر ارتفاع این گیاه ۱۵ سانتیمتر میباشد. برگهای اصلی این گیاه به صورت سه برگچهای با طول تقریبی ۳ الی ۴ سانتیمتر میباشد. گلهای آن به رنگ ارغوانی در انتهای ساقه به شکل گل آذین پدیدار میشود. این گیاه دارای ۲ نوع ریشه میباشد: ریشههای راست که در شرایط بافت مناسب خاک تا عمق ۷ متر میتولند در خاک نفوذ کند و ریشههای جانبی که وظیفه استحکام گیاه در خاک و جذب آب و املاح را بر عهده دارند (Zamanian, 2016). این گونه علاوه بر اینکه در قدیم مورد استفادهی چرای دامها قرار میگرفت، دارای خواص دارویی بسیاری از جمله دارای خاصیت بالای آنتیاکسیدانی، جلوگیری از سرطان (دارای فعالیت ضد توموری)، موجب تصفیهی خون، مقابله از اثرات یائسگی در خانمها، کاهش کلسترول و فشار خون، درمان و جلوگیری از پوکی استخوان و سایر بیماریهای پوستی مانند آکنه، اگزما میباشد از گیاه شبدر قرمز و ایزوفلاونوئید موجود در آن در مزوتراپیها جهت جلوگیری از ریزش مو استفاده میشود (Herman and Herman, 2017). در مجموع این گیاه شامل ۱۳ نوع ایزوفلاونوئید میباشد که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی میباشد. به همین جهت گیاه شبدر قرمز دارای خواص دارویی منحصر بفردی است. فعالیتهای بیولوژیکی آن از جمله فعالیتهای آنتیاکسیدانی و فیتواستروژنی میباشد و به عنوان یک عامل محافظ شیمیایی در برابر سرطانها و بیماریهای قلبی و عروقی کاربرد دارد (Petrovska, 2012).

ترکیبات ایزوفلاونوئیدی موجود در گیاه شبدر قرمز معمولاً به فرمهای گلیکوزیده (به نام آنتوسیانین)، ابتدا در ریشههای گیاه و بعد در اندام هوایی (ساقه و برگ) تجمع مییابد. این متابولیتهای ثانویه نقش اصلی در سازگاری گیاهان نسبت به تنشهای محیطی از جمله تابش اشعه UV، شوری زیاد، فلزات سنگین، نور زیاد، خشک سالی، دارد. در نتیجه گیاه در شرایط استرسزا موجب افزایش سنتز و تجمع فنیل پروپانوئید و ترکیبات فنلی در گیاه میشود (Lin et al., 2000). آثار اشعه UV بر گیاهان به علت نیاز دائمی آنها به نور خورشید اجتنابناپذیر است. گیاهان تحت اثر اشعه فرابنفش، باعث افزایش متابولیتهای ثانویه میشود که به عنوان یک سیستم دفاعی در مقابل انواع واکنشگرهای اکسیژن عمل کرده و موجب تحمل بیشتر شرایط تنش، در سلول گیاه میشود.

اشعه فرابنفش سبب وقوع تنش اکسیداتیو در سلولهای گیاهی میشود و به دنبال آن انواع گونههای اکسیژن فعال افزایش مییابد. گونههای اکسیژن فعال از احیای ناقص اکسیژن اتمسفری در فرآیندهای حیاتی سلول نظیر فتوسنتز، تنفس نوری تولید میشود. از جمله مهمترین انواع اکسیژن فعال میتوان به رادیکال سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل اشاره نمود که به دلیل میل به الکترون خواهی بالا به مولکولهای زیستی سلول نظیر لیپیدها، پروتئینها و نوکلئیک اسیدها صدمه وارد میکند، برای مثال لیپید موجود در ساختار غشاها در اثر اکسیداسیون موجب اختلال در حفظ یکپارچگی و نفوذپذیری انتخابی غشا میشود که این امر برای سلول فوق العاده سمی و خطرناک است (Mahdavian, et al., 2006). آنزیمهای کاتالاز و پراکسیداز از مهمترین آنزیمهای ساز و کار دفاعی سلول و حذف کننده پراکسید هیدروژن بهشمار میآیند که در اثر فعالیت آنها این ترکیبات سمی به آب تبدیل میشود.

از طرفی تجمع انواع گونههای اکسیژن فعال و دیگر ترکیبات سمّی ناشی از اکسیداسیون مواد زیستی در نهایت به مرگ سلولی ختم میشود و حتی در شرایط مطلوب نیز منجر به مرگ برنامه ریزی شده سلول میشود (Asada, 1999). رادیکال های سوپراکسید تحت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به پراکسید هیدروژن تبدیل میشود که برای سلول بسیار سمی است.

با توجه به نقشی که پراکسید هیدروژن درپیام رسانی دارد، لذا میتواند باعث افزایش فعالیت و یا القای بیان برخی ترکیبات آنتیاکسیدانتی از جمله متابولیتهای ثانویه شود که این سیستمهای آنتیاکسیدانتی بهعنوان یک سیستم دفاعی در مقابل انواع واکنشگرهای اکسیژن عمل کرده و به سلول کمک میکنند تا بهتر بتواند شرایط تنش را تحمل کند. از طرفی نیز میتوان تحت تنش پراکسید هیدروژن تا حدودی تولید متابولیتهای ثانویه را نیز افزایش داد (Harborne, 1973).

۲. مواد و روشها

ابتدا بذر شبدر قرمز را با آب شست و شو و سپس به مدت ۸ ساعت در آب خیسانده شده تا آماده ی جوانه زنی شود. سپس بذرها جهت جوانه زنی بر روی کاغذ صافی مرطوب در تاریکی انتقال داده و بعد از جوانه زنی بذرها به مدت ۴۰ روز به گلدان پرلیت و کوکوپیت انتقال و با محلول هوگلند آبیاری و سپس تیمارهای اشعه UV اعمال شد. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار و اشعه UV در ۳ بازه زمانی (۱۵ دقیقه، ۳۰ دقیقه، ۴۵ دقیقه) به مدت ۱ هفته اعمال و در نهایت غلظت پراکسیداسیون لیپید و پراکسیداسیون هیدروژن تولید شده در گیاه بررسی شد.

اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپید با استفاده از اندازه‌گیری مقدار مالون‌دی‌الدهید (MDA) به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید و طبق روش (Hodges et al., 1999) انجام گردید. عمل استخراج به این صورت، که مقدار ۰/۱ گرم از منطقه ریشه و بخش هوایی گیاه شبدر قرمز با ۱ میلی‌لیتر از اسید تری‌کلرواستیک ۰/۱ درصد عصاره‌گیری شد. سپس عصاره‌های مورد نظر در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از محلول بالایی عصاره‌های گرفته شد با ۲ میلی‌لیتر از معرف اسید تیوباربیتوریک/ اسید تری کلرو استیک شامل اسید تیوباربیتوریک ۰/۲۵ درصد در اسید تری کلرو استیک ۱۰ درصد مخلوط و در نهایت مقدار جذب محلول بالایی به‌دست آمده در ۳ طول موج ۴۴۰، ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای شاهد نیز از اسید تری کلرو استیک ۰/۱ درصد به جای عصاره استفاده شد. برای اندازه‌گیری مقدار مالون دی الدهید از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{پراکسیداسیون لیپید} = [[(A_{۵۳۲} - A_{۶۰۰}) - [(A_{۴۴۰} - A_{۶۰۰}) \times ۰/۰۵۷۱]]/۱۵۷۰۰۰]۱۰^{۶}$$

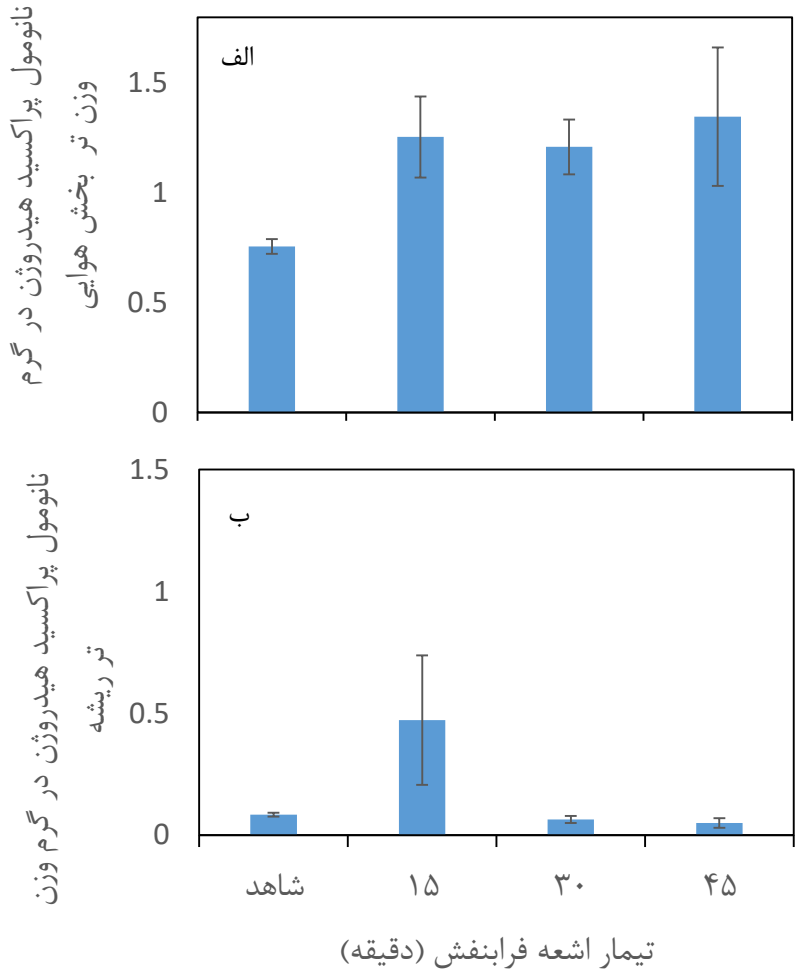
در نهایت میزان پراکسیداسیون لیپید براساس نانو مول مالون‌دی‌آلدهید تولید شده در یک گرم وزن تر بیان شد.

اندازه گیری مقدار پراکسیداسیون هیدروژن با استفاده از طیف سنجی و طبق روش (Sergiev et al, 1997) و با استفاده از بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار با اسیدیته ۷ و یدید پتاسیم ۱ مولار انجام و کمپلکس رنگی تشکیل شده به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد.

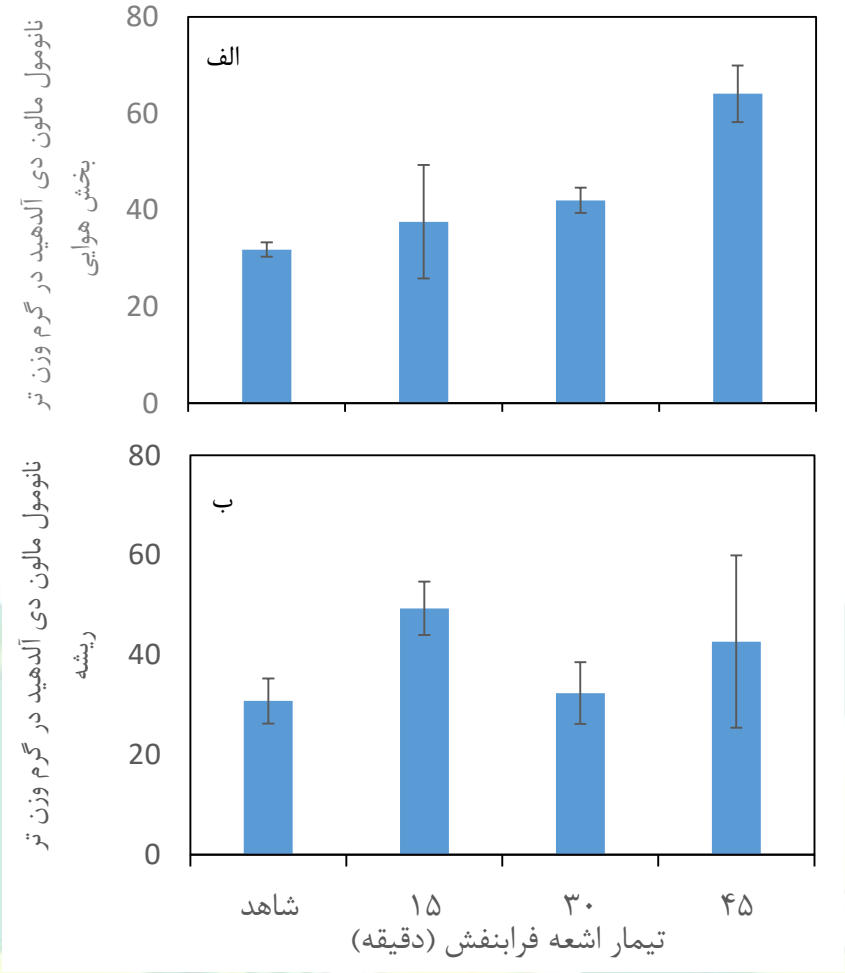
۳. نتایج و بحث

میزان نانومول پراکسید هیدروژن تولید شده در گرم وزن تر بخش هوایی گیاه شبدر قرمز نسبت به تیمارهای مختلف اشعه فرابنفش نشان داد که نتایج مقایسه تیمارهای اشعه فرابنفش (UV-C) نسبت به گیاهان بدون تیمار اشعه فرابنفش نشان داد که همراه با افزایش اشعه فرابنفش (UV-C) تا ۴۵ دقیقه غلظت پراکسید هیدروژن تولید شده در بخش هوایی ۱/۷۸ برابر گردید (شکل ۱-الف). میزان نانومول پراکسید هیدروژن تولید شده در گرم وزن تر بخش ریشه شبدر قرمز نسبت به تیمارهای مختلف اشعه فرابنفش نشان داد که در گیاه تیمار تحت تنش ۱۵ دقیقه ای میزان پراکسید هیدروژن تولید شده، ۵/۶ برابر گیاه شاهد بود. در بازه‌های زمانی بیشتر (۳۰ و ۴۵ دقیقه ای) تغییرات چشمگیری دیده نشد (شکل ۱-ب).

مطابق (شکل ۲-الف) میزان مالون دی آلدهید تولید شده بخش هوایی گیاه شبدر قرمز در تیمارهای مختلف اشعه فرابنفش را نشان داد با افزایش بازه زمانی تیماردهی، میزان مالون دی آلدهید تولید شده افزایش می‌یابد به طوری که میزان مالون دی آلدهید تولید شده در تیمار ۴۵ دقیقه‌ای، ۲ برابر مالون دی آلدهید تولید شده در گیاه شاهد است (شکل ۲-الف). همچنین میزان مالون دی آلدهید تولید شده ریشه گیاه شبدر قرمز در تیمارهای مختلف اشعه فرابنفش، تغییرات معنی‌داری را نشان نداد (شکل ۲- ب). افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و مقدار پراکسید هیدروژن در شرایط تنش نشان داد که خاموش نمودن رادیکال‌های آزاد اکسیژن خارج از توان گیاه بوده است و القاء مکانیسم‌های دفاعی گیاه در مقابل صدمات اکسیداتیو موثر نبوده است. بنابراین کاربرد ترکیبات حفاظتی برون‌زا می‌تواند ظرفیت آنتی اکسیدانی این گیاه را در برابر شرایط تنش افزایش دهد (کبیری و همکاران، ۱۳۹۲).



شکل۱:بررسی اثر اشعه فرابنفش بر میزان پراکسید هیدروژن تولید شده در الف) بخش هوایی ب) ریشه گیاه شبدر قرمز



شکل۲ :بررسی اثر اشعه فرابنفش بر میزان مالون دی آلدهید تولید شده در الف) بخش هوایی ب) ریشه گیاه شبدر قرمز

۴. نتیجه‌گیری

با نازک شدن لایه اوزون و افزایش تابش اشعه فرابنفش همانند سایر تنش‌های محیطی مثل خشکی، شوری و ... رشد و توانایی فتوسنتزی گیاه را کاهش می‌دهند، اختلال در تعادل بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن است که منجر به تجمع گونه‌های فعال اکسیژن و القاء تنش اکسیداتیو ،خسارت به پروتئین‌ها، لیپیدهای غشایی و سایر اجزای سلولی گیاه می‌شود. سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان در سلول‌های گیاهی شامل مکانیسم‌های آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POX)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گلوتاتیون ردوکتاز(GR) و غیر آنزیمی مثل گلوتاتیون، آسکوربات و توکوفرول است. آنزیم SOD با تولید پراکسید هیدروژن (H_2O_2) آنیون سوپر اکسید را حذف می‌کند. آب اکسیژنه تولید شده سپس توسط آنزیم‌های CAT و POX حذف شده و سلول سم زدایی می‌شود.

منابع

۱- کبیری ر.، نصیبی ف.، فرحبخش ح. ۱۳۹۲. مطالعه برخی پارامترهای اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی در گیاه سیاهدانه در شرایط کشت هیدروپونیک. فرآیند و کارکرد گیاهی ۲(۱).

2- Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annual review of plant biology 50(1): 601-639.

3- Harborne J. B. 1973. Phenolic compounds. Phytochemical methods, Springer: 33-88.
4- He X.-g., et al. 1996. Analysis of flavonoids from red clover by liquid chromatography—electrospray mass spectrometry. Journal of chromatography A 755(1): 127-132.
5- Herma A. and Herman A. P 2017. Topically used herbal products for the treatment of hair loss: preclinical and clinical studies. Archives of dermatological research 309(8): 595-610.
6- Hodges D.M., DeLong J.M., Forney C.F., Prange, R.K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta, 207: 604-611.
7- Lin, L.-Z., et al. 2000. LC-ESI-MS study of the flavonoid glycoside malonates of red clover (*Trifolium pratense*). Journal of agricultural and food chemistry 48(2): 354-365.
8- Mahdavian K., et al. 2006. The effect of different bands of ultraviolet radiation on morphological and physiological parameters in pepper (Capsicum annuum L.).
9- Petrovska B. B. 2012. Historical review of medicinal plants' usage. Pharmacognosy reviews 6(11): 1.
10- Sergiev I., Alexieva V., Karanov E. 1997. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences, 51: 121-124.
11- Zamanian M. 2016. Evaluation of forage yield and morphological characteristics of imported Berseem clover cultivars. Seed and Plant Improvement Journal 32(1).

Study of the effect of UV treatments on physiological parameters of red clover (*Trifolium pratense)*

Farahnaz farahdel[1*]; Mahnaz aghdasi[1]; Pooyan mehraban joubani[2]

1- Department of Science, Golestan University, Gorgan, Iran
2- Department of Basic Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

**Corresponding Author Email address farahnaz.f76@gmail.com*

Abstract

Red clover, scientifically known as *Trifollium pratense*, is a perennial plant of the fabaceae family and grows in cold climates, generally on grassland throughout Europe and Asia. The red clover is native to Europe, Western Asia, and northwest Africa, but it has been naturalized in other continents, like North and South America. The red clover is widely grown as a fodder crop, valued for its nitrogen fixation, which increases soil fertility. For these reasons, it is used as a green manure crop. In traditional medicine, red clover is promoted as a treatment for a variety of human maladies, including symptoms of menopause, coughs, disorders of the lymphatic system and a variety of cancers. The isoflavonoid compounds in red clover are usually in glycosidic forms, first aggregate in the roots of the plant and then in the shoots (stems and leaves). Decrease the thickness of the ozone layer due to human industrial activities has increased the amount of ultraviolet (UV) radiation on the surface of earth, due to their low wavelength compared to visible light, they have a lot of energy to penetrate to tissues of all organism. Proteins, DNA, photosynthetic pigments, cell membranes, photosystems and plant hormones are potential targets of UV radiation. Since the effects of UV radiation on plants are obvious, this study was conducted to investigate the stressful effects of ultraviolet radiation on changes in physiological parameters and chlorophyll fluorescence caused by oxidative stresses in red clover. The experiment was performed on red clover in a completely randomized design and UV-C treatments in 3 time intervals (15, 30 and 45 minutes compare to without UV treatment plants) for 1 week and Finally, growth, fluorescence of chlorophyll and chlorophyll percentage were measured from the last developed leave. The comparison of the means of UV treatments compare to control showed that the treatment of UV up to 45 minutes reduced the fresh weight of the shoot and root as well as the percentage of chlorophyll and also reduced the photosynthesis process. Decreaseof chlorophyll and increase of chlorophyll fluorescence in UV treatment indicate damage to photosystem II**.**

Keywords: Red clover, UV, photosynthesis, chlorophyll fluorescence

مطالعه‌ی اثر تیمارهای UV بر صفات فیزیولوژیکی گیاه شبدر قرمز (Trifolium pratense)

فرحناز فرح دل[۱]، مهناز اقدسی[۱]؛ پویان مهربان جوبنی[۲]

۱-گروه علوم پایه، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه گلستان
۲-گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

*ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: Farahnaz.f76@gmail.com

چکیده

شبدر قرمز با نام علمی Trifollium pratense گیاهی چندساله از تیره لوبیا است و در آب و هوای خنک، عموماً در چمن‌زارهای سراسر اروپا و آسیا رشد می‌کند. شبدر قرمز بومی اروپا، آسیای غربی و شمال غربی آفریقا است، اما در سایر قاره‌ها مانند آمریکای شمالی و جنوبی طبیعی شده است. شبدر قرمز به عنوان یک گیاه علوفه‌ای کشت می‌شود و به دلیل تثبیت نیتروژن و به دنبال آن افزایش حاصلخیزی خاک، ارزش بالایی دارد و به همین دلایل از آن به عنوان کود سبز استفاده می‌شود. در طب سنتی، شبدر قرمز به عنوان گیاهی برای انواع بیماری‌ها از جمله علائم یائسگی، سرفه، اختلالات سیستم لنفاوی و انواع سرطان‌ها استفاده می‌شود. ترکیبات ایزوفلاونوئیدی موجود در گیاه شبدر قرمز معمولاً به فرم‌های گلیکوزیده، ابتدا در ریشه‌های گیاه و بعد در اندام هوایی (ساقه و برگ) تجمع می‌یابد. کاهش ضخامت لایه اوزون در اثر فعالیت‌های صنعتی انسان باعث افزایش میزان اشعه فرابنفش (UV) در سطح زمین شده که به دلیل داشتن طول موج پایین نسبت به نور مرئی دارای انرژی زیادی برای نفوذ به بافت‌ها هستند. پروتئین‌ها، DNA، رنگیزه‌های فتوسنتزی، غشاهای زیستی، فتوسیستم‌ها و هورمون‌های گیاهی از اهداف بالقوه پرتو UV هستند. از آنجایی که آثار اشعه UV بر گیاهان به علت نیاز دائمی آن‌ها به نور خورشید اجتناب‌ناپذیر است، این مطالعه با هدف بررسی آثار تنش‌زا اشعه فرابنفش بر تغییرات صفات فیزیولوژیکی و فلورسانس کلروفیل ناشی از تنش‌های اکسایشی در گیاه شبدر قرمز انجام شد. تیمار اشعه فرابنفش (UV-C) در ۳ بازه زمانی (۱۵، ۳۰ و ۴۵ دقیقه نسبت به گیاهان بدون تیمار اشعه فرابنفش) به مدت ۱ هفته بر گیاه شبدر قرمز اعمال و در نهایت مقدار رشد، فلورسانس کلروفیل و درصد سبزینگی برگ از آخرین برگ توسعه‌یافته اندازه‌گیری شد. نتایج مقایسه میانگین تیمارهای اشعه فرابنفش نشان داد که همراه با اعمال تیمار تا ۴۵ دقیقه پرتو UV، مقدار وزن تر بخش هوایی و ریشه و همچنین درصد سبزینگی نسبت به گیاهان شاهد کاهش داد و همچنین موجب کاهش فرآیند فتوسنتز شد و کاهش سبزینگی و افزایش فلورسانس کلروفیل در تیمار اشعه فرابنفش نشان دهنده صدمه بر فتوسیستمII می‌باشد.

واژگان کلیدی: شبدر قرمز، اشعه فرابنفش، فتوسنتز، فلورسانس کلروفیل

۱. مقدمه

شبدر قرمز گیاهی چند ساله از خانواده بزرگ Fabaceae است. حداکثر ارتفاع این گیاه ۱۵ سانتی‌متر می‌باشد. برگ‌های اصلی این گیاه به صورت سه برگچه‌ای با طول تقریبی ۳ الی ۴ سانتی‌متر می‌باشد. گل‌های آن به رنگ ارغوانی و بنفش تیره در انتهای ساقه به شکل گل آذین پدیدار می‌شود. این گیاه دارای ۲ نوع ریشه می‌باشد: ریشه‌های راست که در شرایط بافت مناسب خاک تا عمق ۷ متر می‌تواند در خاک نفوذ کند و ریشه‌های جانبی که وظیفه استحکام گیاه در خاک و جذب آب و املاح را بر عهده دارند. این گیاه دوساله با عمر کوتاهی در منطقه مدیترانه بسیار غنی می‌باشد (Zamanian, 2016). این گونه علاوه بر اینکه در

قدیم مورد استفاده‌ی چرای دام‌ها قرار می‌گرفت، دارای خواص دارویی بسیار مهمی از جمله: موجب تصفیه‌ی خون، جلوگیری از سرطان (دارای فعالیت ضد توموری)، دارای خاصیت بالای آنتی‌اکسیدانی، مقابله از اثرات یائسگی در خانم‌ها، کاهش کلسترول و فشار خون، درمان و جلوگیری از پوکی استخوان و سایر بیماری‌های پوستی مانند: آکنه، اگزما می‌باشد (Herman and Herman, 2017).

این گیاه حاوی غلظت‌های بالا از ایزوفلاونوئیدهاست که ایزوفلاونوئیدهای اصلی آن شامل: biochanin A، diadzin، genistein و formononetin می‌باشد. فعالیت‌های بیولوژیکی آن از جمله فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و فیتواستروژنی می‌باشد و به عنوان یک عامل محافظ شیمیایی در برابر سرطان‌ها و بیماری‌های قلبی و عروقی کاربرد دارد (Petrovska, 2012). ترکیبات ایزوفلاونوئیدی موجود در گیاه شبدر قرمز معمولاً به فرم‌های گلیکوزیده (به نام آنتوسیانین)، ابتدا در ریشه‌های گیاه و بعد در اندام هوایی (ساقه و برگ) تجمع می‌یابد. این متابولیت‌های ثانویه نقش اصلی در سازگاری گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی از جمله تابش اشعه UV، نور زیاد، خشک سالی، شوری زیاد، فلزات سنگین دارد. در نتیجه گیاه در شرایط استرس‌زا موجب افزایش سنتز و تجمع فنیل پروپانوئید و ترکیبات فنلی در گیاه می‌شود (Lin et al. 2000). آثار اشعه UV بر گیاهان به علت نیاز دائمی آن‌ها به نور خورشید اجتناب‌ناپذیر است. این آثار روی گیاهان می‌تواند شامل کاهش فرآیند فتوسنتز، تخریب پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها، تنش اکسایشی و کاهش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی باشد و تغییر در ریخت‌شناسی، تبارزایی و بیوماس گیاه را نیز باعث می‌شود. همچنین، اشعه UV باعث تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن مانند اکسیژن منفرد، آنیون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل شده که این رادیکال‌ها به بر هم زدن تعادل متابولیسمی در سلول‌ها منجر می‌شوند (Asada, 1999). تغییرات ایجاد شده در ریخت‌شناسی گیاهان توسط اشعه UV شامل تغییر در شکل برگ، افزایش شاخه‌های جانبی، کاهش میان گره‌ها، کاهش وزن، کاهش سطح برگ و کاهش ارتفاع گیاه است. از مهم‌ترین سازوکارهای سازگاری گیاهان در برابر اشعه UV می‌توان به افزایش ضخامت برگ، کوچک‌تر شدن برگ، تغییر زاویه برگ‌ها نسبت به اشعه تابشی، افزایش انعکاس از سطح برگ‌ها، افزایش ترکیبات جاذب اشعه UV مانند فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و افزایش کُرک‌های انعکاسی اشاره کرد. به طور کلی، سلول‌های گیاهی دارای سیستم حفاظتی پاداکسایشی با فرآیندهای آنزیمی و غیر آنزیمی هستند تا آثار مخرب گونه‌های واکنشگر اکسیژن (ROS) تولید شده را بر طرف کنند (Mishra et al., 2006).

۲. مواد و روش‌ها

ابتدا بذر شبدر قرمز را پس از با آب، به مدت ۸ ساعت در آب خیسانده تا آماده‌ی جوانه زنی شود. سپس بذرها جهت جوانه زنی بر روی کاغذ صافی مرطوب در تاریکی انتقال داده و بعد از جوانه زنی بذرها به مدت ۴۰ روز به گلدان پرلیت و کوکوپیت انتقال و با محلول هوگلند آبیاری شد. سپس به گیاهان ۴۰ روزه تیمارهای مختلف نور UV اعمال شد. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار و نور UV در ۳ بازه زمانی (۱۵ دقیقه، ۳۰ دقیقه، ۴۵ دقیقه) به مدت ۱ هفته اعمال و در نهایت مقدار رشد، وزن تر، درصد سبزینگی و فلورسانس کلروفیل به صورت ماهانه از آخرین برگ توسعه‌یافته با استفاده از دستگاه فتوسنتزمتر (Walz, Germany) صورت گرفت. اندازه‌گیری مقدار کلروفیل با استفاده از دستگاه کلروفیل متر SPAD 502 PLUS کمپانی KONICA MINOLTA ژاپن انجام شد. صفات فلورسانس کلروفیل از آخرین برگ توسعه‌یافته با استفاده از دستگاه فلورومتر (PAM 2500-Walz, Germany) بر اساس روش (Einali and Shariati, 2012) انجام شد. صفات فلورسانس اندازه گیری شده شامل موارد زیر است: F_0: حداقل فلورسانس از برگ سازگار شده با تاریکی، سطح فلورسانس زمانی که کوئینون A به عنوان اولین پذیرنده الکترون از PSII در حداکثر حالت اکسید خود قرار دارد (مرکز واکنش باز است). F_m: حداکثر فلورسانس در برگ سازگار شده با تاریکی، سطح فلورسانس زمانی‌که کوئینون A در حداکثر حالت احیا قرار دارد (مرکز واکنش فتوسیستم II بسته است). یک پذیرنده الکترون زمانی می‌تواند الکترون خود را به پذیرنده بعدی بدهد که آن پذیرنده در حالت اکسید باشد، در غیر این صورت حداکثر فلورسانس را شاهد خواهیم بود. در این حالت NPQ در حداقل مقدار خود و qP صفر می‌باشد. NPQیا qN

(خاموش کردن غیر فتوشیمیایی الکترون برانگیخته) گفته می‌شود. F_v/F_m: حداکثر عملکرد کوآنتومی فتوسیستم II در شرایط سازگار شده با تاریکی، نشان دهنده حداکثر کارآیی در جذب نور توسط کمپلکس‌های جمع‌کننده نوری فتوسیستم II، که تبدیل به انرژی فتوشیمیایی می‌گردد (احیای کوئینون A). f_{PSII} (فای): عملکرد کوآنتومی فتوسیستم II در شرایط سازگار شده با نور، تخمینی است از کارآیی آنتن‌های جمع‌آوری کننده نور (LHC) فتوسیستم II که برای عملکرد فتوشیمیایی استفاده می‌گردد (احیای کوئینون A). این صفت در یک شدت نور معین برآوردی از کارآیی کوآنتومی زنجیره انتقال الکترون خطی از طریق فتوسیستم II را نشان می‌دهد.

۳. نتایج و بحث

با توجه به (شکل۱)، فاز رویشی گیاهان تحت تنش مختل شده و برگ و ریشه گیاه تنش یافته نسبت به برگ‌های گیاه شاهد رشد کمتری داشته‌اند. همچنین لبه‌های برگ رفته رفته زرد و به تدریج نکروز رخ داده است. در (شکل۲) تعدادی از گیاهان تحت تنش وارد فاز زایشی شده‌اند در این مرحله برگ‌ها در طویل‌ترین حالت خود قرار گرفته و جوانه گلزا ظاهر و رفته رفته گل شبدر قرمز پدیدار شده است. (شکل۳) اثر تیمارهای مختلف اشعه فرابنفش بر وزن تر گیاه را نشان می‌دهد. با افزایش بازه‌های زمانی تابش اشعه فرابنفش، بر میزان وزن تر گیاه شبدر قرمز کاسته شد. به این صورت که گیاه تحت تیمار ۴۵ دقیقه نسبت به گیاه شاهد به ترتیب ۵۷ درصد در وزن تر بخش هوایی و ۴۸ درصد در وزن تر بخش ریشه کاهش یافت. اشعه فرابنفش مانند دیگر تنش‌های محیطی اثرات تخریبی بر گیاهان و جانوران دارد که در اثر تابش‌های شدید آن، باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن مانند اکسیژن منفرد، آنیون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال های هیدروکسیل و غیره می‌شوند. این گونه‌های فعال اکسیژن قابلیت واکنش پذیری زیادی با بیومولکول‌های زیستی دارند به طوری که تخریب پروتئین‌ها و فسفولیپیدها در غشاهای سلولی می‌شوند که این امر منجر به برهم زدن تعادل متابولیسمی در سلول‌ها، مختل شدن اعمال طبیعی سلول‌ها، کاهش وزن و در نهایت مرگ منجر سلول‌ها و گیاه می‌شوند.

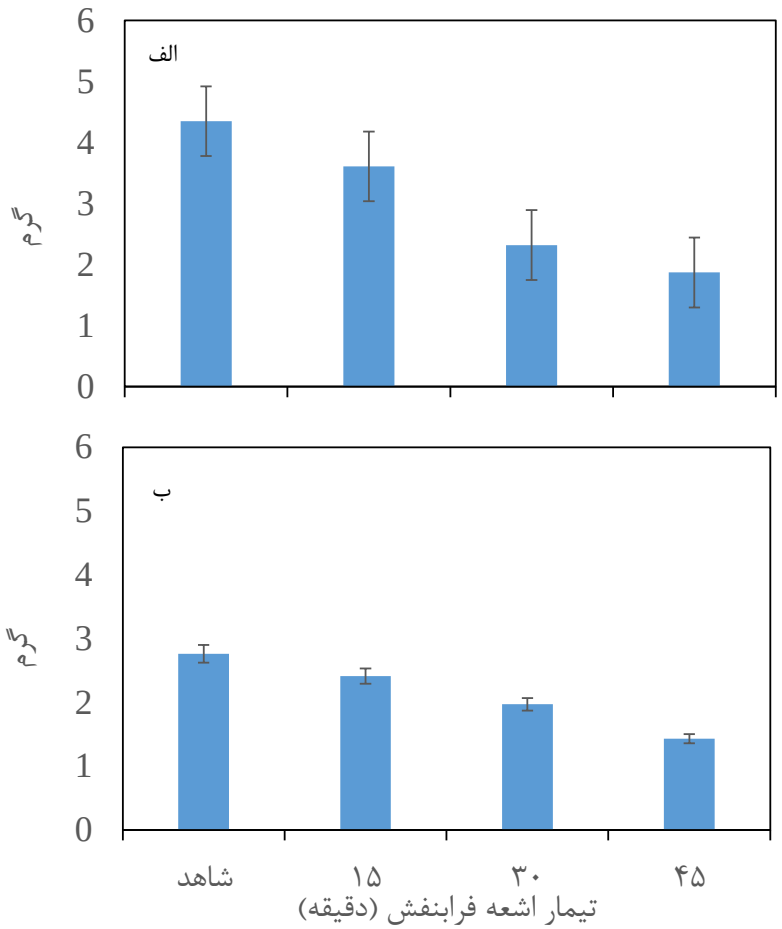
اثر تیمارهای مختلف اشعه فرابنفش بر درصد رنگدانه‌های فتوسنتزی گیاه شبدر نشان داد که با افزایش میزان زمان تیمار اشعه فرابنفش از میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی کاسته شد. گیاه تیمار ۴۵ دقیقه نسبت به گیاه شاهد، با کاهش ۲۱ درصدی رنگدانه‌های فتوسنتزی همراه بود (شکل ۴).



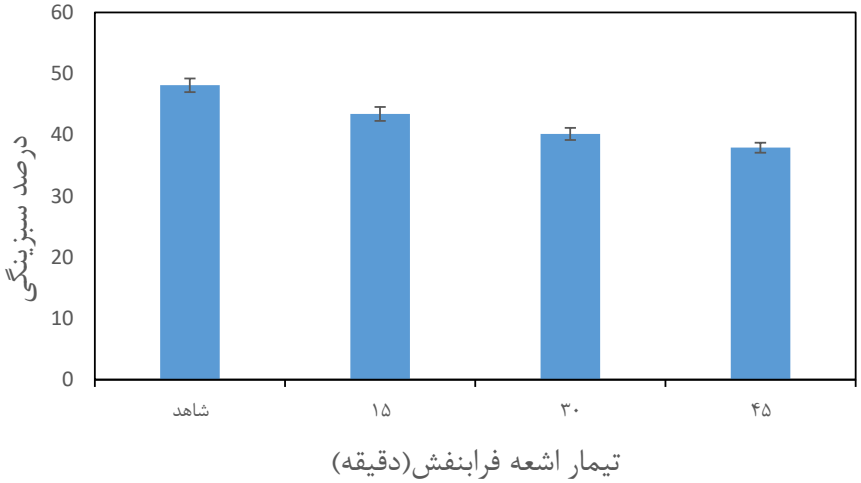
شکل۱:بررسی تیمارهای مختلف اشعه فرابنفش در فاز رویشی گیاه شبدر قرمز



شکل۲: اثر تنش **UV** در فاز زایشی گیاهان تحت تنش



شکل ۳: ارزیابی وزن تر در تیمارهای متلف اشعه فرابنفش در الف) بخش های هوایی و ب) ریشه گیاه شبدر قرمز. میله‌های روی هر یک از ستون ها نشان دهنده خطای استاندارد می‌باشد.



شکل ۴: ارزیابی درصد سبزینگی در تیمار های مختلف اشعه فرابنفش در گیاه شبدر قرمز
میله‌های روی هر یک از ستون ها نشان دهنده خطای استاندارد می‌باشد.

تیمارهای استفاده شده در این آزمایش به طور مستقیم و غیر مستقیم فلورسانس بر کلروفیل و اجزاء ساختاری دستگاه فتوسنتز کننده (مانند کاهش شدت فتوسنتز، کاهش رنگدانه های فتوسنتزی قرار می‌دهند.) اثر معنی‌دار کاهش فتوسنتز بیانگر آن است که تیمار اشعه فرابنفش با تاثیر بر واکنش‌های بیوشیمیایی چرخه کالوین و تغییر در ساختار کلروپلاست‌ها می‌تواند میزان فتوسنتز را کاهش دهد (جدول ۱).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در گیاهان تیمارشده با تیمار شده با اشعه فرابنفش فلورسانس حداکثر در شرایط نوری و خاموشی غیر فتوشیمیایی فتوسیستمII نسبت به گیاهان شاهد کاهش شد. در شرایط طبیعی، QA اولین پذیرنده الکترون، با انتقال الکترون به NADP و بعد به CO2 از طریق QB دومین پذیرنده الکترون، در حالت اکسایش قرار دارد، در نتیجه Fv/Fm نسبتا زیاد است. اگر اکسیداسیون مجدد QA با کاهش یا ایجاد مانعی در مسیر انتقال الکترون محدود شود، مقدار Fv/Fm کاهش می‌یابد (Mallick and Mohn, 2003). در اثر تیمار اشعه فرابنفش کاهش ظرفیت QA سبب کاهش انتقال الکترون به فتوسیستم I و در نتیجه اتلاف انرژی نورانی جذب شده به شکل فلورسانس گردید و در واقع در جریان برانگیختگی کلروفیل، NPQ بر qP غلبه داشت و لذا عملکرد کوانتومی فتوسنتز کاهش و تلفات انرژی به شکل نور و گرما، افزایش پیدا کرد.

جدول۱:بررسی صفات فیزیولوژیکی و فاکتورهای فتوسنتزی در تیمارهای مختلف اشعه فرابنفش

تیمار (دقیقه)	حداقل فلورسانس در تاریکی	حداکثر فلورسانس در روشنایی	حداکثر عملکرد II کوآنتومی فتوسیستم در تاریکی	عملکرد کوآنتومی فتوسیستم II در شرایط سازگار شده با نور	خاموش کردن غیر فتوشیمیایی الکترون برانگیخته
	F0	Fm/	Fv/Fm	F	qN
شاهد	۳۲±۲۲۹	۱۰۹±۱۰۹۹	۰/۰±۷۹/۰۱۵	۴۷±۲۹۳	۰/۰±۰۴/۰۰۹
۱۵	۳۸±۲۰۷	۲۴۸±۱۰۴۴	۰/۰±۸۰/۰۱	۶۷±۲۹۰	۰/۰±۰۳/۰۰۶

۳۰	۲۷±۲۰۸	۹۴±۸۵۲	۰/۰±۷۵/۰۱	۳۱±۲۵۰	۰/۰±۰۱/۰۰۲
۴۵	۵±۱۷۴	۲۲±۶۹۱	۰/۰±۷۵/۰۱	۴±۲۲۱	۰/۰±۰۲/۰۰۳

۴. نتیجه‌گیری

آثار اشعه UV بر گیاهان می‌تواند شامل کاهش وزن تر، کاهش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی، فرآیندهای فتوسنتزی گیاه، تنش اکسایشی و تغییر در فلورسانس گیاه شود. اثر معنی دار کاهش فتوسنتز بیانگر آن است که تیمار اشعه فرابنفش با تاثیر بر واکنش‌های بیوشیمیایی چرخه کالوین و تغییر در ساختار کلروپلاست‌ها می‌تواند میزان فتوسنتز را بکاهد. تغییرات ایجاد شده در ریخت‌شناسی، تبارزایی و بیوماس گیاه دراثر اشعه UV شامل: کاهش وزن، کاهش سطح برگ و کاهش ارتفاع گیاه، تغییر در شکل برگ و زرد شدن برگ و پدیده ی نکروز صورت گرفت. همچنین، اشعه UV باعث تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن مانند اکسیژن منفرد، آنیون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل می‌شود که این رادیکال‌ها به بر هم زدن تعادل متابولیسمی در سلول‌ها منجر می‌شود (Asada, 1999). این گونه‌های فعال اکسیژن قابلیت واکنش پذیری زیادی با بیومولکول‌های زیستی دارند به طوری که موجب تخریب پروتئین‌ها و فسفولیپیدها در غشاهای سلولی می‌شوند که این امر منجر به برهم زدن تعادل متابولیسمی در سلول‌ها، مختل شدن اعمال طبیعی سلول‌ها، و در نهایت مرگ سلول‌ها و گیاه می‌شوند.به طور کلی، سلول‌های گیاهی دارای سیستم حفاظتی پاداکسایشی هستند تا آثار مخرب گونه‌های واکنشگر اکسیژن (ROS) تولید شده را بر طرف کنند. این سیستم، شامل فرآیندهای آنزیمی و غیر آنزیمی است (Mishra et al., 2006).

منابع

1- Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annual review of plant biology 50(1): 601-639
2- Einali A. and Shariati M. 2012. Effects of n-propyl gallate on photosynthesis and physiological parameters in Dunaliella salina are affected by stressful conditions. Brazilian Journal of Plant Physiology 24: 193-202
3- Herman A. and Herman A. P. 2017. Topically used herbal products for the treatment of hair loss: preclinical and clinical studies. Archives of dermatological research 309(8): 595-610
4- Lin L.-Z., et al. 2000. LC-ESI-MS study of the flavonoid glycoside malonates of red clover (*Trifolium pratense*). Journal of agricultural and food chemistry 48(2): 354-365
5- Mallick N. and Mohn F. 2003. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga Scenedesmus. Ecotoxicology and environmental safety 55(1): 64-69
6- Mishra S et al. 2006. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in Bacopa monnieri L. Plant physiology and biochemistry 44(1): 25-37
7- Petrovska B. B. 2012. Historical review of medicinal plants' usage. Pharmacognosy reviews 6(11): 1
8- Zamanian M. 2016. Evaluation of forage yield and morphological characteristics of imported Berseem clover cultivars. Seed and Plant Improvement Journal 32

Evaluation of micro-propagation of *Juglans regia* in the MS and DKW culture media

Neda Hajhassani[1], Mehdi Zarei[2*], Hossein Hosseini Moghadam[3], Hossein Sabouri[4]

[1]M.Sc. Student, Department of Plant Production, Faculty of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gonbad Kavous University
[2]Assistant Professor, Department of Plant Production, Faculty of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gonbad Kavous University
[3]Assistant Professor, Department of Plant Production, Faculty of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gonbad Kavous University
[4]Associate Professor, Department of Plant Production, Faculty of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gonbad Kavous University

*Corresponding Author: mehdizarei@gonbad.ac.ir

Abstract

Walnuts (*Juglans regia* L.) belongs to the Juglandaceae family is one of the important dried fruits. This research was carried out as factorial base on randomized complete design with 14 treatments in 4 replication. The experimental treatments including: culture media (MS and DKW), growth regulators (IBA and BAP) and different concentration (0, 0.4, 0.8 and 1.2 mg/L). The evaluated parameters were such as: fresh weight and diameter of callus. The results showed that culture media, growth regulators and interaction one had a significant effect on all measured traits. The highest fresh weight callus (1.513 gr) was observed for MS medium supplemented with 0.6 mg/L BAP, while the lowest one (0.673 gr) in MS medium without growth regulators. Also, the highest diameter callus (21.470 mm) obtained in DKW medium supplemented with 0.8 mg/L IBA and the lowest one (1.946 mm) recorded in MS medium containing 1.8 mg/L BAP.

Keyword: In-vivo, Growth regulator, Callus, Explant

ارزیابی ریزازدیادی گردو ایرانی در محیط کشت‌های MS و DKW

ندا حاج‌حسنی[۱]، مهدی زارعی[۲*]، حسین حسینی مقدم[۳]، حسین صبوری[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه تولیدات گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس
۲- استادیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس
۳- استادیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس
۴- دانشیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس
*نویسنده مسئول: mehdizarei@gonbad.ac.ir

چکیده

گردو با نام علمی *Juglans regia* از خانواده Juglandaceae یکی از مهم‌ترین میوه‌های خشکباری است. این پژوهش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۱۴ ترکیب تیماری در ۴ تکرار انجام شد. تیمارهای مورد آزمایش شامل محیط کشت (MS و DKW)، تنظیم‌کننده رشد (IBA و BAP) و غلظت‌های مختلف آن (صفر، ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۲ میلی‌گرم در لیتر) بود. صفاتی از جمله وزن تر و قطر کالوس اندازه‌گیری شدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین نوع محیط کشت، سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد و اثر متقابل آن‌ها برای همه صفات اختلاف معنی‌داری وجود دارد. بیشترین وزن‌تر کالوس (۱/۵۱۳ گرم) در محیط‌کشت MS با غلظت ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر BAP و کمترین وزن آن (۰/۶۷۳ گرم) مربوط به تیمار شاهد در محیط‌کشت MS بود. بیش‌ترین قطر کالوس (۲۱/۴۷۰ میلی‌متر) مربوط به محیط‌کشت DKW با غلظت ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر IBA و کمترین مقدار آن (۱/۹۴۶ میلی‌متر) مربوط به محیط‌کشت MS با غلظت ۱/۸ میلی‌گرم در لیتر BAP بود.

واژگان کلیدی: کشت درون شیشه‌ای، تنظیم‌کننده رشد، کالوس، ریزنمونه

۱. مقدمه

گردو با نام علمی *Juglans regia* از خانواده Juglandaceae یکی از مهم‌ترین میوه‌های خشکباری است (وحدتی، ۱۳۸۲؛ کادن، ۱۹۹۷). قسمت‌های مختلف گردو داری خواص دارویی مختلفی هستند، از جمله مغز گردو باعث کاهش تری‌گلیسرید[۴۴۳] و افزایش HDL[۴۴۴] خون می‌شود (زیبایی‌نژاد، ۲۰۰۵). اثر ضدالتهابی، ضداکسیدانی و ضدسرطان، مدر و ملینی عصاره پوست درخت گردو در تعدادی از مطالعات بررسی شده است (بهاتیا و همکاران، ۲۰۰۶). ترکیبات فرار و فنول‌های پوست سبز گردو دارای خاصت ضدالتهابی و آنتی‌بیوتیکی هستند (بیوتری، ۲۰۰۰؛ الیورا، ۲۰۰۸). برگ گردو به عنوان یک ماده قابض و ضدانگل در طب سنتی شناخته شده است (امارال و همکاران، ۲۰۰۴). حضور ترکیباتی نظیر نفتاکیتون، فلاوونوئیدها و ژاگلون[۴۴۵] از ترکیبات مهم آنتی‌اکسیدانی برگ گردو به‌شمار می‌روند. ژاگلون یکی از مهمترین ترکیبات فنولیک موجود در گردو دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشد (کیوادان و همکاران، ۲۰۰۵).

گردو گیاهی است سخت ریشه‌زا و از این‌رو تکثیر گونه‌ها و واریته‌های مختلف آن با روش‌های متداول جنسی تقریباً امکان‌پذیر نمی‌باشد. ازآنجایی که ازدیاد جنسی موجب تفرق صفات می‌گردد و از طرفی سایر روش‌های تکثیر غیرجنسی نظیر قلمه زدن، خوابانیدن و ریزازدیادی نیز هنوز بصورت تجاری متداول نشده‌اند، روش تکیر رویشی پیوند یکی از راه علمی و مفید برای حفظ

443- Terry Glyceride
444- High Density Lipoprotein
445- Jaglon

خصوصیات ژنتیکی ژنوتیپ‌های برتر گردو بشمار می‌رود (نصیری، ۱۳۷۴؛ رضایی و همکاران، ۲۰۰۸). تکثیر به روش پیوند و کوپیوند زمان‌بر و پرهزینه است و استفاده از قلمه به علت عدم ریشه‌زایی و یا درصد بسیار پایین، موفقیت چندانی ندارد. لذا ارائه روشی که بتواند محدودیت‌های فعلی تکثیر را مرتفع نماید لازم و ضروری است (شکافنده و قاسمی، ۱۳۸۷).

سابقه تحقیق در زمینه کشت‌بافت گردو در جهان به سال ۱۹۶۹ بر می‌گردد که کامینوس (۱۹۶۹) با کشت شاخه‌های پوست‌دار گردوی سیاه به کالوس رسیدند. رودیگوئز (۱۹۸۲) از قطعات ساقه، لپه و همچنین قطعات ریشه نهال‌های بذری گردوی سیاه به کالوس و از قطعات کالوس مشتق از لپه و ریشه به ریشه‌زایی رسید. چالوپا (۱۹۸۱) از گیاهچه‌های حاصل از گره نهال‌های بذری به ریشه‌زایی رسید. در حال حاضر به دلیل بذری بودن اکثر باغ‌های ایران، مهم‌ترین موانع صادراتی این محصول، عدم یکنواختی محصول تولیدی ازلحاظ اندازه، کیفیت مغز و سایر صفات ظاهری می‌باشد. از عیب‌های دیگر استفاده از بذر می‌توان به طولانی بودن دوره نونهالی دانهال‌های گردو اشاره کرد. وجود این مشکلات در تکثیر از طریق بذر باعث شده است امروزه استفاده از بذور برای تکثیر ارقام کنار گذاشته شده و دانهال‌های بذری گردو فقط به‌عنوان پایه برای انجام پیوند مورد استفاده قرار گیرند (وحدتی، ۱۳۸۲). به‌همین دلیل به استفاده از روش‌های تکثیر غیرجنسی روی آوردند که استفاده از فنون کشت درون‌شیشه‌ای می‌تواند دوره اصلاحی آن‌ها را به‌مراتب کوتاه‌تر سازد. کشت‌بافت کوتاه‌ترین روش برای ایجاد گیاهان یکنواخت از لحاظ ژنتیکی است و امکان تولید تعداد زیادی از گیاهان عاری از هرگونه بیماری را در مدت‌زمان کم فراهم می‌نماید (فتحی و همکاران، ۱۳۹۲). بنابراین هدف از این تحقیق بررسی اثر نوع محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلف بر ریزازدیایی گردوی ایرانی می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

این تحقیق در آزمایشگاه کشت‌بافت دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس اجرا شد. مواد گیاهی مورد استفاده در اوایل بهار از جوانه‌های جانبی و شاخه‌های جوان از درخت گردوی ایرانی از باغات اطراف شهرستان گنبدکاووس تهیه شدند. ابتدا ریزنمونه‌ها جهت از بین بردن گرد و غبار با آب شسته و سپس در ظروف حاوی مایع ظرفشویی (دی‌ترژن) ضدعفونی و به مدت ۳۰ ثانیه در محلول اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند. سپس ریزنمونه‌ها با آب مقطر شستشو داده شد و به مدت ۶ دقیقه در کلرید جیوه ۰/۰۰۳ قرار گرفتند. پس از اعمال تیمار به‌منظور از بین بردن کامل مواد ضدعفونی‌کننده، ریزنمونه‌ها سه بار با آب مقطر استریل شسته شدند (براساس پر

جهت بررسی نوع محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد با غلظت‌های مختلف روی ریزازدیادی گردوی ایرانی، ابتدا نمونه‌ها به قطعات کوچک‌تر دارای حداقل یک جوانه جانبی تقسیم و در محیط‌کشت‌های MS (Murashige and Skoog) و DKW (Driver and Kuniyuki) با غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد IBA[۴۴۶] (صفر، ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۲ میلی‌گرم در لیتر) و BAP[۴۴۷] (صفر، ۰/۶، ۱/۲ و ۱/۸ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. صفات مورد اندازه‌گیری شامل: وزن‌تر و قطر کالوس بود.

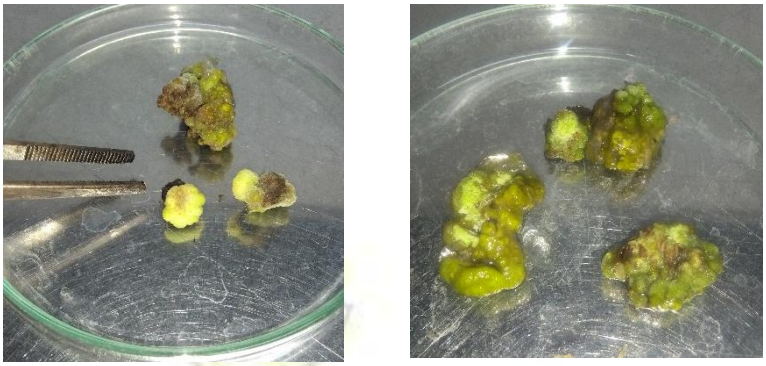
این پژوهش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۱۴ ترکیب تیماری در ۴ تکرار (در هر تکرار ۳ مشاهده (ریزنمونه)) انجام شد. داده‌های به‌دست آمده به‌وسیله نرم افزار SAS (نسخه ۹/۱) آنالیز و مقایسه‌ی میانگین‌ها نیز با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت. برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

۳. نتایج و بحث

[۴۴۶] Indole-۳-butyric acid

[۴۴۷] ۶-Benzylaminopurine

ابتدا ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت پایه (MS بدون تنظیم‌کننده رشد) کشت شدند و بعد از استقرار، ریزنمونه‌ها به مدت سه هفته، کالوس تولید نمودند (شکل ۱). سپس جهت شاخه‌زایی گیاه کالوس‌های تولیده شده به محیط‌کشت‌های MS و DKW با غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد IBA (صفر، ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۲ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (صفر، ۰/۶، ۱/۲ و ۱/۸ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند.



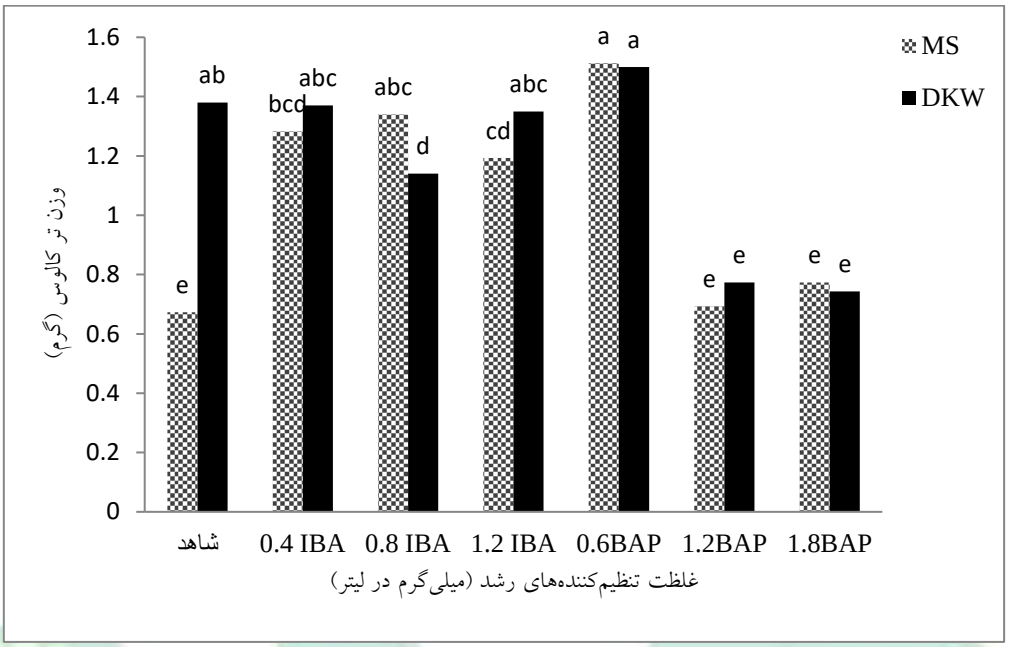
شکل ۱:کالوس‌های تشکیل شده در محیط‌کشت پایه

طبق نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های به‌دست‌آمده، اثرات محیط‌کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر وزن‌تر و قطر کالوس معنی‌دار بودند (جدول ۱). وزن‌تر کالوس در محیط‌کشت MS بیشتر از محیط‌کشت DKW بود. بهترین تنظیم‌کننده رشد، BAP با غلظت ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر در هر دو محیط‌کشت به‌دست آمد. بیشترین وزن‌تر کالوس ۱/۵۱۳ گرم با غلظت ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر BAP در محیط‌کشت MS و کمترین وزن آن ۰/۶۷۳گرم مربوط به گیاه شاهد در محیط‌کشت MS بود (نمودار ۱). قطر کالوس در محیط‌کشت DKW بیش‌تر از محیط‌کشت MS بود. بین دو تنظیم‌کننده رشد، IBA به‌عنوان بهترین تنظیم‌کننده رشد بوده است. بیش‌ترین قطر کالوس به‌دست‌آمده ۲۱/۴۷۰ میلی‌متر مربوط به محیط‌کشت DKW با غلظت ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر IBA و کمترین مقدار آن ۱/۹۴۶ میلی‌متر مربوط به محیط‌کشت MS با غلظت ۱/۸ میلی‌گرم در لیتر BAP بود (نمودار ۲).

جدول ۱: تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف بر صفات مورد مطالعه گردوی ایرانی در کشت درون شیشه‌ای

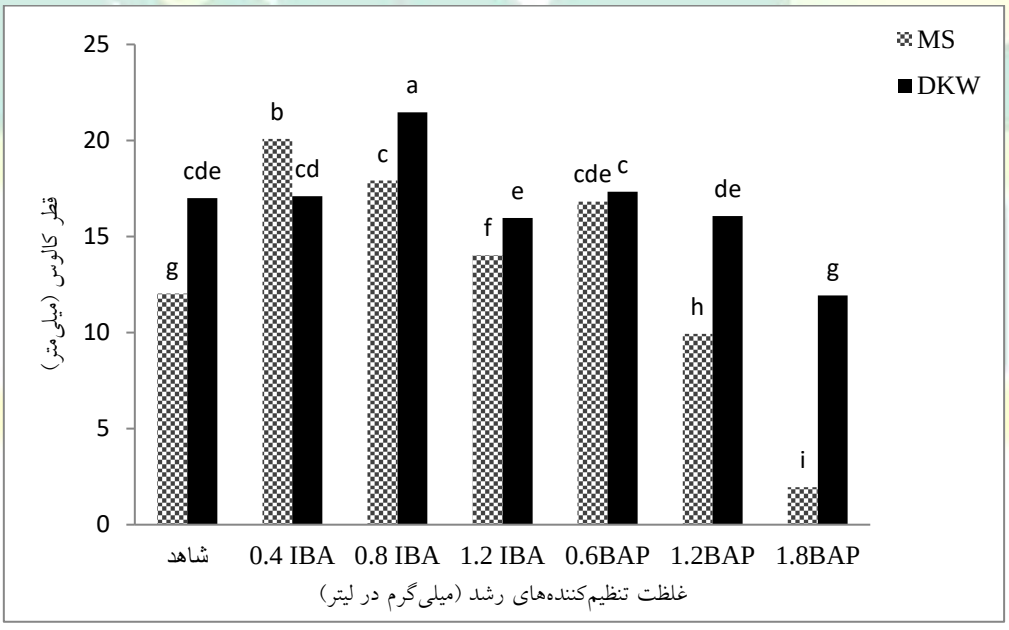
منبع تغییرات	درجه آزادی	وزن تر کالوس	قطر کالوس
تیمار	۱۳	۰/۳۰۶**	۷۱/۶۸**
خطا	۲۸	۰/۰۱۱	۰/۴۲
ضریب تغییرات (درصد)		۹/۵۸	۴/۳۶

ns، * و **: به‌ترتیب عدم وجود اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد.



نمودار ۱:مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد روی وزن‌تر کالوس در دو محیط‌کشت MS و DKW

(میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند، براساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند)



نمودار ۲: مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد روی قطر کالوس در دو محیط‌کشت MS و DKW

(میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند، براساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند)

در اغلب مطالعات از وزن‌تر کالوس برای شاخص اندازه‌گیری رشد کالوس استفاده می‌شود. حضرتی‌جهان و همکاران (۱۳۹۵) گزارش کردند در ریزنمونه برگ بیشترین وزن‌تر کالوس ۰/۵۲۲ در محیط‌کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ترکیب با نیم میلی‌گرم در لیتر BAP و نیم میلی‌گرم در لیتر KIN و در ریزنمونه ساقه در محیط‌کشت MS حاوی دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده گردید. تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نقش مهمی در القای کالوس دارند. برخی از قطعات گیاهی کشت شده برای تولید کالوس فقط به اکسین و برخی فقط به سایتوکینین و اکثر کشت‌ها به هر دو نیاز دارند (قاسمی‌بزدی و احمدی، ۲۰۱۰).

سراج و همکاران، (۱۹۹۷) اظهار داشتند که اکسین یکی از مهمترین تنظیم‌کننده‌های رشد برای تمایز مجدد و یا عدم تمایز در گیاهان می‌باشد. پاسخ بهتر ریزنمونه‌ها به غلظت بالای نمک در محیط‌کشت MS را می‌توان دلیل کال‌زایی بیشتر ریزنمونه‌ها در این محیط دانست (جورج، ۲۰۰۸). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق، کاهش غلظت BAP در دو محیط‌کشت MS و DKW باعث افزایش وزن‌تر کالوس شده است. ترکیبات محیط‌کشت در کال‌زایی و اندام‌زایی تاثیر بسزایی دارند. این اثر زمانی مشهود است که تنظیم‌کننده‌های رشد به محیط‌کشت اضافه می‌گردند (جورج، ۲۰۰۸). اکسین و سیتوکنین به عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، فاکتورهای کلیدی برای کنترل تقسیم سلولی در شرایط کشت‌بافت می‌باشند. استفاده از IBA به عنوان اکسین و BAP به عنوان سایتوکنین به منظور تولید کالوس در کشت بافت گیاهان زیادی گزارش شده است (خرمی‌راد، ۲۰۱۲؛ شرفی، ۲۰۰۸). اکسین یکی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی است که برای فعال‌سازی تقسیم سلولی در سلول‌های گیاهی تمایزیافته در شرایط کشت‌بافت مورد نیاز می‌باشد. اکسین در تنظیم مرحله رونویسی ژن‌ها عمل خود را اعمال می‌کند.

۴. نتیجه‌گیری

کالوس یک بافت غده‌ای کم و بیش تمایز نیافته است که به‌طور معمول در محل زخم‌های ایجاد شده در بافت‌ها واندام‌های تمایز یافته ایجاد می‌شود. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که نوع محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد می‌تواند بر میزان کالوس‌زایی اثر معنی‌داری داشته باشند. وزن‌تر کالوس در محیط‌کشت MS بیشتر از محیط‌کشت DKW بود؛ در حالی که قطر کالوس در محیط‌کشت DKW بیش‌تر از محیط‌کشت MS بود. همچنین بین تنظیم‌کننده‌های رشد بیشترین وزن تر و قطر کالوس به ترتیب در تنظیم‌کننده‌های BAP و IBA بدست آمد.

منابع

۱. حضرتی‌جهان، ر، زارع، ن. دژستان، س. شیخ زاده، پ. فرجامی نژاد، م. فرجامی نژاد، م. ۱۳۹۶. تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر رشد درون‌شیشه ای فندق (*Corylus avellana*). مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران). شماره ۳.

۲. شکافنده، ا و قاسمی، م. ۱۳۸۷. بررسی اثرهای BA و TDZ بر رشد جوانه و رویان‌زایی بدنی لپه‌های نابالغ بادام (*Prunus dulcis* L) دیر گل رقم ۷ شاهرود. مجله علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی). (۲)۲۲: ۱۵۴-۱۴۷.

۳. فتحی، ح؛ کربلایی خیاوی، ح؛ جهانی جلودار، ی؛ و بوذری، ن. ۱۳۹۲. بررسی سازگاری و مقایسه صفات کمی و کیفی برخی از ارقام شلیل در شرایط اقلیمی مشکین شهر. نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی). (۱)۲۷: ۴۴-۵۱.

۴. نصیری، م. ۱۳۷۴. ریشه‌زایی شاخه‌های گردوی ایرانی از طریق خوابانیدن هوایی. پژوهش و سازندگی، شماره ۲۴

۵. وحدتی، ک. ۱۳۸۲. احداث خزانه و پیوند گردو. انتشارات خانیران، تهران.

6. Amaral J.S., Seabra R.M., Andrade P.B., Valentao P., Pereira J.A. and Ferreres F. 2004. Phenolic profile in the quality
7. control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves. Food Chemistry, 88: 373-379.
8. Bhatia K., Rahman S., Ali M. and Raisuddin S. 2006. In vitro activity of *Juglans regia* L. bark extract and its protective effect on cyclophosphamide-induced urotoxicity in mice. Redox Report, 11(6): 273-913.
9. Buttery R.G., Light D.M., Nam Y., Merrill G.B. and Roitman J.N. 2004. Volatile components of green walnut husks. Journal of Agriculture Food Chemistry, 48(7): 2858-61.
10. ChalupaV. 1981. Clonal propagation of broad leaved *fprest chalupa* trees in vitro. 12: 255-271.

11. Cumminus J.N. and Ashby W.C. 1969. Aseptic culture of *Juglans nigra* stem tissues. Forest Science, 15: 102-103.
12. George E.F., Hall M.A. and Klerk G.J.D. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. 3 Edition, Springer, 504 pp.
13. Ghasemi Bezdi K. and Ahmadi A. 2010. Cell and Tissue Biotechnology in Micro-propagation and Plant Breeding. Makhtoomgholi Faraghi Pub. Gorgan, Iran. 254 pp.
14. Khorrami Raad M., Bohluli Zanjani S., Ramezani Sayyad A., Maghsudi M. and Kaviani B. 2012. Effect of cultivar, type and age of explants, light conditions and plant growth regulators on callus formation of Anthurium. American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture, 12 (6): 706-712. 22.
15. Kuden A. and Kaska N. 1997. Studies on the patch budding of walnuts in different budding periods under subtropical conditions. Acta Horticulturae, 442: 299-302.
16. Oliveira I., Sousa A., Ferreira I.C., Bento A., Estevinho L. and Pereira J.A. 2008. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. Food Chemistry Toxicology, 46(7): 2326-2331.
17. Qadan F., Theaini A.J., Ali D.A, Afifi R., Elkhawad A. and Matalka K.Z. 2005. The antimicrobial activities of Psidium guajava and Juglans regia leaf extracts to acne-developing organisms. The American Journal of Chinese Medicine, 33(2): 197-204.
18. Rezaee K., Vahdati K., Grigoorian V. and Valizadeh M. 2008. Walnut grafting success and bleeding rateas affected by different grafting methods and seedling vigour. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2008; 83(1): 94-99.
19. Rodriguez R. 1982. Callus initiation and root formation from in vitro culture of walnut cotyledons. Horticultural Science, 17: 195-196.
20. Sharafi A., Hashemi Sohi H. and Jourabchi E. 2008. Improvement on the situation of regeneration of medicinal plant *Artemisia annua* L. Journal of Environmental Research, 21: 565-573.
21. Zibaeenezhad M.J., Shamsnia S.J. and Khorasani M. 2005. Walnut consumption in hyperlipidemic patients. Angiology, 6(5): 581-30.

The Effect of Gamma Irradiation on Vitamin C Content of Strawberries Under Storage conditions

Razieh Karimi Ghahfarokhi[1*]; Gholamreza Rabiei[2]; Morteza Reisi[3]

1- M.Sc. Student, Department of Horticultural Science, Shahrekord University
2- Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Shahrekord University
3- Assistant Professor, Department of Physics, Shahrekord University

*Corresponding Author Email address; raziehkarimi95@gmail.com

Abstract

This study was conducted to investigate the effect of gamma irradiation on the shelf life of strawberry fruit stored at 4 ± 1 temperature and 90% relative humidity. Strawberries of *Albion* cultivar grown in greenhouse were selected hydroponically for this experiment. The plants were all the same, without symptoms of disease or pest, and under the same nutrition and maintenance management. Post-harvest treatments included control and gamma irradiation at three levels of 0.5, 1 and 2 kg with 3 replications. Evaluation of the desired traits was performed at one week intervals up to 21 days after harvest (7, 14 and 21 days). During storage, fruit weight, fruit tissue firmness, vitamin C content, pH, TA and soluble solids were evaluated. The results showed that during storage, the total weight of the fruit, the content of firmness of the fruit tissue and the amount of vitamin C and TA decreased and the content of soluble solids and taste in the fruit increased. Irradiation treatment had a significant effect on the amount of vitamin C and a decrease in the amount of vitamin C was very evident during storage at a dose of 2 kg and 0.5 kg treatment was important in controlling the reduction of vitamin C. In the treatment of 1 kg until the 14th day of storage, a decrease in the percentage of fruit weight was observed. It was also observed that the firmness of the whole fruit decreased during storage, in the 2 kg treatment and significantly more than other treatments. On the other hand, gamma irradiation treatment had no significant effect on fruit sugar content (TSS) and pH. The effect of storage time on fruit sugar traits, pH, and taste index and TA was significant. It can be inferred that gamma irradiation at a dose of 1 kg can increase the storage of strawberries in the tested conditions.

Keywords: Radiation, Acid Ascorbic, shelf life

اثر پرتودهی گاما بر میزان ویتامین ث میوه توت فرنگی در شرایط انبارداری

راضیه کریمی قهفرخی[1*]؛ غلامرضا ربیعی[2]؛ مرتضی رئیسی[3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

۲- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

۳- استادیار گروه فیزیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد

*ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: raziehkarimi95@gmail.com

چکیده

این پژوهش به منظور بررسی تاثیر پرتودهی گاما بر ماندگاری میوه توت فرنگی نگهداری شده در دمای ۴±۱ و رطوبت نسبی ۹۰ ٪ انجام گرفت. توت فرنگی رقم آلبیون کشت شده درون گلخانه به صورت هیدروپونیک برای این آزمایش انتخاب شد. گیاهان همگی هم‌سن و بدون علائم بیماری یا آفت و تحت مدیریت تغذیه و نگهداری یکسان بودند. تیمارها بلافاصله پس از برداشت و شامل شاهد، پرتودهی گاما در سه سطح ۰.۵ و ۱ و ۲ کیلوگری با ۳ تکرار بودند. ارزیابی صفات مورد نظر در فواصل یک هفته‌ای تا مدت ۲۱ روز پس از برداشت انجام شد (هفت، ۱۴ و ۲۱ روز). در طی انبارمانی صفات وزن میوه، میزان سفتی بافت میوه و میزان ویتامین ث و میزان pH، اسیدیته کل و مواد جامد محلول بررسی شد. نتایج نشان داد در طول انبارمانی بطور کلی وزن میوه، میزان سفتی بافت میوه و میزان ویتامین ث و اسیدیته کل کاهش و میزان مواد جامد محلول و شاخص طعم در میوه افزایش یافت. تیمار پرتودهی اثر معنی داری بر مقدار ویتامین ث داشت و کاهش در مقدار ویتامین ث در طول انبارمانی در دوز ۲ کیلوگری بسیار مشهود بود و تیمار ۰/۵ کیلوگری در کنترل کاهش میزان ویتامین ث موثر بوده. در تیمار ۱ کیلوگری تا روز ۱۴ انباری کنترل کاهش درصد وزن میوه مشاهده شد. همچنین مشاهده گردید که سفتی میوه بطورکلی در طول انبارداری کاهش یافته، در تیمار ۲ کیلوگری و شاهد به طور معنی داری بیشتر از سایر تیمارها کاهش سفتی بود. از طرف دیگر تیمار پرتودهی گاما بر صفات مقدار قند میوه (TSS) و pH تاثیر معنی داری نداشت. اثر مدت زمان انبارداری بر صفات قند میوه، pH، و شاخص طعم و میزان اسیدیته قابل تیتر معنی دار بود. می‌توان چنین استنباط نمود که پرتودهی گاما در دوز یک کیلوگری می‌تواند انبارمانی توت فرنگی را در شرایط آزمایش شده افزایش دهد.

واژگان کلیدی: اسید اسکوربیک، اشعه،انبارمانی

۱.مقدمه

توت فرنگی یک میوه مهم اقتصادی است که سراسر جهان مصرف می شود و به دلیل رنگ، شکل، عطر، طعم و بافت لذیذ خود شناخته شده است. توت فرنگی دارای مواد مغذی مختلفی از جمله مواد معدنی و ویتامین‌ها، آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها و

اسیدهای فنولیک است که از سلول ها در برابر سرطان، اکسیدان‌ها، التهاب و اختلالات عصبی محافظت می‌کند salem et al, (2021) همچنین توت فرنگی منبع اسید اسکوربیک، پتاسیم، کلسیم و فسفر است (Filhoa et al, 2018). توت فرنگی رقم آلبیون(Fragari anannasa Duch CV Albio)، رقمی روز خنثی است.

پرتودهی باعث ایجاد تغییرات خاصی در مواد غذایی شده و می‌تواند ترکیبات شیمیایی و ارزش‌های غذایی غذا را تغییر دهد. این تغییرات به عواملی مانند دوز تابش، عناصر مواد غذایی، بسته بندی و شرایط فرآوری مانند دما و اشباع اکسیژن اتمسفر بستگی دارد. در حالی که برخی از ویتامین‌ها مانند ریبوفلاوین (B2)، پیریدوکسین (B6) و بیوتین معمولاً پایدار هستند، برخی دیگر مانند تیامین (B1) و ویتامین‌های A، C و E نسبتاً ناپایدار هستند اگرچه پرتودهی یکی از تکنیک‌های حفاظتی است که آسیب کمتری به مواد مغذی غذا وارد می‌کند، اما کاهش ویتامین‌ها ناشی از پرتودهی در صورتی که از دوزهای بالا استفاده شود، می‌تواند قابل توجه باشد. مطالعات متعددی در مورد اثرات تابش بر ویتامین‌های موجود در مواد غذایی بین اوایل سال ۱۹۵۰ تا اواخر ۱۹۶۰ به عنوان روشی برای فرآیندهای استریل کردن مواد غذایی انجام شده است. در این روش ها از دوزهای بیش از ۱۰ کیلوگری استفاده شد. با این حال ، مواد غذایی معمولاً با دوزهای پایین تری پرتودهی می‌شوند. استفاده از دوزهای پایین همراه با سایر تیمارهای سبک‌تر راهی برای به حداقل رساندن اثرات تابش بر تغییرات ارگانولپتیک و به حداقل رساندن کاهش ویتامین مواد غذایی است. تخریب ویتامین ث نتیجه تغییر مسیرهای اکسیداسیون متابولیک میوه ها در اثر پرتودهی است که می تواند ویتامین ث را به اسید دهیدروآسکوربیک تبدیل کند، که هنوز می تواند به عنوان ویتامین ث در بدن متابولیزه شده و مفید باشد (Dionsio et al, 2009).

محتوای ویتامین ث در توت فرنگی تازه تا ۸۰ میلی گرم در ۱۰۰ گرم است (Sapei, 2014). در پرتودهی اسفناج، کلم سبز و کلم بروکسل تنها ۱۰ درصد از غلظت اولیه ویتامین‌های این محصولات را کاهش داد. در صورت کم آبی، پایداری ویتامین در این سبزیجات بیشتر از زمانی است که تازه هستند. در مطالعات مربوط به سبزیجات تازه، استفاده از دوز ۱۰.۰ کیلوگری تنها برای نشان دادن اینکه از دست دادن ویتامین ها در غذاهای مورد تجزیه و تحلیل بستگی به دوز تابش دارد، استفاده شد (Müller and Diehl, 1996). در یک مطالعه بر رقمی از توت فرنگی کاهش جزئی و غیر قابل توجهی در سطوح ویتامین ث، در دوزهای ۱ و ۲ کیلوگری در طی ۲ و ۱۱ روز نگهداری در دمای ۵ درجه سانتیگراد نشان داده شد (Maxie et al, 1964). در یک مطالعه دیگر با استفاده از دوزهای پرتوهای بالاتر (۳ و ۴ کیلو گری)، به ترتیب منجر به از دست دادن اسیداسکوربیک به ترتیب ۶۲ و ۸۱ درصد شد (Clark, 1959). با این حال، دوزهای ۱.۰-۲.۰ کیلوگری برای افزایش عمر مفید میوه ها کافی در نظر گرفته می شود. میوه هایی که با دوزهای ۲ کیلوگری تیمار شده بودند، افزایش فوری در محتوای نیاسین نشان دادند، در حالی که تیامین بدون تغییر بود (Maxi et al, 1968). فلفل دلمه، خیار، سیب، لیمو، لیچی، انبه، شلیل، پاپایا، هلو، خرمالو و کدو سبز در ۰، ۷۵، یا ۳۰۰ گری تابش شدند. محصولات مدت کوتاهی پس از تیمار با پرتو و دوباره پس از ۳ تا ۴ هفته نگهداری در دمای ۱ تا ۷ درجه سانتیگراد برای برخی پارامترها، مانند ویتامین C و اسید دهیدروآسکوربیک مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تغییرات کوچک قابل توجهی ($p < ۰/۰۵$) در برخی از متغیرها برای برخی محصولات ثبت شد (Michel et al , 1992). هدف از این پژوهش بررسی تیمار پرتو گاما بر ویژگی های کیفی میوه توت فرنگی و عمر پس از برداشت میوه می باشد.

۲.مواد و روش‌ها

۲-۱- توت فرنگی

این مطالعه در گلخانه هیدروپونیک توت فرنگی در شهرستان بروجن روی بوته‌های توت فرنگی تازه کشت شده رقم آلبیون و در قالب طرح فاکتوریل کاملا تصادفی صورت گرفت. نگهداری بوته–های توت فرنگی در تمام مرحله رشد شامل تغذیه و آبیاری بر اساس برنامه–های معمول انجام گرفت. در تاریخ ۱۴۰۰/۰۴/۰۱ برداشت توت فرنگی‌های رسیده در مرحله برداشت تجاری

در ساعات اولیه صبح انجام گرفت و تمام تیمارها وزن شد و بلافاصله به مرکز پرتودهی انتقال داده شدند و پس از آن به آزمایشگاه دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد انتقال یافت. در آزمایشگاه درون یخچال با دمای ۴±۱ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۹۰٪ نگهداری شدند. فاکتورهای وزن، سفتی بافت، میزان اسیدیته قابل تیتر، میزان مواد جامد محلول ،pH در زمان های صفر، هفت ، ۱۴ و ۲۱ روز اندازه گیری شدند.

۲-۲- پرتودهی گاما

مقداری از توت فرنگی های برداشت شده با توجه به برنامه، پس از گلخانه به مرکز پرتودهی انتقال یافته و در چهار سطح صفر، ۰.۵ و ۱.۰ و ۲.۰ کیلوگری در دمای اتاق پرتودهی شدند.

۲-۳- درصد کاهش وزن

وزن میوه در هر مرحله ثبت شد. کاهش وزن تجمعی به صورت درصد کاهش وزن تازه اولیه بیان شد.

۲-۴- سفتی

سفتی بافت میوه با استفاده از یک دستگاه سفتی سنج (EFFEGI) مجهز به یک پروب با قطر پنج میلی متر ارزیابی شد. اندازه گیری در بخش میانی میوه انجام شد.

۲-۵- اسیدیته قابل تیتر (TA)، pH و مواد جامد محلول (TSS)

برای این منظور از هر نمونه تعداد پنج میوه به صورت تصادفی برداشت و آبگیری شده و آب نمونه را صاف کرده در ابتدا یک قطره از عصاره صاف شده را در دمای آزمایشگاه (۲۲-۲۵ درجه سانتی گراد) روی دستگاه رفراکتومتر (ATAGO PAL3) قرار داده و میزان مواد جامد محلول (TSS) اندازه گیری شد و سپس اسیدیته باقی مانده عصاره را ابتدا با دستگاه pH متر کالیبره شده، اندازه گیری کرده و سپس از این نمونه ۱۰ میلی لیتر به نسبت ۱/۱۰ تهیه شده و با محلول سود NaOH ۰/۱ نرمال تیتر شده تا جایی که pH نمونه به ۸/۱ برسد و سپس بر اساس درصد معادل اسید سیتریک محاسبه شد (Sogvar et al, 2016).

۲-۶- میزان ویتامین ث

اندازه گیری بر اساس روش تیتیراسیون با ۲-۶ دی کلروفنل ایندوفنل ۰/۲۵۰ درصد انجام خواهد شد (AOAC,2000). در این روش ابتدا وزن اولیه نمونه ها تعیین شد (FW) و عصاره آن استخراج و پس از سانتریفیوژ و صاف شدن نمونه وزن عصاره اندازه گیری گردید (JW) برای اندازه گیری مقدار ویتامین ث موجود در نمونه ها به روش زیر عمل شد.

الف) ۱۰ سی سی از محلول اسیداسکوربیک را درون یک ارلن ریخته و پس از اضافه شدن پنج قطره متافسفریک اسید (به عنوان معرف) با ۲-۶-دی کلروفنل ایندول تیتر کرده تا رنگ محلول پوسته پیازی شود، در این زمان میزان ایندوفنل مصرفی را یادداشت کرده (D_1)

ب) یک سی سی از عصاره میوه با نه سی سی آب مقطر رقیق شده و درون ارلن ریخته، پس از اضافه نمودن پنج قطره متافسفریک اسید به روش قبلی تیتر شده و مقدار ایندوفنل مصرفی یادداشت گردد (D_2).

برای بدست آوردن مقدار ویتامین ث موجود در نمونه ها از روابط زیر استفاده شد.

$$H = C_1 / D_1 \qquad (1)$$

H = مقدار ویتامین ث موجود به ازای ۱ میلی لیتر ایندوفنل (میلی گرم)

C_1 = مقدار ویتامین ث موجود در محلول استاندارد (در این آزمایش ۲۵۰ میلی گرم)

D_1 = مقدار ایندوفنل تیتر شده برای محلول استاندارد ویتامین ث (بر حسب میلی لیتر)

$H * F = D_2$ (2)

F = مقدار ویتامین ث موجود در نمونه تیتر شده (بر حسب میلی گرم)

D_2 = مقدار ایندوفنل تیتر شده برای نمونه (میلی لیتر)

$G = F * (J_w / J_1) * (1 / F_w)$ (3)

G = مقدار ویتامین ث موجود در یک گرم میوه (بر حسب میلی گرم)

J_1 = حجم نمونه تیتر شده (بر حسب میلی لیتر)

J_w = حجم کل عصاره (بر حسب میلی لیتر)

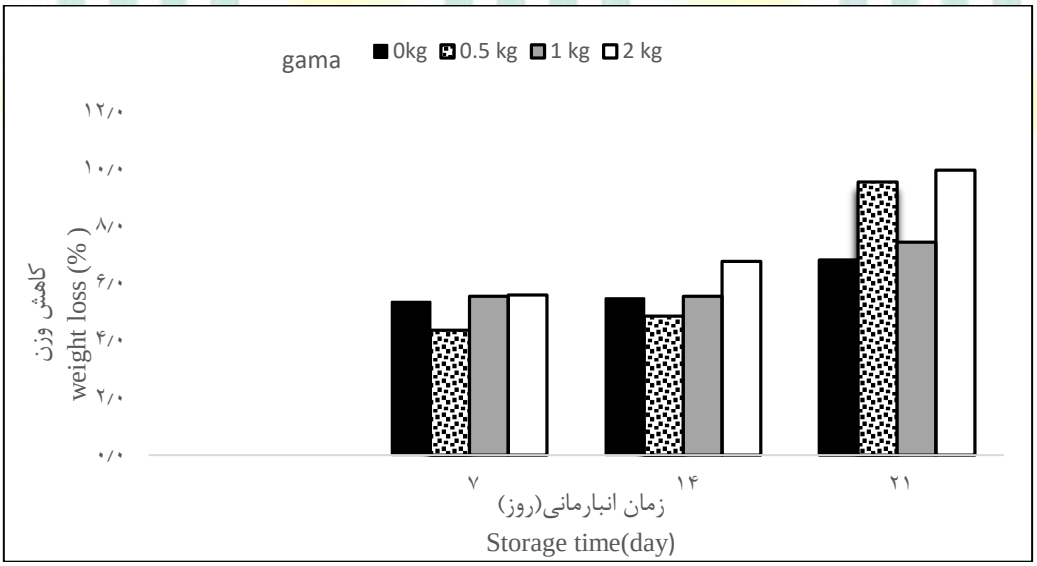
F_w = وزن میوه (بر حسب گرم)

۳. نتایج و بحث

۳-۱-کاهش وزن

با گذشت زمان انبارمانی میزان از دست دادن آب میوه افزایش یافت و در پی آن کاهش وزن در تمام نمونه ها دیده شد (شکل ۱-۳). با توجه به شکل بالاترین میزان کاهش وزن مربوط به تیمار ۲ کیلوگری بود و کمترین درصد تغییرات کاهش وزن در طول انبارداری مربوط به تیمار یک کیلوگری پرتودهی گاما بود. میانگین کاهش وزن در روز هفت انبارداری در دوزهای ۰/۵ ، ۱ و ۲ کیلوگری به ترتیب ۴/۳۷ ، ۵/۵۶ و ۵/۶۰ می باشد و در روز ۲۱ انبارمانی به ترتیب میانگین کاهش وزن در این دوزها ۹/۵۷ ، ۷/۴۶ و ۹/۹۷ است.

عامل اصلی کاهش وزن افزایش تنفس وتعرق است. نتیجه مشابهی از (Salma et al , 2020) گزارش شده که در میوه های تیمار شده با دوز یک کیلوگری میانگین کاهش وزن چهارده روز پس از برداشت کمترین میزان نسبت به بقیه تیمارها بوده.

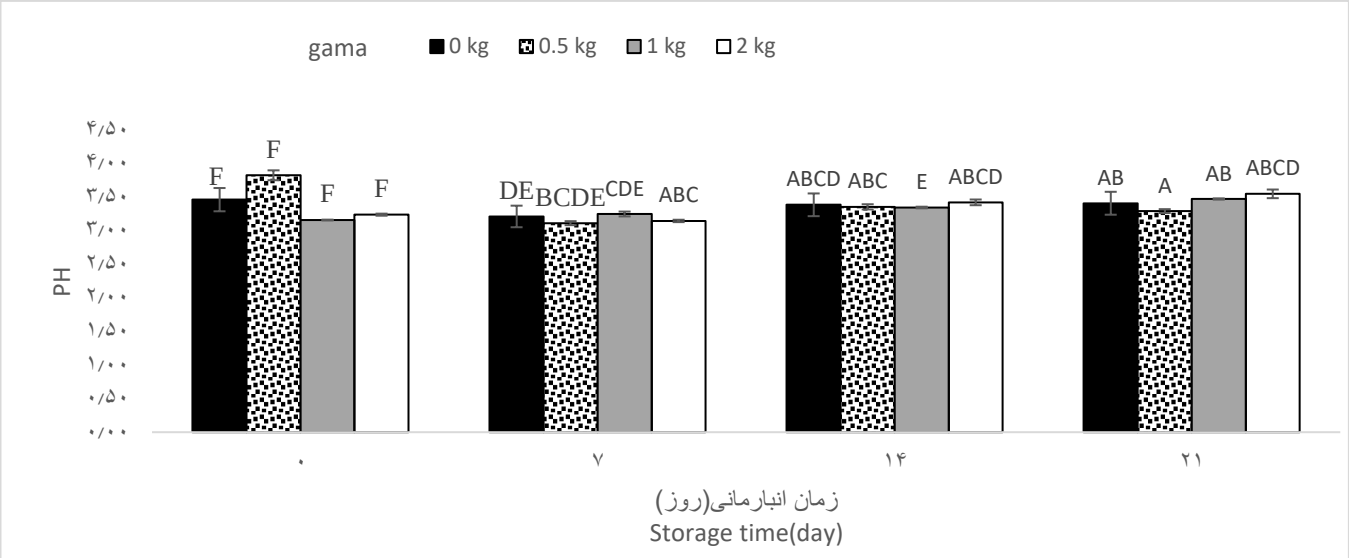


شکل ۳-۱- تاثیر تیمار پرتودهی گاما بر درصد کاهش وزن میوه توت فرنگی در طول انبارمانی (روز).

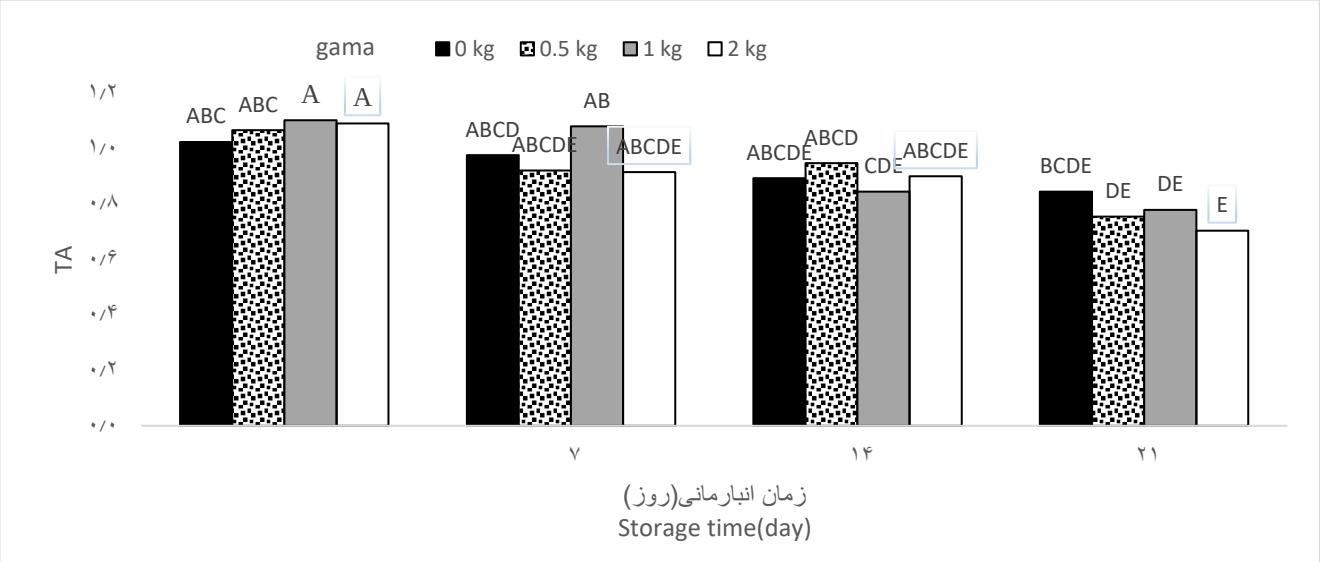
۳-۲-اسید کل و PH

نتایج نشان داد بالاترین میزان pH مربوط به تیمار پرتودهی گاما با دوز ۰/۵ کیلوگری در روز هفتم پس از انبارداری است ولی در طول مدت انبارداری بالاترین میزان PH در مربوط به تیمار شاهد است (شکل ۳-۳). با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳-۱) مشاهده شد که تیمار پرتودهی گاما تاثیر معنی داری در سطح ۵ درصد بر میزان PH میوه توت فرنگی داشت. اثر زمان و برهمکنش زمان وپرتودهی در سطح ۱ درصد معنی دار شد. دلیل افزایش PH در طی انبارداری پس از روز چهاردهم می تواند به دلیل افزایش فرایند تنفس و پس از آن مصرف اسیدهای آلی باشد. این نتایج با آزمایش (Maraei et al ,2017) که مشاهده کردند تیمار پرتودهی گاما بر میزان PH توت فرنگی تاثیری ندارد، متفاوت است. طبق مطالعات قبلی زمان برداشت و دمای نگهداری و همچنین دوز مصرفی پرتودهی می تواند بر میزان PH میوه توت فرنگی موثر باشد (Nunes et al ,2006).

با بررسی نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳-۱) دیده شد زمان تاثیر معنی دار بر میزان اسیدیته کل در سطح ۱ درصد داشته و در اثر تیمار پرتودهی گاما بر اسیدیته کل اخلاف معنی داری دیده نشد. در شکل ۳-۲ مشاهده می‌شود انبارداری باعث افزایش میزان اسیدیته در تمام نمونه ها شدو بیشترین میزان اسیدیته مربوط به تیمار پرتودهی ۱ کیلوگری بود.



شکل ۳-۲: تاثیر تیمار پرتودهی گاما بر PH میوه توت فرنگی در طول انبارمانی (روز).



شکل ۳-۴:تاثیر تیمار پرتودهی گاما بر اسیدیته کل میوه توت فرنگی در طول انبارمانی (روز)

۳-۲-مواد جامد محلول (TSS)و شاخص طعم

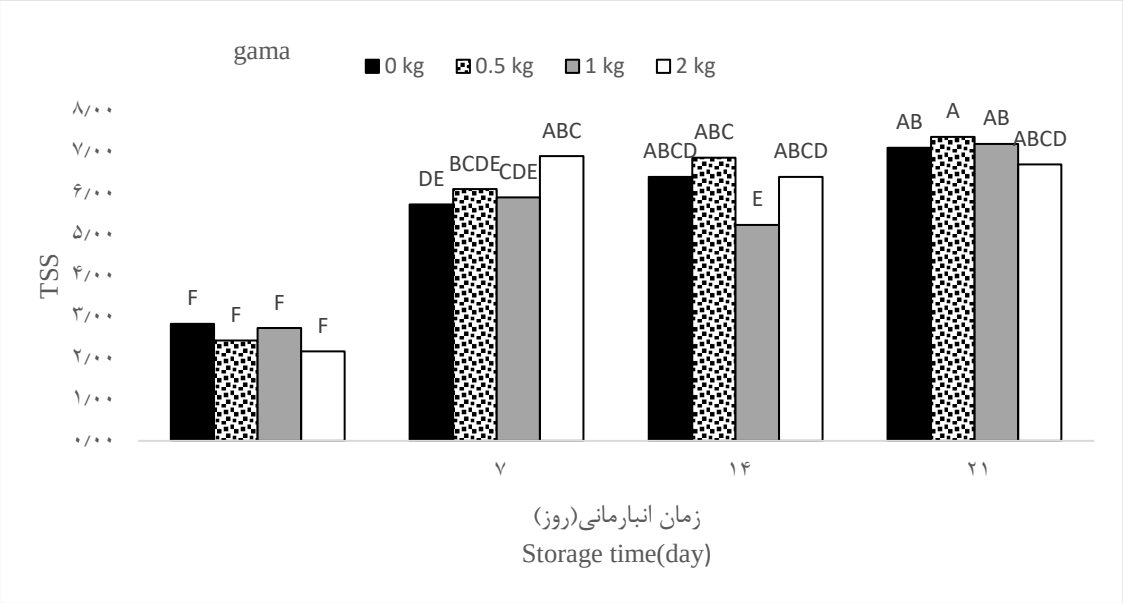
تجزیه واریانس (جدول ۳-۱) نشان داد اثر تیمار پرتودهی گاما بر میزان مواد جامد محلول (TSS) در میوه توت فرنگی تاثیر معنی دار نداشت. در حالی‌که زمان بر میزان مواد جامد محلول در میوه در سطح ۱٪ اختلاف معنی دار نشان داد. تاثیر برهمکنش زمان و پرتودهی گاما نیز اثر معنی داری بر میزان مواد جامد محلول در میوه توت فرنگی نداشت.

با توجه به شکل ۳-۵ میزان مواد جامد محلول در میوه توت فرنگی در طی انبارداری افزایش یافت. بالاترین میزان آن مربوط به تیمار ۲ کیلوگری پرتودهی است و کمترین مربوط به تیمار ۱کیلوگری پرتودهی می باشد.

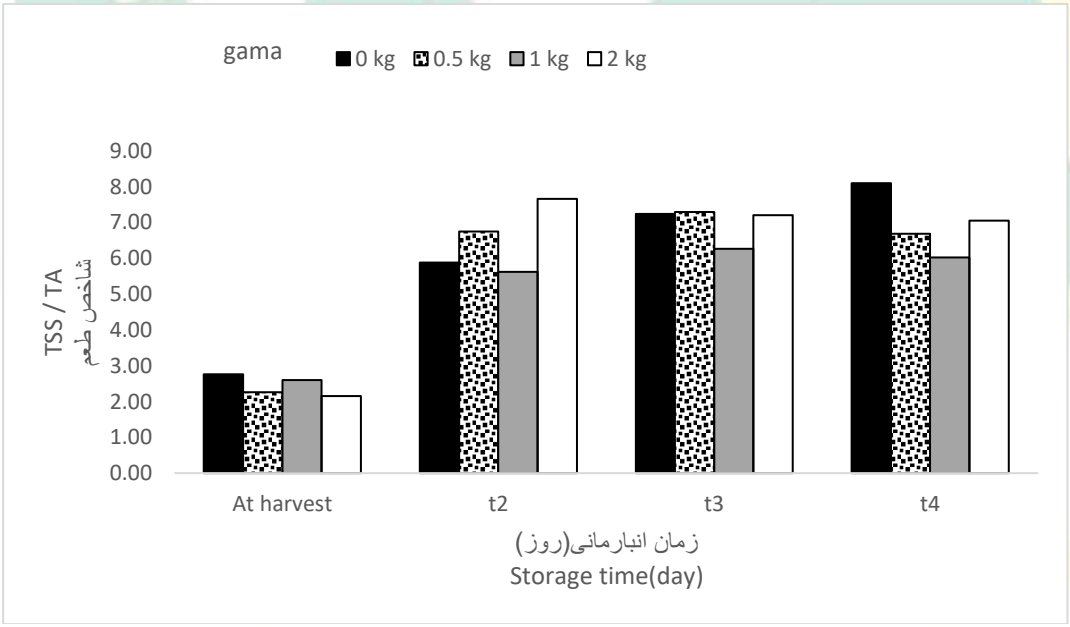
با توجه به تجزیه واریانس (جدول ۳-۱) تیمار پرتودهی گاما تاثیر معنی داری بر شاخص طعم میوه نداشت ولی اثر تیمار زمان در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی نشان داد. شکل ۳-۶ بیانگر تاثیر انبارداری بر افزایش شاخص طعم میوه است که به دلیل افزایش سوخت قندها و کاهش اسیدهای آلی در طی فرایند تنفس می تواند باشد.

جدول ۳-۱:نتایج تجزیه واریانس اثر تیمار پرتودهی گاما در طول انبار داری بر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی میوه توت فرنگی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		TSS	PH	TA	شاخص طعم
زمان	۳	۴۸/۹**	۰/۱۶**	۰/۱۹**	۵۸/۰۴**
پرتودهی گاما	۳	۰/۳۷ns	۰/۰۲*	۰/۰۰۵ ns	۲/۰۵ ns
زمان * پرتودهی گاما	۹	۰/۷۹ns	۰/۰۹**	۰/۰۱ ns	۱/۲۳ns
خطا	۳۲	۰/۵۱	۰	۰/۰۲	۱/۲۵



شکل ۳-۵: تاثیر تیمار پرتودهی گاما بر میزان مواد جامد محلول در میوه توت فرنگی در طول انبارمانی (روز)

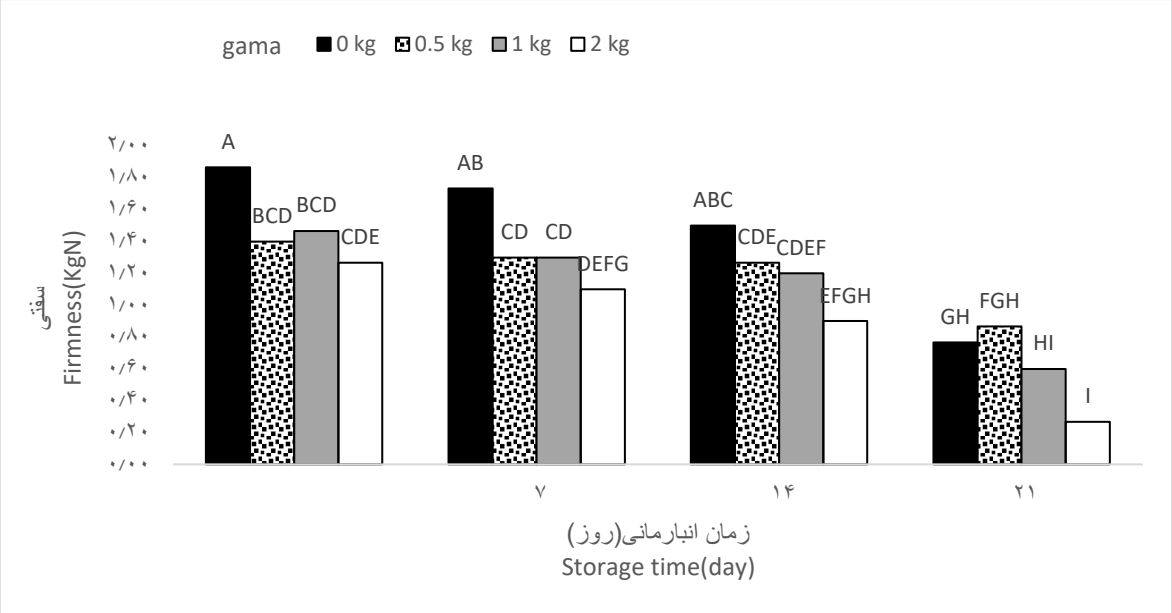


شکل ۳-۶: تاثیر تیمار پرتودهی گاما بر شاخص طعم در میوه توت فرنگی در طول انبارمانی (روز)

۳-۵-سفتی

نتیجه حاصل از این آزمایش نشان دهنده تاثیرگذار بودن تیمار پرتودهی گاما بر کاهش میزان سفتی در طی انبارداری است. به گونه ای که تیمار پرتودهی گاما با دوز ۰/۵ کیلوگری در طول انبارداری اثر بیشتری در درصد کاهش سفتی داشت (شکل ۳-۶). اثر تیمار پرتودهی گاما و زمان بر میزان سفتی میوه در سطح یک درصد معنی دار بوده در حالیکه در برهمکنش زمان و پرتودهی اختلاف معنی داری دیده نشد (شکل۳-۶).

این نتایج نشان دهنده این است که افزایش دوز پرتودهی گاما دیواره سلولی را ضعیف می کند و باعث نرم شدن بافت میوه شده و دلیل این امر ایجاد اختلال در آنزیم های پکتینی است (Salma et al , 2005).



شکل ۳-۶: تاثیر تیمار پرتودهی گاما بر میزان سفتی در میوه توت فرنگی در طول انبارمانی (روز).

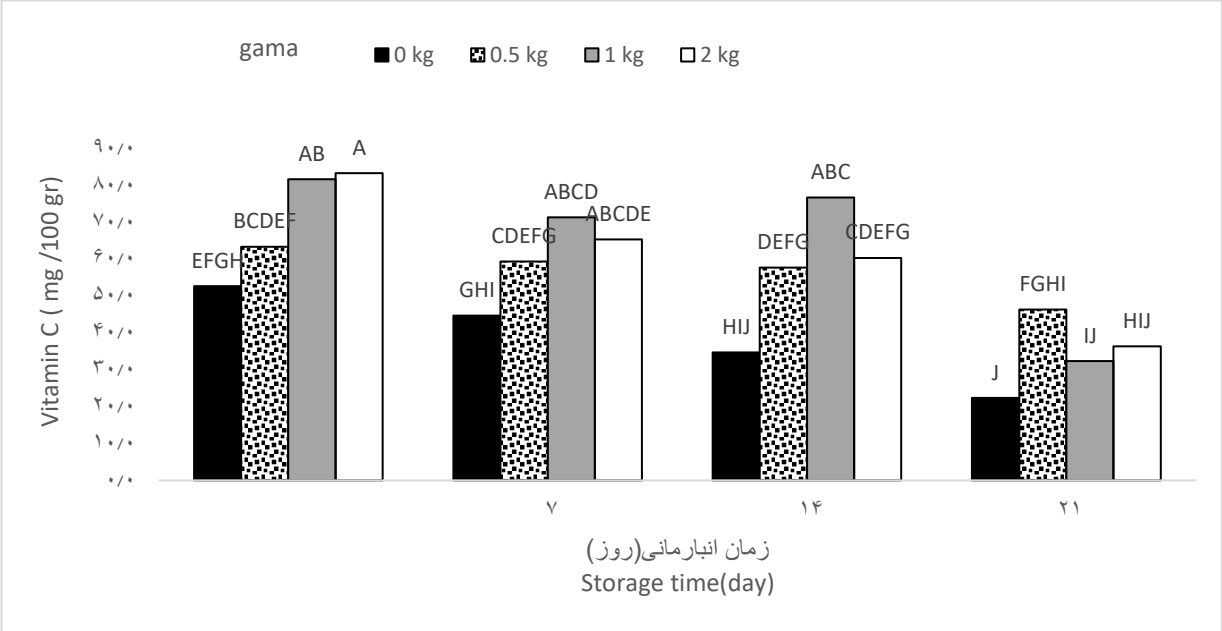
جدول ۳-۲: نتایج تجزیه واریانس اثر تیمار پرتودهی گاما در طول انبار داری بر میزان سفتی و ویتامین C میوه توت فرنگی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		سفتی بافت میوه	ویتامین C
زمان	۳	۱/۷۷ **	۲۷۶۲/۹ **
پرتودهی گاما	۳	۰/۶۹**	۱۶۸۶/۲ **
زمان * پرتودهی گاما	۹	۰/۰۳ns	۱۸۵/۷ ns
خطا	۳۲	۰/۰۴	۱۲۱/۸

۳-۶-ویتامین ث

نتایج تجزیه واریانس(جدول ۳-۲) نشان داد که تیمار زمان و تیمار پرتودهی گاما بر میزان ویتامین ث اثر معنی دار داشت. در طول زمان میزان ویتامین ث در تمامی نمونه ها کاهش یافته و در نمونه های شاهد درصد کاهش بالاتری دیده شد. پرتودهی گاما با دوز ۰/۵ درصد باعث کنترل در کاهش میزان ویتامین ث داشت (شکل ۳-۷).

پرتودهی می تواند تبدیل AA به DHA را تسریع کند در واقع فرمی از اسیداسکوربیک که دارای فعالیت ویتامین ث بالاتری است را می تواند به فرم DHA اکسید کند. استنباط می شودکه از دست دادن اسید به دلیل ذخیره سازی است تا پرتودهی و در طول انبارداری به دلیل فعالیت آنتی اکسیدانی کاهش اسیداسکوربیک اتفاق افتاده.



شکل ۳-۷: تاثیر تیمار پرتودهی گاما بر میزان ویتامین ث در میوه توت فرنگی در طول انبارمانی (روز).

۴. نتیجه‌گیری

با توجه به نتیجه های این پژوهش، تغییرات عمده ای در ویژگی های کمی و کیفی میوه توت فرنگی انجام می گیرد، اما پرتودهی گاما در دوز ۰.۵ کیلوگری و ۱ کیلوگری باعث کنترل تغییرات در برخی ویژگیها شامل کاهش وزن ، کاهش سفتی بافت میوه و میزان ویتامین ث میوه شد و در نتیجه سبب حفظ کیفیت میوه های توت فرنگی در انبار گردید که در مجموع کاربرد پرتودهی گاما در سطوح ۰.۵ و ۱ کیلوگری جهت افزایش دوره انبارداری میوه توت فرنگی رقم آلبیون به مدت ۲۱ روز در بسته بندی درب دار و در دمای ۴±۱ و رطوبت نسبی ۹۰٪ پیشنهاد میگردد.

منابع

1. AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. 17th Edition, The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA. Methods 925.10, 65.17, 974.24, 992.16.

2. Clark I. D., 1959. Possible applications of ionizing radiations in the fruit, vegetable and related industries. App, 1 (6): 175-181.

3.Dionísio A.p.,Gomes R.T., and Oetterer M. 2009. Ionizing Radiation Effects on Food Vitamins – A Review. Brazilian Archives of biology and technology, 52 (5): 1267-1278

4. Filhoa M., Scolforoa K., Saraivaa S.H., Pinheirob Ch., Silvaa P. and Della Luciaa S. 2018. Physicochemical , microbiological and sensory acceptance alterations of strawberries caused by gamma radiation and storage time. Scientia Horticulture, 238: 187-194

5. Maxie E. C. and Sommer N. F. 1968. Changes in some chemical constituints in irradiated fruits and vegetables. In international Atomic energy agency,Vienna: 39-44.

6. Maxie E. C., Eaks I. L. and Sommer N. F. 1964. Some physiological effects of gamma irradiation on lemon fruit. Radiat. Bot, California, 4: 405-411

7. Müller H. and Diehl J. F. 1996. Effect of Ionizing Radiation on Folates in Food. Lebens-Wiss, U.-Technol, 29: 187-199.

8. Mitchell G. E., McLauchlan R. L.,Isaacs A. R.,Williams D. J. and Nottingham S. M. 1992. Effect of low dose irradiation on composition of tropical fruits and vegetables, J. Food Comp, 5: 291-311.

9. Maraei R.W. and Elsawy K.M. 2017. Chemical quality and nutrient composition of strawberry fruits treated by γ-irradiation. Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 10(1): 80–87.

10. Nunes M., Brecht J.K., Morais A.M. and Sargent S.A. 2006. Physicochemical changes during strawberry development in the field compared with those that occur in harvested fruit during storage. Journal of the Science of Food and Agriculture, 86(2): 180–190

11. Saleem M., Anjum M., Naz S., Ali S,Hussain S., Azam M., Sardar H., Ghulam Khaliq C., Canan D. and Ejaz Sh. 2021. Incorporation of ascorbic acid in chitosan-based edible coating improves postharvest quality and storability of strawberry fruits. International Journal of biological Mocromolecules, 189: 160-169

12. Sapei L and Hwa L. 2014. Study on the Kinetics of Vitamin C Degradation in Fresh Strawberry Juices. 9. 62-68

13. Sogvar O., Kousheshsaba M. and Emamifar A. 2016. Aloe vera and ascorbic acid coatings maintain postharvest quality and reduce microbial load of strawberry fruit. Postharvest Biology and Technology, 114, 29-35

14. Salma B., Joana M., Pedro S., Fernanda M., Najla B., Melika M., Nourhène M. and Sandra C. 2020. Effect of Ionizing Radiation and Refrigeration on the Antioxidants of Strawberries. Food and Bioprocess Technology.

The effect of foliar application of potassium silicate on resistance to powdery milldew disease and some morphophysiological characteristics of (*Rosa hybrid*) cultivar *Dolce Vita* in hydroponic system

Amin Rahmani Najaf abad[1]., Javad Rezapour Fard[2*], Zahra Heidari[3]

1- Master student of Horticulture Department, Faculty of Agriculture, Urmia University.
2- Associate Professor of Horticultural, Faculty of Agriculture, Urmia University.
3- PhD student, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University.
** Corresponding Author Email Address: j.rezapourfard@urmia.ac.ir*

Abstract

The rose with the scientific name *Rosa* spp. belongs to the Rosaceae family and is one of the most important cut flowers in the world. This plant is native to the northern hemisphere and is cultivated in temperate regions. One of the problems of rose growers in greenhouse is fungal diseases such as powdery mildew of rose (*Sphaerotheca pannosa* var. rosa). This study was conducted to investigate the effect of silicon (as potassium silicate) on some morphophysiological characteristics and control of powdery mildew disease in "Dulce Vita" rose. Experiment were conducted as completely randomized design at three foliar application levels of potassium silicate (0, 6 and 12 mM) with three replications. The treatment was started one month after planting and continued for three months with foliar application of potassium silicate once a week. Evaluated traits including stem diameter and length, chlorophyll a and b content, chlorophyll index, plant contamination, relative water content and ion leakage, were investigated. The results of trait evaluation showed that at the level of 1% probability, the highest amount of chlorophyll a, b and chlorophyll index was observed in potassium silicate treatment at a concentration of 12 mmol, but no significant difference was observed with a concentration of 6 mmol. The lowest rate of fungal infection was recorded at a concentration of 12 mmol. The results of experiment also showed that the use of potassium silicate has significant effects on increasing the diameter and length of the flower stem. The highest length of stem (77.5 cm) was observed at a concentration of 12 mmol and the lowest was observed in the control treatment (56 cm). Regarding the relative content, there was no significant difference between the control treatment and the concentration of 6 mmol; At a concentration of 12 mM potassium silicate, the highest relative content of 80% was observed. The highest amount of ion leakage was measured in the control treatment and the lowest was measured at 12 mM potassium silicate concentration. Our results showed the positive effects of 12 mM silicon concentration on the evaluated traits in rose cv. Dolce Vita and reduction of powdery mildew contamination.

Keywords: Chlorophyll, Ion leakage, Fungal contamination, Shoot height, Foliar application

تاثیرمحلول پاشی برگی سیلیکات پتاسیم بر مقاومت به بیماری سفیدک سطحی و خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی گل رز (Rosa hybrida) رقم دولسه ویتا در سیستم هیدروپونیک

امین رحمانی نجف آباد [۱]؛ جواد رضاپورفرد [۲*]؛ زهرا حیدری [۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه
۲- دانشیار گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه
۳- دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه
*ایمیل نویسنده مسئول: j.rezapourfard@urmia.ac.ir

چکیده:

رز با نام علمی .Rosa spp متعلق به خانواده Rosaceae و یکی از مهمترین گل‌های بریدنی در دنیا است. این گیاه بومی نیم‌کره‌ی شمالی بوده و در نواحی معتدل پروش داده می‌شود. یکی از معضلات تولیدکنندگان رز بیماری های قارچی مانند سفیدک سطحی رز (Sphaerotheca pannosa var. rosa) است. این پژوهش به منظور بررسی تاثیر ماده سیلیسیم بر برخی خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی و کنترل بیماری سفیدک سطحی (Powdery mildew) در گل رز رقم دولسه‌ویتا در گلخانه‌های تحقیقاتی گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، بصورت طرح کاملا تصادفی در سه سطح سیلیسیم (صفر، ۶ و ۱۲ میلی مولار) با سه تکرار انجام شد. به این منظور از کود سیلیکات پتاسیم استفاده شد و اعمال تیمار بصورت محلول‌پاشی برگی از یک ماه بعد از کشت نشاهای قلمه-پیوندی شروع شد و به مدت سه ماه و با فاصله زمانی یک هفته انجام شد. صفات ارزیابی شده شامل قطر و طول شاخه گل دهنده، کلروفیل a و b، شاخص کلروفیل، میزان آلودگی پیکره رویشی گیاه، محتوای نسبی آب برگ و نشت یونی بودند. نتایج مقایسه میانگین صفات نشان داد که در سطح احتمال ۱٪، بیشترین میزان کلرفیل a، b و شاخص کلروفیل در تیمار سیلیکات پتاسیم با غلظت ۱۲ میلی‌مولار مشاهده گردید که با شاهد در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی داری داشت اما بین این تیمار و غلظت ۶ میلی‌مولار تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. کمترین میزان آلودگی قارچی در غلظت ۱۲ میلی‌مولار ثبت شد. همچنین نتایج آزمایشات بیانگر معنی‌دار بودن مصرف سیلیکات بر روی افزایش قطر ساقه گل‌دهنده و طول شاخه گل‌دهنده بود. بیشترین طول شاخه به میزان ۷۷/۵ سانتی‌متر در غلظت ۱۲ میلی‌مولار و کمترین آن در تیمار شاهد با طول ۵۶ سانتی متر اندازه‌گیری شد. در مورد محتوای نسبی آب برگ، بین تیمار شاهد و غلظت ۶ میلی‌مولار سیلیسیم تفاوت معنی داری وجود نداشت ولی بین شاهد و غلظت ۱۲ میلی مولار سیلیسیم تفاوت در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود و بیشترین میزان محتوای نسبی آب برگ به میزان ۸۰٪ در این تیمار مشاهده گردید. بیشترین میزان نشت یونی در تیمار شاهد و کمترین آن در غلظت ۱۲ میلی‌مولار اندازه گیری شد. نتایج ما نشان دهنده تاثیر مثبت غلظت ۱۲ میلی‌مولار سیلیسیم بر روی صفات مورد ارزیابی در گل رز رقم دولسه ویتا و کاهش آلودگی سفیدک سطحی بود.

واژگان کلیدی: کلروفیل، نشت یونی، آلودگی قارچی، ارتفاع شاخساره، محلول‌پاشی

۱. مقدمه

گل رز در محدود وسیع و گسترده ای از انواع آب و هوا و خاک می‌روید و گل می‌دهد. سازگاری بالای این گیاه موجب گسترش و محبوبیت آن شده است. گیاه‌شناسان عقیده دارند که گل رز درکشورهای اطراف دریای مدیترانه بصورت خودرو پراکنش زیادی داشته و اکثر آنها از واریته‌های گل محمدی بوده اند (قاسمی قهساره و کافی، ۱۳۹۱).

رز با نام علمی .Rosa spp متعلق به خانواده Rosaceae و یکی از مهمترین گل‌های بریدنی در دنیا است. این گیاه بومی نیم‌کره‌ی شمالی بوده و در نواحی معتدل پرورش داده می‌شود. تقریبا تمام گونه‌های آن چوبی و دارای شاخه های خاردار هستند. با توجه به اینکه پرورش گل شاخه بریده رز در سطح تجاری عمدتاً در شرایط گلخانه‌ای انجام می‌شود (قاسمی قهساره و کافی، ۱۳۹۱)، بروز بیماری‌های قارچی می‌تواند کمیت و کیفیت محصول را تحت تاثیر قرار دهد.

مهمترین بیماری قارچی رز، سفیدک پودری (Sphaerotheca pannosa var.rosa) است. حداقل دما برای رشد و نمو سفیدک پودری ۳ تا ۵ درجه سانتیگراد، حداکثر ۳۳ درجه سانتیگراد، دمای بهینهٔ رشد ۲۱ درجه سانتیگراد و محدوده رطوبت نسبی قابل تحمل آن ۵۵-۳۵ درصد بوده و رطوبت نسبی کمتر از ۵۰ درصد را ترجیح می‌دهد (بیات و ادریسی، ۱۳۸۵; Horst, 1999). با توجه به خطرات زیست محیطی و افزایش هزینه‌های تولید، پرورش دهندگان به دنبال راهکارهای جایگزین مناسب بجای استفاده از قارچ‌کش‌ها هستند.

سیلیسیم بعداز اکسیژن، دومین عنصر فراوان درخاک است. در بافت ریشه تمام گیاهان در خاک، مقداری سیلیکون وجود دارد. مطالعات متعدد نشان داده است که این عنصر آثار مثبتی بر رشد و عملکرد گیاه دارد (Gong *et al*., 2005). بیشتر منابع این عنصر به صورت ترکیب با سایر عناصر وجود دارد و اغلب نامحلول هستند (ملکوتی و همکاران، ۱۳۸۷). به طور مثال، مواد معدنی مانند کوارتز، رس‌ها و فلدسپارها از نظر سیلیسیم غنی هستند؛ اما به علت حلالیت کم نمی‌توانند به عنوان منبع سیلیسیم استفاده شوند. سیلیکات پتاسیم یک کود سیلیسیمی است و برای محصولات با ارزش استفاده می‌شود. این کود حلالیت خیلی زیادی دارد و می‌توان در سیستم‌های آبکشت از آن استفاده کرد (خوشگفتارمنش، ۱۳۸۹) .

محلول‌های مورد استفاده در کشت‌های هیدروپونیک فاقد سیلیسیوم می‌باشند و حتی درکشت‌های گلخانه‌ای در خاک هم به دلیل تبخیر و تعرق کمتر نسبت به فضای باز، جذب و انتقال عناصری مانند سیلیسیوم محدودتر است (Barakatain *et al*., 2013). سیلسیم توسط گیاه به‌صورت باردار (آنیون) $Si(OH)^{-4}$ جذب و در نهایت به صورت رسوب حل نشدنی سیلیسیک اسید در گیاه تجمع می‌یابد. بیشتر منابع سیلسیم در خاک به‌صورت نامحلول هستند و با ترکیبی که توسط گیاه جذب می‌شوند، متفاوت هستند (Soylemezoglu *et al*., 2009).

سیلیکون باعث افزایش رشدگیاهان، کاهش حساسیت به عوامل بیماریزای قارچی و افزایش تحمل گیاهان در شرایط تنش‌های غیر زیستی شده است. این ماده در بسیاری از موارد با تحریک رشد و افزایش فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده، موجب حفاظت گیاه در برابرتنش‌های محیطی می‌شود (Balakhnina *et al*., 2013). در تحقیقی بیان شد که محلول‌پاشی تیمار سیلیکات پتاسیم در شرایط تنش شوری و بدون تنش موجب افزایش میزان پروتئین‌های محلول برگ شد (رنجبر کبوترخانی، ۱۳۹۵). باتوجه به این که وجود هرگونه آفت و بیماری بر روی گیاهان از جمله گل رز تاثیر منفی بر رشد، نمو و در نهایت بازار پسندی دارد تولیدکنندگان مجبور به استفاده از سموم شیمایی جهت کنترل این عوامل هستند که آثار زیان‌باری بر محیط زیست و انسان دارد لذا استفاده از ترکیبات غیر سمی و دوست‌دار محیط زیست مانند سیلیسیم برای کنترل بیماری‌های شایعی از قبیل بیماری‌های قارچی در محصولات زینتی حائز اهمیت می‌باشد. با توجه به حساس بودن گل

رز رقم دولسه‌ویتا به بیماری سفیدک سطحی، در این پژوهش، تاثیر محلول‌پاشی برگی سیلیکات پتاسیم بر کنترل این بیماری و نیز بهبود شرایط رشدی و فیزیولوژیکی این گیاه در شرایط کشت هیدروپونیک مورد بررسی قرار گرفت.

۲.مواد و روش‌ها

این آزمایش در پاییز و زمستان سال ۱۳۹۸ و بهار سال ۱۳۹۹ در گلخانه‌های تحقیقاتی دانشگاه ارومیه انجام شد. نشاهای خریداری شده به گلدان‌های ۱۰ لیتری حاوی ۳۰٪پرلایت و ۷۰٪ پیت ماس منتقل شدند و پس از رشد کافی بوته‌ها، محلول‌پاشی هر هفته یک بار به مدت سه ماه صورت گرفت سپس نمونه برداری های لازم انجام شد.

قطر و ارتفاع شاخه گل‌دهنده: برای اندازه‌گیری طول ساقه گل‌دهنده از محل برش تا لبه غنچه از خط‌کش یک متری با دقت ۱ میلی‌متر استفاده شد و واحد آن بر حسب سانتی‌متر گزارش شد، قطر ساقه گل‌دهنده با استفاده از دستگاه کولیس دیجیتال مدل (NO:Z,22855) برحسب میلی‌متر از سه نقطه مشابه در طول شاخه اندازه گیری شد و میانگین آنها ثبت شد.

کلرفیل a و b: جهت اندازه‌گیری میزان کلروفیل از روش (Arnon, 1949) استفاده گردید. برای اندازه گیری میزان کلروفیل، مقدار ۰/۱ گرم از وزن تازه برگ را در هاون چینی با ازت مایع کاملا خرد کرده سپس چهار میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد به آن اضافه گردید و برگهای خرد شده داخل استون به طور کامل له شد. نمونه ها بلافاصله با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ با دور چهارهزار دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا پس از ته نشینی بافت برگی، محلول شفاف بالای فالکون‌ها برای اندازه گیری کلروفیل مورد استفاده قرار گیرد. میزان جذب عصاره با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و نانومتر قرائت و با استفاده از رابطه زیر میزان کلروفیل a, b و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه و گزارش گردید.

$$\text{Chlorophyll a} = 19/3\ (A_{663}) - 0/86\ (A_{645})\ v/100W$$

$$\text{Chlorophyll b} = 19/3\ (A_{645}) - 3/6\ (A_{663})\ v/100W$$

که در آن V حجم محلول صاف شده بر حسب میلی‌لیتر، A جذب نور در طول موج های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر و W وزن تر نمونه (گرم) می‌باشد.

شاخص کلروفیل: توسط دستگاه (SPAD مدل CCM-200) از سه عدد برگ میانی اندازه‌گیری شد و میانگین آن‌ها ثبت گردید.

میزان آلودگی: جهت اندازه گیری آلودگی پیکر رویشی گیاه و سطح برگ از روش (Yermiyahu et al., 2006) با اندکی تغییرات استفاده گردید برای سهولت در اندازه گیری شدت بیماری عمل رتبه بندی از ۱ تا ۸ انجام شد که در این رتبه بندی عدد کمتر نشان دهنده عدم آلودگی قارچی بوده و افزایش اعداد نشان دهنده شدت آلودگی به بیماری می باشد (۰= ۰٪، ۱=۱۰٪-۵، ۲= ۱۰٪-۲۰، ۳= ۲۰ -۳۰٪، ۴= ۳۰٪-۳۵، ۶=۳۵٪-۴۰، ۷= ۴۰٪-۵۰ و ۸= بیش از ۵۰٪).

نشت یونی: (ثبات غشای سلولی) با استفاده از روش (Sullivan and Ross, 1979) با اندکی تغییرات انجام گرفت. در ابتدا مقدار ۰/۵ گرم از قطعات هم‌اندازه برگی از برگ‌های کاملا توسعه یافته در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد، سپس هدایت الکتریکی محلول اندازه‌گیری گردید (EC1). برای اندازه‌گیری هدایت الکتریکی دوم (EC2) نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و بعد از خنک شدن ECدوباره گرفته شد و در نهایت نشت یونی (EL) بر اساس رابطه زیر محاسبه شد.

$$EL(\%) = \frac{EC1}{EC2} \times 100$$

محتوای نسبی: آب برگ با استفاده از روش (Barrs and Weatherley, 1962) انجام گرفت برای اینکار ابتدا دیسک‌های برگی هم اندازه از نظر وزنی تهیه شد سپس آنها را درون پتری‌دیش قراردادیم و به هرکدام میزان برابری آب مقطر اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد پس از سپری شدن این مدت با استفاده از کاغذ صافی آب اضافی دیسک‌ها گرفته شد و دوباره وزن گردیدند دیسک‌ها در نهایت به مدت ۷۲ ساعت و دمای ۸۵ درجه در آون خشک شدند و میزان محتوای نسبی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید. RWC = (FW-DW)/(TW-DW)×100

که در این رابطه FW بیانگر وزن تر نمونه برگی، DW بیانگر وزن خشک و TW بیانگر وزن آماس می‌باشد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: جهت تجزیه و تحلیل داده‌های بدست آمده از برنامه SAS نسخه ۹.۱ استفاده شد. مقایسه میانگین به روش دانکن در سطوح احتمال $P\leq0.05$ و $P\leq0.01$ انجام گردید. همچنین نمودارها با استفاده از برنامه اکسل نسخه ۲۰۰۷ رسم گردید.

۳.نتایج و بحث:

نتایج تجزیه واریانس (جدول شماره ۱) نشان داد که محلول‌پاشی برگی سیلیکات پتاسیم، در سطح احتمال ۱٪ روی صفات مورد نظر اثر معنی داری داشته است.

جدول ۱:تجزیه واریانس تاثیر محلول پاشی برگی سیلیکات پتاسیم بر برخی خصوصیات گل رز (*Rosa hybrida*) رقم دولسه ویتا در سیستم هیدروپونیک

		میانگین مربعات			
منابع تغییرات	درجه آزادی	aکلروفیل	bکلروفیل	شاخص کلروفیل	میزان آلودگی گیاه
سیلیکات پتاسیم	۲	۳/۳۹۵**	۲۱/۰۶۴**	۷۳/۵۷۳**	۱۶/۵۹۲**
خطای آزمایش	۱۸	۰/۲۰۴	۰/۱۰۰	۱/۰۰۷	۰/۱۱۱
ضریب تغییرات	--------	۳/۵۲۰	۵/۳۸۶	۲/۲۴۶	۱۶/۰۷۱

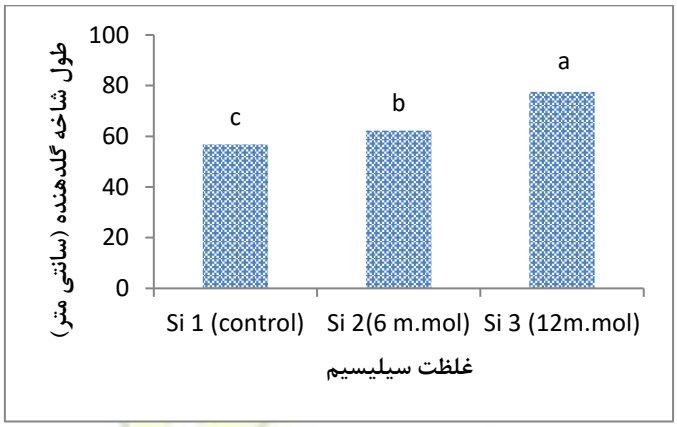
ns، * و** به ترتیب به معنی عدم وجود اختلاف معنی دار، معنی دار در سطح ۵ درصد و معنی دار در سطح یک درصد.

جدول ۲: تجزیه واریانس تاثیر محلول پاشی برگی سیلیکات پتاسیم بر برخی خصوصیات گل رز (*Rosa hybrida*) رقم دولسه ویتا در سیستم هیدروپونیک

		میانگین مربعات			
منابع تغییرات	درجه آزادی	محتوای نسبی	نشت یونی	ارتفاع شاخساره	قطر شاخساره
سیلیکات پتاسیم	۲	۱۶۷/۳۳۶**	۸۷۴/۳۲۳**	۱۰۴۴/۷۰۳**	۳۰/۰۸۷**
خطای آزمایش	۱۸	۵/۱۶۴	۴/۵۸۹	۱۲/۴۴۴	۰/۵۰۶
ضریب تغییرات	--------	۲/۹۹۱	۶/۲۶۶	۵/۳۸۴	۶/۳۶۸

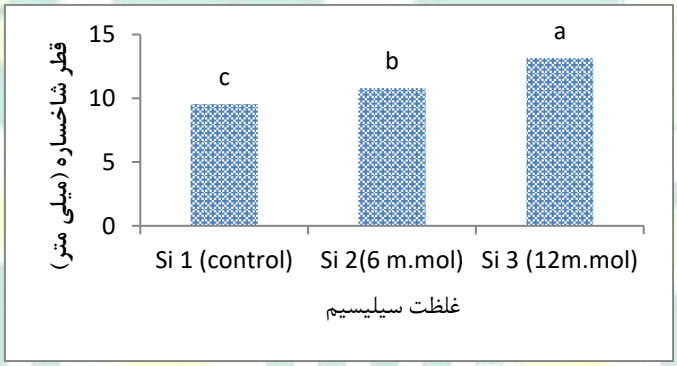
ns، * و** به ترتیب به معنی عدم وجود اختلاف معنی دار معنی دار در سطح ۵ درصد و معنی دار در سطح یک درصد.

قطر و ارتفاع ساقه گل‌دهنده: با توجه به جدول تجزیه واریانس (شماره ۲) اندازه قطر و طول شاخه گل‌دهنده در سطح یک درصد اختلاف معنی داری با تیمار شاهد داشتند. همچنین بر اساس شکل ۱، بیشترین میزان طول شاخه گل‌دهنده مربوط به غلظت ۱۲ میلی‌مولار سیلیکات پتاسیم و کمترین آن مربوط به تیمار شاهد بود.



شکل۱: تاثیر غلظت‌های مختلف سیلیکات پتاسیم بر طول شاخه گل‌دهنده رز رقم دولسه ویتا

در نمودار شکل ۲ مشاهده می‌گردد که غلظت‌های مختلف سیلیکات پتاسیم در افزایش قطر شاخساره (شاخه گل‌دهنده) موثر می‌باشد به طوریکه با افزایش غلظت اندازه قطر شاخساره نیز افزایش می‌یابد.

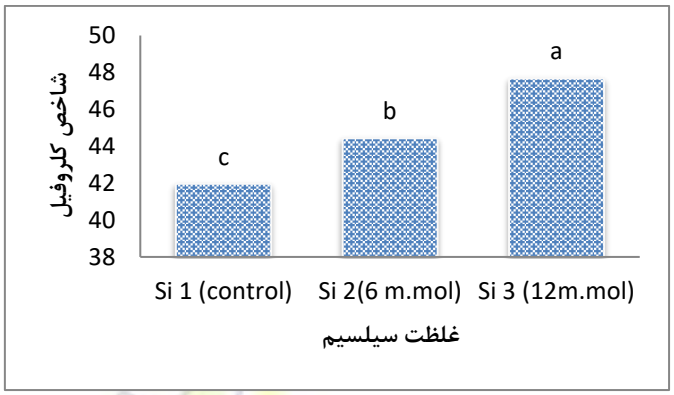


شکل۲ : تاثیر غلظت‌های مورد استفاده سیلیکات پتاسیم بر قطر شاخساره رز رقم دولسه ویتا

سیلیسیم با افزایش فعالیت آنزیم روبیسکو و افزایش مقدار کلروفیل برگ باعث افزایش فتوسنتز می‌شود، افزایش فتوسنتز موجب افزایش تجمع ماده خشک در گیاه می‌شود. تجمع مواد حاصل از فتوسنتز در گیاه، تقسیم و رشد سلول‌های گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد و باعث بهبود ویژگی‌های مورفولوژیک مانند قطر و طول شاخه گل‌دهنده می‌شود (بیات و همکاران، ۱۳۹۱؛ Reezi *et al*., 2009). نتایج ما با نتایج مهرگان و همکاران (۱۳۹۷) و جلیل زاده و همکاران (۱۳۹۷) بر روی رز رقم بورلی واتسون همخوانی داشت.

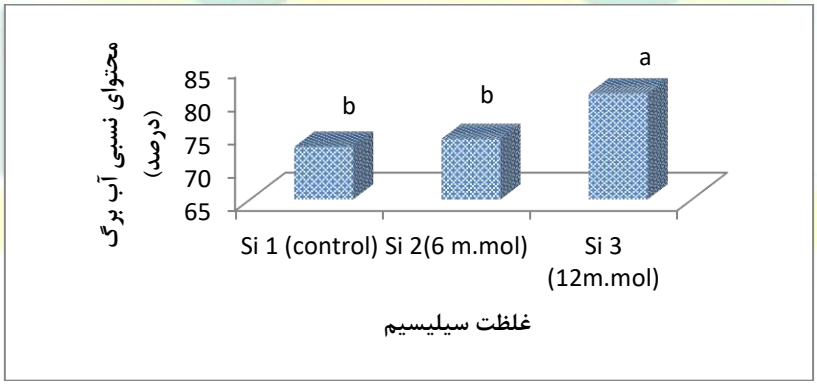
کلرفیل a، b و شاخص کلروفیل: با توجه به جدول تجزیه واریانس شماره ۱، تاثیر تیمار سیلیکات پتاسیم بر روی شاخص کلروفیل و کروفیل a ,b در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار شد. در گزارشی به نقش مثبت سیلیسیم در ممانعت از تخریب کلروفیل و در نتیجه افزایش فتوسنتز اشاره شده است (Cachorro *et al*., 1994) با توجه به اهمیت وجود سیلیسیم در عملکرد آنزیم روبیسکو در برگ گیاه، این آنزیم کارایی تثبیت دی‌اکسیدکربن توسط گیاهان را افزایش داده و در نهایت منجر به بهبود

کلروفیل و فتوسنتز در گیاهان می‌شود (محقق و همکاران، ۱۳۸۹) . با توجه به شکل ۳، بیشترین شاخص کلروفیل در غلظت ۱۲ میلی‌مولار محلول پاشی با سیلیکات پتاسیم مشاهده گردید. این نتایج، با نتایج ساکی و دانایی (۱۳۹۴) مشابه بود.



شکل ۳: نمودار تاثیر غلظت‌های سیلیکات پتاسیم در شاخص کلروفیل رز رقم دولسه ویتا

محتوی نسبی: در این پژوهش طبق جدول تجزیه واریانس شماره ۲ سیلیسیم باعث افزایش محتوای نسبی آب برگ یونی شد؛ سیلیسیم با رسوب در دیواره خارجی سلولهای اپیدرم برگ، میزان اتلاف آب از طریق روزنه‌ها، تبخیر و تعرق را کاهش داده (Gong *et al*., 2005) و موجب حفظ آب سلول و افزایش محتوای نسبی آب می‌شود. همچنین سیلیسیم با رسوب در دیواره سلولی و در ترکیب با درشت ملکولهای آلی (شامل سلولز، پکتین، گلیکو پروتئین‌ها و لیگنین) ترکیبهای کلوئیدی بی‌شکل با سطح جذب بالا را تشکیل داده و در نتیجه سیلیسیم در انتقال و جذب آب تأثیرگذار می‌باشد (Wang and Naser, 1994) به علاوه سیلیسیم با افزایش جذب عناصر غذایی همچون پتاسیم و انتقال آنها به گیاه، باعث تجمع یونها در واکوئل‌های سلول‌های برگ شده و با کاهش پتانسیل اسمزی سبب حفظ نسبت آب در گیاه می‌شود (Galston *et al*., 1980). شکل ۴ نشان می‌دهد که افزایش غلظت سیلیسیم موجب افزایش محتوای نسبی آب می‌گردد اما اختلاف معنی داری بین غلظت ۶ میلی‌مولار و تیمار شاهد مشاهده نشد.

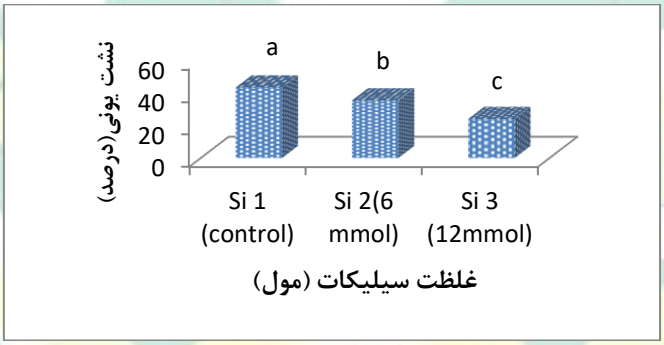


شکل ۴: تاثیر غلظت‌های مختلف سیلیکات پتاسیم بر میزان محتوای نسبی آب در رز رقم دولسه ویتا

نتایج تحقیقات متعددی مبنی بر کاهش تخریب غشای سلولی و نشت یونی برگ تحت تأثیر تیمار ترکیبات مختلف سیلیسیمی (مام رش پور و نظری دلجو، ۱۳۹۸، Kaya *et al*., 2006; Reezi *et al*., 2009)، با نتایج این بررسی همخوانی دارد. با توجه به شکل ۵ مشاهده می‌گردد که میزان نشت یونی با افزایش غلظت سیلیسیم کاهش پیدا کرد. عوامل نامساعد متعدد موثر بر رشد و نمو

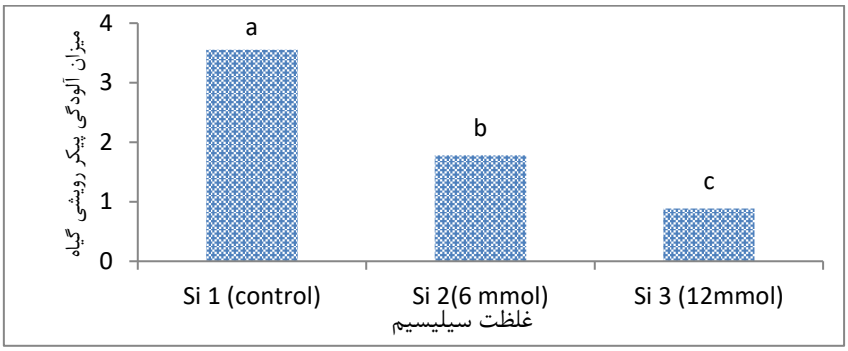
گیاه از قبیل هدایت الکتریکی بالای بستر کشت، ابتلا به عوامل بیماری‌زا مانند بیماری‌های قارچی و بطور کلی تنش‌های زنده و غیر زنده باعث پراکسیداسیون لیپید و افزایش تخریب غشا در سلول گیاهی و در نتیجه تخریب سلول و متعاقبا افزایش نشت یونی می‌گردد (Kaya *et al*., 2002). افزودن سیلیسیم به محلول غذایی یا کاربرد آن بصورت محلول‌پاشی برگی منجر به تعدیل اثرات تنش و در نتیجه بهبود وضعیت غشای سلولی به دلیل رسوب سیلیسیم در دیواره سلولی و در نتیجه کاهش تخریب دیواره سلولی و نشت یونی می‌گردد (Kaya *et al*., 2006; Zhu *et al*., 2004).

دیواره ثانویه سلول عمدتا از سه کربوهیدرات سلولز، لیگنین‌ها و همی‌سلولزها تشکیل شده است (Gallego-Giraldo *et al*., 2001). سیلیسیوم به طور متفاوتی بر ویژگی سه پلیمر اصلی دیوارسلولی، از جمله بر تبلور سلولز، میزان جایگزینی آرابینوز زایلان و نسبت سیناپیل الکل در لیگنین‌های استخراجی تأثیرگذار است (Zhang *et al*., 2015) مطالعه محل‌های رسوب سیلسیم در دیواره‌های سلولی نشان‌دهنده ارتباط آن با قندهای محلول و اجزای پروتئینی و همچنین اتصال کووالانسی به مواد آلی در دیواره های سلول است. پیشنهاد شده است که سیلسیم می‌تواند در برخی موارد، از جمله استحکام ساختاری، جایگزین کلسیم شود و سیلسیم یک جایگزین با صرف انرژی کمتر اما بدون قابلیت انتقال مجدد در مقایسه با سنتز لیگنین و سلولز، به خصوص تحت شرایط محدودیت رشد یا تنش باشد (Vulavala *et al*., 2016) در میان عناصر معدنی در دیواره‌های سلولی، بور و سیلسیم باعث حفظ استحکام فیزیکی ساختار دیواره سلول می‌شوند (Broadley *et al*., 2012). با توجه به تاثیرات ذکر شده می‌توان استنباط کرد که مصرف سیلیس موجب کاهش نشت یونی می‌شود.



شکل ۵: نمودار تاثیر غلظت‌های سیلیکات پتاسیم بر میزان نشت یونی در رز رقم دولسه ویتا

ایجاد مقاومت در مقابل عامل قارچ سفیدک سطحی: به نظر می‌رسد که با افزایش محلول‌پاشی سیلیسیم، غلظت ایـن عنصر در اندام هوایی افزایش می‌یابد و با رسـوب سیلیسـیم در دیواره سلولی و تشکیل لایه سلولز- سیلیسیم و پیوند با کلسـیم و پکتین، استحکام دیواره سلولی زیاد می‌شود و تحمل گیـاه در برابر تخریب سلولی ناشی از عوامل بیماریزا افزایش می‌یابد (Liang *et al*., 2007). طبق جدول تجزیه واریانس شماره ۱ و شکل ۶، نتایج استفاده از محلول‌پاشی سیلیسیم در کاهش وکنترل آلودگی قارچی معنی‌دار بوده و با نتایج تحقیق حسینی فر و همکاران (۱۳۹۶) همخوانی داشت.



شکل ۶: تاثیر غلظت‌های مختلف سیلیکات پتاسیم بر آلودگی به سفیدک سطحی در رز رقم دولسه ویتا

۴. نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده از این پژوهش مشخص گردید که استفاده از سیلیکات پتاسیم می‌تواند تاثیر مثبتی بر عملکرد رز و مقاومت در برابر عامل بیماری سفیدک سطحی داشته باشد. از بین غلظت‌های مورد استفاده، غلظت ۱۲ میلی‌مولار سیلیسیم بیشترین تاثیر را بر صفات اندازه گیری شده داشت.

منابع

۱- بیات ح.، نعمتی س.ح. و سلاح ورزی ی. ۱۳۹۱. تأثیر سیلیسیم بر رشد و برخی خصوصیات فیزیولوژیک اطلسی ایرانی (*Petunia hybrida*). مجله علوم باغبانی ایران. جلد ۲۶، شماره ۱، ص: ۱۶- ۱۰.

۲- بیات ح. و ادریسی ب. ۱۳۸۵. ارزیابی مقاومت به سفیدک سطحی در برخی از کلونهای رز، گزارش نهایی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مرکزی، ۲۵ ص.

۳- حسینی فر ن.، عبدوسی و. و زرین نیا و. ۱۳۹۶. اثر محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک، سیلیکات پتاسیم و الیسیتور قارچی در شرایط تنش شوری بر گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.). فصلنامه زیست شناسی سلولی و مولکولی گیاهی. جلد ۱۲، شماره ۴، ص: ۵۶۸- ۵۹.

٤- خوشگفتارمنش ا. ۱۳۸۹. مباحث پیشرفته در تغذیه گیاه. چاپ اول، مرکز نشر دانشگاه صنعتی اصفهان. ۳۸۸ ص.

٥- رنجبر کبوترخانی م.، اسمعیلی‌زاده م.، کریمی ح. و شمشیری م.ح. ۱۳۹۵. بررسی تاثیر محلول پاشی عناصر سیلسیم و پتاسیم بر برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی و اکوفیزیولوژی دانهال‌های پسته رقم بادامی ریز زرند کرمان در شرایط تنش شوری. مجله علوم باغبانی ایران. جلد ۲۷، شماره ۴، ص: ۷۵۷ – ۷۳۹.

٦- ساکی ز. و دانایی ا. ۱۳۹۴. تاثیر محلول پاشی نمک‌های سیلسیم بر صفات فیزیولوژکی و آنزیمی گل رز (*Rosa hybrida*) رقم Grand prix. فصلنامه زیست شناسی سلولی مولکولی گیاهی. جلد ۱۰، شماره ۳ و ۴، ص: ۲۰- ۱۳.

۷- قاسمی قهساره م. و کافی م. ۱۳۹۱. گلکاری علمی و عملی (جلد اول). نشر مولف، ۳۱۳ ص.

۸- مامرش پور ع. و نظری دلجو م.ج. ۱۳۹۸. ماندگاری و واکنش فیزیولوژیکی گل شاخه بریده لیلیوم اورینتال به عنصر شبه ضروری سیلیسیم در کشت بدون خاک. مجله علوم باغبانی ایران. جلد ۵۰، شماره ۱، ص: ۱۵۰- ۱۴۱.

۹- مفیدی ع. و عبایی م. ۱۳۷۵. گلکاری (ترجمه). جلد اول. سازمان پارکها و فضای سبز شهر تهران. ۲۹۴ ص.

۱۰- ملکوتی م.ج.، کشاورز پ. و کریمیان ن. ۱۳۸۷. روش جامع تشخیص و توصیه بهینه کود برای کشاورزی پایدار. چاپ هفتم انتشارات دانشگاه تربیت مدرس ، ۷۱۸ ص.

۱۱-محقق پ. شیروانی م. و قاسمی س. ۱۳۸۹. تأثیرکاربرد سیلیسیم بر رشد و عملکرد دو رقم خیار در سیستم هیدروپونیک. نشریه علمی پژوهشی رابطه خاک و گیاه دانشگاه صنعتی اصفهان. جلد اول. شماره۱، ص: ۴۰- ۳۵.

۱۲-مهرگان ب.، موسوی فرد ص. و رضایی نژاد ع.ا. ۱۳۹۷. تأثیر محلول‌پاشی سیلیکات پتاسیم بر برخی ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه آلترنانترا (Alternanthera repens L.) تحت تنش خشکی، مجله به زراعی کشاورزی دانشگاه تهران، جلد۲۰، شماره ۱، ص: ۳۱۴- ۲۹۹.

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

14- Balakhnina T. and Borkowska A. 2013. Effects of silicon on plant resistance to environmental stresses: review. International Agrophysics. 27(2): 225-232.

15- Barakatain L., Nikbakht A., Etemadi N. and Ali J.K. 2013. Effect of source and method of silica application on some of the quantitative and physiological characteristics of *Gerbera jamesonii* L. Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture, 4(13), 39-47. (in Farsi)

16- Barrs, H.D., and P.E. Weatherley. 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. Australian Journal of Biological Sciences. 15: 413-428.

17- Broadley M., Brown P., Cakmak I., Ma J.F., Rengel Z. and Zhao F., 2012. Beneficial elements. In: Marschner's mineral nutrition of higher plants (pp. 249-269). Academic Press.

18- Cachorro P., Ortiz A. and Cerdá A. 1994. Implications of calcium nutrition on the response of *Phaseolus vulgaris* L. to salinity. *Plant Soil*, 159, 205-212.

19- Gallego-Giraldo L., Escamilla-Trevino L., Jackson L.A. and Dixon R.A. 2011. Salicylic acid mediates the reduced growth of lignin down-regulated plants. In: Proceedings of *the National Academy of Sciences* USA, 108, 20814-20819.

20- Galston A. W., Davies P. J. and Satter R. L. 1980. The life of the green plant. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall Inc; 69.

21- Gong H., Zhu X., Chen K., Wang S. and Zhang C. 2005. Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Plant Science*, 169, 313-321.

22- Horst R.K. 1999. Compendium of rose diseases. APS Press, 49 pp.

23- Kaya C., Kirnak H., Higgs D. and Saltali K. 2002. Supplementary calcium enhances plant growth and fruit yield in strawberry cultivars grown at high (NaCl) salinity. *Scientia Horticulturae*, 93, 65-74.

24- Kaya C., Tuna L. and Higgs D. 2006. Effect of silicon on plant growth and mineral nutrition of maize grown under water-stress conditions. Journal of Plant Nutrition, 29, 1469-1480.

25- Liang Y., Sun W., Zhu Y.G. and Christie P. 2007. Mechanisms of silicon mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: A review. Environment Pollution, 147: 422-428.

26- Reezi, S., Babalar M and Kalantari S. 2009. Silicon alleviates salt stress, decreases malondialdehyde content and affects petal color of salt stressed cut rose (*Rosa hybrida* L.) 'Hot Lady'. Journal of American Biotechnology, (8): 1502-1508.

27- Soylemezoglu G, Demir K, Inal A and Gunes A. 2009. Effect of silicon on antioxidant and stomatal response of two grapevine (*Vitis vinifera* L.) rootstocks grown in boron toxic, saline and boron toxic-saline soil. Scientia Horticulturae. 123(2): 240-246.

28- Sullivan, C. Y. and Ross, W. M. 1979. Selecting for drought and heat resistance in grain sorghum. In H.Mussel, R. C. Staples (Eds.), *Stress physiology in crop plants* (pp. 263-281). New York: John Wiley & Sons.

29- Vulavala V. K., Elbaum R., Yermiyahu U., Fogelman E., Kumar A. and Ginzberg I. 2016. Silicon fertilization of potato: expression of putative transporters and tuber skin quality. Planta, 243(1), 217-229.

30- Wang J. and Naser N. 1994. Improved performance of carbon paste ampermeric biosensors through the incorporation of fumed silica. Electroanalysis, 6, 571- 575.

31- Yermiyahu, U., Shamai, I., Peleg, R., Dudai, N. and Shtienberg, D. 2006. Reduction of *Botrytis cinerea* sporulation in sweet basil by altering the concentrations of nitrogen and calcium in the irrigation solution. Plant Pathology, 55, 544-552.

32- Zhang J., Zou W., Li Y., Feng Y., Zhang H., Wu Z. Tu Y. Wang Y. Cai X. and Peng L. 2015. Silica distinctively affects cell wall features and lignocellulosic saccharification with large enhancement on biomass production in rice. Plant Science, 239, 84-91.

33- Zhu Z., Wei G., Li J., Qian Q. and Yu J. 2004. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Science*, 167, 527-533.

Evaluation of the effect of zinc nitrate on chlorophyll fluorescence parameters of (*Lallemantia iberica* L.) under different irrigation regimes

Leila Akbari*[448] , Zeinab Chaghakaboodi

Assistant Professor, Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Science and Agricultural Engineering, Razi University, Kermanshah

L.akbari@razi.ac.ir

Abstract

Fluorescence parameters are one of the most important factors in determining photosynthetic capacity during plant life. For this purpose, an experiment was conducted to compare the resistance to different levels of drought stress, evaluate some physiological indicators and evaluate the function of photosystem II using chlorophyll fluorescence parameters. The experiment was performed on two water stress factors including 75 (control), 50 and 25% of field capacity (FC) and three levels of zinc nitrate on (*Lallemantia iberica* L.) plant. In the results of comparing the mean with increasing drought stress levels and application of nitrate foliar application of zinc, a decrease in pi and Fv / Fm was not observed. The highest effect in foliar application was related to the amount of ten mg / l zinc nitrate in the studied areas. According to the obtained diagrams and parameters studied during the stress period, it can be said that foliar application of zinc nitrate as one of the essential elements in appropriate concentrations can be a good factor in reducing the effects of stress at different stages of growth of Balango plant for Deal with drought stress conditions.

Keywords: Drought Stress, Fluorescence Chlorophyll, Zinc Nitrate, Foliar Spraying

بررسی تأثیر نیترات روی بر پارامترهای کلروفیل فلورسانس گیاه بالنگو در رژیم‌های مختلف آبیاری

لیلا اکبری[1*]، زینب چقاکبودی[2]

۱ و ۲. استادیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

L.akbari@razi.ac.ir

چکیده

پارامترهای فلورسانس از مهم‌ترین فاکتورها برای تعیین ظرفیت فتوسنتزی در طول زندگی گیاهان می‌باشد. بدین منظور، آزمایشی با هدف مقایسه میزان مقاومت به سطوح مختلف تنش خشکی، ارزیابی برخی از شاخص های فیزیولوژیکی و ارزیابی کارکرد فتوسیستم II با استفاده از پارامترهای فلورسانس کلروفیل انجام شد. آزمایش با دو عامل تنش آبی شامل ۷۵(شاهد)، ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی(FC) و سه سطح نیترات روی بر روی گیاه بالنگو انجام شد.

در نتایج مقایسه میانگین با افزایش سطوح تنش خشکی و اعمال محلول پاشی نیترات روی کاهش در میزان pi و Fv/Fm مشاهده نشد. بیشترین تأثیر در محلول پاشی مربوط به مقدار ده میلی گرم بر لیتر نیترات روی در سطوح مورد بررسی بود.

با توجه به نمودارهای به دست آمده و پارامترهای مورد بررسی در طول دوره تنش می توان گفت که محلول پاشی نیترات روی به عنوان یکی از عناصر ضروری در غلظت های مناسب می تواند به عنوان عامل مناسبی در کاهش اثرات تنش در مراحل مختلف رشدی گیاه بالنگو برای مقابله با شرایط تنش خشکی باشد.

کلمات کلیدی: تنش آبی، بیشینه کارایی کوانتومی فتوسیستم II ، عملکرد کارایی کوانتومی موثر فتوسیستم II، محلول پاشی

۱. مقدمه

گیاه داروئی بالنگو گیاهی یکساله، روغنی، زودرس و سرمادوست می باشد. گیاهی با کاربردهای متنوع و با امکان کشت دیم است. تنش خشکی با تغییر فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بر رشد و نمو گیاه تأثیر می گذارد و در نتیجه بهره وری محصول کاهش می یابد. گیاهان در جای خود ثابت هستند. بنابراین، باید استرس غیر زنده را تحمل کنند. گیاهان موجوداتی چند سلولی هستند. که پاسخ آن‌ها در برابر تنش های غیرزیستی بسیار پیچیده است. مکانیزم های متفاوتی برای مقاومت در برابر شرایط تنش در آن ها به وجود می آید. مکانیسم‌های مقاومت گیاه به تنش خشکی بر سه راهبرد اصلی فرار از خشکی، اجتناب و تحمل خشکی است(Hassan *et al*., 2020).

سازگاری گیاهان با خشکی به منظور مقابله با شرایط تنش از طریق واکنش‌های مختلف و سازش‌های متنوع فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی مورد شناسائی و بررسی قرار می گیرد. قندهای محلول در شرایط تنش خشکی به واسطه حفظ فشار اسمزی در برگ های گیاهان، از دهیدراسیون پروتئین‌ها و غشاهای سلولی جلوگیری می کنند(Oukarroum *et al*., 2007). یکی از تنش های محیطی مهم است که گیاه در طول چرخه زندگی و مراحل مختلف رشد گیاه با آن روبرو می شود

تنش کم آبی است و به عنوان مهم ترین عامل در کاهش عملکرد در گیاهان مختلف می باشد(Deepak *et al*., 2019). در مطالعات زیادی رابطه بین فلورسانس کلروفیل و کارآیی فتوسنتزی گیاه تحت شرایط تنش بررسی شده است.
بدین منظور جهت تعیین وضعیت فیزیولوژیکی گیاه و میزان آسیب وارده به دستگاه فتوسنتزی در شرایط تنش از تکنیکی به نام سنجش فلورسانس کلروفیل استفاده می‌شود. در حقیقت، مقدار فلورسانس کلروفیل می‌تواند توانایی گیاه در تحمل به تنش‌های محیطی، سالم بودن غشاء تیلاکوئید، کارآیی نسبی انتقال الکترون از فتوسیستم II به فتوسیستم I و هم‌چنین میزان آسیبی که در شرایط تنش به گیاه وارد می‌گردد را به خوبی نشان دهد. تنش خشکی، باعث ایجاد اختلال در فعالیت فتوسیستم II و هم‌چنین تخریب ساختمان پروتئین D_1 موجود در فتوسیستم II و در نتیجه سبب کاهش نسبت Fv/Fm[449] می شود(Rahbarian *et al*., 2013). به‌منظور ارزیابی فعالیت فتوسنتزی برگ و میزان آسیب وارده به گیاه سنجش فلورسانس کلروفیل مورد استفاده قرار می‌گیرد(Hosseinzadeh *et al*., 2016). کارآیی فتوسیستم II یا عملکردکوانتومی به‌عنوان شاخصی مهم در ارزیابی میزان تحمل به تنش‌های محیطی گونه‌های مختلف گیاهی از جمله تنش خشکی است(Massacci *et al*., 2008). پتانسیل عملکرد کوانتومی فتوسیستم II، با نسبت فلورسانس متغیر به حداکثر فلورسانس (Fv/Fm) نشان داده می‌شود و دامنه آن در شرایط غیر تنش بین ۰/۸۵-۰/۶۵ است، اما چنانچه گیاهان در شرایط تنش‌هایی همچون خشکی، شوری و گرما قرار گیرند، مقدار آن کمتر خواهد شد. در شرایط تنش، ژنوتیپ‌های با نسبت بالاتر Fv/Fm، از کارایی فتوسنتزی بالاتری برخوردار هستند(Soheili Movahed *et al*., 2017). به منظور ارزیابی اثر تنش خشکی بر سیستم فتوسنتزی گیاه و تخمین میانگین کارآیی کوانتوم فتوسیستم II از پارامترهای فلورسانس کلروفیل استفاده های زیادی شده است. در واقع، تنش خشکی با تأثیر سوءی که بر همانندسازی کربن می‌گذارد، ظرفیت پذیرش و انتقال الکترون را کاهش داده، در نتیجه سیستم به سرعت به F_mمی‌رسد، که نتیجه آن کاهش فلورسانس متغیر (F_v) خواهد بود. از طرفی، با افزایش شدت نور، سیستم فتوسنتزی با یک روش تنظیمی برای کاهش انرژی القا شده تحریکی، انرژی مازاد را از طریق افزایش خاموشی غیر فتوشیمیایی به صورت فرآیند غیر تشعشعی از دست می‌دهد. با این مکانیسم تنظیمی، ضمن حفاظت از مرکز واکنش، موجب می‌گردد که حداقل صدمه به این مرکز وارد شود. از این رو، کارآیی فتوشیمیایی فتوسیستم II به صورت نسبت Fv/Fm نسبت فلورسانس متغیر به فلورسانس ماکزیمم بیان می‌شود. بنابراین، تنش‌های محیطی با تأثیر بر فتوسیستم II باعث کاهش این نسبت می‌شوند.

از سوی دیگر روی یک ریز مغذی ضروری است که با تنظیم مکانیسم های فیزیولوژیکی و مولکولی مختلف، نقش اساسی در مقاومت محصول در برابر تنش خشکی ایفا می کند. در شرایط تنش خشکی، کاربرد روی باعث بهبود جوانه‌زنی بذر، روابط آبی گیاه، پایداری غشای سلولی، تجمع اسمولیت، تنظیم روزنه‌ای، راندمان مصرف آب و فتوسنتز می‌شود و در نتیجه عملکرد گیاه به طور قابل‌توجهی بهتر می‌شود. علاوه بر این، روی با هورمون های گیاهی تعامل می کند، بیان پروتئین های استرس را افزایش می دهد و آنزیم های آنتی اکسیدانی را برای مقابله با اثرات خشکسالی تحریک می کند(Rana *et al*., 2013).
در مطالعه محلول پاشی نانوذره سلنیوم بر خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیائی گیاه بالنگوی شهری تحت رژیم‌های مختلف رطوبتی نتایج حاکی از آن است که بهترین غلظت مورد استفاده ده میلی‌گرم بر لیتر سلنات سلنیوم است که تأثیر مثبتی بر عملکرد و وزن گیاه و هم‌چنین افزایش محتوای پرولین، پروتئین و قند محلول داشته است که می‌تواند مربوط به نقش آنتی اکسیدانی سلنیوم باشد(عامریان و همکاران، ۱۳۹۹).
هدف از انجام این پژوهش بررسی تأثیر محلول پاشی نیترات روی در سطوح مختلف تنش رطوبتی بالنگو به منظور کاهش مشکلات فیزیولوژیکی در این گیاه و تشخیص جایگاه نیترات روی در کاهش صدمات ناشی تنش رطوبتی است.

[449] Maximum photochemical quantum yield

۲. مواد و روش ها:

این تحقیق در سال زراعی ۱۴۰۰ در گلخانه تحقیقاتی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی اجرا گردید. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاًتصادفی در سه تکرار انجام شد. در این آزمایش سطوح رطوبتی در سه سطح شامل ۷۵ (شاهد) ،۵۰ و ۲۵ درصد نیاز آبی گیاه به عنوان فاکتور اول و محلول پاشی با نیترات روی در سه سطح صفر، پنج و ده میلی گرم بر لیتر به عنوان فاکتور دوم بود. بذر گیاه بالنگو از مرکز تحقیقات دیم سرارود بخض دانه‌های روغنی تهیه گردید. تعدادی از گیاهچه ها پس از گذراندن مرحله چهار برگی حذف و تنها سه بوته در هر گلدان جهت اعمال تنش قبل از گلدهی نگه‌داری گردید. جهت اعمال تیمارهای رطوبتی، گلدان ها به صورت یکسان از خاک پر شدند، گلدان ها به طور کامل با آب پر شدن و سپس بر روی یک سطح مشبک جهت رسیدن به ظرفیت مزرعه قرار اده شدند. سپس گلدان ها وزن شدند و خاک آن‌ها برای خشک شدن به آون برای اندازه‌گیری وزن خشک منتقل شدند. رطوبت خاک طبق فرمول زیر محاسبه گردید(Schonfeld *et al.*, 1988). از روش وزنی برای اعمال سطوح مختلف تنش استفاده شد. بدین صورت که پس از محاسبه ظرفیت زراعی(FC[450]) سایر سطوح تنش به صورت درصدی از رطوبت زراعی در نظر گرفته شد. مقدار کاهش رطوبت تا رسیدن به مقدار رطوبت مورد نظر بر حسب گرم آب محاسبه و به گلدان‌ها اضافه گردید.

$$FC = \frac{FCW - DW}{DW} * 100$$

FC: ظرفیت زراعی، FCW: وزن خاک ر ظرفیت زراعی، DW: وزن خاک خشک شده در آون

شاخص‌های فلورسانس کلروفیل (Pi[451] و Fv/Fm) نیز با استفاده ازدستگاه تنش‌سنج (PEA Plus) اندازه‌گیری شد.

۳.نتایج و بحث

در پایان آزمایش، آزمون نرمال بودن داده ها انجام شد. تجزیه واریانس داده ها در سطح احتمال پنج درصد با نرم افزار SPSS انجام شد. نتایج حاصل از آنالیز واریانس شاخص های فلورسانس کلروفیل نشان داد که اثر متقابل خشکی و سطوح مختلف نیترات روی (میلی گرم بر لیتر) معنی دار است(جدول ۱).

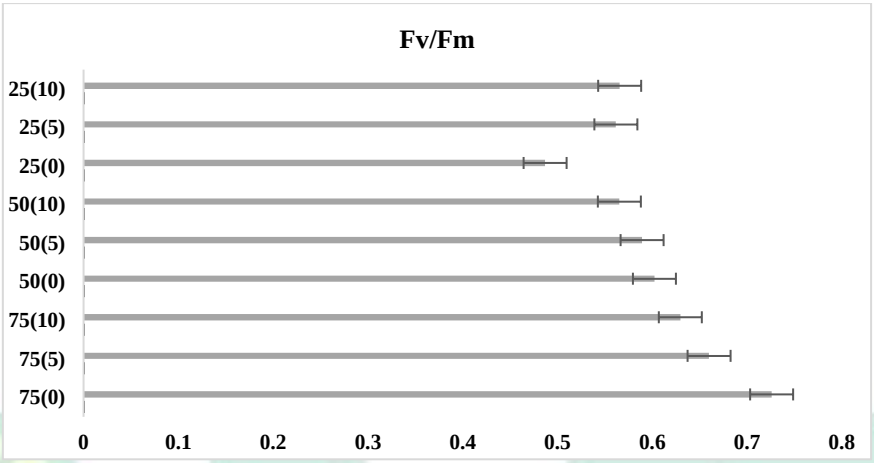
جدول۱: تجزیه واریانس شاخص های فلورسانس کلروفیل در شرایط تنش خشکی تحت اعمال محلول پاشی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		Pi	F_v/F_m
خشکی	۲	^{ns}۶/۵۵۸	۰/۰۲۵*
نیترات روی	۲	^{ns}۱۲/۷۴۱	^{ns}۰/۰۰۸
خشکی*نیترات روی	۴	۲۰/۶۱۸**	۰/۰۱۱*

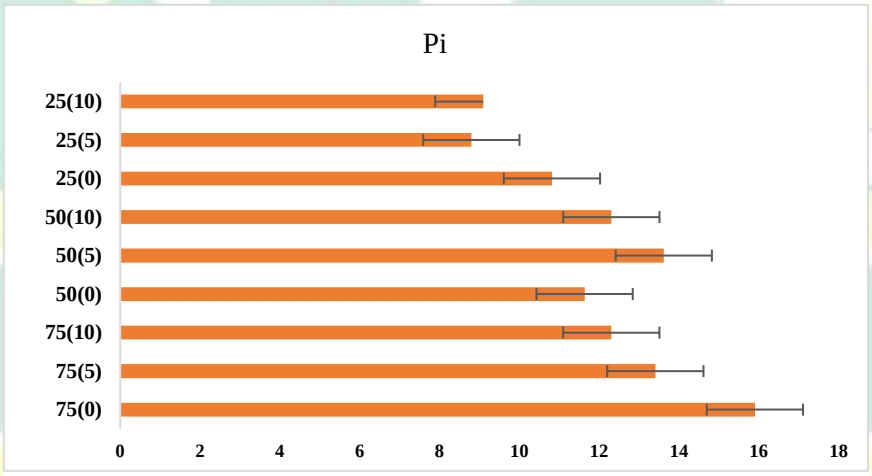
[450] Field Capacity
[451] Photochemical coefficient

خطای آزمایشی	۱۸	۴/۳۶۵	۰/۰۰۴

غیر معنی دار، *، ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصدns

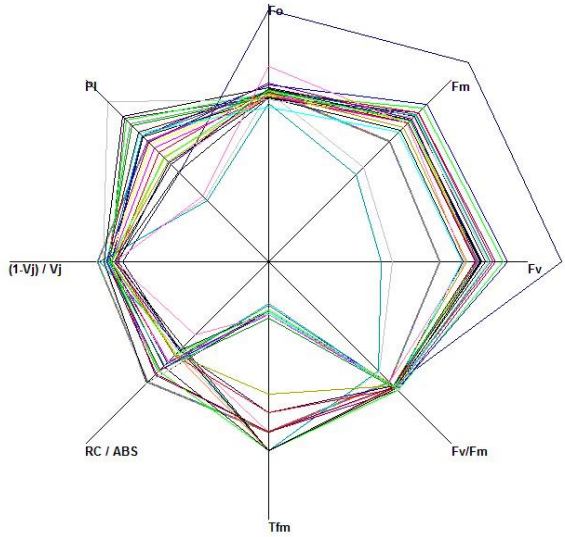


شکل ۱: نمودار اثر متقابل Fv/Fm در بررسی سطوح مختلف خشکی و نیترات روی در گیاه بالنگو



شکل ۲:نمودار اثر متقابل پارامتر pi در بررسی سطوح مختلف خشکی و نیترات روی در گیاه بالنگو

در مقایسه میانگین اثرات متقابل بین سطوح خشکی و نیترات روی نتایج حاکی از آن است که با افزایش درصد ظرفیت زراعی، کارآیی فتوشیمیایی سیستم فتوسنتزی II دچار کاهش شده است. با افزایش سطح تنش خشکی، روند کاهشی در مقدار Fv/Fmایجاد شده، به طوری که بیشترین نسبت Fv/Fm که شاخص مناسبی برای نشان دادن کارایی فتوسیستم دو می باشد در ۷۵ درصد ظرفیت زراعی تنش خشکی و در شرایط تنش شدید ۲۵ درصد ظرفیت زراعی نیز این محلول پاشی در غلظت های ۵ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر در دامنه بین ۰/۸۵-۰/۶۵ بوده است. مقایسه میانگین تیمارها در پارامتر Pi (شکل ۲) نشان می دهد که بالاترین میزان مربوط به شاهد و با افزایش سطح تنش این میزان کاهش می یابد. در محلول پاشی توسط نیترات روی تأثیر مثبتی در کاهش این میزان داشته است. بنابراین می توان بیان داشت که محلول پاشی می تواند به عنوان راهکار مناسبی در کاهش افت عملکرد فتوسنتزی مؤثر باشد.



شکل۳: نمودار عنکبوتی پارامترهای مورد بررسی تحت تنش با اعمال تیمار محلول پاشی

از میانگین شاخص های مورد بررسی تحت تأثیر PEA Plusبر اساس داده های دستگاه تنش سنج و نمودار حاصل از نرم افزار درصدهای متفاوت ظرفیت زراعی و نیز استفاده از غلظت های متفاوت نیترات روی، تأثیر محلول در سطح ۱۰ میلی گرم بر لیتر بیشتر Pi نسبت به IIبر روی شرایط تنش رطوبتی ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی برای پارامتر عملکرد کوانتومی فتوسیستم بوده است. بر اساس نتایج می توان بیان داشت که در شرایط تنش رطوبتی در مراحل مختلف رسیدگی گیاه می توان با کمک در جهت ماندگاری و حفظ ساختار اامواد ضروری رشد به صورت محلول پاشی تا حدودی به حفظ ساختار سیستم فتوسنتزی گیاه کمک نمود(شکل ۳) .

منابع

عامریان، م.، زبرجدی، ع، ر.، محرابی، ج.، ۱۳۹۹. تأثیر غلظت‌های مختلف سلنیوم بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی بالنگوی شهری در رطوبت‌های مختلف آبیاری. نشریه پژوهش آب در کشاورزی. جلد ۳۴، شماره ۳. ص: ۴۳۱-۴۱۵.

1. Deepak SB., Thakur, A., Singh, S., Bakshi M and Bansal S, 2019. Changes in crop physiology under drought stress: A review. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 8(4): 1251-1253.
2. Hassan, M, U., Aamer, M,. Chattha, M, U,. Haiying, T,. Shahzad, B., Barbanti, L., Nawaz, M., Adnan Rasheed, A, Afzal, Y, Liu and H, Guoqin,. 2020. The Critical Role of Zinc in Plants Facing the Drought Stress. Agriculture, 10(0396): 1-20.
3. Hosseinzadeh, S. R., Amiri, H., & Ismaili, A., 2016. Effect of vermicompost fertilizer on photosynthetic characteristics of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under drought stress. Photosynthetica, 54(1): 87–92.
4. Massacci, A., Nabiev, S. M., Pietrosanti, L., Nematov, S. K., Chernikova, T. N., Thor, K., & Leipner, J. 2008. Response of the photosynthetic apparatus of cotton (Gossypium hirsutum) to the onset of drought stress under field conditions studied by gas-exchange analysis and chlorophyll fluorescence imaging. Plant Physiology and Biochemistry., 46(2): 189–195.
5. Oukarroum, A., Madidi, S. E., Schansker, G., and Strasser, R. J., 2007. "Probing the responses of barley cultivars (Hordeum vulgare L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering", Environmental and Experimental Botany, 60 (3):438-446.
6. Rahbarian, R., Khavari-Nejad, R., Ganjeali, A., Bagheri, A., & Najafi, F., 2013. Drought stress effects on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and water relations in tolerant and susceptible chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes. Iranian Journal of Pulses Research, 4(2): 87–96. (In Persian).
7. Rana, R.M., Rehman, S.U., Ahmed, J., Bilal, M., 2013. A comprehensive overview of recent advances in drought stress tolerance research in wheat (*Triticum aestivum* L.). Asian J. Agric. Biol., 1:29–37.

8. Schonfeld MA, Johnson RC, Carwer BF and Mornhinweg DW, 1988. Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. Crop Science 28: 526-531.
9. Soheili Movahed, S., Esmaeili, M. A., Jabbari, F., Khoramdel, S., & Fooladi, A., 2017. Effect of water deficit on leaf relative water content, chlorophyll fluorescence indices and grain yield of four maize beans. Journal of Crop Science, 10(1):169–190. (In Persian).

The effect of glycine betaine treatment on increasing the shelf life and alleviating chilling injury of "Cavendish" banana fruit

R. Hoseini[1]; J.Rezapour fard[2*]; Morteza Soleymani aghdam[3]

1-Graduate student of Horticultural Science, Saba Urmia University,Urmia-Iran.
2-Assistant Professor of Horticultural Science, Collage of Agriculture, Urmia University,Urmia-Iran
3- Assistant Professor of Horticultural Science, Collage of Agriculture, Imam Khomeini International University, Qazvin-Iran.

**Corresponding Author Email address: j.rezapourfard@urmia.ac.ir*

Abstract

In this study, the effect of glycine betaine treatment on increasing the shelf life and reducing frost damage of Cavendish cultivar was investigated. Banana green fruits were treated with concentrations of 0 and 100 mM glycine betaine at room temperature and after they were air-dried at room temperature for 2 h, the fruits were stored at 7 ± 0.5 °C with 85–90% RH for 28 days. During this period, ion leakage, chlorophyll, dye and antioxidant capacity in fruit skin were measured at 7-day intervals. The results showed that the effect of glycine betaine treatment at the level of 1% on the measured traits was significant. Based on the comparison of the mean data by Duncan method, it was found that in the postharvest period, chilling increased ion leakage of cells, decreased chlorophyll and antioxidant capacity and color indices. In addition, glycine betaine treatment at 100 mM was able to prevent damage to cell membrane and reduce ion leakage during storage, and this treatment also preserved chlorophyll and prevent its decomposition in the skin of the fruit during storage. Glycine betaine treatment increased the antioxidant capacity compared to the control. Skin color index was also affected by glycine betaine treatment and fruits treated at 100 mM had a slower color change from green to yellow or less browning due to chilling. The results showed that glycine betaine treatment can increase the shelf life of banana fruit and reduce chilling injury in this fruit by increasing its antioxidant capacity.

Keywords: Antioxidant capacity, Shelf life, Maturity, Chlorophyll, Ion leakage, Cold damage and Cold resistance

بررسی تاثیر تیمار گلایسین بتائین بر افزایش ماندگاری و کاهش صدمات سرمازدگی میوه موز رقم کاوندیش

رعنا حسینی[۱]؛ جواد رضا پور فرد[۲]*؛ مرتضی سلیمانی اقدم [۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته علوم باغبانی دانشگاه غیرانتفاعی صبا، ارومیه .
۲- استادیارگروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه ، ارومیه .
۳- استادیارگروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی قزوین، قزوین.

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: j.rezapourfard@urmia.ac.ir

چکیده

در این پژوهش تأثیر تیمار گلایسین بتائین بر افزایش ماندگاری و کاهش صدمات ناشی از سرمازدگی موز رقم کاوندیش بررسی گردید. میوه‌های سبز موز در شرایط دمای اتاق با غلظت‌های صفر و ۱۰۰ میلی مولار گلایسین بتائین تیمار شدند و پس از انجام تیمار و خشک شدن رطوبت سطح میوه‌ها در دمای اتاق، میوه ها در سردخانه با دمای ۰/۵± ۷ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۸۵ الی ۹۰ ٪ به مدت ۲۸ روز نگهداری شدند. در این دوره صفات نشت یونی، کلروفیل، رنگ و و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در پوست میوه در فواصل ۷ روزه اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که تأثیر تیمار گلایسین بتائین در سطح ۱ درصد روی صفات اندازه‌گیری شده معنی‌دار بود. بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها به روش دانکن مشخص شد که در دوره‌ی پس از برداشت، سرمازدگی باعث افزایش نشت یونی سلول‌ها، کاهش کلروفیل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و شاخص‌های رنگ گردید. ضمناً تیمار گلایسین بتائین در غلظت ۱۰۰ میلی مولار توانست جلوی آسیب به غشای سلول را بگیرد و نشت یونی را در طی دوره انبارمانی کاهش دهد و همچنین این تیمار باعث حفظ کلروفیل و جلوگیری از تجزیه آن در پوست میوه در مرحله انباری شد. تیمار گلایسین بتائین باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با شاهد گردید. شاخص رنگ پوست نیز تحت تأثیر تیمار با گلایسین بتائین قرار گرفت و میوه‌های تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میلی مولار روند تغییر رنگ از سبز به زرد کندتر و یا قهوه‌ای شدن کمتری در اثر سرمازدگی داشتند. نتایج حاصل نشان داد تیمار گلایسین بتائین می‌تواند با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی باعث افزایش عمر انباری میوه موز و کاهش صدمات سرمازدگی در این میوه گردد.

واژگان کلیدی : ظرفیت آنتی اکسیدانی، مدت زمان انبارداری، رسیدگی، کلروفیل، نشت یونی، آسیب سرمایی و مقاومت به سرما

۱. مقدمه

موز با نام علمی Musa acuminata متعلق به خانواده Musaceae می‌باشد. موز یکی از مهمترین میوه‌های مناطق گرم و مرطوب مانند آسام هند، چین و برمه بوده و قدمت این گیاه بیش از ۳۰۰۰ سال می‌رسد (بیدریغ،۱۳۸۳). میوه موز به صورت کال و نارس برداشت می‌شود و در مرحله پس از برداشت وارد مرحله رسیدگی می‌شود که در این مرحله به دلیل تولید اتیلن و رسیدگی سریع آن ممکن است بازاریابی آن دچار مشکل شود (Scot, 2008). موز نمی‌تواند برای مدت طولانی در درجه حرارت پایین ۱۴-۱۲ درجه سانتیگراد انبار شود زیرا باعث سیاه شدن سریع پوست و علائم خسارت سرمازدگی،

عدم موفقیت در رسیدن، سفت‌شدن قسمت مرکزی و از بین رفتن طعم و مزه می‌شود(Grierson et al.,1967). بسیاری از دانشمندان معتقدند در بافت‌های گیاهی که در معرض تنش سرما قرار گرفته‌اند محتوای مالون‌دی‌آلدهید ملاک مناسبی برای نشان دادن سلامت غشاء پلاسمایی است (Antunes and Sfakiotakis, 2008). از دست دادن کیفیت و بازارپسندی میوه عمدتاً در اثر آسیب به غشای سلولی و در نتیجه اکسیداسیون آنزیمی فنول‌ها توسط پلی فنول اکسیدازها ایجاد می‌شود Lin *et al.*, (2016; Sheng *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017).

گلایسین بتائین یکی از معمول‌ترین ترکیب آلی سازگار و از مهمترین ترکیبات چهارگانه آمونیوم می‌باشد که در میکروارگانیسم‌های مختلف گیاهان عالی و حیوانات می‌تواند وجود داشته باشد. غلظت گلایسین بتائین در بافت‌ها و گونه‌های مختلف گیاهی که این ماده را به عنوان محلول سازگارکننده استفاده می‌کنند، متفاوت می‌باشد (Malekzadeh, 2015). گلایسین بتائین از طریق تأثیر بر تنظیم پتانسیل اسمزی سلول‌ها به پایداری و تثبیت پروتئین‌ها و غشای سلولی کمک می‌کند (Hanson, 1990) و نیز با تأثیر بر ظرفیت فتوسنتزی گیاه، سبب بهبود رشد گیاهچه‌های تحت تنش می‌شود (Korkmaz *et al.*, 2012). تاثیرکاربرد خارجی گلایسین بتائین در بهبود اثرات منفی دمای پایین در رشد گونه‌های مختلف گیاهی گزارش شده است (Wyatt *et al.*, 2002).

گلایسین بتائین با تاثیر بر افزایش ظرفیت فتوسنتزی و حفظ پتانسیل تورژسانس سلول‌ها، سبب بهبود مقاومت به تنش سرما می‌شود (Bandurska and Stroinski, 2005). افزایش گلایسین بتائین خارجی، به منظور تعدیل اسمزی سلول، موجب افزایش پرولین به منظور تخفیف اثر تنش شده است. تجمع پرولین با کاهش تولید رادیکال‌های آزاد موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدها و مانع از تخریب غشاء در شرایط تنش محیطی می‌شود (Alia and Mohanty, 1993). علاوه بر این نشان داده شده است که گلایسین بتائین وظیفه حفاظت از پروتئین‌ها و غشاهای سلولی در مقابل دماهای بالا و تنش‌های اسمزی درون گیاه را بر عهده دارد (Robinson *et al.*, 1986). گلایسین بتائین می‌توانند سبب مهار رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) شده و آثار مضر آن‌ها را کاهش دهد (Okuma *et al.*, 2004).

پرولین یکی از محافظت کننده‌های اسمزی است و با تأثیر بر فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه و از بین بردن رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل، ممکن است یکی از دلایل افزایش تحمل تنش سرمایی در گیاهچه‌های خیار در اثر کاربرد گلایسین بتائین باشد (Ashraf and Foolad, 2007). نتایج دیگر بررسی‌ها در میوه انار نشان داد که گلایسین بتائین همانند سایر ترکیبات سازگارکننده به تنش، دارای توانایی القاء مقاومت به سلول‌های گیاهی می‌باشد. گلایسین بتائین توانست با تأثیر روی غشاء پلاسمایی میزان ضریب سرمازدگی و نشت الکترولیت و محتوای مالون دی‌آلدهید را در جهت حفظ سلامت میوه تغییر دهد. از طریق این عملکرد، میزان ترکیبات سازگار همچون مقدار پرولین در سلول‌های تیمار شده با گلایسین بتائین خارجی نیز افزایش یافت. در نهایت با تغییر میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) از قهوه‌ای شدن و تیره‌شدن میوه جلوگیری نمود (ملک زاده و حاتم نیا، ۱۳۹۴).

Rab و Saltveit (1996) بیان کردند که تنش سرما موجب افزایش نشت الکترولیت‌ها می‌شود و غلظت ترکیبات مضر اکسیژن افزایش می‌یابد. تجمع این ترکیبات سمی ممکن است منجر به پراکسیداسیون لیپیدی غشاء سلولی و اندامک‌ها شود که در نهایت منجر به اختلالات فیزیولوژیکی و بروز صدمات تنش سرما در گیاهان می‌شود(Parsad *et al.*, 1994) . گلایسین بتائین باعث افزایش پرولین می‌شود و پرولین از طریق تنظیم فشار اسمزی، جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها و زدودن رادیکال‌های هیدروکسیل، تحمل گیاهان را در برابر تنش ها افزایش می‌دهد (Kuznetsov and Shevykova, 1999) .

۲. مواد و روش ها

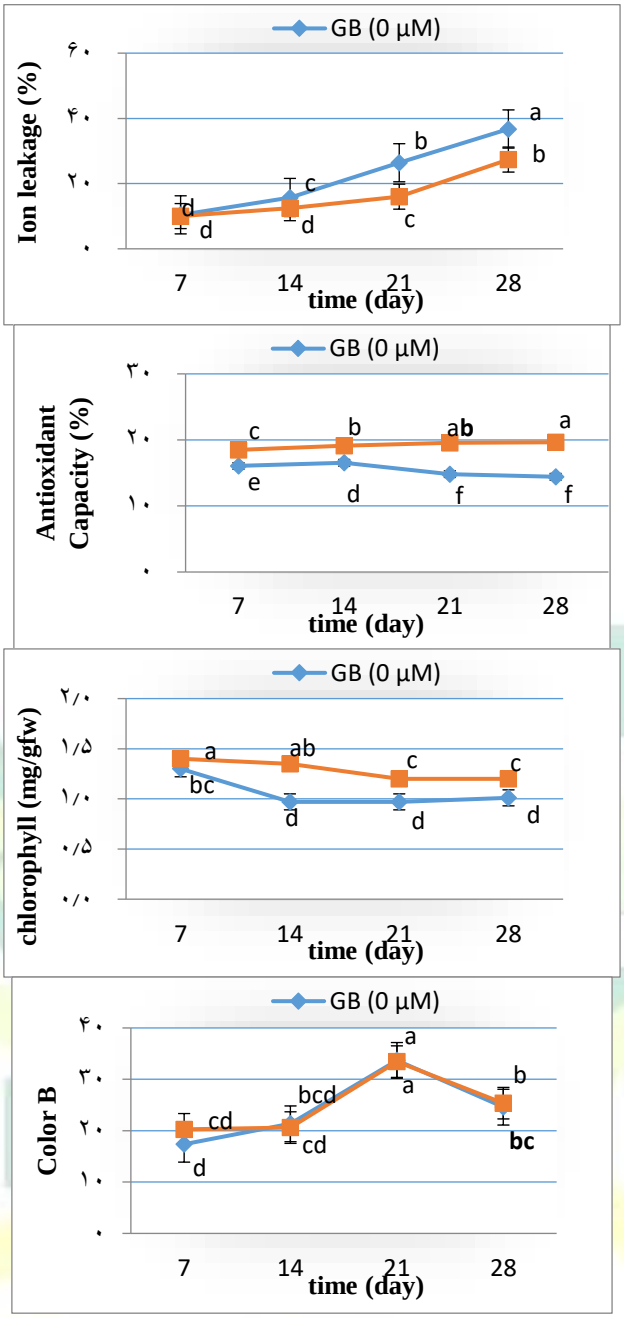
برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدان روش DPPH (diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical) به کار رفت که در این روش میزان ۳/۹ میلی لیتر از استوک DPPH ساخته شده داخل کوت ریخته و جذب توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۵ نانومتر

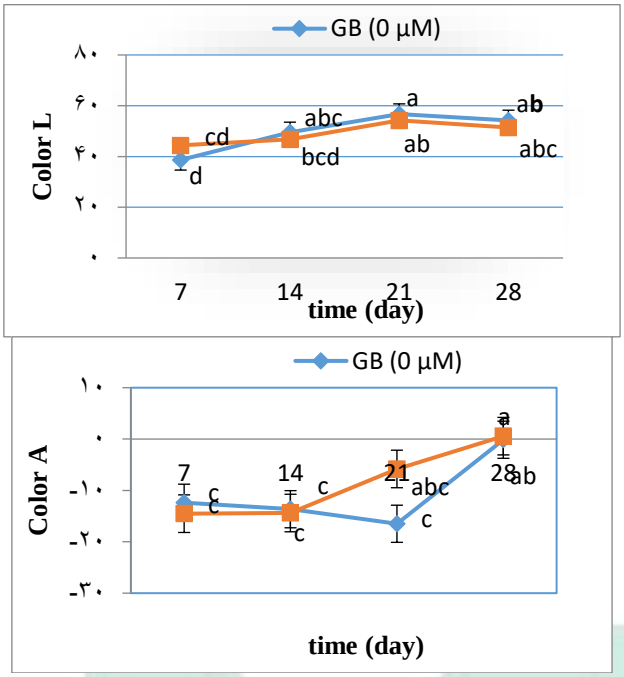
خوانده شد، سپس ۱/. میلی‌لیتر از عصاره اضافه و پس از جذب آن در ۵۱۵ نانومتر، ابتدا هریک دقیقه تا دقیقه ۱۰، سپس هر ۳ دقیقه تا دقیقه ۳۰ خوانده شد. در صد مهار رادیکال DPPH با استفاده از معادله I(%)=100×(A0-As)/A0 محاسبه گردید که A0 جذب کنترل (حاوی همه اجزا واکنشگر بدون نمونه) As جذب نمونه بود. سپس از عصاره گیری توسط استون آزمایش‌ها به روش اسپکتروفتومتر UV/VIS انجام شد . فاز رویی جدا شده را در کورت ریخته و مقادیر جذب کلروفیل b و a و کاروتنوئید کل، به ترتیب در طول موج ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۸۰ نانومتر قرائت شد. از استون ۸۰ درصد به عنوان بلانک استفاده شد. با استفاده از معادله Arnon مقدار کلروفیل کل به دست آمد: Chl.total (mg/g FW) = [20.2(A645)+8.02(663)]×V/W

برای اندازه‌گیری نشت‌یونی از پوست موز، قطعات مربعی به میزان یکسان تهیه شد سپس نمونه‌ها در آب مقطر و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، هدایت الکتریکی هر نمونه با استفاده از EC متر مدل Lutron اندازه‌گیری شد (EC1). به منظور اندازه‌گیری میزان نشت‌یونی در اثر مرگ سلول‌ها، لوله‌های آزمایش در دستگاه بن‌ماری در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شدند و پس از سرد شدن لوله‌ها، مجدداً هدایت الکتریکی نمونه‌ها اندازه‌گیری شد (EC2) سپس درصد نشت یونی با استفاده از فرمول EC1×۱۰۰ = نشت یونی (درصد) محاسبه شد. اندازه‌گیری مولفه های رنگ (L، a و b) بر اساس مدل رنگی CIE LAB نیز با استفاده از دستگاه رنگ سنج Konica Minolta مدل CR-400 در فواصل ۷ روزه انجام شد. فاکتور L نشانگر شفافیت و روشنایی رنگ بوده و دامنه ای بین صفر برای رنگ سیاه تا صد برای رنگ سفید دارد. فاکتور a طیف رنگی بین سبز با اعداد منفی و قرمز با اعداد مثبت را نشان می دهد و دارای دامنه ۶۰- تا ۶۰+ است. فاکتور b نیز بیانگر محدوده رنگی بین آبی (مقادیر منفی) و زرد (مقادیر مثبت) و با محدوده عددی ۶۰- تا ۶۰+ است (Wang و همکاران، ۲۰۱۷).

۳. نتایج و بحث

۱- نشت یونی: با افزایش زمان انبارمانی سرد، میزان نشت‌یونی افزایش یافت به طوری که بالاترین میزان آن مربوط به تیمار شاهد در مدت زمان ۲۸ روز انباری بود. نتایج نشان داد تیمار بتائین گلایسین ۱۰۰ میلی‌مولار در زمان ۷ روز بیشترین تأثیر را در کاهش میزان نشت یونی با ۱۰/۰۴ درصد داشت. در تمامی مدت زمان‌های تیمار، بتائین گلایسین باعث کاهش میزان نشت یونی نسبت به شاهد گردید. ۲- ظرفیت آنتی اکسیدانی: تیمار با گلایسین بتائین با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار ظرفیت آنتی اکسیدانی را در مقایسه با شاهد افزایش داد به طوری که در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار در مدت ۲۸ روز، بیشترین میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی (۱۹/۶۴) مشاهده شد. ۳- کلروفیل کل: میزان کلروفیل با گذشت مدت زمان انبارمانی کاهش یافت. همچنین در کل دوره انبارمانی، گلایسین بتائین با غلظت ۱۰۰ میلی مولار باعث حفظ کلروفیل و جلوگیری از تخریب آن در مقایسه با شاهد گردید. ۴- شاخص رنگ (L، a و b): تیمار میوه های موز در تمامی مدت زمان انباری ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز با بتائین گلایسین ۱۰۰ میلی‌مولار فاکتورهای شاخص رنگ (a و b) را در مقایسه با شاهد افزایش داد ولی برای شاخص رنگ L در سطح یک درصد تاثیر معنی‌داری مشاهده نگردید.


GB (0 µM)
Ion leakage (%)
time (day)
GB (0 µM)
Antioxidant Capacity (%)
time (day)
GB (0 µM)
chlorophyll (mg/gfw)
time (day)
GB (0 µM)
Color B
time (day)



نمودارهای ۱ تا ۶: مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل طول مدت انباری (روز) و غلظت بتائین گلایسین بر شاخص‌های ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، نشت یونی، کلروفیل و مولفه‌های رنگ (L، a و b) در پوست میوه موز. حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در آزمون دانکن در سطح ۱٪ است.

نتایج بررسی‌های Zhang و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد که تیمار گلایسین بتائین باعث کاهش چشمگیر نشت‌یونی و میزان‌مالون‌دی آلدهید در میوه های ازگیل ژاپنی شد. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در تیمار ترکیبی آب گرم و گلایسین بتائین نسبت به گروه شاهد بالاتر بود. این محققین عنوان کردند که پرولین و گاما آمینو بوتیریک اسید در میوه ازگیل ژاپنی با تیمار ترکیبی آبگرم و گلایسین بتائین تجمع می‌یابد که با افزایش متابولیسم فعالیت آنزیم‌های دی پرولین- ۵ کربوکسیلاز و اورنیتین دی‌آمینو ترانسفراز و گلوتامات دکربوکسیلاز بیان می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که تیمار گلایسین بتائین با تحریک فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و متابولیسم پرولین یا گاما آمینو بوتیریک اسید تحمل سرما در میوه را افزایش می‌دهد.کاربرد گلایسین بتائین می‌تواند با تغییر فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه شامل افزایش کلروفیل، فعالیت آنتی اکسیدانی و پرولین و کاهش تجمع پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدهید از خسارت سرمازدگی بکاهد. بنابراین گلایسین بتائین را می‌توان ماده اثربخش برای رفع اثرات مخرب تنش سرما به حساب آورد (صیدپور و همکاران، ۱۳۹۳). تخریب کلروفیل یکی از علائم آشکاری است که نشان دهنده پیری و فرسودگی محصولات باغی است. به عنوان مثال کلم گل چینی و کلم بروکلی در طول ذخیره سازی پس از برداشت زرد می‌شوند که عمدتاً به دلیل تجزیه کلروفیل است (Cai *et al.*, 2019; Tan *et al.*, 2019). در آزمایش ما تیمار گلایسین بتائین توانست از تجزیه و تخریب کلروفیل جلوگیری کند. علاوه بر این، قندهای محلول نه تنها به طعم و مزه کمک می‌کنند، بلکه با تأثیر بر متابولیسم انرژی و تنظیم اسمزی نقش اساسی در سازگاری با استرس دارند(Cao *et al.*, 2013). در میوه انبه (لی و همکاران،۲۰۱۴) و به طور مشابه در موز محتویات قند محلول به تدریج در طول ذخیره سازی ۱۳ درجه سانتیگراد و ۱۹ درجه سانتیگراد افزایش یافت که با تجزیه نشاسته مطابقت دارد (Peroni-Okita *et al.*, 2013). همچنین تیمار ۲۰ میلی مولار گلایسین بتائین روی میوه توت فرنگی باعث بهبود شاخص‌های رنگ میوه ، غلظت مواد جامد محلول، ترکیبات فنلی، آنتوسیانین و ترکیبات غیر آنتوسیانینی و عناصر معدنی گردید (Adak, 2019). تفاوت رنگ به طور اساسی به تفاوت ساختار شیمیایی رنگدانه هایی از جمله آنتوسیانین و کاروتنوئید بر

می‌گردد (Junka *et al*., 2007). به نظر می رسد که گلایسین بتائین باعث افزایش pH می شود و pH واکوئلی باعث تفاوت در بیان رنگ می‌شود. احتمال می رود گلایسین بتائین با پتاسیم موجود در بافت باعث بهبود ماندگاری رنگ شده است.

۴. نتیجه گیری

تیمار میوه‌های موز با گلایسین بتائین ۱۰۰ میلی مولار در دوره ۲۸ روز انبارمانی در دمای ۷ درجه سانتیگراد توانست اثرات تنش سرمایی را با افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی و حفظ کلروفیل کاهش دهد و در نتیجه تا حد زیادی از آسیب به غشای سلولی بکاهد که با کاهش نشت یونی در دوره انبارمانی ۲۸ روزه نشان داده می‌شود. همچنین این تیمار در مقایسه با شاهد توانست تغییر رنگ پوست میوه از سبز به زرد را کند کرده و از قهوه‌ای شدن پوست در اثر سرمازدگی جلوگیری کند که از روی روند تغییرات مولفه‌های رنگ در طول دوره انبارمانی در دمای ۷ درجه سانتیگراد می توان به این امر پی برد. در مجموع این یافته‌ها نشان داد که محتوای بالای ظرفیت آنتی اکسیدانی، کلروفیل و رنگ و کاهش نشت یونی توسط بتائین گلایسین می‌تواند برای نگهداری با کیفیت میوه و مقاومت به سرما در شرایط انبارمانی میوه موز مفید باشد.

منابع

۱. بی دریغ س. (۱۳۸۳). کشت گلخانه ای موز. انتشارات ندای سبز شمال. ۸۹ ص.

۲. فروغ صیدپور، ف؛ سیاری،م. و قنبر، ف. (۱۳۹۳). اثر گلایسین بتائین بر مقاومت به سرمازدگی گیاهچههای خیار. مجله به زراعی کشاورزی. ۱۷: (۱)، ص: ۵۳-۶۷.

۳. ملک زاده پ و حاتم نیا ع.ا (۱۳۹۴). اثر تیمار گلایسین بتائین در کاهش آسیب سرما بر میوه انار در طول انبارمانی. مجله فیزیولوژی محیطی گیاهی، دوره: ۱۰، شماره: ۳۸، ص: ۳۹-۴۸.

4. Adak N. (2019). Effects of glycine betaine concentrations on the agronomic characteristics of strawberry grown under deficit irrigation conditions. Applied Ecology and Environmental Research, 17(2): 3753-3767.
5. Alia P.S. and Mohanty P. (1993). Proline in relation to free radical production in seedlings of *Brassica juncea* raised under sodium chloride stress. Plant and Soil, 156: 497-500.
6. Antunes M.D.C. and Sfakiotakis E.M. (2008). Changes in fatty acid composition and electrolyte leakage of 'Hayward' kiwifruit during storage at different temperatures. Food Chemistry, 110: 891-896.
7. Arnon D. 1949. Copper enzymes isolated chloroplasts: Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology, 24(1), 1-15.
8. Bandurska H. and Stroinski A. (2005). The effect of salicylic acid on barley response to water deficit. Acta Physiologiae Plantarum, 27(3): 379-386.
9. Grierson E.B., Grierson W. and Soule B. (1967). Chilling injury in tropical fruit. I. Bananas (*Musa paradisiacal* var. sapientum cv.Lacatan). Proceedings tropical regamerican society horticultural science, 11:82-94.
10. Hanson A.D. (1990). Drought and salt tolerance: towards understanding and application. Trends in Biotechnology, 8: 358-362.
11. Junka N., Wongs-Aree C., Kanlayanarat S. and Thanomchit K. (2007). Predominance of cyanidin found in flower from two species of Aerides orchids. Acta Horticulturae, 755: 549-556.
12. Korkmaz A., Rauf S., Irikc I., Kocac F., Degera O. and Demirkırı A.R. (2012). Alleviation of salt induced adverse effects in pepper seedlings by seed application of glycine betaine. Scientia Horticulturea, 148(4): 197-205.
13. Kuznetsov V.I. and Shevykova N.I. (1999). Proline under stress: Biological role, metabolism, and regulation. Russian Journal of Plant Physiology, 46: 274-287.
14. Lin Y.X., Lin Y.F., Chen Y.H., Wang H., Shi J. and Lin H.T. (2016). Hydrogen peroxide induced changes in energy status and respiration metabolism of harvested longan fruit in relation to pericarp browning. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64(22): 4627–4632.
15. Malekzadeh P. (2015). Influence of exogenous application of glycine betaine on antioxidative system and growth of salt stressed soybean seedlings (*Glycine max* L.). Physiology and Molecular Biology of Plants. 20:133–137.
16. Saltveit M.E. and Morris L.L. (1990). Overview of chilling injury of horticultural crops. In: C.Y. Wang (Ed), Chilling Injury of Horticultural Crops, CRC, Press, pp. 3-15.
17. Scot N. (2008). Postharvest rots of banana. Published by the College of Tropical Agriculture and Human Resources (CTAHR). Plant disease, 54: 1-5.

18. Sheng L., Zhou X., Liu Z.Y., Wang J.W., Zhou Q., Wang L., Zhang Q. and Ji S.J. (2016). Changed activities of enzymes crucial to membrane lipid metabolism accompany pericarp browning in 'Nanguo' pears during refrigeration and subsequent shelf life at room temperature. Postharvest Biology and Technology, 117: 1–8.
19. Wang J., Mu W.S., Fang X.M., Mujumdar A.S., Yang X.H., Xue L.Y., Xie L., Xiao H.W., Gao Z.J. and Zhang Q. (2017). Pulsed vacuum drying of Thompson seedless grape: effects of berry ripeness on physicochemical properties and drying characteristic. Food and Bioproducts Processing, 106: 117-126.
20. Wang J.W., Zhou X., Zhou Q., Cheng S.C., Wei B.D. and Ji S.J. (2017). Low temperature conditioning alleviates peel browning by modulating energy and lipid metabolisms of 'Nanguo' pears during shelf life after cold storage. Postharvest Biology and Technology, 131: 10–15.
21. Wyatt S.E., Rashotte A.M., Shipp M.J., Robertson D. and Muday G.K. (2002). Mutations in the gravity persistence signal loci in Arabidopsis disrupt the perception and/or signal transduction of gravitropic stimuli. Plant Physiology, 130(3): 1426-1435.

Effect of gamma radiation on quality characteristics and postharvest life of sweet pepper

Majid Balouti Dehkordi ۱*; Gholamreza Rabiee ۱; Morteza Raisi ۲

1-Master student of Horticulture Sciences, Faculty of Agriculture, Shahrekord University

2-Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Shahrekord University

3-Assistant Professor, Department of Physics, Faculty of Agriculture, Shahrekord University

*majidbaloutidehkordi@gmail.com * Email of the author in charge of correspondence:*

Abstract

Capsicum is a type of pepper that is available in red, yellow, green, orange, and rarely in white, purple, blue, black, and brown. Capsicum annum L is one of the most important vegetables in the potato family. The stem of the bell pepper is strong and upright, and its cultivars, which are grown in the greenhouse today, are up to one meter high, which can even grow up to 180 cm. The bell pepper forms several lateral branches that form a flower bud at the end of each branch. This plant is now used as a vegetable or even as a medicine. Today, healthy and environmentally friendly ways are essential for use in post-harvest technology of fruits and vegetables due to their devastating effects on humans and animals. The experiment was conducted as a completely randomized design. In this study, the effect of gamma ray irradiation was performed at doses of zero, 400 and 800 GY. It should be noted that all environmental conditions of the laboratory in terms of humidity and temperature of storage of experimental samples were the same for all treatments. This experiment on the effect of gamma rays on postharvest life and quality of bell peppers Nirvin cultivar was studied during five weeks of fruit storage at a temperature of 1±7° C and a relative humidity of 85% to 90%. Qualitative traits of bell pepper including fruit texture firmness, tissue color, weight loss percentage, soluble solids, apparent decay percentage, anthocyanin, phenol, ascorbic acid, total acidity, titratable acidity, lycopene and carotenoids were evaluated. The results of this experiment showed that treatment with gamma radiation, especially at a dose of 800 GY, increased soluble solids, total acidity, lycopene, carotenoids, tissue redness and phenol and decreased anthocyanin, ascorbic acid, brightness and yellowing of tissues. But the dose of 400 GY, unlike 800 GY, had a very effective effect in reducing the microbial load and thus reducing caries and weight loss percentage and maintaining the freshness and freshness of fruits. The results of this study showed that the use of gamma radiation has an effect on the quality characteristics and postharvest life of sweet pepper.

Keywords: Marketability, Gamma rays, Storage

اثر پرتودهی گاما بر ویژگی‌های کیفی و عمر پس از برداشت فلفل دلمه‌ای

مجید بلوطی دهکردی[1*]؛ غلامرضا ربیعی[1]؛ مرتضی رئیسی[2]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
۲- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
۳- استادیار گروه فیزیک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

*ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: majidbaloutidehkordi@gmail.com

چکیده

فلفل دلمه‌ای گونه‌ای از فلفل می‌باشد که در رنگ‌های قرمز، زرد، سبز، نارنجی و بسیار کم به رنگ‌های سفید، بنفش، آبی، سیاه و قهوه‌ای یافت می‌شود. فلفل دلمه‌ای با نام علمی *Capsicum annum L* یکی از سبزی‌های شاخص خانواده Solanaceae است. ساقه فلفل دلمه‌ای مستحکم و به حالت ایستاده می‌باشد و رقم‌های آن‌که امروزه در گلخانه کاشت می‌شوند تا یک متر دارای ارتفاع می‌باشند که حتی امکان دارد تا ۱۸۰ سانتی‌متر رشد بنماید. فلفل دلمه‌ای شاخه‌های متعدد جانبی را به وجود می‌آورد که در انتهای هر شاخه یک غنچه گل به وجود می‌آید و گل‌های آن دوجنسی می‌باشد، امروزه این گیاه در دنیا به‌عنوان سبزی یا حتی به‌صورت دارویی استفاده می‌شود. امروزه، روش‌های سالم و سازگار با محیط‌زیست به علت اثرات زیان‌بار بر انسان و حیوانات برای استفاده در تکنولوژی و فناوری بعد از برداشت میوه‌ها و سبزی‌ها لازم می‌باشد. آزمایشی به شکل طرح کاملاً تصادفی انجام پذیرفت. در این پژوهش اثر پرتودهی با اشعه‌ی گاما در دزهای صفر، ۴۰۰ و ۸۰۰ انجام شد. لازم به ذکر است که کلیه شرایط محیطی آزمایشگاه ازنظر میزان رطوبت و دمای محل نگهداری نمونه‌های آزمایشی برای کلیه تیمارها به طور یکسان بود. این آزمایش بر تأثیر اشعه گاما بر عمر پس از برداشت و کیفیت فلفل دلمه‌ای رقم نیروین (Nirvin) در طول پنج هفته نگهداری میوه‌ها درون دمای ۱±۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۸۵ تا ۹۰ درصد مورد مطالعه قرارگرفت. صفات کیفی فلفل دلمه‌ای شامل سفتی بافت میوه، رنگ بافت، درصد کاهش وزن، مواد جامد محلول، درصد پوسیدگی ظاهری، آنتوسیانین، فنل، اسید اسکوربیک، اسیدیته کل، اسیدیته قابل تیتر، لایکوپن و کارتنوئید ارزیابی شدند. نتایج این آزمایش نشان داد که تیمار با اشعه‌ی گاما بخصوص دز ۸۰۰ گری باعث افزایش مواد جامد محلول، اسیدیته کل، لایکوپن، کارتنوئید، قرمزی رنگ بافت و فنل و باعث کاهش آنتوسیانین، اسید اسکوربیک، روشنایی و زردی رنگ بافت گردیده است، اما دز ۴۰۰ گری برخلاف ۸۰۰ گری تأثیر بسیار مؤثری در کاهش بار میکروبی و درنتیجه کاهش پوسیدگی و درصد کاهش وزن و حفظ طراوت و شادابی میوه‌ها داشت. نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از پرتودهی با اشعه گاما بر ویژگی‌های کیفی و عمر پس از برداشت فلفل دلمه‌ای تأثیر دارد.

کلیدواژه: بازارپسندی، اشعه گاما، انبارمانی

۱. مقدمه

شیوه‌های متداول فرآوری و حفظ مواد غذایی نظیر بهره‌گیری از افزودنی‌ها و نگهدارنده‌ها و همین‌طور روش‌های گرمایی باعث از بین رفتن ارزش تغذیه‌ای، تغییر ویژگی‌های حسی و اثرات مضر روی سلامت مصرف‌کننده می‌شود. لذا امروزه شیوه‌های فرآیند

و نگهداری غیر سنتی سریعاً در حال توسعه می‌باشد (استالتر و هاواس[۴۵۲]، ۲۰۱۸). جدا بر این با توجه به تقاضای مصرف کننده جهت غذای تازه‌تر، طبیعی‌تر و سالم‌تر که قادر باشد ایمنی بالاتری را فراهم کند، علت بالا رفتن میزان علاقه مندی به بهره‌گیری از روش‌های غیر گرمایی در فرآوری مواد غذایی شده است (شارما و میشرا[۴۵۳]، ۲۰۱۷). با توجه به متنوع بودن مواد غذایی و تنوع در شیوه‌های نگهداری آن‌ها، یکی از بهترین شیوه‌ها در زمان حاضر پرتودهی مواد غذایی است. با فرآوری مواد غذایی به شیوه پرتودهی و انبارداری محصول‌ها با اشعه‌دهی آن‌ها در حد مطلوب، کیفیت مواد غذایی تا مدت زمان‌های مختلف ثابت باقی می‌ماند و با کنترل میکروارگانیسم‌ها عوامل فساد هم مهار می‌گردد، که این مورد سبب می‌شود که، مواد غذایی جدایی از وجود باکتری‌های بیماری‌زا، مخمرها، کپک‌ها و حشرات گردیده و نیز رسیدگی، پیری و جوانه‌زدن میوه‌ها و سبزی‌ها را کنترل بنماید (برزوئی و مجدآبادی، ۱۳۹۷). ترکیبات شیمیایی مواد غذایی برای بهبود کیفیت مواد غذایی تغییر پیدا کرده و در آخر بعد از اعمال پرتو هیچ‌گونه سمی در مواد غذایی باقی نخواهد ماند (اشکبوس اصفهانی و همکاران، ۱۳۹۹). البته اهمیت به این نکته هم ضرورت دارد که، افزایش دز پرتودهی جهت مواد غذایی می‌تواند اثرات مضر هم روی آن‌ها داشته باشد (ناکانیشی[۴۵۴]، ۲۰۱۷)، بر طبق نتایج به دست آمده از پژوهش‌های پیشین مفیدترین دز برای بیشتر مواد غذایی در حدود چهار کیلوگری معرفی شده است. پرتودهی در سبزی‌ها علت افزایش ماندگاری، در فرآورده‌های شیلاتی باعث حفظ کیفیت و افزایش ماندگاری و حفظ خواص تغذیه‌ای و حسی می شود (ملا، ۱۳۹۶). پرتودهی مواد غذایی با اشعه گاما در مقایسه با بقیه روش‌های پرتودهی دارای امتیازاتی می‌باشد که از این بین می‌توان به، عدم تغییر در طعم، رنگ و بو محصولات بعد از پرتودهی، کنترل و از بین بردن حشرات و آفت‌های کشاورزی، به تعویق انداختن زمان رسیدگی میوه‌جات، نابودی همه میکروارگانیسم‌ها و عامل‌های بیماری‌زای ناشی از مواد غذایی، به وجود نیامدن پسماند بعد از اعمال پرتودهی (برخلاف اتیلن اکساید و...)، عدم اثر گذاشتن شرایط محیطی (گرما، فشار و ...) بر کارا بودن پرتودهی، قابل استفاده بودن محصولات بلافاصله بعد از پرتودهی، به‌کارگیری این شیوه برای هر دوی محصولات تازه و منجمد، باعث رادیو اکتیوه شدن کالاها و محصولات پرتودهی شده نمی‌گردد و همین‌طور قابلیت سترون‌سازی و پرتودهی مواد غذایی با بسته‌بندی نهایی اشاره نمود (سازمان بهداشت جهانی، ۱۹۹۸). در این راه محققانی نیز آزمایش‌هایی انجام دادند، الیویرا و همکاران[۴۵۵] (۲۰۱۱) در پژوهشی اثر بکارگیری پرتو گاما را در دزهای صفر، یک و دو کیلوگری بر روی انباربمانی میوه کیوی مورد ارزیابی قرار دادند که نتایج حاصله نشان داد که، پرتودهی گاما با جلوگیری از گسترش بیماری سبب افزایش عمر انبارمانی میوه کیوی گردیده است. یافته‌های علمی در چند دهه اخیر بیان‌گر این موضوع بوده که، یکی از علت‌های زیادی ضایعات کشاورزی، پایین بودن درصد ماده خشک و یا بالا بودن رطوبت موجود در محصولات کشاورزی می باشد، که عمدتا این امر ناشی از استفاده بیش از اندازه کودهای فسفاته، نیتروژنه و رعایت نکردن اصول مصرف بهینه کود می‌باشد (ملکوتی، ۲۰۱۴). در حال حاضر یکی از شیوه‌های کاهش ضایعات و افزایش انباربمانی محصولات کشاورزی، پرتودهی با اشعه است. در آزمایشی که توسط نوری و طوفانیان (۲۰۰۱) با هدف بالا بردن مدت زمان غده‌های سیب زمینی و همینطور پیاز صورت گرفت، و به‌وسیله‌ی پرتو گاما انجام پذیرفت، بیان‌گر این بود که چهار ماه بعد از انبارداری تحت شرایط محیطی، میزان فاسد شدن در پیازهای پرتودهی شده با گاما تا ۱۵ درصد و در نمونه های شاهد تا ۶۴ درصد تنزل پیدا کرده است. لذا بنابر مطالب گفته شده در این تحقیق به دنبال این مساله است که اثر پرتودهی گاما بر ویژگی‌های کیفی و عمر پس از برداشت فلفل دلمه‌ای چگونه است.

۲. مواد و روش‌ها

در این پژوهش به بررسی اثر پرتودهی دزهای مختلف اشعه گاما بر ویژگی‌های کیفی و عمر پس از برداشت فلفل دلمه‌ای پرداخته شد. این پژوهش در سه تکرار و هر تکرار شامل چهار میوه در محل آزمایشگاه‌های گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی در

[452] Stalter, R. and Howath
[453] Sharma& Mishra
[454] Nakanishi
[455] Oliveira

دانشگاه شهرکرد انجام گرفت. میزان دزهای پرتو گاما به منظور پرتودهی میوه‌های فلفل دلمه‌ای در دزهای صفر، ۴۰۰ و ۸۰۰ گری بود. لازم به ذکر است که کلیه شرایط محیطی آزمایشگاه از نظر میزان رطوبت و دمای محل نگهداری نمونه‌های آزمایشی برای کلیه تیمارها به طور یکسان بود. میوه فلفل دلمه‌ای از گلخانه در شهرستان شهرکرد برداشت و در بسته بندی‌های جداگانه بر اساس تعداد نمونه برای هر تیمار بسته‌بندی شده و بلافاصله به مرکز پرتودهی منتقل شد. میوه‌های تیمار کنترل در شرایط مشابه تیمارهای پرتودهی نگهداری شد. پس از تیمار، میوه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد و در یخچال در دمای ۱±۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۹۰٪ نگهداری شد. زمان بندی اجرای آزمایش به صورت مشاهده هفتگی از زمان تیمار تا ۲۸ روز بود و هر هفت روز یکبار بررسی فاکتورهای یاد شده اجرا شد. صفاتی که در این آزمایش مورد بررسی قرار گرفت شامل درصد کاهش وزن، سفتی میوه، درصد میوه‌های پوسیده، مقدار مواد جامد محلول، اسیدیته قابل تیتر، نسبت قند به اسید، مقدار اسیدآسکوربیک، وزن خشک، مقدار فنل‌کل و مقدار کاروتنوئیدها می‌باشند.

۲-۱ رنگ میوه

رنگ میوه با دستگاه رنگ‌سنج پس از بیرون آوردن میوه از یخچال و هم دما شدن با دمای محیط اندازه گیری شد. پارامترهای L*, a* b* اندازه گیری و میانگین آن محاسبه شد.

۲-۲ درصد کاهش وزن میوه

درصد کاهش وزن میوه در فاصله های هفت روزه و به صورت تصادفی از نمونه‌ها به کمک فرمول انجام شد.

٪ کاهش وزن = ۱۰۰/{ (a – b / a) }

a و b به ترتیب وزن اولیه و نهایی میوه در هر دوره است.

۲-۳ درصد پوسیدگی

میزان پوسیدگی ظاهری در طول زمان پنج هفته و برای هر تیمار جداگانه، از فرمول تعداد میوه پوسیده هر تیمار برتعدادکل میوه آن تیمار محاسبه گردید و نتایج به درصد بیان شد.

Decay in cadence (%) = decayed fruits / total fruits × ۱۰۰

۲-۴ سفتی میوه

سفتی میوه‌ها به کمک دستگاه سفتی سنج دستی انجام شد.

۲-۵ آنتوسیانین

برای اندازه‌گیری ترکیبات آنتوسیانینی از دو سیستم بافر (بافر پتاسیم کلرید ۰/۲۵ مولار و بافر سدیم استات ۰/۴ مولار) استفاده شد و جذب آنها به طور جداگانه در طول موج ۵۲۰ و ۷۰۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. نتایج بر حسب میلی گرم سیانیدین ۳-گلیکوزید بر گرم ماده جامد عصاره و بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید.

غلظت رنگ‌دانه آنتوسیانین = A × MW × DF × 1000 / E × L

A = (A520-A700) pH1- (A520-A700) pH4.5

۲-۶ فنل

ارزیابی فنل کل با استفاده از معرف فولین سیوکالتو و استاندارد اسید گالیک انجام شد. در این اندازه‌گیری که بر اساس روش سینگلتون و روسی (۱۹۶۵) صورت گرفت، میزان فنل کل براساس میلی‌گرم اسید گالیک در گرم وزن تر میوه بیان شد.

۲-۷ لایکوپن

ابتدا محلول (وزنی/حجمی) BHT ۰/۰۵ در استون راساخته، سپس پنج گرم از گوشت میوه را در هاون کوبیده و یک گرم از آن را در فالکون ریخته و پنج میلی لیتر از محلول BTH و پنج میلی لیتر اتانول و ۱۰ میلی لیتر هگزان به آن اضافه شد و مخلوط شد سپس سه میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده شد و پس از ۱۰ دقیقه استراحت جذب آن در طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده واز فرمول زیر محاسبه گردید.

Lycopen(mg/kg tissue) = A530 × 31.2 / gr tissue

۲-۸ تعیین pH و اسید قابل تیتر

برای این منظور از هر نمونه تعداد پنج میوه به صورت تصادفی برداشت شد و بوسیله مخلوط‌کن آسیاب شد و از نمونه صاف شده ۱۰ میلی‌لیتر به نسبت ۱/۱۰ تهیه شد و با محلول سود ۰/۱ نرمال تیتر شد و براساس درصد معادل اسید سیتریک محاسبه گردید. میزان pH به کمک دستگاه pH متر مطابق دستورالعمل اندازه گیری شد.

۲-۹ اندازه‌گیری مواد جامد محلول

برای محاسبه (TSS) میزان ترکیبات و مواد جامد محلول از دستگاه رفرکتومتر دیجیتالی استفاده شد. مقداری از آب میوه تهیه شده در مرحله قبل به کار رفت.

۲-۱۰ مقدار آسکوربیک اسید

اندازه گیری براساس روش تیتراسیون با ۲-۶ دی‌کلروفنل ایندوفنل انجام شد (AOAC، ۲۰۰۰).

۲-۱۱ مقدار کاروتنوییدها

مقدار ۰/۵ گرم میوه از مخلوط میوه های تکرار با ۱۰ میلی لیتر استون ۸۰٪ درون هاون چینی ساییده و از کاغذ صافی گذرانده شد. سپس بوسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر خوانده شد و مطابق فرمول مقدار بدست آمد. (هیگبی، ۱۹۶۲).

۲-۱ کاروتنویید (میلی گرم بر گرم) = {وزن اولیه/(جذب در ۴۷۰ × ۱۰۰۰)} × ۱۰۰

پس از جمع آوری داده‌ها، با توجه به اینکه یادداشت‌برداری در فواصل زمانی انجام می‌شود، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها در نرم افزار SPSS ورژن ۲۳ و به روش اندازه‌گیری‌های مکرر (Repeated measures) انجام شد.

۳. نتایج بحث

آزمایش‌ها نشان داد که طی پنج هفته میانگین درصد کاهش وزن میوه و درصد پوسیدگی ظاهری برای دز $۴۰۰GY$ کمترین مقدار و برای دز $۸۰۰GY$ بیشترین مقدار می‌باشند. به همین ترتیب طی ۵ هفته میانگین سفتی بافت برای دز $۴۰۰GY$ کمترین و برای دز شاهد بیشترین، میانگین آنتوسیانین برای دز $۸۰۰GY$ کمترین و برای دز شاهد بیشترین، میانگین فنل برای دز شاهد کمترین و برای دز $۸۰۰GY$ بیشترین، میانگین اسید اسکوربیک برای دز $۸۰۰GY$ کمترین و برای دز شاهد بیشترین، میانگین اسیدیته کل برای دز شاهد کمترین و برای دز $۸۰۰GY$ بیشترین، میانگین اسیدیته قابل تیتر برای دز $۸۰۰GY$ کمترین و برای دز شاهد بیشترین، میانگین لایکوپن، کارتنوئید و مواد جامد محلول برای دز شاهد کمترین و برای دز $۸۰۰GY$ بیشترین، میانگین رنگ بافت (L روشنایی) برای دز $۸۰۰GY$ کمترین و برای دز شاهد بیشترین، میانگین رنگ بافت (a قرمزی) برای دز شاهد کمترین و برای دز $۸۰۰GY$ بیشترین و میانگین رنگ بافت (b زردی) برای دز $۸۰۰GY$ کمترین و برای دز شاهد بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده است. در ادامه به بررسی جداگانه هرکدام از صفات و علل آن می‌پردازیم.

در این بخش ابتدا جدول تحلیل توصیفی یافته های پژوهش بر اساس آماره‌های توصیفی نظیر میانگین و انحراف معیار نشان داده می‌شود و سپس به تحلیل استنباطی داده‌ها بر اساس آزمون LSD می‌پردازیم.

۳-۱ تحلیل توصیفی

جدول ۱: شاخص های توصیفی متغیرهای پژوهش به تفکیک سه دز

متغیر	دز	تعداد	دامنه	حداقل	حداکثر	میانگین	انحراف معیار	واریانس
درصد کاهش وزن میوه	شاهد	۱۵	۷/۴۰	۰	۷/۴	۲/۶۹۲	۲/۶۸۹۹۸	۷/۲۳۶
	$۴۰۰GY$	۱۵	۶	۰	۶	۲/۴۰۸	۲/۱۴۵۰۲	۴/۶۰۱
	$۸۰۰GY$	۱۵	۱۰/۱	۰	۱۰/۱	۳/۶	۳/۴۷۴۱۹	۱۲/۰۷۰
درصد پوسیدگی ظاهری	شاهد	۱۵	۳۶/۶۶	۰	۳۶/۶۶	۱۲/۶۶۴۷	۱۳/۳۴۳۸۸	۱۷۸/۰۵۹
	$۴۰۰GY$	۱۵	۲۶/۶۶	۰	۲۶/۶۶	۷/۳۳۱۳	۹/۲۷۴۱۲	۸۶/۰۰۹

	۸۰۰GY	۱۵	۵۰	۰	۵۰	۱۷/۰۸۶۷	۱۸/۶۵۵۳۵	۳۴۸/۰۲۲
سفتی بافت	شاهد	۱۵	۵/۹	۴/۷	۱۰/۶	۷/۵۲	۲/۴۳۲۸۷	۵/۹۱۹
	۴۰۰GY	۱۵	۴	۵/۳	۹/۳	۷/۴۵۳۳	۱/۵۳۶۶۳	۲/۳۶۱
	۸۰۰GY	۱۵	۲/۷	۳/۸	۶/۵۰	۵/۱۸	۱/۰۳۷۹۹	۱/۰۷۷
آنتوسیانین	شاهد	۱۵	۱۶۶	۲۸۰	۴۴۶	۳۷۹/۹۳۳۳	۶۲/۷۸۲۴۷	۳۹۴۱/۶۳۸
	۴۰۰GY	۱۵	۱۵۴	۲۴۱	۳۹۵	۳۳۶	۶۱/۵۶۶۴۶	۳۷۹۰/۴۲۹
	۸۰۰GY	۱۵	۱۰۱	۲۰۰	۳۰۱	۲۶۳/۸	۳۳/۰۱۷۷۴	۱۰۹۰/۱۷۱
فنل	شاهد	۱۵	۱۲/۹۶	۲۷/۲	۴۰/۱۶	۳۴/۱۹۰۷	۴/۴۶۱۳۴	۱۹/۹۰۴
	۴۰۰GY	۱۵	۱۰/۷۹	۳۳	۴۳/۷۹	۳۶/۶۸۸	۳/۷۵۴۱۸	۱۴/۰۹۴
	۸۰۰GY	۱۵	۱۲/۹۱	۳۵/۲	۴۸/۱۱	۴۲/۲۲۸۷	۴/۵۴۹۸۲	۲۰/۷۰۱
اسید اسکوربیک	شاهد	۱۵	۵۷/۱۰	۹۸/۵۰	۱۵۵/۶۰	۱۲۱/۷۶۱۳	۲۰/۴۹۴	۴۲۰/۰۰۴
	۴۰۰GY	۱۵	۶۵/۱۰	۷۴/۲۰	۱۳۹/۳۰	۱۰۱/۲۷۹۳	۲۳/۵۱۶۲۸	۵۳۳/۰۱۶
	۸۰۰GY	۱۵	۶۲/۸۶	۴۶/۳۴	۱۰۹/۲۰	۷۰/۲۹۰۷	۲۳/۷۹۰۹۸	۵۶۶/۰۱۱
اسیدیته کل	شاهد	۱۵	۰/۲۸	۴/۸۰	۵/۰۸	۵/۰۰۸۰	۰/۰۷۴۳۷	۰/۰۰۶
	۴۰۰GY	۱۵	۰/۲۱	۴/۹۱	۵/۱۲	۵/۰۳۱۳	۰/۰۶۷۱۷	۰/۰۰۵
	۸۰۰GY	۱۵	۰/۱۶	۵/۰۲	۵/۱۸	۵/۱۱۶۰	۰/۰۴۹۱۱	۰/۰۰۲
اسیدیته قابل تیتر	شاهد	۱۵	۰/۶۴	۰/۹۸	۱/۶۲	۱/۲۲۲۰	۰/۲۲۰۹۵	۰/۰۴۹
	۴۰۰GY	۱۵	۰/۴۷	۱/۰۳	۱/۵۰	۱/۱۹۸۰	۰/۱۶۲۳۶	۰/۰۲۶
	۸۰۰GY	۱۵	۰/۴۳	۰/۸۷	۱/۳۰	۱/۰۵۶۰	۰/۱۳۷۶۲	۰/۰۱۹
لایکوپن	شاهد	۱۵	۶۹/۵۰	۴۲/۸۰	۱۱۲/۳۰	۸۳/۶۶	۲۵/۶۲۴۳۴	۶۵۶/۶۰۷
	۴۰۰GY	۱۵	۵۸/۸۰	۸۷/۴۰	۱۴۶/۲۰	۱۱۹/۳	۲۲/۰۰۴۲۲	۴۸۴/۱۸۶
	۸۰۰GY	۱۵	۵۵/۱۰	۱۱۸/۲	۱۷۳/۳۰	۱۴۶/۹۰۶۷	۲۰/۶۲۱۳۹	۴۲۸/۱۳۴
کارتنوئید	شاهد	۱۵	۴/۲۴	۳/۳۹	۷/۶۳	۵/۹۵۰۷	۱/۴۶۰۲۴	۲/۱۳۲
	۴۰۰GY	۱۵	۵/۶۱	۵/۷۱	۱۱/۳۲	۸/۹۹۸۰	۱/۹۹۴۷۲	۳/۹۷۹
	۸۰۰GY	۱۵	۶/۸۵	۶/۰۶	۱۲/۹۱	۹/۹۲۹۳	۲/۳۴۳۵۰	۵/۴۹۲
مواد جامد محلول	شاهد	۱۵	۱	۵/۱	۶/۱	۵/۵۶۶۷	۰/۳۴۷۷۸	۰/۱۲۱
	۴۰۰GY	۱۵	۱/۲	۵/۲۰	۶/۴	۵/۸۶	۰/۳۷۱۸۷	۰/۱۳۸
	۸۰۰GY	۱۵	۱/۷۰	۵/۶۰	۷/۳۰	۶/۳۸	۰/۵۸۵۷۸	۰/۳۴۳
رنگ بافت (L روشنایی)	شاهد	۱۵	۱۷/۷۴	۴۸/۵۶	۶۶/۳۰	۵۶/۱۹۶۷	۶/۱۵۳۶۹	۳۷/۸۶۸
	۴۰۰GY	۱۵	۱۳	۵۰/۱۰	۶۳/۱۰	۵۵/۴۱۶۷	۴/۰۷۳۴۶	۱۶/۵۹۳
	۸۰۰GY	۱۵	۱۵/۹۹	۴۳/۱۱	۵۹/۱۰	۵۰/۷۸۲۷	۵/۴۰۱۳۴	۲۹/۱۷۴
رنگ بافت (A قرمزی)	شاهد	۱۵	۲۰/۳۰	۳۸/۱۰	۵۸/۴۰	۴۸/۷۳۷۳	۶/۷۴۷۸۸	۴۵/۵۳۴
	۴۰۰GY	۱۵	۱۸	۴۰	۵۸	۵۰/۲۶۸۰	۵/۷۹۵۰۹	۳۳/۵۸۳
	۸۰۰GY	۱۵	۱۹/۰۲	۴۲/۴۰	۶۱/۴۲	۵۲/۹۶۶۷	۶/۳۳۷۱۶	۴۰/۱۶۰
رنگ بافت (B زردی)	شاهد	۱۵	۲۰/۶۶	۲۷/۴۴	۴۸/۱۰	۳۶/۶۸۱۳	۷/۲۲۰۳۵	۵۲/۱۳۳
	۴۰۰GY	۱۵	۱۳/۶۴	۳۱/۱۶	۴۴/۸۰	۳۶/۳۳۶۷	۴/۶۲۴۹۸	۲۱/۳۹۰
	۸۰۰GY	۱۵	۱۷/۹۰	۲۵/۳۰	۴۳/۲۰	۳۲/۵۶۴۷	۵/۴۵۱۷۲	۲۹/۷۲۱

.

۳-۲ تحلیل استنباطی

۳-۲-۱ پرتودهی گاما بر درصد کاهش وزن میوه موثر است.

جدول ۲: مقایسه میانگین درصد کاهش وزن میوه به تفکیک سه دز بر اساس آزمون *LSD*

دوز اول	دوز دوم	اختلاف میانگین	خطای استاندارد	سطح معناداری	فاصله اطمینان ۹۵٪ برای اختلاف میانگین	
					حد پایین	حد بالا
شاهد	۴۰۰GY	۰/۲۸۴	۰/۴۸۳	۰/۵۶۱	-۰/۷۰۲	۱/۲۷۰
	۸۰۰GY	-۰/۹۰۸	۰/۴۸۳	۰/۰۷۰	-۱/۸۹۴	۰/۰۷۸
۴۰۰GY	۸۰۰GY	-۰/۱۹۲*	۰/۴۸۳	۰/۰۱۹	-۲/۱۷۸	-۰/۲۰۶

*: در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.

با توجه به جدول ۲ بر اساس آزمون تعقیبی *LSD* و سطح خطای پنج درصد بین میانگین درصد کاهش وزن میوه دز شاهد و ۴۰۰*GY* اختلاف معناداری وجود ندارد (سطح معناداری برابر ۰/۵۶۱ و بیشتر از ۰/۰۵ است). به همین ترتیب بین میانگین درصد کاهش وزن میوه دز شاهد و ۸۰۰*GY* نیز تفاوت معناداری نیست. (سطح معنی‌داری برابر ۰/۰۷۰). اما چون سطح معنی‌داری آزمون تفاوت بین دزهای ۴۰۰*GY* و ۸۰۰*GY* کمتر از خطای ۰/۰۵ است پس اختلاف بین میانگین این دو دز معنی‌دار است. همچنین با توجه به فاصله اطمینان ۹۵ درصدی و یا اختلاف میانگین (که همگی مقادیر منفی هستند) ملاحظه می‌شود که میانگین درصد کاهش وزن میوه برای دز ۴۰۰*GY* کمتر از ۸۰۰*GY* می‌باشد. افزایش در افت وزن می‌تواند ناشی از افزایش تعرق و تنفس میوه در دوره انبارداری و همچنین مصرف ترکیبات کربوهیدراتی، اسیدها و قندها باشد. از فاکتورهای مهم افت وزن در طی پرتودهی از بین رفتن مولکول‌های آب و جذب امواج و انرژی توسط مولکول‌هاست.

۲-۲-۳ پرتودهی گاما بر درصد پوسیدگی ظاهری موثر است.

جدول ۳: مقایسه میانگین درصد پوسیدگی ظاهری به تفکیک سه دز بر اساس آزمون *LSD*

دوز اول	دوز دوم	اختلاف میانگین	خطای استاندارد	سطح معناداری	فاصله اطمینان ۹۵٪ برای اختلاف میانگین	
					حد پایین	حد بالا
شاهد	۴۰۰*GY*	۵/۳۳۳*	۱/۷۲۷	۰/۰۰۴	۱/۸۰۶	۸/۸۶۰
	۸۰۰*GY*	-۴/۴۲۲*	۱/۷۲۷	۰/۰۱۶	-۷/۹۴۹	-۰/۸۹۵
۴۰۰*GY*	۸۰۰*GY*	-۹/۷۵۵*	۱/۷۲۷	۰/۰۰۱	-۱۳/۲۸۲	-۶/۲۲۸

*: در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.

با توجه به جدول ۳ بر اساس آزمون تعقیبی *LSD* و سطح خطای پنج درصد میانگین دز شاهد بیش از ۴۰۰*GY* می‌باشد. به همین ترتیب بین میانگین درصد پوسیدگی ظاهری دز شاهد و ۸۰۰*GY* و همچنین بین دزهای ۴۰۰*GY* و ۸۰۰*GY* نیز اختلاف معنی‌دار است و در هر دو مقایسه میانگین دز ۸۰۰*GY* بیشتر است. افزایش پوسیدگی در دز بالا می‌تواند به علت تخریب دیواره سلولی و بافت میوه رخ دهد و نقاط صدمه دیده مکان مناسبی برای تجمع عوامل بیماری‌زا می‌شود و درنتیجه افزایش فعالیت میکروارگانیسم‌ها اتفاق میافتد و دز پایین احتمالاً توانایی پاکسازی مناسب میکروارگانیسم‌ها را از طریق صدمه به DNA آن‌ها و غیرفعال کردن آن‌ها داشته و درنتیجه کاهش پوسیدگی اتفاق افتاده است.

۳-۲-۳ پرتودهی گاما بر سفتی بافت موثر است.

جدول ۴: مقایسه میانگین سفتی بافت به تفکیک سه دز بر اساس آزمون *LSD*

دوز اول	دوز دوم	اختلاف میانگین	خطای استاندارد	سطح معناداری	فاصله اطمینان ۹۵٪ برای اختلاف میانگین	
					حد پایین	حد بالا
شاهد	۴۰۰*GY*	۰/۰۶۷	۰/۰۵۲	۰/۲۰۹	-۰/۰۳۹	۰/۱۷۳
	۸۰۰*GY*	۲/۳۴۰*	۰/۰۵۲	۰/۰۰۱	۲/۲۳۴	۲/۴۴۶
۴۰۰*GY*	۸۰۰*GY*	۲/۲۷۳*	۰/۰۵۲	۰/۰۰۱	۲/۱۶۷	۲/۳۷۹

*: در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.

با توجه به جدول ۴ در سطح خطای پنج درصد بین میانگین سفتی بافت دز شاهد و ۴۰۰*GY* اختلاف معناداری وجود ندارد اما بین میانگین سفتی بافت دز شاهد و ۸۰۰*GY* و همچنین بین دزهای ۴۰۰*GY* و ۸۰۰*GY* اختلاف معنی‌دار است. نرم شدن بافت میوه در زمان رسیدن نتیجه تجزیه پلی ساکاریدهای دیواره سلولی می‌باشد. پلی ساکاریدهای دیواره سلولی براثر فعالیت آنزیم‌های هیدرولیز کننده پکتین متیل استراز، پلی گالاکتروناز و سلولاز تجزیه می‌شوند و با افزایش مدت زمان ذخیره‌سازی بافت میوه افت پیدا می‌کند.

۴-۲-۳ پرتودهی گاما بر آنتوسیانین موثر است.

جدول ۵: مقایسه میانگین آنتوسیانین به تفکیک سه دز بر اساس آزمون *LSD*

دوز اول	دوز دوم	اختلاف میانگین	خطای استاندارد	سطح معناداری	فاصله اطمینان ۹۵٪ برای اختلاف میانگین	
					حد پایین	حد بالا
شاهد	۴۰۰GY	۴۳/۹۳۳*	۱/۹۷۴	۰/۰۰۱	۳۹/۹۰۲	۴۷/۹۶۵
	۸۰۰GY	۱۶۶/۱۳۳*	۱/۹۷۴	۰/۰۰۱	۱۱۲/۱۰۲	۱۲۰/۱۶۵
۴۰۰GY	800GY	۷۲/۲۰۰*	۱/۹۷۴	۰/۰۰۱	۶۸/۱۶۹	۷۶/۲۳۱

*: در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.

با توجه به جدول ۵ میانگین دز شاهد به‌طور معنی‌داری بیش از ۴۰۰GY می‌باشد. به همین ترتیب بین میانگین آنتوسیانین دز شاهد و ۸۰۰GY و همچنین بین دزهای ۴۰۰GY و ۸۰۰GY نیز اختلاف معنی‌دار است. افزایش سنتز آنتوسیانین پس از برداشت میوه‌ها به فعالیت آنزیم‌هایی چون فنل آلانین آمونیلاز (PAL) ارتباط دارد که در طی انبارداری افزایش می‌یابد.

۵-۲-۳ پرتودهی گاما بر فنل موثر است.

جدول ۶: مقایسه میانگین فنل به تفکیک سه دز بر اساس آزمون *LSD*

دوز اول	دوز دوم	اختلاف میانگین	خطای استاندارد	سطح معناداری	فاصله اطمینان ۹۵٪ برای اختلاف میانگین	
					حد پایین	حد بالا
شاهد	۴۰۰GY	-۴/۴۹۷*	۰/۱۵۲	۰/۰۰۱	-۴/۸۰۸	-۴/۱۸۷
	۸۰۰GY	-۸/۰۳۸*	۰/۱۵۲	۰/۰۰۱	-۸/۳۴۸	-۷/۷۲۸
۴۰۰GY	۸۰۰GY	-۳/۵۴۱*	۰/۱۵۲	۰/۰۰۱	-۳/۸۵۱	-۳/۲۳۰

*: در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.

با توجه به جدول ۶ بر اساس آزمون تعقیبی *LSD* و سطح خطای پنج درصد میانگین دز ۴۰۰GY بیش از شاهد می‌باشد. به همین ترتیب بین میانگین فنل دز شاهد و ۸۰۰GY و همچنین بین دزهای ۴۰۰GY و ۸۰۰GY نیز اختلاف معنی‌دار است و در هر دو مقایسه میانگین دز ۸۰۰GY بیشتر است. افزایش فنل کل در هنگام رسیدن مربوط به تبدیل فلاونوئیدها به ترکیبات کوچکتر یا همان ترکیبات فنول‌های ثانویه می‌باشد.

۶-۲-۳ پرتودهی گاما بر اسید اسکوربیک موثر است.

جدول ۷: مقایسه میانگین اسید اسکوربیک به تفکیک سه دز بر اساس آزمون *LSD*

دوز اول	دوز دوم	اختلاف میانگین	خطای استاندارد	سطح معناداری	فاصله اطمینان ۹۵٪ برای اختلاف میانگین	
					حد پایین	حد بالا
شاهد	۴۰۰GY	۲۰/۴۸۲*	۰/۵۱۰	۰/۰۰۱	۱۹/۴۴۰	۲۱/۵۲۴
	۸۰۰GY	۵۱/۴۷۱*	۰/۵۱۰	۰/۰۰۱	۵۰/۴۲۹	۵۲/۵۱۲
۴۰۰GY	۸۰۰GY	۳۰/۹۸۹*	۰۰/۵۱۰	۰/۰۰۱	۲۹/۹۴۷	۳۲/۰۳۰

*: در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.

با توجه به جدول ۷ میانگین دز شاهد به‌طور معنی‌داری بیش از ۴۰۰GY می‌باشد. به همین ترتیب بین میانگین اسید اسکوربیک دز شاهد و ۸۰۰GY و همچنین بین دزهای ۴۰۰GY و ۸۰۰GY نیز اختلاف معنی‌دار است. در طول دوره انبارداری، نمونه‌های پرتودهی شده میزان اسید اسکوربیک کمتری نسبت به شاهد دارند. پرتودهی می‌تواند تبدیل AA به DHA را تسریع کند و شکلی از اسید اسکوربیک که دارای فعالیت بیشتری است را به فرم DHA اکسید کند. استنباط می‌شود که کم شدن اسید اسکوربیک بیشتر به دلیل ذخیره‌سازی است تا پرتودهی و در طول انبارداری به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش اتفاق میافتد.

۷-۲-۳ پرتودهی گاما بر اسیدیته کل موثر است.

جدول ۸: مقایسه میانگین اسیدیته کل به تفکیک سه دز بر اساس آزمون *LSD*

دوز اول	دوز دوم	اختلاف میانگین	خطای استاندارد	سطح معناداری	فاصله اطمینان ۹۵٪ برای اختلاف میانگین	
					حد پایین	حد بالا

شاهد	۴۰۰GY	-۰/۰۲۳	۰/۰۱۲	۰/۰۵۴	-۰/۰۴۷	۰/۰۰۰
	۸۰۰GY	-۰/۱۰۸*	۰/۰۱۲	۰۰/۰۰۱	-۰/۱۳۲	-۰/۰۸۴
۴۰۰GY	۸۰۰GY	-۰/۰۸۵۵*	۰/۰۱۲	۰/۰۰۱	-۰/۱۰۸	-۰/۰۶۱

*: در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.

با توجه به جدول ۸ بر اساس آزمون تعقیبی *LSD* و سطح خطای پنج درصد بین میانگین اسیدیته کل دز شاهد و ۴۰۰*GY* اختلاف معناداری وجود ندارد (سطح معناداری برابر ۰/۰۵۴ و بیش از ۰/۰۵ است) اما بین میانگین اسیدیته کل دز شاهد و ۸۰۰*GY* و همچنین بین دزهای ۴۰۰*GY* و ۸۰۰*GY* اختلاف معنی‌دار است و در هر دو مقایسه میانگین دز ۸۰۰*GY* بیشتر است. تغییرات مشاهده شده در اسیدیته کل احتمالاً به دلیل شکستن کربوهیدرات‌ها و مواد پکتینی هیدرولیز پروتئین و تجزیه گلیکوساکاریدها به واحدهای سازنده در طی فرآیند تنفس می‌باشد.

۳-۲-۸ پرتودهی گاما بر اسیدیته قابل تیتر موثر است.

جدول ۹: مقایسه میانگین اسیدیته قابل تیتر به تفکیک سه دز بر اساس آزمون *LSD*

دوز اول	دوز دوم	اختلاف میانگین	خطای استاندارد	سطح معناداری	فاصله اطمینان ۹۵٪ برای اختلاف میانگین	
					حد پایین	حد بالا
شاهد	۴۰۰GY	۰/۰۲۴*	۰/۰۱۰	۰/۰۲۷	۰/۰۰۳	۰/۰۴۵
	۸۰۰GY	۰/۱۶۶*	۰/۰۱۰	۰/۰۰۱	۰/۱۴۵	۰/۱۸۷
۴۰۰GY	۸۰۰GY	۰/۱۴۲*	۰/۰۱۰	۰/۰۰۱	۰/۱۲۱	۰/۱۶۳

*: در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.

با توجه به جدول ۹ میانگین اسیدیته قابل تیتر دز ۴۰۰*GY* به‌طور معنی‌داری بیشتر از دز شاهد است. به همین ترتیب بین میانگین اسیدیته قابل تیتر دز شاهد و ۸۰۰*GY* و همچنین بین دزهای ۴۰۰*GY* و ۸۰۰*GY* نیز اختلاف معنی‌دار است. تغییرات مشاهده شده در اسیدیته قابل تیتر احتمالاً به دلیل شکستن کربوهیدرات‌ها و مواد پکتینی هیدرولیز پروتئین و تجزیه گلیکوساکاریدها به واحدهای سازنده در طی فرآیند تنفس می‌باشد و از آنجایی که اسیدهای آلی به‌عنوان سوبسترا برای واکنش-های آنزیمی تنفس استفاده می‌شوند طی دوره پس از برداشت کاهش پیدا می‌کنند.

۳-۲-۹ پرتودهی گاما بر لایکوپن موثر است.

جدول ۱۰: مقایسه میانگین لایکوپن به تفکیک سه دز بر اساس آزمون *LSD*

دوز اول	دوز دوم	اختلاف میانگین	خطای استاندارد	سطح معناداری	فاصله اطمینان ۹۵٪ برای اختلاف میانگین	
					حد پایین	حد بالا
شاهد	۴۰۰GY	-۳۵/۶۴۰*	۰/۱۷۱	۰/۰۰۱	-۳۵/۹۸۹	-۳۵/۲۹۱
	۸۰۰GY	-۶۳/۲۴۷*	۰/۱۷۱	۰/۰۰۱	-۶۳/۵۹۶	-۶۲/۸۹۷
۴۰۰GY	۸۰۰GY	-۲۷/۶۰۷*	۰/۱۷۱	۰/۰۰۱	-۲۷/۹۵۶	-۲۷/۲۵۷

*: در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.

بر اساس اطلاعات جدول ۱۰ بر اساس آزمون تعقیبی *LSD* و سطح خطای پنج درصد میانگین لایکوپن دز ۴۰۰*GY* بیشتر از دز شاهد است. به همین ترتیب بین میانگین لایکوپن دز شاهد و ۸۰۰ *GY* و همچنین بین دزهای ۴۰۰*GY* و ۸۰۰*GY* نیز اختلاف معنی‌دار است. افزایش میزان لایکوپن احتمالاً به دلیل فعالسازی آنزیم‌هایی است که با تخریب دیواره سلولی لایکوپن را در معرض اکسیدان‌ها قرار می‌دهند. و سبب افزایش مقدار لایکوپن می‌شوند.

۳-۲-۱۰ پرتودهی گاما بر کارتنوئید موثر است.

جدول ۱۱:مقایسه میانگین کارتنوئید به تفکیک سه دز بر اساس آزمون *LSD*

دوز اول	دوز دوم	اختلاف میانگین	خطای استاندارد	سطح معناداری	فاصله اطمینان ۹۵٪ برای اختلاف میانگین	
					حد پایین	حد بالا
	۴۰۰GY	-۳/۰۴۷*	۰/۰۴۱	۰/۰۰۱	-۳/۱۳۲	-۲/۹۶۳

شاهد	۸۰۰GY	-۳/۹۷۹*	۰/۰۴۱	۰/۰۰۱	-۴/۰۶۳	-۳/۸۹۴
۴۰۰GY	۸۰۰GY	-۰/۹۳۱*	۰/۰۴۱	/	-۱/۰۱۶	-۰/۸۴۷

*: در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.

بر اساس اطلاعات جدول ۱۱ میانگین کارتنوئید در ۴۰۰GY بیشتر از دز شاهد است. به همین ترتیب بین میانگین کارتنوئید در شاهد و ۸۰۰GY و همچنین بین دزهای ۴۰۰GY و ۸۰۰GY نیز اختلاف معنی‌دار است. افزایش میزان کارتنوئید احتمالاً به دلیل فعال‌سازی آنزیم‌هایی است که با تخریب دیواره سلولی کارتنوئید را در معرض اکسیدان‌ها قرار می‌دهند و سبب افزایش کارتنوئید می‌شوند.

۳-۲-۱۱ پرتودهی گاما بر مواد جامد محلول موثر است.

جدول ۱۲: مقایسه میانگین مواد جامد محلول به تفکیک سه دز بر اساس آزمون *LSD*

دز اول	دز دوم	اختلاف میانگین	خطای استاندارد	سطح معناداری	فاصله اطمینان ۹۵٪ برای اختلاف میانگین	
					حد پایین	حد بالا
شاهد	۴۰۰GY	-۰/۲۹۳*	۰/۰۳۱	۰/۰۰۱	-۰/۳۵۶	-۰/۲۳۰
	۸۰۰GY	-۰/۸۱۳*	۰/۰۳۱	۰/۰۰۱	-۰/۸۷۶	-۰/۷۵۰
۴۰۰GY	۸۰۰GY	-۰/۵۲۰*	۰/۰۳۱	۰/۰۰۱	-۰/۵۸۳	-۰/۴۵۷

*: در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.

با توجه به جدول ۱۲ بر اساس آزمون تعقیبی *LSD* و سطح خطای پنج درصد بین میانگین مواد جامد محلول دز شاهد و ۴۰۰GY اختلاف معناداری وجود دارد (سطح معناداری برابر ۰/۰۰۱ و کمتر از ۰/۰۵ است) و میانگین دز ۴۰۰GY بیشتر است. به همین ترتیب بین میانگین مواد جامد محلول دز شاهد و ۸۰۰GY و همچنین بین دزهای ۴۰۰GY و ۸۰۰GY نیز اختلاف معنی‌دار است. افزایش در محتوای مواد جامد محلول در مدت زمان نگهداری به دلیل تبدیل نشاسته به قندهای محلول نیست بلکه به دلیل هضم شدن پلی ساکاریدهای دیواره‌های سلولی و تبدیل اسیدهای آلی به قندهاست.

۳-۲-۱۲ پرتودهی گاما بر رنگ بافت (L روشنایی) موثر است.

جدول ۱۳: مقایسه میانگین رنگ بافت (L روشنایی) به تفکیک سه دز بر اساس آزمون *LSD*

دز اول	دز دوم	اختلاف میانگین	خطای استاندارد	سطح معناداری	فاصله اطمینان ۹۵٪ برای اختلاف میانگین	
					حد پایین	حد بالا
شاهد	۴۰۰GY	۰/۷۸۰*	۰/۲۶۵	۰/۰۰۶	۰/۲۳۹	۱/۳۲۱
	۸۰۰GY	۵/۴۱۴*	۰/۲۶۵	۰/۰۰۱	۴/۸۷۳	۵/۹۵۵
۴۰۰GY	۸۰۰GY	۴/۶۳۴*	۰/۲۶۵	۰/۰۰۱	۴/۰۹۳	۵/۱۷۵

*: در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.

با توجه به جدول ۱۳ میانگین رنگ بافت (L روشنایی) دز شاهد بیشتر از دز ۴۰۰GY است. به همین ترتیب بین میانگین رنگ بافت (L روشنایی) دز شاهد و ۸۰۰GY و همچنین بین دزهای ۴۰۰GY و ۸۰۰GY نیز اختلاف معنی‌دار است. L* نماد روشنایی و تیرگی رنگ می‌باشد که از صفر برای سیاه تا ۱۰۰ برای روشنایی تعریف شده است.

۳-۲-۱۳ پرتودهی گاما بر رنگ بافت (a قرمزی) موثر است.

جدول ۱۴: مقایسه میانگین رنگ بافت (a قرمزی) به تفکیک سه دز بر اساس آزمون *LSD*

دز اول	دز دوم	اختلاف میانگین	خطای استاندارد	سطح معناداری	فاصله اطمینان ۹۵٪ برای اختلاف میانگین	
					حد پایین	حد بالا
شاهد	۴۰۰GY	-۱/۵۳۱*	۰/۳۰۲	۰/۰۰۱	-۲/۱۴۷	-۰/۹۱۴
	۸۰۰GY	-۴/۲۲۹*	۰/۳۰۲	۰/۰۰۱	-۴/۸۴۶	-۳/۶۱۳
۴۰۰GY	۸۰۰GY	-۲/۶۹۹*	۰/۳۰۲	۰/۰۰۱	-۳/۳۱۵	-۲/۰۸۲

*: در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.

با توجه به جدول ۱۴ بر اساس آزمون تعقیبی *LSD* و سطح خطای پنج درصد بین میانگین رنگ بافت (a قرمزی) دز شاهد و ۴۰۰*GY* اختلاف معناداری وجود دارد (سطح معناداری برابر ۰/۰۰۱ و کمتر از ۰/۰۵ است) و میانگین دز ۴۰۰*GY* بیشتر است. به همین ترتیب بین میانگین رنگ بافت (a قرمزی) دز شاهد و ۸۰۰*GY* و همچنین بین دزهای ۴۰۰*GY* و ۸۰۰*GY* نیز اختلاف معنی‌دار است. *a نماد سبزی تا قرمزی رنگ بافت است که از ۶۰- برای سبز تا ۶۰+ برای رنگ قرمز می‌باشد.

۱۴-۲-۳ پرتودهی گاما بر رنگ بافت (b زردی) موثر است.

جدول ۱۵: مقایسه میانگین رنگ بافت (**b** زردی) به تفکیک سه دز بر اساس آزمون *LSD*

K دز اول	دز دوم	اختلاف میانگین	خطای استاندارد	سطح معناداری	فاصله اطمینان ۹۵٪ برای اختلاف میانگین	
					حد پایین	حد بالا
شاهد	۴۰۰*GY*	۰/۳۴۵	۰/۳۲۰	۰/۲۹۱	-۰/۳۱۰	۰/۹۹۹
	۸۰۰*GY*	۴/۱۱۷*	۰/۳۲۰	۰/۰۰۱	۳/۴۶۲	۴/۷۷۱
۴۰۰*GY*	۸۰۰*GY*	۳/۷۲۲*	۰/۳۲۰	۰/۰۰۱	۳/۱۱۸	۴/۴۲۶

*: در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.

با توجه به جدول ۱۵ بر اساس آزمون تعقیبی *LSD* و سطح خطای پنج درصد بین میانگین رنگ بافت (b زردی) دز شاهد و ۴۰۰*GY* اختلاف معناداری وجود ندارد (سطح معناداری برابر ۰/۲۹۱ و بیش از ۰/۰۵ است). اما بین میانگین رنگ بافت (b زردی) دز شاهد و ۸۰۰*GY* و همچنین بین دزهای ۴۰۰*GY* و ۸۰۰*GY* اختلاف معنی‌دار است. *b شاخصی برای رنگ آبی تا زرد می‌باشد که از ۶۰- برای رنگ آبی تا ۶۰+ برای رنگ زرد می‌باشد.

۴.نتیجه‌گیری

از آنجایی که کیفیت ظاهری و صفات کیفی محصولات کشاورزی بارزترین شاخص برای مصرف کننده و بازارپسندی می‌باشد، لذا هر عاملی که سرعت پیری را کاهش بدهد و از رشد عوامل پوسیدگی جلوگیری کند، باعث حفظ وضعیت ظاهری و بازارپسندی محصول می‌گردد. هرگونه نقصان در صفات کیفی و ظاهر محصولات ازقبیل پوسیدگی، نرمی، رنگ پریدگی، ترک خوردگی و... باعث کاهش شدید ارزش اقتصادی محصول و بازارپسندی می‌گردد. درطی فرآیند انبارداری و با گذشت زمان و افزایش این مدت خصوصیات کیفی محصولات کاهش پیدا میکند، و با افزایش این مدت میزان اسید اسکوربیک، آنتوسیانین، سفتی میوه بخصوص در دوز ۸۰۰ گری کاهش پیدا کرد. استفاده از پرتو گاما بر روی صفات کیفی فلفل دلمه‌ای موثر واقع شد بخصوص در دوز ۴۰۰ گری که با ممانعت از شیوع وگسترش پاتوژن ها مثل قارچها و باکتری‌ها و میکروب‌ها باعث شد که پوسیدگی به طور موثری کاهش پیدا کند وکیفیت محصول حفظ گردد که درنتیجه آن بازارپسندی و رضایت مشتری فراهم شود، این نکته نیز باید مورد توجه گیرد که استفاده از پرتو گاما علاوه بر تاثیرات مثبت می‌تواند تاثیرات منفی نیز داشته باشد و باید در مناسب طی آزمایشات مختلف انتخاب شود، دز بالاتر (۸۰۰گری) در این آزمایش باعث افزایش و شیوع عوامل و پاتوژن‌های بیماری‌زا و نرمی و فساد گردید که می‌تواند به علت تخریب ترکیبات پکتینی موجود در اگزالات باشد، بنابراین دز مناسب برای محصولات ورقم‌های مختلف متفاوت می‌باشد و باید طی آزمایشات مختلف مشخص گردد و هنوز می‌طلبد تا آزمایشات و بررسی‌های بیشتری روی محصولات مختلف انجام شود، از آنجایی که تیمار با اشعه گاما اثر بسیار خوبی بر حفظ طراوت و شادابی و از بین بردن عوامل بیماری‌زا دارد و خواص غذایی را نیز در محصول تقریبا حفظ می‌کند و از طرفی امروزه در دسترس می‌باشد و هزینه بسیار کمتری از لحاظ اقتصادی بر تولید کننده یا صادر کننده محصولات مختلف نسبت به بقیه شیوه‌ها تحمیل می‌کند بنابراین نسبت به شیوه‌های دیگر مناسب‌تر می‌باشد.

منابع

۱. اشکبوس اصفهانی، ج.، احسانپور، ع. و عبدی، م(۱۳۹۹). اثر تابش نوترون بر برخی از پارامترهای رشد گیاه یونجه (Medicage Sativa).مجله علوم پایه دانشگاهی آزاد اسلامی (JSIAU).شماره ۶۶

۲. برزوئی، ا. و مجدآبادی، ع(۱۳۹۷). اثر پرتوهای گاما بر برخی مکانیسم های بیوشیمیایی دو ژنوتیپ گندم (Triticum astivumدر شرایط گلخانه. علوم و فنون کشت های گلخانه ای، سال دوم،

۳. ملا، ب. (۱۳۹۶). اثرات پرتودهی و تاثیر آن بر ترکیبات مواد غذایی. اولین همایش ملی تکنولوژی نوین در علوم و صنایع غذایی و گردشگری ایران. بابلسر

4. Stalter, R. and Howath, D(2018). Gamma Radiation. St. Johns university USA, www.intechopen.com
5. Sharma, B. and Mishra, K. 2017. Micro-mutations for fruit number, fruit length and fruit yield characters in gamma-irradiated generation of ANKUR-40 variety of okra [Abelmoschus esculentus (L.) Monech). Int. J. Plant Sci. Muzaffarnagar, 2(2): 208-211.
6. Nakanishi, T.M(2017). Application of Neutron Radiography to plant research Radiosotopes. 46, 579.
7. Oliveira, A. C., Silva, L. C., Oliveira, M., Modolo, S. and Arthur, D. (2011). Evaluation of gamma radiation of minimally processed kiwifruit. Internathional Meeting on Radiation Processing. Montreal. 189 p.
8. Johnson, W. J., Shannon J., Glenn, R. S. and Bruce, B. 2019. Psychology in Extremis: Preventing Problems of Professional Competence in Dangerous Practice Settings. American Psychological Association.42, 94-104
9. Malakouti, M. J. (2014). The proper of fertilizer for crops in Iran: Determine the amount, type and timing of fertilizer to the relative self-sufficiency, social food security and increase farmers' in come. Khaneye Keshavarz. Moballaghane Publisher. 101: 330
10. Nouri, J. and Toofanian, F. (2001). Extension of storage of onions and potatoes by gamma irradiation. Pakistan Journal of Biological Sciences. 4: 1275-1278.

Investigate the effectiveness of pure and nanoencapsulated Froriepia subpinnata extract on oxidative stability of sesam oil

Mina sanati[1*]; Reza akbari[2]; Akram taleghani[3]; S. Zahra Sayyed−Alangi[4] ; Majid Mokaber Esfahani[5]

1- MSc. Student, Faculty of Science, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavus, Iran

2-Assistant Professor of Chemistry, Faculty of Science, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavus, Iran

۳-Assistant Professor of Chemistry, Faculty of Science, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavus, Iran

٤-Associate Professor of Chemistry, Faculty of Science, Islamic Azad University,Azadshahr, Iran

٥-Assistant Professor of Chemistry, Faculty of Science, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavus, Iran

Mina_sanati3@yahoo.com

Abstract

Nowadays, due to the negative effects of synthetic antioxidants, the tendency to use natural antioxidants is increasing. Froriepia subpinnata is a plant of the Umbelliferae family. F. subpinnata extract contains significant amounts of phenols, flavonoids, carotenoids with high antioxidant properties. In this study, the antioxidant activity of pure and nanorized extracts of F. subpinnata in stabilizing sesame oil, as well as comparing their effect with synthetic antioxidant BHT during a 20-day storage period was investigated. For this purpose, first the extract of F. subpinnata plant was extracted using water, ethanol, methanol, hexane, ethyl acetate solvents by ultrasound method. Examination of phenolic compounds and antioxidant activity through free radical scavenging of DPPH revealed that methanolic extract had the highest antioxidant activity among the extracts. Then, methanolic extract of F. subpinnata was formed into nanoemulsion using 6 different formulations containing different ratios of oil, lecithin and extract. Creamy index and encapsulation efficiency showed that formulation with No. 4 led to the production of the best nanoemulsion and subsequent experiments were performed using this formulation. The results of Particle size determination showed that particle size was in the range of 364.4 nm, zeta potential of the sample was in the range of -32.6 mV and particle size distribution was in the range of 0.308. Then, different concentrations (300,200,100 ppm) of pure and encapsulated extract of F. subpinnata were added to sesame oil to delay oxidative damage and oxidative stability was measured at 4-day intervals for 20 days by peroxide and thiobarbituric indices. The results showed that the blank sample had the highest rate of oil oxidation and the lowest oxidation rate was related to the BHT-200 sample (BHT synthetic antioxidant at 200 concentration) and then related to
LNL-1-300 sample (encapsulated F. subpinnata extract at a concentration of 300)

Keywords: Antioxidant, *F. subpinnata*, microencapsulation , Sesame oil

بررسی تاثیر عصاره نانو ریزپوشانی شده و آزاد اناریجه در کنترل اکسایشی روغن کنجد

مینا صنعتی[1*]؛ رضا اکبری [2]؛ اکرم طالقانی [3]؛ زهرا سیدالنگی [4] ؛ مجید مکبراصفهانی [5]

۱-دانشجو ، گروه شیمی ، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبدکاووس

۲- استادیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبدکاووس

۳- استادیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبدکاووس

۴- دانشیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد آزادشهر

۵- استادیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبدکاووس

Mina_sanati3@yahoo.com

چکیده

امروزه به علت اثرات منفی آنتی اکسیدان‌های مصنوعی، تمایل به استفاده از آنتی اکسیدان‌های طبیعی روبه افزایش است. اناریجه با نام علمی (*Froriepia subpinnata*) گیاهی از خانواده چتریان است. عصاره اناریجه حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنول، فلاونوئید، کاروتنوئید با خاصیت بالای آنتی اکسیدانی است. در این پژوهش فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره خالص و ریزپوشانی شده اناریجه در پایدارسازی روغن کنجد ، همچنین مقایسه اثر آن‌ها با آنتی اکسیدان سنتزی BHT طی دورهٔ ۲۰ روزه نگهداری بررسی شد. بدین منظور ابتدا عصاره گیاه اناریجه با استفاده از حلال‌های آب، اتانول، متانول، هگزان، اتیل استات با روش التراسوند استخراج شد. با بررسی مقادیر ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی از طریق مهار رادیکال آزاد DPPH مشخص شد که عصاره متانولی بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را در بین عصاره‌ها داشت. سپس عصاره متانولی اناریجه، با استفاده از ۶ فرمولاسیون مختلف حاوی نسبت‌های مختلف روغن، لسیتین و عصاره به شکل نانومولسیون بارگیری شد. اندیس خامه ای شدن و کارایی ریزپوشانی نشان داد که فرمولاسیون شماره ۴ منتهی به تولید بهترین نانومولسیون شد و ادامه آزمایشات با استفاده از این فرمولاسیون انجام شد. نتایج تعیین اندازه ذرات نشان داد که اندازه ذرات در محدوده ۳۶۴/۴ نانومتر، پتانسیل زتا نمونه در محدوده ۳۲/۶- میلی ولت و توزیع اندازه ذرات در محدوده ۰/۳۰۸ قرار داشت. سپس غلظت‌های مختلف (۱۰۰ ppm، ۲۰۰، ۳۰۰) عصاره خالص و ریزپوشانی شده اناریجه به منظور تاخیر انداختن فساد اکسیداتیو به روغن کنجد اضافه شد. و در فواصل زمانی ۴ روزه و به مدت ۲۰ روز پایداری اکسیداتیو از طریق اندیس پراکسید و تیوباربیتوریک اندازه‌گیری شد. نتایج بررسی روغن‌ها نشان داد که نمونه شاهد بالاترین میزان اکسیداسیون روغن را داشته است و کمترین میزان اکسایش مربوط به نمونه BHT-200 (آنتی اکسیدان سنتزی BHT در غلظت ۲۰۰) و بعد از آن مربوط به نمونه LNL-1-300 (عصاره اناریجه ریزپوشانی شده در غلظت ۳۰۰) بود.

واژگان کلیدی: آنتی اکسیدان، اناریجه، ریزپوشانی، روغن کنجد

۱.مقدمه

چربی‌ها و روغن‌ها ها از جایگاه ویژهای در رژیم غذایی انسان برخوردارند که از منابع مختلف گیاهی و حیوانی تهیه می شوند و سهم عمده ای از نیاز بدن به انرژی را تأمین می‌کنند. واکنش‌های اکسیداسیون علت اصلی فساد روغن‌ها و چربی‌های خوراکی در حین نگهداری یا عملیات حرارتی مانند سرخ کردن یا پخت و پز است. روغن‌های خوراکی حاوی مقادیر بالایی از اسیدهای چرب غیر اشباع (به ویژه اسیدهای چرب چند غیراشباعی) بسیار مستعد به اکسیداسیون می باشند (Akoh, & Min, 2008). از این رو پایدارسازی روغن‌ها تحت شرایط حرارتی و نگهداری اجتناب‌ناپذیر است. این فرآیند ممکن است با روش‌های مختلف از جمله جلوگیری از دسترسی اکسیژن ، غیرفعال کردن آنزیم‌های کاتالیز کننده اکسیداسیون ، کاهش فشار اکسیژن ، افزودن عوامل کلات، استفاده از دمای پایین و استفاده از بسته‌بندی مناسب مهار شود. روش دیگر محافظت در برابر اکسیداسیون استفاده از مواد افزودنی خاصی به نام آنتی‌اکسیدان‌ها است(Ramarathnam et al, 1995). یک ترکیب آنتی‌اکسیدان یا آنزیم آنتی‌اکسیدان می‌تواند باعث جلوگیری از تشکیل رادیکال‌های آزاد یا سایر گونه های واکنش پذیر شود و با اهدای هیدروژن یا الکترون به رادیکال‌های واکنش دهنده یا گونه‌ها از سلول در برابر استرس اکسیداتیو دفاع کند (Azizkhani and Sodanlo, 2021). صدها ترکیب سنتزی وجود دارد که دارای خواص آنتی اکسیدانی هستند به عنوان مثال TBHQ یک آنتی‌اکسیدان مصنوعی بسیار رایج است که به صورت تجاری به لیپیدها اضافه می‌شود تا از روند اکسیداسیون جلوگیری کند و ماندگاری آن‌ها را افزایش دهد اما کاربرد آن‌ها در مواد غذایی به دلیل ایمن نبودن و اثرات ضد بهداشتی محدود می‌باشد. به همین دلیل، استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی در جهان در حال گسترش است (Aardt, 2004). یکی از راه‌های افزایش پایداری اکسیداتیو روغن‌های خوراکی استفاده از عصاره‌های آنتی اکسیدانی گیاهان مختلف است (سلطانی، ۱۳۹۰). ترکیبات پلی‌فنلی ، مشتق شده از گیاهان ، دارای خواص آنتی اکسیدانی قوی هستند. فنلیک‌ها علاوه بر افزایش ماندگاری مواد غذایی با مهار پراکسیداسیون لیپید ، در مهار رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند و می‌توانند از بدن انسان در برابر آسیب‌های ناشی از آنها محافظت کنند Cicerale et al, (2009). علی‌رغم پتانسیل زیاد عصاره‌های گیاهی به عنوان ترکیبات آنتی اکسیدان و ضد میکروبی، حلالیت کم آن‌ها در آب و فراریت بالای ترکیبات فنلی باعث مشکلاتی در استفاده از آن‌ها می‌شود. برای محافظت ازاین ترکیبات زیستی فعال آبگریز باید از انکپسولاسیون عصاره‌های گیاهی استفاده شود (Joseph and Morrison, 2006). به منظور محافظت از ترکیبات بیولوژیک هیدروفوبیک در برابر شرایط محیطی و بهبود حلالیت و ثبات آن‌ها، روش‌های مختلف ریزپوشانی مانند میکروانکپسولاسیون، نانوانکپسولاسیون و تهیه نانوامولسیون به کار می‌رود. امروزه تهیه نانوامولسیون به دلیل هزینه پایین، عدم سمیت، در دسترس بودن، روش تهیه آسان و سریع بسیار مورد توجه است (Machado et al, 2019).

اناریجه با نام علمی (Froriepia subpinnata) گیاهی از خانواده چتریان است که در استان‌های گلستان و استان‌های گیلان و مازندران می‌روید. اناریجه گیاهی یکساله با ارتفاع ۲۰-۱۱۰ سانتی‌متر است. اناریجه از جمله گیاهان دارای خاصیت آنتی اکسیدانی می‌باشد. عصاره گیاه اناریجه حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنول، فلاونوئید و کاروتنوئید با خاصیت بالای آنتی اکسیدانی می‌باشد. (Latifi and Daneshniya, 2019) در بیشتر مناطق شمال ایران، برگ‌های بکر گیاه را به عنوان سبزیجات برای پخت وپز وطعم دادن غذاهای محلی استفاده می کنند. در طب سنتی، این گیاه در برابر اختلالات کبدی، به عنوان داروی آرامبخش، ضداسپاسم، ضدنفخ، ادرار آور مورداستفاده قرار می‌گیرد. با استناد به مطالب فوق، این مطالعه می‌تواند مقدمه‌ای جهت

استفاده از عصاره اناریجه به صورت ریزپوشانی شده به عنوان جایگزین آنتی اکسیدان سنتزی باشد که به روغن کنجد اضافه می‌گردد. در نهایت این پژوهش می‌تواند با شناخته شدن بیشتر این گیاه ، راه را برای تحقیقات آینده هموار سازد و نیز گامی در جهت بهداشت و اعتلای ایمنی غذایی جامعه برداشته شود.

۱) معرفی عصاره اناریجه ریزپوشانی شده به عنوان یک محصول جدید به منظور جایگزینی نگهدارنده‌های سنتزی
۲) مقایسه تأثیر عصاره آزاد و نانوریزپوشانی شده اناریجه با BHT در جلوگیری از اکسایش روغن کنجد
۳) تعیین اثر عصاره نانوریزپوشانی شده اناریجه در کنترل پایداری اکسایشی روغن کنجد در بازه زمانی نگهداری و مقایسه آن با فرم آزاد عصاره

۲.مواد و روش ها

۲-۱-آماده سازی نمونه

نمونه برداری از گیاه اناریجه با نام علمی (Froriepia subpinnata) در اواسط فصل بهار از مناطق بکر روستای لاویج که از توابع شهرستان نور در استان مازندران است انجام شد. بعد از تمیز نمودن، در سایه و به دور از تماس مستقیم خورشید خشک شد. سپس با استفاده از آسیاب پودر شده و از الک با مش ۴۰ عبور داده شد. در نهایت در بسته‌های مقاوم به هوا و رطوبت بسته بندی شده و تا انجام آزمایشات بعدی در فریزر ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

۲-۲-استخراج عصاره گیاه به روش التراسوند

ابتدا برگ گیاه خشک و آسیاب شده با نسبت ۱:۱۰ با هریک از حلال‌های آب، اتیل استات، هگزان، اتانول و متانول به مدت ۸ ساعت توسط دستگاه شیکر همزده شد. سپس بر روی التراسونیک با درجه حرارت ۴۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت، درنهایت عصاره بدست آمده توسط کاغذ صافی واتمن صاف شد. عصاره های حاصل توسط تبخیرکننده چرخشی خلا خشک شدند. عصاره های حاصل جهت انجام آزمایشات بعدی در فریزر ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

۲-۳-اندازه گیری ترکیبات فنولی کل

میزان کل ترکیبات فنلی با روش فولین سیوکالتو اندازه گیری شد، روش فولین سیوکالتو رایج‌ترین روش اندازه‌گیری ترکیبات فنولی می‌باشد. اساس کار در این روش، احیاء معرف فولین توسط ترکیبات فنولی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ است که حداکثر جذب را در طول موج ۷۶۰ نانومتر نشان می‌دهد. به منظور اندازه‌گیری ترکیبات فنولی عصاره ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره با ۱/۱۶۰ میلی لیترآب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو مخلوط شد. بعد از گذشت ۱ تا ۸ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول سدیم کربنات (۲۰ درصد) به محتوی لوله آزمایش افزوده شد. لوله‌های آزمایش بعد از تکان دادن درون حمام آب با دمای ۴۰ درجه سانتیگراد قرارگرفتند و پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب نوری آن‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. جهت رسم منحنی استاندارد از اسیدگالیک استفاده گردید. (اسلینکارد و سینگلتون،۱۹۹۷)

۲-۴-ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

توانایی مهار رادیکال آزاد به روش شیمادا و همکاران (۱۹۹۲) انجام شد. برای این منظور، محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام) از عصاره‌ها آماده شدند. یک میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH (با غلظت یک میلی‌مولار) به ۳ میلی‌لیتر از عصاره افزوده و مخلوط حاصله به شدت هم زده شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در محل تاریک قرار گرفتند. بعد از این مدت میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. لازم به ذکر است که در نمونه شاهد، عصاره با ۳ میلی لیتر متانول جایگزین شد. در نهایت درصد مهار رادیکال های DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه گردید. درصد مهار رادیکال‌های DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه گردید. که در آن A_c وA_s به ترتیب جذب کنترل وجذب نمونه می‌باشند.

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد} = (A_c-A_s)/A_c\times100$$

۲-۵-تهیه نانوامولسیون

فرمولاسیون طراحی شده برای تولید نانوامولسیون‌ها، پس از انجام چندین پیش تیمار و رسیدن به این رنج از غلظت‌های ترکیبات مورد نیاز در جدول (۱)، به روش مظفری و همکاران (۲۰۰۲) بر اساس تکنیک گرمایش با تغییرات اندکی انجام شد.

برای تهیه نانوامولسیون نیاز به دو فاز آلی و آبی می باشد : برای تهیه فاز آلی، ۱/۵ گرم لسیتین و ۱۵ و یا ۱۷/۵ سی سی روغن (بست به نوع تیمار) و برای فاز آبی نیز ۲/۵ گرم گلیسرول در ۳۵ میلی لیتر آب مقطر در بن ماری با دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت حل گردید. میزان عصاره مشخص شده (۱تا ۲ سی سی) در آب مقطر، در دمای محیط، حل گردید و سپس محلول آب و گلیسرول در ارلنی حاوی مگنت با سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه و دمای ۵۵ درجه سانتیگراد با Ph= ۶ بر روی هات پلیت، با عصاره مخلوط و سپس محلول روغن و لسیتین قطره قطره به فاز آبی اضافه شد . (مقدار آب اضافه شده محاسبه و در نهایت از میزان آب اضافه شده به گلیسرول کم می‌شود). پس از تمام شدن محلول روغن و لسیتین، مگنت خارج و امولسیون در زیر دستگاه هموژنایزر با سرعت ۸۰۰۰ دور در ۸ دقیقه، قرار داده شد و محلول هموژن گردید. یکی از راحت ترین و در عین حال دقیق ترین روش هایی که می توان مواد با ماهیت مایع را با یکدیگر مخلوط نمود به شکلی که دارای اندازه ذره ایی مناسبی باشند؛ استفاده از دستگاه هموژنایزر است.

جدول ۱: فرمولاسیون‌های مختلف برای نانوامولسیون‌های تهیه شده با عصاره اناریجه، لسیتین و روغن

تیمار	غلظت عصاره	روغن	لسیتین
۱	۲	۱۵	۱/۵
۲	۴	۱۵	۱/۵
۳	۶	۱۵	۱/۵
۴	۲	۱۷/۵	۱/۵
۵	۴	۱۷/۵	۱/۵
۶	۶	۱۷/۵	۱/۵

۲-۶-تعیین پایداری از طریق اندازه گیری شاخص خامه ای شدن

۲۰ میلی لیتر از نمونه‌های امولسیون در استوانه‌های مدرج ۲۵ میلی لیتری انتقال داده شد ، سر آن را بسته و در دمای محیط، پس از ۲۴ ساعت، با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید. در طی دوران نگهداری دو فاز شدن نمونه به دو لایه، یک لایه رویی (کرم) و لایه زیری (سرم) مشاهده شد. در این رابطه CI شاخص خامه ای شدن، HS ارتفاع لایۀ سرمی و HE ارتفاع کل امولسیون می‌باشد.

$$CI(\%)=\frac{HS}{HE}\times 100$$

۲-۷-خشک کردن انجمادی نانوامولسیون ها

ابتدا نانوامولسیون‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰- منجمد شدند. سپس در خشک‌کن انجمادی (مدل operon FDB-550) در فشار ۰/۱۰ میلی بار در دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ساعت خشک گردیدند.

۲-۸-راندمان ریز پوشانی

۰/۵ میلی‌گرم از پودرهای نانوریزپوشانی شده با ۲ میلی لیتر از حلال اتانول- متانول (۱به۱) مخلوط و به مدت ۲ دقیقه ورتکس شد. سپس مخلوط حاصل با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شد. مقدار ترکیبات فنلی محلول حاصل بر اساس روش فولین-سیوکالچو توضیح داده شده در بخش ۳-۴ تعیین گردید. در نهایت راندمان ریزپوشانی براساس معادله زیر محاسبه شد. که P_2 میزان فنل سطح و P_1 میزان فنل اضافه شده به امولسیون‌ها می‌باشد (Robert et al, 2010).

$$EE\ (\%) = 100 - (P_2/P_1 \times 100)$$

۲-۹-بررسی اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا نانوامولسیون‌های حاوی عصاره

میانگین قطر اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات، شاخص چندبس پاشیدگی ذرات و پتانسیل زتا با استفاده از دستگاه (Zetasizer Nano Zs) اندازه گیری شد. (Shahavi et al, 2015)

۱/۱ بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها قبل و بعد از ریزپوشانی بر روی روغن

عصاره متانولی اناریجه در غلظت‌های (۳۰۰،۲۰۰،۱۰۰ پی‌پی‌ام به فرم آزاد و نانو ریزپوشانی) به نمونه روغن کنجد اضافه شد و نمونه‌های روغن کنجد تحت شرایط دمایی ۶۳ درجه سانتی گراد طی ۲۰ روز ذخیره سازی شدند و سپس اندیس‌های پراکسید و تیباربیتوریک اسید در زمان‌های صفر، ۲۰،۱۶،۱۲،۸،۴ روز اندازه گیری شد. نمونه‌ها در شیشه های شفاف بسته بندی شد و تا زمان آزمایش در آون ۶۳ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

۲-۱۰-اندازه گیری پراکسید و تیوباربیتوریک اسید

عدد پراکسید مطابق با روش ارائه شده در استاندارد ملی ایران به شماره 4179 اندازه گیری شد.

۲-۱۱-اندازه گیری اندیس تیوباربیتوریک اسید

اندازه گیری این شاخص مطابق با استاندارد AOCS Cd 19-90 (2009) انجام گرفت.

۳.نتایج و بحث

۳-۱-تعیین محتوای کل ترکیبات فنولی

نتایج مربوط به مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره‌های استخراج شده به روش التراسونیک در جدول (۲) نشان داده شده است. نتایج نشان داد که بین مقدار فنول کل عصاره‌ها اختلاف معنی داری وجود داشت. ($P<0/05$) بر اساس نتایج ، بیشترین محتوای ترکیبات فنولی را عصاره متانولی و کمترین محتوای ترکیبات فنولی را عصاره آبی با مقادیر ۲/۵۴ ±۱۷۱/۴۶ و ۳/۲۸ ±۷۴/۹۷ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم نمونه خشک عصاره دارا بودند. عملکرد حلال‌های مختلف در استخراج ترکیبات فنولی یک گیاه متفاوت است.

جدول ۲:میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌های استخراج شده اناریجه

نوع عصاره	فنول کل
عصاره متانولی	171/46± 2/54 [a]
عصاره اتانولی	102/16± 1/92 [b]
عصاره آبی	74/97± 3/28 [c]

۳-۲-ارزیابی قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH عصاره های مختلف اناریجه

نتایج مربوط به فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های استخراج شده با استفاده از حلال های مختلف در جدول (۳) نشان داده شده است. با توجه به نتایج، میزان فعالیت رادیکال آزاد DPPH تحت تاثیر غلظت عصاره ها بود ، با افزایش غلظت عصاره ها روند تغییرات خاصیت آنتی اکسیدانی در نمونه های مورد بررسی افزایشی است. به عبارت دیگر افزایش غلظت عصاره مصرفی سبب افزایش قابلیت عصاره در مهار رادیکال هایDPPH شده است. و اختلاف غلظت های مختلف عصاره در میزان مهار رادیکال آزاد از نظر آماری معنادار است. نتایج نشان داد که در بین حلال های مورد استفاده به منظور استخراج عصاره، حلال های الکلی و به ویژه متانول بالاترین قابلیت را در استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی دارا بودند و در تمامی غلظت های بررسی شده، عصاره های متانولی، اتانولی، و آبی و اتیل استاتی و هگزانی به ترتیب بیشترین تا کمترین فعالیت آنتی اکسیدانی را از خود نشان دادند. با توجه به محتوای ترکیبات فنولی و همچنین قابلیت بالاتر عصاره متانولی در احیای رادیکال های آزاد DPPH ، در ادامه آزمایشات از این عصاره استفاده شد.

جدول ۳: قدرت احیا رادیکال های آزاد Dpph عصاره های مختلف اناریجه

غلظت / نوع عصاره	500	1000	1500	2000
متانولی	37/71± 1/02 [Aa]	50/13± 0/69 [Ba]	75/21± 1/78 [Ca]	85/71± 1/12 [Da]
اتانولی	23/82± 2/52 [Ab]	31/76± 1/15 [Bb]	47/64± 0/51 [Cb]	54/14± 2/56 [Db]
آبی	19/04± 0/95 [Ac]	23/39± 2/04 [Bc]	38/09± 3/44 [Cc]	43/29± 1/49 [Dc]
هگزان	0/388± 0/81[Ae]	0/518± 0/74 [Be]	0.776± 1/96 [Ce]	0/881± 3/73 [De]
اتیل استات	15/44± 3/21[Ad]	20/58± 1/69 [Bd]	28/08± 2/46 [Cd]	31/90± 0/75 [Dd]

۳-۳-بررسی خامه ای شدن فرمولاسیون های مختلف

پایداری نانوامولسیون ها توسط مشاهدات چشمی و اندازه گیری ارتفاع لایه سرم جداشده بررسی شد. نتایج حاصل از سنجش خامه ای شدن امولسیون جدول (۴) نشان داده شده است .بررسی های چشمی نشان داد که (بالاترین مقدار دو فاز شدن مربوط به تیمار ۶ و کمترین میزان خامه ای مربوط به تیمار ۴ است). همان طور که مشاهده شد فرمولاسیون های شماره ۴ در بین تمام فرمولاسیون ها بالاترین میزان خامه ای شدن را دارا بود . به همین دلیل استفاده از این فرمولاسیون برای انجام مراحل بعد در دستور کار قرار گرفت.

جدول ۴: اندیس خامه ای شدن ۶ فرمولاسیون های مختلف

تیمار	روغن (درصد)	لستین (درصد)	غلظت عصاره (درصد)	خامه ای شدن (درصد)
1	15	۱/۵	2	82/1± 1/93 ab
2	15	۱/۵	4	79/4± 0/89 b
3	15	۱/۵	6	77/8± 1/23 bc
4	۱۷/۵	۱/۵	2	85/3± 1/67 a
5	۱۷/۵	۱/۵	4	76/5± 0/35 c
6	۱۷/۵	۱/۵	6	75/2± 1/58 c

۳-۴-بررسی راندمان ریزپوشانی فرمولاسیون های مختلف

بر اساس جدول (۵) بالاترین و کمترین مقدار EE به ترتیب در تیمارهای ۴ و ۶ مشاهده شد. تفاوت معناداری بین EE تیمارهای مختلف وجود دارد . همانند اندیس خامه ای شدن ، مقدار راندمان ریزپوشانی با افزایش غلظت عصاره کاهش پیدا کرده است.

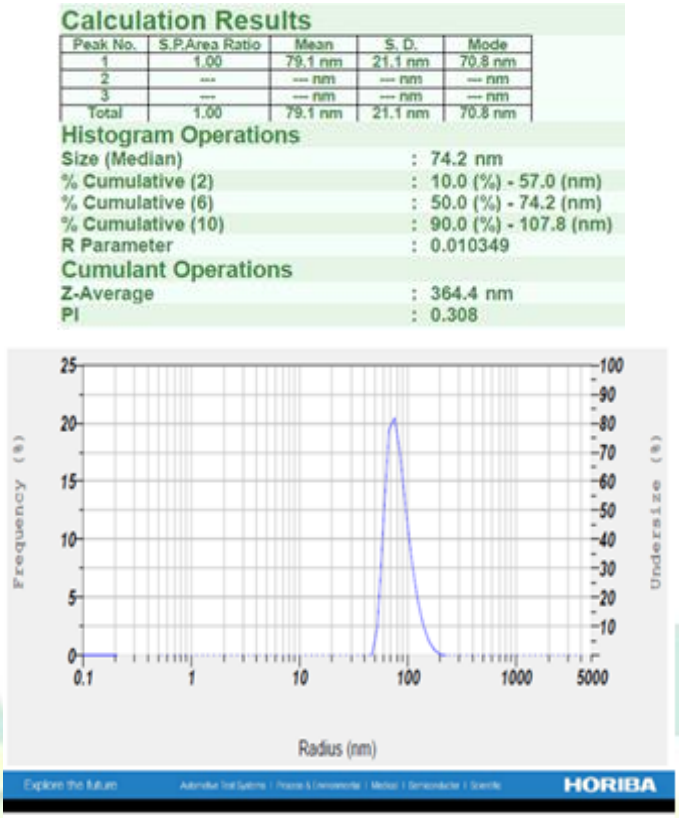
جدول ۵: راندمان ریزپوشانی ۶ فرمولاسیون مختلف

تیمار	روغن (درصد)	لستین (درصد)	غلظت عصاره (درصد)	راندمان ریزپوشانی
1	15	۱/۵	2	71/24± 1/26 b
2	15	۱/۵	4	64/29± 1/07 c
3	15	۱/۵	6	61/31± 0/42 cd
4	۱۷/۵	۱/۵	2	78/43± 1/11 a
5	۱۷/۵	۱/۵	4	57/53± 0/69 d
6	۱۷/۵	۱/۵	6	51/92± 1/56 de

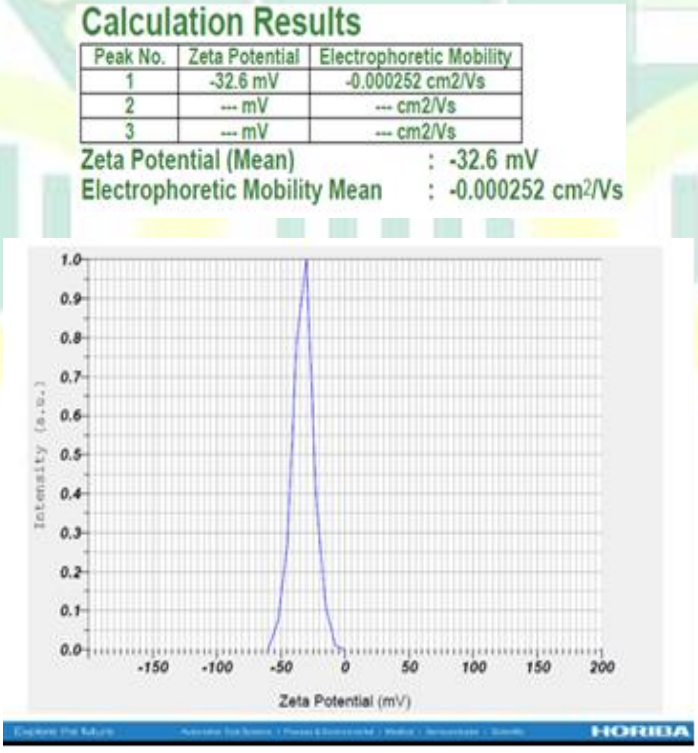
۱/۲

۳-۵-بررسی میانگین اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا

نتایج مربوط به تعیین اندازه و توزیع اندازه ذرات نانولیپوزوم در نمودار (۱) نشان داده شده است. ارزیابی اندازه نانولیپوزوم نشان داد که اندازه ذرات در محدوده نانوامولسیون‌هایی بودند که IUPAC گزارش کرده است و نانولیپوزوم دارای اندازه‌ی۳۶۴/۴ نانومتر بود. که این اندازه مربوط به Z-average که به عنوان قطر میانگین هارمونیک تعریف شده است. هم چنین نتایج شاخص چند پراکندگی (PdI) نشان داد که ذرات از نظر توزیع اندازه وضعیت مطلوبی دارند، به طوری که برای نانولیپوزوم تولید شده مقدار این شاخص برابر با ۰/۳۰۸ بود. در مقایسه با چندین مطالعه انجام شده در خصوص نانولیپوزوم‌ها، نمونه‌های تولید شده در این مطالعه در محدوده قابل قبولی قرار داشتند.



شکل ۱: نمودار اندازه ذرات متوسط اندازه ذرات و شاخص بسپاشیدگی (PDI) نانوامولسیون تهیه شده با فرمولاسیون شماره ۴



شکل ۲: نمودار پتانسیل زتا نانوامولسیون تهیه شده با فرمولاسیون شماره ۴

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها قبل و بعد از ریزپوشانی از طریق اندازه گیری اندیس پراکسید و تیوباربیتوریک اسیدمشاهده می‌شود که در تمام نمونه‌های مورد بررسی با افزایش مدت زمان نگهداری روغن، عدد پراکسید افزایش یافته است، که نشان دهنده‌ی روند افزایشی اکسایش در روغن کنجد طی دوره‌ی نگهداری است. نمونه شاهد بالاترین میزان عدد پراکسید را در همه‌ی روزها دارا بود. که نشان دهنده‌ی اکسیداسیون شدید روغن در طی نگهداری در نبود ترکیبات نگهدارنده است و تمامی نمونه‌های مورد بررسی از نظر عدد پراکسید اختلاف معناداری با نمونه شاهد نشان دادند. به طور کلی، همه نمونه‌ها طی دوره نگهداری فعالیت ضد اکسایشی از خود نشان دادند و بسته به نوع نمونه توانایی پایش PV متفاوت بود. در روز صفر، نمونه EX-300 پایین ترین عدد پراکسید را دارا بود. و در روزهای بعدی کمترین میزان اندیس پراکسید تا پایان روز۲۰ام مربوط به نمونه BHT-200 بوده است. هم چنین نتایج بدست آمده نشان داد، تفاوت معناداری در اندیس پراکسید نمونه LNL-1-300 (عصاره اناریجه ریزپوشانی شده در غلظت ۳۰۰) با نمونه BHT-100 (آنتی اکسیدان سنتزی BHT در غلظت ۱۰۰) تا روز ۱۲ام وجود نداشت. اما در کل قدرت کمتری از نمونه BHT-200 داشت. با افزایش غلظت عصاره اناریجه از ۱۰۰ به ۲۰۰ و ۳۰۰ چه در حالت ریزپوشانی شده و چه در حالت ریزپوشانی نشده نتایج بهتری مشاهده شد. افزایش غلظت عصاره سبب افزایش ترکیبات فنلی و بالا رفتن فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره اناریجه می‌شود (کامکار و همکاران، ۱۳۹۰). البته افزودن عصاره نانو ریزپوشانی شده اناریجه به روغن کنجد اکسیداسیون آن را به طور موفقیت آمیز در مقایسه با شکل آزاد عصاره اناریجه کاهش داد.

جدول ۶: میزان اندیس پراکسید نمونه‌های روغن حاوی عصاره‌های آزاد و ریزپوشانی شده اناریجه در روزهای نگهداری

روز / تیمار	صفر	٤	٨	١٢	١٦	٢٠
کنترل	1/02± 0/01 ^{Aa}	6/34± 0/12 ^{Ba}	11/25± 0/26 ^{Ca}	19/73± 0/41 ^{Da}	32/78± 0/91 ^{Ea}	50/04±1/32 ^{Fa}
BHT-100	0/69± 0/02 ^{Ac}	1/37± 0/07 ^{Bghi}	3/63± 0/11 ^{Ce}	8/64± 0/24 ^{Def}	14/81± 0/35 ^{Egh}	26/33±0/78 ^{Fghi}
BHT-200	0/77± 0/00 ^{Ab}	1/13± 0/02 ^{Bi}	2/92± 0/9 ^{Ch}	7/18± 0/19 ^{Dg}	13/02± 0/22 ^{EK}	24/55±0/82 ^{Fj}
LNL-1-300	0/64± 0/05 ^{Acd}	2/78± 0/08 ^{Bef}	4/24± 0/12 ^{Cde}	9/31± 0/24 ^{Dcde}	17/42± 0/32 ^{Ecde}	30/54±0/83 ^{Fc}
LNL-1-200	0/61± 0/01 ^{Ad}	1/71± 0/04 ^{Bg}	3/42± 0/09 ^{Cefg}	9/53± 0/26 ^{DC}	16/97± 0/31 ^{Ede}	30/88±0/89 ^{Fbc}
LNL-1-100	0/63± 0/02 ^{Acd}	1/18± 0/04 ^{Bh}	3/15± 0/19 ^{Cf}	8/95± 0/21 ^{De}	16/11± 0/33 ^{Ee}	29/16±0/79 ^{Fde}
EX-100	0/56± 0/01 ^{Ade}	4/83± 0/13 ^{Bb}	6/09± 0/10 ^{Cb}	10/61± 0/19 ^{Db}	18/43± 0/40 ^{Eb}	31/03±0/88 ^{Fb}
EX-200	0/55± 0/02 ^{Ae}	3/94± 0/11 ^{Bc}	5/73± 0/7 ^{Cbc}	10/19± 0/25 ^{Dbc}	17/58± 0/32 ^{Ecd}	30/99±0/76 ^{Fb}
EX-300	0/52± 0/03 ^{Aef}	3/69± 0/11 ^{Bcd}	5/94± 0/14 ^{Cbc}	9/25± 0/23 ^{Dd}	17/21± 0/39 ^{Ed}	29/86±0/72 ^{Fd}

روند تغییرات عدد تیوباربیتوریک اسید در تمام نمونه‌های موردبررسی افزایشی بود. نتایج نشان داد که عصاره خام و ریزپوشانی شده اناریجه در تمامی غلظت‌ها قادر به کاهش اندیس تیوباربیتوریک اسید بوده است. ($P<0/05$) همچنین، اختلاف معنی داری بین تیمارهای مختلف از نظر TBA در همه روزهای اندازه‌گیری به جز روز تولید وجود داشت. همچنین نتایج ما نشان داد که بیشترین و کمترین مقدار TBA مربوط به نمونه شاهد و نمونه روغن حاوی BHT-200 است. همچنین نمونه‌های روغن حاوی

عصاره نانو ریزپوشانی شده عدد TBA کمتری نسبت به نمونه‌های حاوی عصاره خام داشتند و در بین نمونه‌ها LNL-1-300 عملکرد بهتری نسبت به سایر نانوریزپوشانی‌ها داشت. به طوری که حتی در روز ۸ام میزان اندیس تیوباربیتوریک اسید آن با نمونه BHT-200 برابری می‌کرد.

جدول۷: میزان اندیس پراکسید نمونه های روغن حاوی عصاره های آزاد و ریزپوشانی شده اناریجه در روز های نگهداری

روز / تیمار	صفر	٤	٨	١٢	١٦	٢٠
کنترل	0/067± 0/003 ^{Aa}	0/113± 0/006 ^{Ba}	0/154± 0/009 ^{Ca}	0/224± 0/004 ^{Da}	0/326± 0/003 ^{Ea}	0/483± 0/004 ^{Fa}
BHT-100	0/045± 0/002 ^{Ac}	0/074± 0/005 ^{Be}	0/117± 0/003 ^{Cc}	0/165± 0/002 ^{Def}	0/198± 0/001 ^{Ecd}	0/243± 0/003 ^{Fd}
BHT-200	0/041± 0/001 ^{Acd}	0/066± 0/005 ^{Bc}	0/107± 0/005 ^{Cde}	0/151± 0/001 ^{Dfg}	0/174± 0/005 ^{Ef}	0/224± 0/002 ^{Ff}
LNL-1-300	0/054± 0/003 ^{Ab}	0/080± 0/001 ^{Bde}	0/125± 0/002 ^{Cb}	0/183± 0/005 ^{Dd}	0/227± 0/004 ^{Eb}	0/268± 0/004 ^{Fb}
LNL-1-200	0/052± 0/001 ^{Abc}	0/076± 0/003 ^{Bef}	0/120± 0/002 ^{Cbc}	0/169± 0/009 ^{De}	0/208± 0/003 ^{Ebc}	0/251± 0/003 ^{Fcd}
LNL-1-100	0/042± 0/004 ^{Acde}	0/070± 0/005 ^{Bb}	0/109± 0/004 ^{Ce}	0/153± 0/001 ^{Df}	0/181± 0/006 ^{Ee}	0/241± 0/003 ^{Fde}
EX-100	0/052± 0/007 ^{Abc}	0/085± 0/003 ^{Bb}	0/119± 0/009 ^{Cc}	0/199± 0/007 ^{Db}	0/222± 0/008 ^{Eb}	0/263± 0/004 ^{Fbcd}
EX-200	0/046± 0/002 ^{Ac}	0/075± 0/004 ^{Bde}	0/110± 0/003 ^{Cd}	0/173± 0/002 ^{Dde}	0/201± 0/004 ^{Ec}	0/241± 0/007 ^{Fde}
EX-300	0/043± 0/003 ^{Acd}	0/067± 0/003 ^{Bg}	0/107± 0/004 ^{Ce}	0/156± 0/006 ^{Df}	0/185± 0/008 ^{Ed}	0/258± 0/002 ^{Fc}

۴.نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از عمل ریزپوشانی با محافظت عصاره، منجر به افزایش توان آنتی اکسیدانی عصاره می شود و لذا فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های ریزپوشانی شده بالاتر از عصاره های خام بود. در مجموع نتایج این تحقیق پیشنهاد می کند که با توجه به مضرات آنتی اکسیدان های سنتزی ، میتوان از عصاره ریزپوشانی شده اناریجه به عنوان یک نگهدارنده طبیعی به منظور افزایش عمر ماندگاری روغن کنجد استفاده نمود.

منابع

۱. کامکار، ا، اسدی، ف، جبلی جوان، ا، جمشیدی، ر. ۱۳۹۰. ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی اسانس و عصاره نعناع ایرانی. دامپزشکی و آزمایشگاه، دوره ۱ ، شماره۱

2. Aardt, V. (2004). Effect of antioxidants on oxidative stability of edible fats and oils: thermogravimetric analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, *52*(3), 587-591.
3. Akoh, & Min. (2008a). Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology. *CRC Press*.
4. AOAC. 2009. Official methods of analysis. Washington: Association of Official Analytical Chemists.Cicerale, S.,
5. Azizkhani, Maryam, and Azam Sodanlo. (2021) "Antioxidant activity of Eryngium campestre L., Froriepia subpinnata, and Mentha spicata L. polyphenolic extracts nanocapsulated in chitosan and maltodextrin." Journal of Food Processing and Preservation 45.2: e15120.

6. Conlan, X. A., Sinclair, A. J., & Keast, R. S. (2009). Chemistry and health of olive oil phenolics. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 49(3), 218–236.

7. Joseph, T. Morrison, M. 2006. Nanotechnology in Agriculture and Food Nanoforum report.
8. Latifi, Z, Daneshniya, M.(2019). Measurement of phytochemical and antioxidant compounds and identification of main phenolic compound in Anarijeh plant(Froriepiasubpinnata) extract by RPHPLC method.

9. Machado, A. R., Pinheiro, A. C., Vicente, A. A., Souza-Soares, L. A.,& Cerqueira, M. A. (2019). Liposomes loaded with phenolic extracts of Spirulina LEB-18: Physicochemical characterization and behavior under simulated gastrointestinal conditions. Food Research International, 120, 656– 667.
10. Mohammadi, A., Jafari, S. M., Esfanjani, A. F., and Akhavan, S. 2015. Application of nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the oxidative stability of soybean oil. Food Chemistry.
11. Mozafari MR, Reed CJ, Rostron CH, Kocum CE, Piskin ER (2002) Construction of stable anionic liposome-plasmid particles using the heating method: a preliminary investigation. Cell Mol Biol Lett 7(3):923–928

12. Noshad, M. Mohebbi, M. Koocheki, A. Shahidi, F. 2015. Microencapsulation of vanillin by spray drying using soy protein isolate–maltodextrin as wall material. Flavour and Fragrance journal.30, 387-391.
13. Ramarathnam, N., Osawa, T., Ochi, H., & Kawakishi, S. (1995). The contribution of plant food antioxidants to human health. Trends in Food Science and Technology,6, 75–82.
14. Robert, P. Gorena, T. Romero, N. Sepulveda, E. Chavez, J. Saenz, C. 2010.Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (Punica granatum) by spray drying. *International journal of food science & technology*, 45:1386-1394.
15. Shahavi, M. H., Hosseini, M., Jahanshahi, M., Meyer, R. L., & Darzi, G. N. (2015). Evaluation of critical
16. parameters for preparation of stable clove oil nanoemulsion. Arabian Journal of Chemistry.

17. Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T (1992) Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. J Agric Food Chem 40:945–948
18. Slinkard K, Singleton VL (1977) Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. Am J Enol Vitic 28:49–55

Effect of salicylic acid on flavonols metabolism of nettle roots

Mahdieh Dehghan-Nejhad[1*]; Nader Chaparzadeh[2]; Leila Zarandi-Miandoab[2]

1- MS Student, Department of Biology, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
2- Professor, Department of Biology, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

** Email: nchapar@azaruniv.ac.ir*

Abstract

The medicinal nettle plant (Urtica dioica L), belongs to Urticaceae family, is one of the medicinal plants that is distributed in most parts of the world. The nutritional and medicinal value of plants depends on the content of their biochemical compounds. Nettle is a good plant for studying the antioxidant value and flavonoids content. Secondary metabolites are widely present in all plant species and according to their biosynthetic pathways and structural features are divided into several groups including flavonoids. Salicylic acid, a phytohormone, has several function in plants and is produced as a phenolic compound in plants through shikimic acid pathway. One of the goals of this research is to investigate, in controlled and out of season conditions, the production of flavonoids secondary metabolites as well as the activity of phenylalanine ammonia lyase of the medicinal nettle plants under salicylate treatments, which can be done by laboratory culture. Nettle seeds were disinfected after washing with distilled water and then placed in petri dish on filter paper. The germination was carried out for 7 days in the dark at 25 °C and then, plants were grown in germinator. For salicylic acid treatments (0, 0.5, 1, 2 and 3 mmol), plants were sprayed by one day intervals and 14 day old plants were used for measurements. Treatments were done under completely sterile conditions. Flavonols were extracted from nettle root with 50% methanol and quantified calorimetrically at 440 nm. After extraction from nettle root, phenylalanine ammonia lyase activity was measured using phenylalanine as substrate at 35 °C and 290 nm. The replication data were pooled together and mean and standard error were calculated. All data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) using SPSS software. The results showed that treatment with salicylic acid elevated the flavonols content and phenylalanine ammonia lyase activity as compared with the control plants. Significantly higher flavonols content and phenylalanine ammonia lyase activity were shown by the plants sprayed with salicylic acid at 1 mmol. The results suggest that salicylic acid could be utilized for the induction of plant defensive system that will enable the plant to withstand stresses against reactive oxygen species.

Keywords: Flavonoids, Phenylalanine ammonia lyase, Antioxidant, Nettle

تاثیر اسید سالیسیلیک بر متابولیسم فلاونول‌های ریشه گزنه

مهدیه دهقان نژاد[۱]؛ نادر چاپارزاده[۲*]؛ لیلا زرندی میاندوآب[۲]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهیدمدنی آذربایجان، تبریز، ایران
۲- استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهیدمدنی آذربایجان، تبریز، ایران

Email: nchapar@azaruniv.ac.ir

چکیده

گیاه گزنه با نام علمی *Urtica dioica* L متعلق به تیره گیاهی *Urticaceae* از جمله گیاهان دارای ارزش دارویی می‌باشد که در اکثر نقاط دنیا پراکنش دارد. ارزش دارویی گیاهان به محتوای ترکیبات بیوشیمیایی آن‌ها مربوط می‌شود. گزنه گیاهی مناسب برای مطالعه ارزش آنتی‌اکسیدانی و محتوای فلاونوئیدها است. متابولیت‌های ثانویه به طور گسترده‌ای در تمام گونه‌های گیاهی وجود دارند و با توجه به مسیرهای بیوسنتز و ویژگی‌های ساختاری به چند گروه از جمله فلاونوئیدها تقسیم می‌شوند. اسید سالیسیلیک به عنوان یک هورمون در گیاهان وظایف متعددی را بر عهده دارد و به عنوان یک ترکیب فنلی در گیاهان از مسیر اسید شیکیمیک تولید می‌شود. یکی از اهداف این تحقیق بررسی تولید متابولیت‌های ثانویه فلاونوئیدی و همچنین بررسی فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز گیاه دارویی گزنه، تحت تیمار اسید سالیسیلیک و در شرایط کاملا کنترل شده و خارج از فصل می‌باشد که این امر از طریق کشت آزمایشگاهی انجام پذیر است. بذور گیاه گزنه پس از شست و شو با آب مقطر ضدعفونی و سپس درون پتری‌دیش با فواصل معین روی کاغذ صافی قرار گرفتند. روند جوانه‌زنی به مدت هفت روز در تاریکی و دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام و رشد گیاهان در ژرمیناتور انجام گرفت. تیمار اسید سالیسیلیک به غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌مولار به صورت افشانه یک روز در میان اعمال و روز چهاردهم گیاهان برای سنجش برداشت شدند. تیماردهی با اعمال افشانه اسید سالیسیلیک با غلظت‌دهی معین بر روی دانه رست‌ها، زیر هود و به صورت کاملا استریل انجام گرفت. فلاونول‌ها از ریشه گزنه به کمک متانول ۵۰٪ استخراج و به روش رنگ سنجی در طول موج ۴۴۰ نانومتر تعیین مقدار شدند. سنجش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز پس از استخراج از عصاره ریشه گزنه در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد در طول موج ۲۹۰ نانومتر با استفاده از گهرمایه فنیل آلانین انجام شد. میانگین تکرارها و خطای استاندارد محاسبه و تمامی داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و با روش تحلیل واریانس (ANOVA) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان دادند که اعمال تیمار اسید سالیسیلیک باعث افزایش میزان فلاونول‌ها و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز نسبت به شاهد شد. بیشینه‌ی این افزایش در غلظت ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک مشاهده شد. چنین ارزیابی می‌شود که فلاونوئیدها و آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز به دلیل تاثیر مستقیم اسید سالیسیلیک در ریشه گزنه افزایش می‌یابند. نتایج نشان می‌دهد که از اسید سالیسیلیک می‌توان برای القای سیستم دفاعی گیاه در در مقاومت به تنش‌ها، برای مقابله با گونه‌های فعال اکسیژن، استفاده کرد.

واژگان کلیدی: فلاونوئیدها، فنیل آلانین آمونیالیاز، آنتی‌اکسیدان

۱.مقدمه

گزنه با نام علمی Urtica dioica L، گیاهی علفی و پایا با ساقه راست است که ارتفاع گیاه می‌تواند به بیش از دو متر نیز برسد. ساقه آن چهارگوش بوده و برگ‌های متقابل آن پوشیده از کرک‌های گزنده است. میوه‌های عدسی شکل و مسطح دارد که توسط دو کاسبرگ درونی پوشیده می‌شوند. مدت مدیدی است که از برگ گزنه به عنوان دارو در درمان آرتروز و بیماری‌های

مختلف نظیر نقرس، ریزش مو و خونریزی‌های ملایم استفاده می‌شود. مواد فنلی در این گیاه شامل کافئیک اسید، فرولیک اسید و سیناپیک اسید می‌باشد (Al-Tameme et al., 2015). گزنه در خاک‌های حاصلخیز به خوبی رشد می‌کند و در برابر آفات و بیماری‌ها مقاوم است. آن یک علف هرز با سیستم ریشه‌ای و ریزوم‌های قوی است (Kregiel et al., 2018). فیبر آن یک محصول چند منظوره برای استفاده در صنایع داروسازی، نساجی و بیوکامپوزیت‌ها است (Xu et al., 2019).

فلاونوئیدها به عنوان آنتی‌اکسیدان و دیگر عوامل فعال زیستی مهم شناخته می‌شوند که مدت‌هاست به دلیل مزایای آن برای سلامتی انسان، درمان و پیشگیری از بسیاری از بیماری‌ها مورد مطالعه هستند. فنل‌ها، گروه عمده‌ای از مواد شیمیایی گیاهی آنتی‌اکسیدانی، به دلیل فعالیت‌های بیولوژیکی و مهار رادیکال‌های آزاد اهمیت زیادی دارند. فنل یک ترکیب آروماتیک، دارای یک گروه هیدروکسیل متصل به حلقه بنزن است (Tungmunnithun et al., 2018). درصد عظیمی‌از ترکیبات فنلی منشا فنیل‌آلانین دارند. مهم‌ترین آنزیم این مسیر فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) است. PAL آنزیم نقطه شاخه‌ای بین متابولیسم اولیه (مسیر شیکیمات) و ثانویه (فنیل‌پروپانویید) است. اهمیت این مسیر را می‌توان با واقعیت تأیید کرد که در شرایط رشد طبیعی، ۲۰٪ کربن ثابت شده توسط گیاهان از این مسیر عبور می‌کنند (Michalak, 2006). فنلیک‌ها یک گروه ضروری از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که دارای یک حلقه آروماتیک با یک یا چند گروه هیدروکسیل از اسیدآمینه فنیل‌آلانین یا تیروزین هستند که از طریق مسیر فنیل‌پروپانوئیدها تولید می‌شوند.

PAL به عنوان آنزیم گیاهی یکی دیگر از مواد گیاهی است که در درمان بیماری‌های انسانی کاربرد مهمی‌دارد. L- فنیل‌آلانین یکی از اسیدآمینه‌های ضروری است که نمی‌تواند در پستانداران به میزان کافی در مقادیر مناسب برای ایجاد شرایط لازم برای سنتز پروتئین، سنتز شود. قارچ‌ها و گیاهان قادر به سنتز فنیل‌آلانین از طریق مسیر شکیمیک‌اسید هستند (Hyun et al., 2011). فعالیت فنیل‌آلانین آمونیالیاز در سطح رونویسی تنظیم می‌شود و با توجه به مرحله تمایز سلولی و قرار گرفتن در معرض انواع مختلف تنش بیان آن به مقدار زیادی متغییر است (Zhang and Liu, 2015).

اسید سالیسیلیک (SA) یک مولکول سیگنال مهم در گیاهان است. SA از پیش‌ساز کوریسمات از دو مسیر در گیاهان سنتز می‌شود (Hayat et al., 2005). اسید سالیسیلیک اهمیت زیادی در مقابله با شرایط تنش‌زای زیستی و غیرزیستی داشته و تاثیر چشمگیری بر شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهان دارد. ثابت‌ترین نقش SA به عنوان یک مولکول سیگنال در پاسخ‌های دفاعی گیاه است. همچنین اسید سالیسیلیک یک آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی محلول در آب است که می‌تواند رشد گیاه را کنترل کند (Hayat et al., 2010).

هدف این تحقیق بررسی تاثیر اسید سالیسیلیک بر متابولیسم فلاونول‌های ریشه گیاه گزنه، تحت شرایط کاملا کنترل شده و خارج از فصل می‌باشد که این امر از طریق کشت آزمایشگاهی انجام پذیر است. کشت گیاهان در شرایط کنترل شده و مستقل از تغییرات محیطی مزیت بررسی مسیرهای بیوسنتزی بیوشیمیایی و آنزیمی‌متابولیت‌های ثانویه را دارد.

۲. مواد و روش‌ها

بذرهای سالم گیاه گزنه Urtica dioica L با آب مقطر شست و شو داده شده و با هیپوکلریت ۲٪ و قارچ‌کش مانکوزب ۵٪ ضدعفونی شدند. سپس بذرها به درون پتری‌دیش‌ها منتقل و با فواصل معین روی کاغذ صافی قرار گرفتند. محلول غذایی هوگلند برای کمک به انجام روند جوانه‌زنی، به مدت هفت روز در تاریکی و دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد در اختیار بذرها قرار گرفت. در مرحله بعد رشد گیاهان در ژرمیناتور با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و در بازه‌ی نوری تنظیم شده ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نوری $150\mu mol\ photons\ m^{-2}s^{-1}$ انجام گرفت.

تیمار اسید سالیسیلیک به غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌مولار به صورت افشانه یک روز در میان اعمال و روز چهاردهم گیاهان برای سنجش برداشت شدند.(شکل ۱)



شکل ۱: مراحل کشت و جوانه‌زنی گیاه گزنه

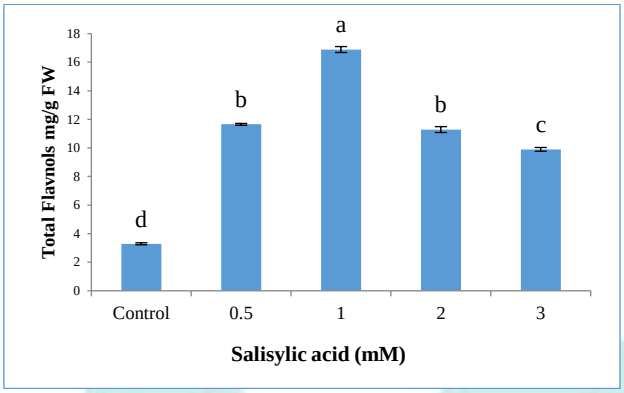
استخراج فلاونول‌ها از ریشه گزنه به کمک متانول ۵۰٪ انجام شد و پس از صاف کردن آن سنجش فلاونول‌هاانجام شد. برای سنجش فلاونول‌ها عصاره به دست آمده با محلول کلریدآلومنیوم و محلول استات‌سدیم مخلوط و پس از صاف کردن میزان جذب در طول موج ۴۴۰ نانومتر تعیین شد. تعیین غلظت فلاونول‌ها با استفاده از محلول استاندارد روتین در غلظت‌های مختلف انجام و بر اساس میکروگرم بر گرم وزن تر گزارش شد (Iqbal et al., 2015).

برای استخراج عصاره آنزیمی‌ریشه گیاه گزنه از بافر بورات ۲۰۰ میلی مولار با pH ۸/۸ به علاوه‌ی مقداری از پلی ونیل پیرولیدون، Na_2EDTA و مرکاپتواتانول استفاده شد. مراحل استخراج و سانتریفیوژ در دمای بین ۰ تا ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. از مایع رویی برای سنجش فعالیت آنزیم PAL استفاده شد (Campos et al., 2004). سنجش فعالیت آنزیم در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت در حضور فنیل‌آلانین انجام و از تری‌کلرواستیک اسید برای توقف واکنش استفاده شد. با تعیین جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر با استفاده از منحنی حاصل از محلول‌های استاندارد اسید سینامیک میزان فعالیت آنزیم تعیین شد.

۳. نتایج و بحث

گیاهان فرآیندهای پیچیده‌ای را برای افزایش بقا، از جمله تولید متابولیت‌های ثانویه مختلف، توسعه داده‌اند. متابولیت‌های ثانویه گیاهی مشتقات متابولیت‌های اولیه تولید شده توسط گیاهان به دلیل تغییرات فیزیولوژیکی متنوع هستند. این ترکیبات اهداف مختلفی مانند پاسخ‌های دفاعی در برابر گیاهخواران و عوامل بیماری‌زا و محافظت در برابر اشعه ماوراء بنفش را ارائه می‌دهند و در حفاظت از گیاهان در برابر تنش‌های زیستی یا غیرزیستی ایفای نقش می‌کنند. متابولیت‌های ثانویه از خانواده‌ی متابولیت‌های اولیه مختلف هستند که می‌توانند در پاسخ به استرس‌ها القا شوند. تعدادی از عوامل سلولی و بیوشیمیایی بر ذخیره و حمل و نقل متابولیت‌های ثانویه تأثیر می‌گذارد. به طور کلی، عواملی که باعث ایجاد تغییرات در متابولیت‌های ثانویه می‌شوند به چهار دسته تقسیم می‌شوند: عوامل محیطی، عوامل مورفوژنتیک، عوامل اونتوژنتیک و عوامل ژنتیکی. در میان این عوامل، عوامل محیطی تعیین کننده‌ی اصلی نوسانات در متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند. فلاونول‌ها یک گروه مهم از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که از طریق مسیر فنیل پروپانوئیدها تولید می‌شوند (Shitam, 2016). در مطالعه حاضر داده‌های ارائه شده در شکل ۲ نشان می‌دهد که اسید سالیسیلیک باعث افزایش میزان فلاونول‌های ریشه گیاه گزنه نسبت به شاهد شده است و بیشینه انباشتگی در غلظت ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک اتفاق افتاده است. اسید سالیسلیک به عنوان یک مولکول پیام‌رسان نقش مهمی‌در رشد و نمو گیاه و پاسخ‌های دفاعی آن به عهده دارد. کاربرد برونزای اسید سالیسیلیک بیان بسیاری از ژن‌های دفاعی را در گیاه می‌تولند القا کند. مطالعات قبلی نیز افزایش ترکیبات فنلی کل را در تیمار با اسید

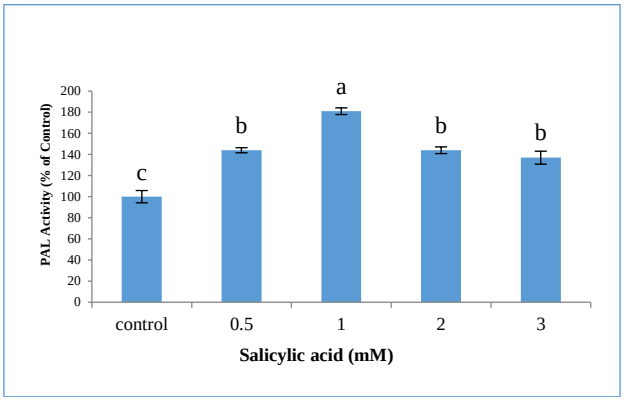
سالیسیلیک گزارش کرده‌اند (Guleria et al., 2005). فلاونوئیدها با نقش آنتی‌اکسیدانی، جاروب کننده گونه‌های فعال اکسیژن هستند. گونه‌های فعال اکسیژن باعث این پاسخ می‌شوند زیرا به تولید اسید سالیسیلیک به صورت درونزا و به پیام‌رسانی آن در مسیرهای مختلف منجر می‌شوند. مرحله اساسی و مهم در تولید فلاونوئیدها دآمیناسیون L-فنیل‌آلانین و تولید ترانس‌سینامیک‌اسید می‌باشد. آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز این واکنش را کاتالیز می‌کند. بنابراین می‌توان افزایش فلاونوئیدها به عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی‌را به عنوان پاسخی در برابر افزایش تنش اکسیداتیو نسبت داد.



شکل ۲: تاثیر اسید سالیسیلیک بر محتوی فلاونول‌های ریشه گزنه

فنیل‌آلانین که از مسیر شکمیک‌اسید تولید می‌شود مستقیماً برای سنتز پروتئین در گیاهان و یا از طریق مسیر فنیل‌پروپانوئیدها برای تولید طیفی از متابولیت‌های ثانویه استفاده می‌شود. اولین قدم در این توالی متابولیک، شامل عمل فنیل‌آلانین آمونیالیاز است. PAL کاتالیز کننده تبدیل از ال-فنیل آلانین به ترانس‌سینامیک‌اسید است. بنابراین محل عمل PAL به عنوان نقطه ورود کلیدی به مسیر فنیل‌پروپانوئیدها و هدایت جریان کربن از متابولیسم اولیه به متابولیسم ثانویه و سنتز ترکیبات فنلی در نظر گرفته می‌شود (Kong, 2015). تیمار اسید سالیسیلیک با القای فعالیت آنزیم‌های کلیدی در تولید ترکیبات فنلی مانند آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز باعث افزایش تولید ترکیبات فنلی می‌شود. داده‌های ارائه شده در شکل ۳ نشان می‌دهد که اسید سالیسیلیک باعث افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز ریشه گیاه گزنه نسبت به شاهد شده است که بیشینه فعالیت PAL در ریشه، در غلظت ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک اتفاق افتاده است.

در مطالعه حاضر با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک افزایش فعالیت آنزیم PAL و محتوی فلاونول‌ها مشاهده می‌شود. در گزارش‌های دیگر نیز ارتباط مستقیم بین فعالیت این آنزیم و فلاونوئیدها اثبات شده است (Koushesh et al., 2012). رابطه بیان شده ما بین اسید سالیسیلیک، فلاونول‌ها و فعالیت آنزیم PAL نشان دهنده نقش تنظیمی احتمالی اسید سالیسیلیک در سنتز فلاونول‌ها می‌باشد.



شکل ۳: تاثیر اسید سالیسیلیک بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز ریشه گزنه

۴. نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، با اعمال تیمار اسید سالیسیلیک افزایش بیوسنتز فلاونول‌ها هماهنگ با افزایش فعالیت آنزیم PAL اتفاق می‌افتد. بیشینه این افزایش در غلظت ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک مشاهده شد. می‌توان اینگونه ارزیابی کرد که اسید سالیسیلیک به شکل معنی‌دار بر تولید متابولیت‌های ثانویه مانند فلاونوئیدها و فعالیت آنزیم‌ها تاثیر گذار است. این افزایش‌ها می‌تواند برای فائق آمدن بر شرایط ناگوار مانند تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن به گیاه برای تداوم حیات کمک نماید. همچنین در مقیاس تولیدی و صنعتی برای افزایش محتوی فلاونوئیدها به دلیل اینکه گزنه یک گیاه اقتصادی دارویی است می‌تواند کمک کننده باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و قطب علمی‌آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی (دانشگاه اصفهان) سپاس گزاری می‌نمایند.

منابع

Al-Tameme H.J., Hadi M.Y. and Hameed I.H. 2015. Phytochemical analysis of *Urtica dioica* leaves by fourier-transform infrared spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy, 7(10): 238-252.

Campos R., Nonogaki H., Suslow T. and Saltveit M.E. 2004. Isolation and characterization of a wound inducible phenylalanine ammonia-lyase gene (LsPAL1) from Romaine lettuce leaves. Physiologia Plantarum, 121(3): 429-438.

Guleria S., Sohal B.S. and Mann A.P.S. 2005. Salicylic acid treatment and/or Erysiphe polygoni inoculation on phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase content and accumulation of phenolics in pea leaves. Journal of Vegetable Science, 11(2): 71-79.

Hayat S., Fariduddin Q., Ali B. and Ahmad A.J.A.A.H. 2005. Effect of salicylic acid on growth and enzyme activities of wheat seedlings. Acta Agronomica Hungarica, 53(4): 433-437.

Hayat Q., Hayat S., Irfan M. and Ahmad A. 2010. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. Environmental and Experimental Botany, 68(1): 14-25.

Hyun M.W., Yun Y.H., Kim J.Y. and Kim S.H. 2011. Fungal and plant phenylalanine ammonia-lyase. Mycobiology, 39(4): 257-265.

Iqbal E., Salim K.A. and Lim L.B. 2015. Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) from Brunei Darussalam. Journal of King Saud University-Science, 27(3): 224-232.

Kong J.Q. 2015. Phenylalanine ammonia-lyase, a key component used for phenylpropanoids production by metabolic engineering. RSC advances, 5(77): 62587-62603.

Koushesh saba M., Arzani K. and Barzegar M. 2012. Postharvest polyamine application alleviates chilling injury and affects apricot storage ability. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(36): 8947-8953.

Kregiel D., Pawlikowska E. and Antolak H. 2018. Urtica spp.: Ordinary plants with extraordinary properties. Molecules, 23(7): 1664.

Michalak A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. Polish Journal of Environmental Studies, 1:15(4).

Shitan N. 2016. Secondary metabolites in plants: transport and self-tolerance mechanisms. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 80(7): 1283-1293.

Tungmunnithum D., Thongboonyou A., Pholboon A. and Yangsabai A. 2018. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. Medicines, 5(3): 93.

Xu X., Backes A., Legay S., Berni R., Faleri C., Gatti E., Hausman J.F., Cai G. and Guerriero G. 2019. Cell wall composition and transcriptomics in stem tissues of stinging nettle (*Urtica dioica L.*): Spotlight on a neglected fibre crop. Plant Direct, 3(8): e00151.

Zhang X. and Liu C.J. 2015. Multifaceted regulations of gateway enzyme phenylalanine ammonia-lyase in the biosynthesis of phenylpropanoids. Molecular Plant, 8(1); 17-27.

Applications of Nanotechnology in Plant Pathology

Nahid Moarrefzadeh[1*], Hadi Khateri[1]

Department of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran.

* *Email: n.moarrefzadeh@razi.ac.ir*

Abstract

As the world's population grows, there is a need to provide healthy food for its inhabitants. Plants in nature are attacked by a variety of plant pathogens. These agents cause increasing challenges to the sustainable production of agricultural products by decreasing the growth and yield of plants. To combat pathogens attacks and their damages, farmers use a variety of methods, that usually include chemical pesticides. These chemicals not only are not able to completely control plant diseases, but their continuous and unprincipled use has increased the resistance of plant pathogens and had harmful effects on human health and other organisms. Therefore, in order to increase the efficiency of plant disease control and production efficiency in agricultural crops, new methods with less risks for human and the environment are needed to be combined with conventional methods. In recent years, technological advances and innovations in agriculture have been made to contrast these challenges, and nanotechnology is one of them. Nanotechnology can be used in different aspects of plant pathology in different ways; Nanoparticles can be very effective in detecting and diagnosis of plant pathogens as nanobiosensors. Nanoparticles can be potentially used to increase plant resistance to various abiotic and biotic stresses, including plant diseases. Due to their very small size and high reactive, nanoparticles can affect on the activity of plant pathogenic microorganisms and inhibit pathogens in a way comparable to chemical pesticides. Therefore, the advantages of this technology can be used against a wide range of different fungal and bacterial pathogens and protection of plants against them. Nanomaterials can also be used against target pathogens as nano-pesticides in pesticide formulations as carriers of active ingredients of chemicals, host-defense induction chemicals, etc. For protecting plants against plant pathogens, nanoparticles are a good choice for the transfer of genetic material or proteins, by expressing pathogenesis-related genes. In the present review paper, the relationship and various aspects of the application of nanotechnology in plant pathology and plant disease control have been investigated.

Keywords: Nanoparticles, Biosensors, Resistance, Disease management

کاربردهای نانوتکنولوژی در بیماری‌شناسی گیاهی

ناهید معرف‌زاده[1*]؛ هادی خاطری[1]

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه
*Email: n.moarrefzadeh@razi.ac.ir

چکیده

با افزایش جمعیت جهان، ضرورت تأمین مواد غذایی سالم برای تغذیه ساکنان آن وجود دارد. گیاهان در طبیعت مورد حمله انواع بیمارگرهای گیاهی قرار می‌گیرند که با کاهش رشد و عملکرد گیاهان، چالش‌های فزاینده‌ای در تولید پایدار محصولات کشاورزی به وجود می‌آورند. کشاورزان برای مقابله با حمله بیمارگرها و کاهش خسارت محصول خود از روش‌های مختلفی استفاده می‌کنند که در میان آن‌ها کاربرد سموم شیمیایی مختلف بیش از همه رایج است. این سموم نه‌تنها قادر به مهار کامل بیماری‌های گیاهی نیستند، بلکه کاربرد مداوم و غیراصولی آن‌ها سبب افزایش مقاومت بیمارگرهای گیاهی شده و اثرات مضری نیز بر سلامت انسان و سایر موجودات زنده محیط‌زیست داشته است. بنابراین، برای افزایش کارایی کنترل بیماری‌های گیاهی و افزایش راندمان تولید در محصولات کشاورزی، به روش‌های جدیدی نیاز است تا با روش‌های مرسوم تلفیق شده و درعین‌حال خطرات کمتری برای انسان‌ها و محیط‌زیست داشته باشند. در سال‌های اخیر، برای مقابله با این چالش‌ها، پیشرفت‌ها و نوآوری‌های فن‌آورانه‌ای در کشاورزی انجام شده که نانوتکنولوژی یکی از آن‌هاست. نانوتکنولوژی توانایی استفاده در جنبه‌های مختلف بیماری‌شناسی گیاهی به طرق مختلف را دارد؛ نانوذرات می‌توانند به‌صورت نانوبیوسنسور در تشخیص و ردیابی بیمارگرهای گیاهی بسیار کارآمد باشند. از نانوذرات می‌توان به‌طور بالقوه برای افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش‌های غیرزیستی و زیستی مختلف از جمله بیماری‌های گیاهی استفاده نمود. نانوذرات می‌توانند به دلیل اندازه بسیار کوچک و واکنش‌پذیری بالا بر فعالیت میکروارگانیسم‌های بیماریزای گیاه تأثیر بگذارند و بیمارگرها را به روشی قابل‌مقایسه با آفت‌کش‌های شیمیایی مهار کنند. بنابراین، از مزایای این فناوری می‌توان در مقابله با طیف وسیعی از بیمارگرهای مختلف قارچی و باکتریایی و حفاظت از گیاهان در برابر آن‌ها استفاده نمود. همچنین از نانو مواد می‌توان به‌صورت نانو آفت‌کش در فرمولاسیون آفت‌کش‌ها به‌عنوان حامل مواد فعال سموم شیمیایی، مواد شیمیایی القا کننده دفاع میزبان و غیره در برابر بیمارگرهای هدف استفاده نمود. نانوذرات انتخاب خوبی برای انتقال مواد ژنتیکی یا پروتئین‌هایی هستند که با بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی، سبب محافظت از گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌شوند. در مقاله مروری حاضر، ارتباط و جنبه‌های مختلف کاربرد نانوتکنولوژی در بیماری‌شناسی و کنترل بیماری‌های گیاهی بررسی گردیده است.

واژگان کلیدی: نانوذرات، بیوسنسور، مقاومت، مدیریت بیماری

۱.مقدمه

با افزایش جمعیت جهان، ضرورت تأمین مواد غذایی سالم برای تغذیه ساکنان آن وجود دارد (Doi et al., 2009). گیاهان در طبیعت مورد حمله انواع بیمارگرها قرار می‌گیرند که رشد و بهره‌وری آن‌ها را کاهش داده یا متوقف می‌کنند (Nargund et al., 2021) و سهم عمده‌ای در کاهش عملکرد محصولات کشاورزی و تأثیر شدیدی بر اقتصاد جهانی و سلامت انسان دارند (Banerjee et al., 2021). کشاورزان از روش‌های مختلفی برای مقابله با حمله بیمارگرها و کاهش تلفات هنگفت محصول استفاده می‌کنند (Nargund et al., 2021) که در میان آن‌ها کاربرد سموم شیمیایی مختلف بیش از همه رایج است؛ سالانه در جهان نزدیک به ۲.۵ متریک تن (سنجه‌ی وزن برابر با ۱۰۰۰ کیلوگرم) سموم شیمیایی برای کنترل بیماری‌ها و آفات مختلف گیاهی استفاده می‌گردد (Yadav et al., 2018). بااین‌حال، خسارت مستقیم عملکرد گیاهان در اثر این عوامل بین ۲۰ تا ۴۰ درصد یا گاه حتی بیش از ۵۰ درصد از تولید کشاورزی است (Yadav et al., 2018). از سوی دیگر، کاربرد مداوم و غیراصولی بیشتر سموم شیمیایی، سبب افزایش مقاومت آفات و بیمارگرهای گیاهی در برابر سموم شده و اثرات مضری نیز بر سلامت انسان و سایر موجودات زنده محیط‌زیست داشته است (Boricha and Fulekar, 2009; Latif and Amin, 2017; Singh et al., 2018). بنابراین، برای افزایش کارایی کنترل بیماری‌های گیاهی، به روش‌های نوآورانه و پیشرفته‌ای نیاز است تا با روش‌های مرسوم

تلفیق شوند (Nargund et al., 2021) و درعین‌حال خطرات کمتری برای انسان‌ها و محیط‌زیست داشته باشند (Yadav et al., 2018).

در سال‌های اخیر، برای مقابله با چالش‌های فزاینده تولید پایدار محصولات کشاورزی و پاسخگویی به تقاضای غذایی فزاینده جمعیت، پیشرفت‌ها و نوآوری‌های فن‌آورانه قابل‌توجهی در زمینه کشاورزی انجام شده است (Wang et al., 2016; Mazzaglia et al., 2017). در میان این رویکردها، نانوتکنولوژی از علوم و روش‌های نوینی است که با القای تحمل به بیماری در گیاه (Banerjee et al., 2021)، مهار مستقیم بیمارگرهای گیاهی و استفاده به‌عنوان نانوآفتکش، پتانسیل افزایش راندمان تولید در محصولات کشاورزی را دارد (Shang et al., 2019; Nargund et al., 2021). در مقاله حاضر تلاش شده ضمن تعریف کلی از نانوتکنولوژی و خصوصیات نانوذرات، ارتباط و جنبه‌های مختلف کاربرد این فناوری در بیماری‌شناسی و کنترل بیماری‌های گیاهی بررسی شود.

۱-۱-نانوتکنولوژی

واژه نانوتکنولوژی اولین بار توسط تانیگوچی (۱۹۷۴) ابداع شد. نانوتکنولوژی به فناوری در مقیاس نانو اطلاق می‌شود که بر دست‌کاری ماده در مقیاس نانو و کاربرد اتم‌ها، مولکول‌ها یا ذرات زیر میکرونی با اندازه‌های نانو (۱۰۰-۱ نانومتر) در سیستم‌های شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی تأکید دارد (Patel et al., 2014; Nargund et al., 2021). نانوتکنولوژی دارای دو جنبه عمده است؛ جنبه اول سنتز مواد در اندازه نانو و جنبه دوم استفاده یا کاربرد نانو مواد برای اهداف مورد نظر (Khan and Rizvi, 2014). تبدیل مواد درشت به ذرات با اندازه نانو، سبب ایجاد ویژگی‌های جدید در ماده می‌شود. در این اندازه، اتم‌ها و مولکول‌ها به گونه‌ای متفاوت عمل نموده و خواص و عملکردهای جدید و جالبی ارائه می‌دهند که به‌طور کامل در مقیاس ماکرو آن‌ها وجود ندارد (Nargund et al., 2021). از دیگر دلایل رفتار متفاوت نانوذرات در خواص فیزیکی، شیمیایی، نوری، الکتریکی و مغناطیسی می‌توان به محدودیت حامل‌های بار، ساختارهای الکترونیکی وابسته به اندازه، افزایش نسبت سطح به حجم و سایر عوامل ناشی از خواص منحصر به فرد اتم‌ها اشاره کرد (Shah et al., 2015). مهم‌ترین عواملی که امکان تولید نانوساختارها را فراهم می‌کنند، اندازه، شکل و خواص مورد نظرند که امکان کاربرد گسترده آن‌ها را در زمینه‌های مختلف پزشکی، صنعت، کشاورزی و سایر علوم زیستی فراهم می‌کنند (Khan and Rizvi, 2014; Nargund et al., 2021) و در صورت بهره‌برداری مناسب قادرند تحولاتی را در کل جامعه ایجاد نمایند (Khan and Rizvi, 2014).

در عرصه کشاورزی، نانوتکنولوژی قابلیت کاربرد جهت تولید، بهره‌برداری و حفاظت از منابع طبیعی، محصولات کشاورزی و دام را دارد (Khan and Rizvi, 2014). ازجمله نانومواد‌ی که در طی سال‌های گذشته در کشاورزی توسعه یافته‌اند، می‌توان به نانوآفت‌کش‌ها، نانوکودها و نانوحس‌گرها اشاره نمود (Atiq et al., 2020).

۱-۲- خصوصیات و سنتز نانوذرات

به‌طورکلی، نانوذرات کوچک‌تر از ۱۰۰ نانومتر بوده و حاوی ۲۰ تا ۱۵۰۰۰ اتم هستند و در قلمرویی وجود دارند که در مقیاس‌های کوانتومی و نیوتنی قرار دارد. نانوذرات را نمی‌توان با میکروسکوپ‌های نوری تصویربرداری کرد و چندین برابر کوچک‌تر از سلول‌های باکتریایی هستند (Liu, 2006). نانوذرات نسبت سطح به حجم بالایی دارند که واکنش‌پذیری و فعالیت بیوشیمیایی احتمالی آن‌ها را افزایش می‌دهد (Dubchak et al., 2010). آن‌ها اشکال متفاوتی دارند و ممکن است کروی، میله‌ای، چندوجهی و غیره باشند (Liu, 2006). نانوذرات در وضوح بالا به‌صورت نقطه پراکنده نور ظاهر می‌شوند. آن‌ها تحت حرکت براونی حرکت می‌کنند و سرعت آن‌ها بسته به اندازه ذرات، بسیار

متفاوت است (Liu, 2006) . مهم‌ترین پارامترهای شناسایی نانوذرات شامل اندازه ذرات، پراکنش و شکل آن‌هاست. میانگین قطر ذرات و توزیع اندازه و بار آن‌ها بر پایداری و توزیع نانوذرات تأثیر می‌گذارد. نانوذرات با اندازه، مورفولوژی و بار سطحی‌شان با استفاده از تکنیک‌های میکروسکوپ پیشرفته مانند میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) مشخص می‌شوند. بار سطحی نانوذرات بر پایداری فیزیکی و قابل استفاده بودن پراکندگی پلیمر و عملکرد آن‌ها تأثیر می‌گذارد (Nargund et al., 2021).

نانوذرات با روش‌های شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی سنتز می‌شوند. خواص نانوذرات و کارایی سنتز بسته به روش سنتز متفاوت است. مشخص شده روش‌های شیمیایی برای سنتز نانوذرات کارآمدتر از روش‌های دیگر هستند و سنتز تجاری نانوذرات عمدتاً با روش‌های شیمیایی انجام می‌شود (Khan and Rizvi, 2014). اما با توجه به اینکه یکی از جنبه‌های مهم نانوتکنولوژی در سنتز نانوذرات، توسعه فرآیندهای کارآمد و سازگار با محیط‌زیست است (Khan et al., 2009)، یکی از گزینه‌های مهم برای دستیابی به این هدف، استفاده از منابع زیستی طبیعی است (Khan and Rizvi, 2014). روش‌های متعددی برای سنتز نانوذرات با استفاده از مواد بیولوژیکی مختلف به‌عنوان عوامل احیاکننده وجود دارد که از آن جمله می‌توان به میکروارگانیسم‌ها، میکروسیال‌ها، موجودات دریایی و عصاره‌های گیاهی اشاره نمود (Ruffo Roberto et al., 2019). در میان عوامل مذکور، عصاره‌های گیاهی و میکروارگانیسم‌ها مورد توجه ویژه قرار گرفته‌اند (Banerjee et al., 2021).

۱-۳-استفاده از نانوذرات در بیماری‌شناسی گیاهی

نانوتکنولوژی توانایی استفاده در جنبه‌های مختلف بیماری‌شناسی به طرق مختلف دارد. از نانوذرات می‌توان به‌طور بالقوه برای بهبود مقاومت و حفاظت از محصولات مختلف در برابر بیماری‌های گیاهی (Banerjee et al., 2021) و مشابه آفت‌کش‌های شیمیایی جهت کنترل طیف وسیعی از بیمارگرهای مختلف گیاهی (Khan and Rizvi, 2014) که مربوط به بخش‌های مختلف گیاه نظیر شاخ و برگ، ریشه، ساقه و میوه هستند، استفاده نمود (Elmer and White, 2018; Bayoumy et al., 2019). علاوه بر این، نانوذرات می‌توانند به‌عنوان حامل مواد فعال آفت‌کش‌ها، مواد شیمیایی القا کننده دفاع میزبان و غیره در برابر بیمارگرهای هدف استفاده شوند (Khan and Rizvi, 2014). همچنین با توجه به اندازه بسیار کوچک ذرات و میزان واکنش یا حساسیت بسیار بالای آن‌ها، نانوذرات می‌توانند به‌صورت نانوبیوسنسور در تشخیص و ردیابی بیمارگرهای گیاهی بسیار کارآمد باشند (Khan and Rizvi, 2014). همچنین، نانوذرات انتخاب خوبی برای انتقال مواد ژنتیکی یا پروتئین‌هایی هستند که با بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی، سبب محافظت از گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌شوند (Banerjee et al., 2021). ازجمله نانوذرات کاربردی در زمینه‌های ذکرشده می‌توان به فلزات و اکسیدهای فلزی، نانوذرات غیرفلزی، نانوذرات کربنی، نانوذرات کیتوزان و ... اشاره نمود (Banerjee et al., 2021) در بخش زیر به به‌طور مفصل‌تر به برخی کاربردهای نانوذرات در بیماری‌شناسی گیاهی اشاره شده است.

۱-۴-نانوبیوسنسورها به‌عنوان ابزاری جدید برای تشخیص و ردیابی بیماری‌های گیاهی

برای کنترل بیماری‌های گیاهی در ابتدا لازم است ردیابی و تشخیص سریع بیمارگر صورت گیرد. ترکیب زیست‌شناسی و نانوتکنولوژی چشم‌انداز وسیع‌تری را برای ردیابی بیماری و فرآیند تشخیص بیماری در گیاهان زراعی فراهم می‌نماید (Khan and Rizvi, 2014). ازآنجاکه تشخیص بیمارگرها در مقادیر بسیار کم یا در شدت بسیار کم بیماری بسیار دشوار است، استفاده از حس‌گرهای زیستی مبتنی بر نانو (نانوبیوسنسورها)، حساسیت ردیابی بیمارگر و تشخیص بیماری را در مقایسه با تکنیک‌های مرسوم افزایش داده است (Elmer and White, 2018). نانوبیوسنسورها ابزار امیدبخشی هستند که قادرند ردیابی عوامل بیماری‌زای مختلف و تشخیص بیماری‌های گیاهی را بسیار دقیق‌تر و سریع‌تر از روش‌های مرسوم انجام دهند (Brock et al.,

2011; Khan and Rizvi, 2014). نانوبیوسنسورها از سه جزء پروب، گیرنده زیستی (گیرنده سیگنال که سیگنال‌ها را از محیط اطراف دریافت می‌کند) و مبدل سیگنال تشکیل شده‌اند. هنگامی‌که تغییری در محیط رخ دهد، گیرنده آن را به‌صورت یک سیگنال دریافت می‌کند که شامل یک تعامل بیومولکولی است. یک مبدل شدت سیگنال را اندازه‌گیری نموده و اطلاعات را به سیگنال الکتریکی در خروجی دیجیتال تبدیل می‌کند (Brock et al., 2011). در سال‌های اخیر، نانوبیوسنسورها برای تشخیص وجود برخی ویروس‌های بیماریزای گیاهی مانند ویروس موزائیک توتون ، ویروس موزائیک کاهو و ویروس موزائیک لوبیا چشم‌بلبلی طراحی شده‌اند (Chartuprayoon et al., 2013; Lin et al., 2014) و حساسیت ردیابی بیمارگر را در مقایسه با تکنیک‌های الیزای مرسوم افزایش داده‌اند. حس‌گرهای ایمن مبتنی بر نانوطلا برای تشخیص بیماری سیاهک هندی در گندم (*Tilletia indica*)کارآمد بوده‌اند (Singh et al., 2010). همچنین به نظر می‌رسد کاربرد برخی از این حس‌گرها بتواند در فرایند گواهی بذر و قرنطینه گیاهی بسیار کارآمد و دقیق باشد (Khan and Rizvi, 2014).

از حس‌گرهای زیستی و تکنیک‌های سنجش می‌توان علاوه بر تشخیص بیمارگرها، جهت شناسایی متابولیت‌های جانبی آن‌ها و یا نظارت بر تغییرات فیزیولوژیکی در گیاهان استفاده نمود (Khan and Rizvi, 2014). گیاهان از طریق تغییرات فیزیولوژیکی به تنش‌های مختلف پاسخ می‌دهند (Khan and Khan, 2011) و در شرایط تنش چندین هورمون مرتبط با تنش را انباشته می‌کنند (Banerjee et al., 2021). یکی از این پاسخ‌ها القای دفاع سیستمیک است که به نظر می‌آید توسط اسید جاسمونیک، متیل‌جاسمونات و اسید سالیسیلیک تنظیم می‌شود (Khan and Haque, 2013). در یک تحقیق، از این محرک غیرمستقیم برای القای یک نانوحس‌گر الکترود طلای اصلاح شده modified با نانوذرات مس، برای نظارت بر مقادیر اسید سالیسیلیک در دانه‌های روغنی برای شناسایی بیمارگر قارچی *Sclerotinia sclerotiorum* استفاده شد و اسید سالیسیلیک با استفاده از این حس‌گر با موفقیت و با دقت اندازه‌گیری گردید (Wang et al., 2010)

۱-۵-استفاده از نانوذرات جهت افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش‌های مختلف

گیاهان به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم تحت تأثیر انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی قرار دارند که زیان اقتصادی بالایی به گیاهان وارد می‌سازند (Yadav et al., 2018). برای غلبه بر این شرایط، گیاهان باید استراتژی‌های سازگاری هوشمندانه را انتخاب کنند که شامل تنظیم هورمونی، بیان ژن استرس و فعال‌سازی آنزیم‌های مختلف مرتبط با استرس است (Banerjee et al., 2021). با پیشرفت‌های اخیر در نانوتکنولوژی می‌توان با استفاده از مجموعه‌ای جدید از روش‌ها توسط نانوذرات، نانوالیاف‌ها و نانوکپسول‌ها، بیان ژن‌های مقاومت گیاهان را دست‌کاری و افزایش داده و درنتیجه مقاومت گیاهان را بهبود بخشید (McKnight et al.; Rai et al., 2012). با تلفیق بیوتکنولوژی و نانوتکنولوژی می‌توان به ابزار جدیدی برای انتقال ژن و دارورسانی (drug delivery) دست یافت. روش مرسوم انتقال ژن با استفاده از ناقل‌های ویروسی، در حین انتقال مواد ژنتیکی با چالش‌های متعددی مواجه است. در مقایسه با انتقال ژنوم با واسطه ناقل ویروسی، انتقال ژن مبتنی بر نانوتکنولوژی روش راحت‌تری است و برای جایگزینی کامل ژنوم در بسیاری از گونه‌های گیاهی استفاده شده است (Torney et al., 2007). کیتوزان بیوپلیمری طبیعی بوده و دارای فعالیت‌های زیستی متعدد ازجمله خواص ضد میکروبی در برابر چند میکروب بیماریزا است. نانوذرات کیتوزان گزینه‌های خوبی برای دارورسانی و انتقال ژنوم هستند، زیرا کارایی انتقال آن‌ها را می‌توان با استفاده از مواد شیمیایی مختلف مانند پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) بهبود بخشید. یکی از مزایای استفاده از نانوذرات کیتوزان که استفاده از آن‌ها را به‌عنوان یک وسیله عالی انتقال ژن ممکن می‌سازد، این است که آن‌ها می‌توانند به‌راحتی به RNA متصل شده از غشای

پلاسما عبور کنند. همچنین نانوذرات کیتوزان می‌توانند si-RNA را انتقال دهند و تحمل گیاهان زراعی را در برابر آفات مختلف و بیمارگرها بهبود بخشند (Zhang et al., 2010; Gaur et al., 2020). علاوه بر این، گزارش شده نانوذرات کیتوزان بیان ژن‌های مرتبط با دفاع را افزایش می‌دهند (Chandra et al., 2015). به‌عنوان‌مثال، کاربرد نانوذرات نقره پوشش داده شده با DNA علاوه بر اتیلن گلیکول، DNA پلاسمایی را با موفقیت به پروتوپلاست جدا شده گل اطلسی منتقل نمود (Rad et al., 2013). در تحقیق دیگری انتقال ژن با واسطه نانوذرات SiO_2 در توتون و ذرت انجام شد و مقاومت قابل‌توجهی در برابر بیماری‌ها ایجاد نمود (Galbraith, 2007).

علاوه بر موارد فوق، کاربردهای نانوذرات مس باعث افزایش سنتز آنزیم‌های مختلف مرتبط با دفاع ازجمله پلی فنل اکسیداز در گیاهان شده است (Sarkar et al., 2020). استفاده از نانو کودها نیز قادر است جهت غلبه بر شرایط نامطلوب محیطی به گیاهان مختلف کمک نماید (Onaga and Wydra, 2016). به‌عنوان‌مثال، استفاده از نانوذرات SiO_2 با تجمع پرولین، تنش شوری را در گیاهان گوجه‌فرنگی بهبود می‌بخشد (Siddiqui and Al-Whaibi, 2014). استفاده از نانو اکسید روی با افزایش تجمع پرولین و سایر اسیدهای آمینه، با بهبود کمبود آب و فعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، نیترات ردوکتاز، کاتالاز و پراکسیداز، که تحمل استرس را در گیاهان افزایش می‌دهند، مرتبط است (Wang et al., 2015).

۱-۶-نانوذرات به‌عنوان مهارکننده بیمارگرهای مختلف گیاهی

با توجه به این‌که خواص فیزیکوشیمیایی نانوذرات از فرم ماکروی آن‌ها بسیار متفاوت است، بنابراین به دلیل اندازه بسیار کوچک (کوچک‌تر از یک ذره ویروس) و واکنش‌پذیری بالا می‌توانند بر فعالیت میکروارگانیسم‌ها تأثیر بگذارند و از مزایای این فناوری می‌توان در حفاظت از گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی و مقابله با آن‌ها استفاده نمود (Khan and Rizvi, 2014). دامنه و کاربرد نانوذرات در بیماری‌شناسی و کنترل بیماری‌های گیاهی را می‌توان از دو دیدگاه عمده بررسی نمود؛۱) اثر مستقیم نانوذرات بر بیمارگرها و ۲) استفاده از نانو مواد در فرمولاسیون آفت‌کش‌ها (نانو آفت‌کش‌ها) (Khan and Rizvi, 2014). ا

۱-۷-اثر مستقیم نانوذرات بر بیمارگرها

ساده‌ترین راه استفاده از نانوذرات برای محافظت از گیاهان در برابر تهاجم بیمارگرها، کاربرد مستقیم آن‌ها در خاک، بر روی بذر، یا شاخ و برگ گیاه است. به‌این‌ترتیب، نانوذرات می‌توانند بیمارگرها را به روشی قابل‌مقایسه با آفت‌کش‌های شیمیایی مهار کنند (Khan and Rizvi, 2014) و نقش مهمی در عرصه‌های مختلف حفاظت از گیاهان در برابر بیمارگرهای قارچی و باکتریایی داشته باشند (Servin et al., 2015; Elmer and White, 2016).

۱-۸-تأثیر نانوذرات مختلف بر بیمارگرهای قارچی

نتایج پژوهش‌های مختلف حاکی از اثرات بازدارنده نانوذرات مختلف بر روی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی است. در مورد اثرات مهارکنندگی نانوذرات نقره بر بیمارگرهای قارچی گزارش‌های مختلفی منتشر شده است: در یک پژوهش، اشکال مختلف یون‌ها و نانوذرات نقره توانسته‌اند قارچ‌های بیماریزای Bipolaris sorokiniana و Magnaporthe grisea را مهار کنند (Jo et al., 2009). در تحقیق دیگری اثر ضدقارچی نانوذرات نقره در برابر قارچ‌های بیماریزای مختلف ازجمله A. Alternaria alternata، brassicicola، Botrytis cinerea، Cladosporium cucumerinum، Corynespora cassiicola، Cylindrocarpon destructans، F. solani ، F. oxysporum f. sp. lycopersici ، Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinum، Didymella bryoniae، Glomerella cingulata، Monosporascus cannonballus، Pythium aphanidermatum، Pythium spinosum و Stemphylium lycopersici در شرایط آزمایشگاهی به اثبات رسید و نشان داد نانوذرات نقره می‌توانند به‌عنوان عوامل ضدقارچی عالی با طیف وسیع در نظر گرفته شوند (Kim et al., 2012). در یک بررسی نیز دیگر غلظت ۱۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره فعالیت بازدارندگی بسیار خوبی در برابر قارچ‌های بیماری‌زای Alternaria alternata، Sclerotinia sclerotiorum،

Macrophomina phaseolina، Rhizoctonia solani، B. cinerea و Curvularia lunata نشان داد (Krishnaraj et al., 2012). همچنین نانوذرات نقره توانسته‌اند بسیاری از بیمارگرهای خاکزاد مانند Phytophthora parasitica ، Meloidogyne spp.، Fusarium spp. را مهار نمایند (Elmer and White, 2018). علاوه بر این، گزارش شده نانوذرات نقره پیشرفت بیمارگر Colletotrichum musae را تقریباً ۷۰ درصد در میوه موز مهار می‌کنند (Jagana et al., 2017).

فعالیت ضدقارچی نانوذرات مس نیز در برابر بیمارگرهای گیاهی مختلف مانند Curvularia lunata، Fusarium oxysporum، Alternaria alternata، Phoma destructiva، Alternaia alternata، Phytophthora cinnamon، Fusarium solani ، Penecillium digitatum (Khamis et al., 2017)، Aspergillus flavus، Aspergillus niger و گونه‌های Penicillium مشخص گردیده است (Rajesh et al., 2018). علاوه بر این گزارش شده محلول‌پاشی نانوذرات مس (۱۱ تا ۲۵ نانومتر) روی گوجه‌فرنگی به‌طور کارآمد آلودگی Phytophthora infestans را در غلظتی بسیار کمتر از فرمولاسیون‌های قارچ‌کش تجاری مهار می‌کند (Giannousi et al., 2013).

تأثیر بالای نانوذرات روی علیه چند بیمارگر قارچی ازجمله Mucor plumbeus، Alternaria alternata، Fusarium oxysporum، Sclerotinia sclerotiorum، Rhizoctonia solani و Rhizopus stolonifera به اثبات رسیده است (He et al., 2011; Wani and Shah, 2012; Sardella et al., 2017). نانوذرات روی به‌شدت رشد میسلیوم و تولید قارچ‌زهرهایی مانند زئارالنون و دئوکسی‌نیوالنول را در Fusarium graminearum مهار نموده و باعث افزایش تولید ROS، پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش محتوای ارگوسترول غشای قارچی، که برای بیمارگر آزمایش‌شده مضرند، گردیده‌اند (Atiq et al., 2020). علاوه بر این، نانوذرات اکسید روی در برابر چند بیمارگر قارچی ازجمله Penicillium expansum، Mucor plumbens، Aspergillus flavus، Aspergillus niger، Botrytis cinerea مؤثر بوده‌اند (He et al., 2011; Rajiv et al., 2013). همچنین گزارش شده نانوذرات منگنز و روی، گسترش بیماری‌های گیاهچه‌میری و پوسیدگی زغالی ناشی از Rhizoctonia solani و Macrophomina phasoliana را در آفتابگردان مهار کرده‌اند (El-Hai et al., 2009).

در نانوذرات طلا نیز فعالیت ضدقارچی در برابر Aspergillus niger, Aspergillus flavus, Puccinia graminis tritci, Candida albicans (Jayaseelan et al., 2013) و Sclerotium rolfsii (Thanighaiarassu et al., 2014) مشخص گردیده است. برخی محققین بیان کرده‌اند که فعالیت بازدارندگی نانوذرات مختلف مانند نانوذرات نقره، نانوذرات مس و طلا به‌شدت به غلظت آن‌ها بستگی دارد و با افزایش غلظت نانوذرات در یک محدوده خاص، حداکثر مهار رشد قارچ را نشان می‌دهند (Atiq et al., 2020). در میان نانوذرات غیرفلزی نیز مشخص شده نانوذرات گوگرد اثر قارچ کشی داشته و می‌توانند از گیاهان در برابر Fusarium solani (عامل بیماری‌های سوختگی زودهنگام و پژمردگی در گوجه‌فرنگی) و Venturia inaequalis (عامل باعث بیماری لکه‌سیاه سیب) محافظت کنند (Rao and Paria, 2013). همچنین به دلیل فعالیت اتوکاتالیستی نانو تیتانیوم، از آن به‌عنوان یک عامل بالقوه ضدقارچی استفاده می‌شود (Boxi et al., 2016). همچنین نانوذرات متالوئید Si با نقره، سفیدک پودری کدوتنبل را مهار کرده‌اند (Park et al., 2006).

نانوذرات کربنی مهندسی‌شده نیز قادرند برخی از بیمارگرهای گیاهی را ریشه‌کن نمایند. عمدتاً سه نوع از نانوذرات کربنی در مهار بیماری‌ها استفاده می‌شوند که شامل فولرن‌ها (fullerenes)، اکسیدهای گرافن (graphen) و نانولوله‌های کربنی (carbon nanotubes) هستند (Banerjee et al., 2021). گزارش شده است که نانولوله‌های کربنی تک جداره single-wall می‌توانند از تشکیل کنیدی در Fusarium graminearum و Fusarium poae جلوگیری کنند (Wang et al., 2014).

مطالعه اخیر نشان داده نانوذرات کیتوزان می‌توانند پاسخ‌های ایمنی گیاهان را تقویت نموده باعث ایجاد مقاومت در برابر بیماری شوند (El Hadrami et al., 2010; Amanzadi et al., 2019). به‌عنوان‌مثال، استفاده از نانوذرات کیتوزان با افزایش آنزیم‌های مرتبط با دفاع مانند پلی‌فنل اکسیداز، فنیل‌آلانین آمونیالیاز و-1,3-β گلوکاناز polyphenol oxidase, phenylalanine ammonia-lyase, and β-1,3-glucanase، مقاومت به بیماری را در گیاه چای القا نمود (Chandra et al., 2015).

۱-۹-تأثیر نانوذرات مختلف بر بیمارگرهای باکتریایی

اثرات بازدارنده نانوذرات مختلف بر روی بیمارگرهای باکتریایی نیز به اثبات رسیده است. در یک پژوهش، نانوذرات نقره حداکثر بازدارندگی را در برابر گونه‌های *Pseudomonas* نشان دادند (Savithramma et al., 2011). در *Arabidopsis thaliana* مخلوط نانوذرات نقره و سیلیس علیه بیمارگر باکتریایی *Pseudomonas syringae* pv *tomato* سبب ۲۵ درصد مقاومت به بیماری شد (Chu et al., 2012). گزارش شده نانوذرات نقره پتانسیل ضد باکتریایی خوبی برای حذف آلاینده‌های باکتریایی در فرآیند کشت بافت گیاه توتون دارند (Safavi et al., 2011). علاوه بر موارد فوق، نانوذرات روی نیز به‌طور گسترده برای کنترل بیمارگرهای مختلف باکتریایی استفاده شده‌اند. به‌عنوان‌مثال، کاربرد Zinckicide، فرمولاسیون نانو روی، بیماری شانکر مرکبات ناشی از بیمارگر *Xanthomonas citri* را مهار کرده است (Graham et al., 2016). نانوذرات مس نیز در برابر *Pseudomonas syringae* اثر بازدارندگی نشان داده‌اند (Khamis et al., 2017) اکسید گرافن که از نانوذرات کربنی است نیز توانسته تا ۹۵ درصد مقاومت در برابر بیماری ناشی از بیمارگر باکتریایی *Xanthomonas oryzae* را در گیاه القا کند (Chen et al., 2013). مشخص شده که فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات به غلظت نانوذرات، فیزیولوژی، متابولیسم، نفوذپذیری انتخابی درون سلولی غشاها و نوع سلول میکروبی بستگی دارد (Khan and Rizvi, 2014).

همچنین علاوه بر بیمارگرهای قارچی و باکتریایی، نانوذرات ممکن است به دلیل اندازه بسیار کوچک بتوانند ذرات ویروس را هدف قرار داده و زمینه جدیدی برای کنترل ویروس‌ها در گیاهان فراهم نمایند (Khan and Rizvi, 2014).

۱-۱۰-اثر غیر مستقیم نانوذرات بر بیمارگرها

۱-۱۰-۱-نانو آفت‌کش‌ها

همچنان‌که پیش‌تر ذکر شد، یکی از رایج‌ترین شیوه‌های حفاظت از محصولات زراعی، کاربرد وسیع ترکیبات شیمیایی شامل قارچ‌کش‌ها، علف‌کش‌ها و حشره‌کش‌ها است. بیش از ۹۰ درصد از آفت‌کش‌های استفاده‌شده در محیط از بین رفته و یا قادر به رسیدن به مکان‌های هدف ضروری برای کنترل مؤثر آفات نیستند (Nuruzzaman et al., 2016). این امر نه‌تنها هزینه‌های تولید محصول را افزایش می‌دهد، بلکه باعث تخلیه سیستم‌های محیطی می‌شود. لازم به ذکر است که وجود مواد مؤثره در حداقل غلظت مؤثر یک فرمولاسیون در مکان‌های مورد نظر، برای تضمین حفاظت بهتر از گیاهان در برابر تهاجم آفات و بیمارگرها و متعاقب آن جلوگیری از آسیب محصول، ضروری است (Shang et al., 2019). به عنوان مثال، وجود ماده مؤثره یک فرمولاسیون در ناحیه ریشه گیاه در مرحله اولیه رشد محصول به محافظت از گیاه در برابر تهاجم بیمارگر و پایین آوردن جمعیت آن به زیر سطح آستانه اقتصادی کمک می‌کند (Khan et al., 2014a; Khan et al., 2014b). ازآنجاکه همه پروپاگول‌ها یا اسپورهای یک بیمارگر در یک زمان به میزبان نزدیک نشده یا به میزبان حمله نمی‌کنند، بلکه به‌صورت متناوب حمله می‌کنند، بنابراین ماندگاری یا آزادسازی آهسته یا تدریجی ماده فعال در ناحیه ریشه، باعث افزایش اثربخشی فرمولاسیون می‌شود (Khan and Rizvi, 2014) علاوه بر این، آزادسازی به موقع و آهسته ماده شیمیایی، مقدار خالص آفت کش مورد نیاز برای کنترل بیماری را کاهش داده و اثرات نامطلوب آفت‌کش‌ها را بر انسان و محیط‌زیست به حداقل می‌رساند (Khan and Jairajpuri, 2012). در این رابطه، توسعه فرمولاسیون‌های جدید جهت حفاظت از گیاهان، از دیرباز عرصه مهمی در تحقیقات کشاورزی بوده است. نانوتکنولوژی و کاربرد نانوفرمولاسیون یا کپسوله‌سازی آفت‌کش‌ها یکی از این فناوری‌ها است (Shang et al., 2019) و آزادسازی کنترل شده ماده فعال را می‌توان با استفاده از نانو مواد به‌عنوان حامل مواد شیمیایی به دست آورد (Khan and Rizvi, 2014). نانو فرمولاسیون و نانوکپسوله کردن آفت‌کش‌ها شامل پوشش مواد مؤثره آفت‌کش‌ها با مواد دیگری با اندازه‌های مختلف در محدوده نانو است که در آن مواد محصور شده به‌عنوان فاز داخلی ماده هسته (آفت‌کش‌ها) و مواد کپسول‌سازی به‌عنوان فاز خارجی شناخته می‌شوند (Nuruzzaman et al., 2016). نانو آفت‌کش‌ها حاوی ذرات بسیار کوچکی از مواد فعال آفت کش یا دیگر ساختارهای مهندسی‌شده کوچک با خواص آفت کش مفید هستند (Khan and Rizvi, 2014). نانو فرمولاسیون آفت‌کش‌ها سطح ویژه بزرگی را عرضه می‌کنند و درنتیجه میل ترکیبی بیشتری با هدف دارند (Yan et al., 2005). به دلیل پایداری جنبشی

بهتر kinetic stability، اندازه کوچک‌تر، ویسکوزیته کم و شفافیت نوری، نانوامولسیون ها می‌توانند به‌عنوان یک سیستم آزادسازی بهتر آفت‌کش عمل کنند (Xu et al., 2010) و به‌عنوان یک حامل برای رهایی آفت‌کش، حلالیت و فراهمی زیستی مواد فعال شیمیایی را بهبود بخشند (Khan and Rizvi, 2014). به دلیل افزایش پتانسیل پراکندگی و ترشوندگی، نانوفرمولاسیون‌ها باعث کاهش رواناب runoff حلال آلی و حرکت ناخواسته آفت‌کش‌ها (فرمولاسیون‌های کشاورزی) می‌شوند (Bergeson, 2010). همچنین نانو مواد و بیوکامپوزیت ها دارای خواص مفیدی مانند سختی، نفوذپذیری، بلورینگی، پایداری حرارتی، انحلال پذیری و زیست تجزیه پذیری می‌باشند که برای سیستم‌های کشاورزی پایدار ضروری هستند (Bordes et al., 2009; Bouwmeester et al., 2009). نانو فرمولاسیون آفت کش‌ها، ماندگاری یا آزادسازی کنترل شده مواد فعال را در نواحی ریشه یا داخل گیاهان بدون به خطر انداختن کارایی آن‌ها تسهیل می‌کند. از سوی دیگر، فرمولاسیون‌های مرسوم آفت‌کش‌ها یا علف‌کش‌ها نه‌تنها حلالیت آفت‌کش‌ها در آب را محدود می‌کنند، بلکه به سایر موجودات نیز آسیب می‌رسانند و منجر به افزایش مقاومت در برابر ارگانیسم‌های هدف می‌شوند. در مقابل، نانو فرمولاسیون‌ها می‌توانندجهت غلبه بر محدودیت‌های ذکرشده در بالا کمک نمایند (Dwivedi et al., 2016; Shang et al., 2019). چنین فرمولاسیون‌هایی می‌توانند با کاهش میزان کاربرد آفت‌کش‌ها، میزان ورود و خطرات زیست‌محیطی مرتبط با آن‌ها را تا حد زیادی کاهش داده و از تخریب محیط‌زیست و آسیب به سایر گونه‌های غیر هدف ممانعت نمایند (Shang et al., 2019)، چون مقدار ماده شیمیایی مؤثر حداقل ۱۰-۱۵ برابر کمتر از مقدار استفاده شده در فرمولاسیون‌های کلاسیک است، بنابراین مقدار بسیار کمتری از مقدار طبیعی برای دستیابی به کنترل رضایت بخش بیماری مورد نیاز است (Khan and Rizvi, 2014). از سوی دیگر، انتشار به موقع و کنترل شده مواد فعال نیز می‌تواند مقدار کل آفت‌کش‌های مورد نیاز برای کنترل آفات و بیماری‌ها را کاهش دهد و این امر، یکی از ویژگی‌های مهم مدیریت تلفیقی آفات (IPM) است. علاوه بر موارد فوق، استفاده کمتر از آفت کش‌ها هزینه‌های مربوط به تولید محصول را کاهش می‌دهد (Shang et al., 2019). بنابراین با توجه به موارد ذکرشده، نانو مواد موجود در آفت‌کش‌ها، قارچ‌کش‌ها و علف‌کش‌ها دامنه وسیعی در توسعه کشاورزی پایدار دارند (Shang et al., 2019).

قارچ‌کش‌های فرموله شده از نانوذرات مس توانسته‌اند از پیشرفت *Phytophthora infestans* در گوجه‌فرنگی جلوگیری کنند (Giannousi et al., 2013). مخلوط بردو ساخته شده از نانوذرات مس توانسته نماتد Xiphinema index را که باعث ایجاد بیماری در گیاه انگور می‌شود، مهار کند (Elmer and White, 2018). استفاده از آفت‌کش‌ها و کودهای فرموله شده با نانوذرات مس، باعث افزایش مقاومت گیاهان در برابر بیماری‌های مختلف می‌شود (Banerjee et al., 2021). در میان نانوذرات غیرفلزی، بیشتر از نانوذرات گوگرد برای فرمولاسیون نانو قارچ‌کش‌ها استفاده می‌شود (Banerjee et al., 2021). از نانو مواد، لوله‌های کربن، فنجان‌ها carbon tubes, cups و غیره می‌توان به‌عنوان حامل برخی از مواد شیمیایی بسیار واکنش‌پذیر reactive مانند فرومون‌ها، مواد شیمیایی القاکننده مقاومت اکتسابی سیستمیک و محرک SAR، بازدارنده‌های سنتز پلی‌آمین یا حتی اجزای فعال غلیظ شده آفت‌کش‌ها برای رهاسازی کنترل‌شده آن‌ها به ویژه در شرایط غرقاب استفاده نمود (Khan and Rizvi, 2014; Nargund et al., 2021).

۲.نتیجه گیری

در حال حاضر سیستم‌های کشاورزی در سراسر جهان با چالش‌های متعدد و بی‌سابقه‌ای در تولید و عملکرد محصول مواجهند که یکی از مهم‌ترین آن‌ها بیمارگرهای گیاهی می‌باشند. به منظور کاهش خسارت بیماری‌های گیاهی و دستیابی به امنیت غذایی، علم بیماری‌شناسی گیاهی به روش‌های جدیدی برای تشخیص به موقع و مدیریت بیمارگرهای گیاهی نیاز دارد. همچنان‌که در این بررسی مروری مشاهده شد، نانوتکنولوژی از طریق نانوبیوسنسورها، ابزار جدیدی را برای تشخیص و ردیابی سریع و زودهنگام بیمارگرها یا آسیب‌های محیطی دیگر فراهم نموده است و می‌تواند با توسعه برخی ابزارهای جدید برای بهبود مقاومت در برابر بیماری‌های گیاهی، مکمل یا جایگزین روش‌های کشاورزی مرسوم باشد. علاوه بر این، نانوذرات دارای فعالیت‌های ضد میکروبی بوده و باعث مهار قارچ‌ها و باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی شده و روش‌های آینده برای مبارزه با بیماری‌های گیاهی

هستند. استفاده آفت‌کش‌های محصور شده در نانوفرمولاسیون های مختلف نیز کاربرد بهتر و رهاسازی کنترل شده مواد فعال آفت‌کش‌ها را فراهم نموده و ضمن سمیت کمتر و مقرون به صرفه‌تر بودن، آلودگی‌های محیط‌زیست را کاهش می‌دهد. بنابراین با توجه به فواید و کاربردهای نانوذرات در بیماری‌شناسی، نانوتکنولوژی یکی از بهترین روش‌ها برای کاهش خسارت بیماری‌های گیاهی و بهبود تولید محصول است که قادر است کشاورزی رایج را به سمت کشاورزی پایدار سوق داده و در نهایت به رونق اقتصاد جهانی کمک کند.

بااین‌حال، استفاده از نانوتکنولوژی هنوز در مراحل اولیه است و با وجود قابلیت کاربردهای متعدد و مختلف این فناوری در کشاورزی و بیماری‌شناسی، هنوز دانش زیادی در مورد ظرفیت جذب، حد مجاز و سمیت زیست محیطی نانوذرات وجود ندارد. تعامل نانوذرات با سطح گیاه نیز هنوز مورد سؤال است و اثرات بلندمدت آن‌ها نیز باید بررسی گردد. مسائل مذکور باید قبل از استفاده تجاری از نانوذرات در کشاورزی بررسی شده و در نهایت پس از اثبات بی‌خطر بودن، می‌توان از آن‌ها به‌عنوان جایگزین نهاده‌های معمولی مورد استفاده در کشاورزی استفاده نمود.

منابع

1- Amanzadi B., Mirzaei E., Hassanzadeh G., Mahdaviani P., Boroumand S. and Abdollahi M. 2019. Chitosan-based layered nanofibers loaded with herbal extract as wound-dressing materials on wound model studies. Biointerface Research in Applied Chemistry, 9: 3979-3986.

2- Atiq M., Naeem I., Sahi S.T., Rajput N.A., Haider E., et al. 2020. Nanoparticles: a safe way towards fungal diseases. Arch Phytopathol Plant Protect, 53(17-18): 781-792.

3- Banerjee A., Sarkar A., Acharya K. and Chakraborty N. 2021. Nanotechnology: an Emerging Hope in Crop Improvement. Letters in Applied NanoBioScience, 10(4): 2784-2803.

4- Bayoumy A., Elhaes H., Osman O., Ibrahim M., Kholmurodov K. and Hussein T. 2019. Effect of nano metal oxides on heme molecule: molecular and biomolecular approaches. Biointerface Research in Applied Chemistry, 10(1): 4837-4845.

5- Bergeson L.L. 2010. Nanosilver pesticide products: what does the future hold? Environ Qual Manage, 19(4): 73-82.

6- Bordes P., Pollet E. and Avérous L. 2009. Nano-biocomposites: Biodegradable polyester/nanoclay systems. Progress in Polymer Science, 34(2): 125-155.

7- Boricha H. and Fulekar M. 2009. *Pseudomonas plecoglossicida* as a novel organism for the bioremediation of cypermethrin. Biology and medicine, 1(4): 1-10.

8- Bouwmeester H., Dekkers S., Noordam M.Y., Hagens W.I., Bulder A.S., et al. 2009. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. Regul Toxicol Pharmacol, 53(1): 52-62.

9- Boxi S.S., Mukherjee K. and Paria S. 2016. Ag doped hollow TiO_2 nanoparticles as an effective green fungicide against *Fusarium solani* and *Venturia inaequalis* phytopathogens. Nanotechnology, 27(8): 085103.

10- Brock D.A., Douglas T.E., Queller D.C. and Strassmann J.E. 2011. Primitive agriculture in a social amoeba. Nature, 469(7330): 393-396.

11- Chandra S., Chakraborty N., Dasgupta A., Sarkar J., Panda K. and Acharya K. 2015. Chitosan nanoparticles: A positive modulator of innate immune responses in plants. Sci Rep, 5: 15195.

12- Chartuprayoon N., Rheem Y., Ng J.C.K., Nam J., Chen W. and Myung N.V. 2013. Polypyrrole nanoribbon based chemiresistive immunosensors for viral plant pathogen detection. Analytical Methods, 5(14): 3497.

13- Chen J., Wang X. and Han H. 2013. A new function of graphene oxide emerges: inactivating phytopathogenic bacterium *Xanthomonas oryzae* pv. Oryzae. Journal of Nanoparticle Research, 15(5): 1658.

14- Chu H., Kim H.-J., Su Kim J., Kim M.-S., Yoon B.-D., et al. 2012. A nanosized Ag–silica hybrid complex prepared by γ-irradiation activates the defense response in *Arabidopsis*. Radiat Phys Chem, 81(2): 180-184.

15- Doi T., Morita S., Abe J., Zhu S. and Yamagishi J. 2009. Analaysis of determining factors on community structure of soil bacteria in volcano ash soil (Kanto Loan) farming field using PCR-DGGE method.pp. 1-4 Paper presented at the International Symposium "Root Research and Applications" (RootRAP), 2-4 September, Boku, Vienna, Austria.

16- Dubchak S., Ogar A., Mietelski J. and Turnau K.J.S.J.o.A.R. 2010. Influence of silver and titanium nanoparticles on arbuscular mycorrhiza colonization and accumulation of radiocaesium in Helianthus annuus. Spanish Journal of Agricultural Research, 8(S1): S103-S108.

17- Dwivedi S., Saquib Q., Al-Khedhairy A.A. and Musarrat J. 2016. Understanding the Role of Nanomaterials in Agriculture, pp. 271-288 In: Singh, D.P., Singh, H.B. and Prabha, R. (Eds.), Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol 2: Functional Applications. Springer India, New Delhi.

18- El-Hai K., El-Metwally M., El-Baz S. and Zeid A. 2009. The use of antioxidants and microelements for controlling damping-off caused by *Rhizoctonia solani* and charcoal rot caused by *Macrophomina phasoliana* on sunflower. Plant Pathology Journal, 8(3): 79-89.

19- El Hadrami A., Adam L.R., El Hadrami I. and Daayf F. 2010. Chitosan in plant protection. Mar Drugs, 8(4): 968-987.

20- Elmer W. and White J. 2016. The use of metallic oxide nanoparticles to enhance growth of tomatoes and eggplants in disease infested soil or soilless medium. Environmental Science: Nano, 3(5): 1072-1079.

21- Elmer W. and White J.C. 2018. The Future of Nanotechnology in Plant Pathology. Annu Rev Phytopathol, 56: 111-133.

22- Galbraith D.W. 2007. Silica breaks through in plants. Nature nanotechnology, 2(5): 272-273.

23- Gaur P., Pal H., Puri D., Kumar N. and Shanmugam S. 2020. Formulation and development of hesperidin loaded solid lipid nanoparticles for diabetes. Biointerface Research in Applied Chemistry, 10(1): 4728-4733.

24- Giannousi K., Avramidisb I. and Dendrinou-Samara C. 2013. Synthesis, characterization and evaluation of copper based nanoparticles as agrochemicals against. RSC Advances, 3: 21743–21752.

25- Graham J.H., Johnson E.G., Myers M.E., Young M., Rajasekaran P., et al. 2016. Potential of Nano-Formulated Zinc Oxide for Control of Citrus Canker on Grapefruit Trees. Plant Dis, 100(12): 2442-2447.

26- He L., Liu Y., Mustapha A. and Lin M. 2011. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. Microbiol Res, 166(3): 207-215.

27- Jagana D., Hegde Y.R. and Lella R. 2017. Green nanoparticles: A novel approach for the management of banana anthracnose caused by *Colletotrichum musae*. Int J Curr Microbiol Appl Sci, 6(10): 1749-1756.

28- Jayaseelan C., Ramkumar R., Rahuman A.A. and Perumal P. 2013. Green synthesis of gold nanoparticles using seed aqueous extract of Abelmoschus esculentus and its antifungal activity. Industrial Crops and Products, 45: 423-429.

29- Jo Y.K., Kim B.H. and Jung G. 2009. Antifungal Activity of Silver Ions and Nanoparticles on Phytopathogenic Fungi. Plant Dis, 93(10): 1037-1043.

30- Khamis Y., Hashim A.F., Margarita R., Alghuthaymi M.A. and Abd-Elsalam K.A.J.P.A.S. 2017. Fungicidal efficacy of chemically-produced copper nanoparticles against *Penincillium digitatum* and *Fusarium solani* on citrus fruit. Philippine Agricultural Scientist: 69-78.

31- Khan M.R., Altaf S., Mohiddin F., Khan U. and Anwer A. 2009. Biological control of plant nematodes with phosphate solubilizing microorganisms, pp. 395-426. Nova Science Publishers, Inc., New York, USA

32- Khan M.R., Ashraf S., Rasool F., Salati K.M., Mohiddin F.A. and Haque Z. 2014a. Field performance of *Trichoderma* species against wilt disease complex of chickpea caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* and *Rhizoctonia solani*. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 38: 447-454.

33- Khan M.R. and Haque Z. 2013. Morphological and biochemical responses of five tobacco cultivars to simultaneous infection with *Pythium aphanidermatum* and *Meloidogyne incognita*. Phytopathologia Mediterranea, 52(1): 98.

34- Khan M.R., Haque Z. and Kausar N. 2014b. Management of the root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* infesting rice in the nursery and crop field by integrating seed priming and soil application treatments of pesticides. Crop Protect, 63: 15-25.

35- Khan M.R. and Jairajpuri M. 2012. Nematode infestation in horticultural crops, national scenario, pp. 1-30, Nematode infestation part III: horticultural crops. National Academy of Sciences, India.

36- Khan M.R. and Khan M.M. 2011. Plants response to diseases in sulphur dioxide stressed environment. Plant Pathology Journal (Faisalabad), 10(1): 1-12.

37- Khan M.R. and Rizvi T.F. 2014. Nanotechnology: Scope and Application in Plant Disease Management. Plant Pathology Journal, 13(3): 214-231.

38- Kim S.W., Jung J.H., Lamsal K., Kim Y.S., Min J.S. and Lee Y.S.J.M. 2012. Antifungal Effects of Silver Nanoparticles (AgNPs) against Various Plant Pathogenic Fungi. Mycobiology, 40(1): 53-58.

39- Krishnaraj C., Ramachandran R., Mohan K. and Kalaichelvan P.T. 2012. Optimization for rapid synthesis of silver nanoparticles and its effect on phytopathogenic fungi. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 93: 95-99.

40- Latif Z. and Amin A. 2017. Bioremediation of Heavy Metals for Sustainable Agriculture, pp. 275-289 In: Mehnaz, S. (Ed.), Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation. Springer Nature Singapore

41- Lin H.Y., Huang C.H., Lu S.H., Kuo I.T. and Chau L.K. 2014. Direct detection of orchid viruses using nanorod-based fiber optic particle plasmon resonance immunosensor. Biosens Bioelectron, 51: 371-378.

42- Liu W.-T. 2006. Nanoparticles and their biological and environmental applications. J Biosci Bioeng, 102(1): 1-7.

43- Mazzaglia A., Fortunati E., Kenny J.M., Torre L. and Balestra G.M. 2017. Nanomaterials in plant protection. Nanotechnology in agriculture and food science, 7: 115-133.

44- McKnight T.E., Melechko A.V., Griffin G.D., Guillorn M.A., Merkulov V.I., et al. 2003. Intracellular Integration of Synthetic Nanostructures with Viable Cells for Controlled Biochemical Manipulation. Nanotechnology, 14: 551–556.

45- Nargund V.B., Vinay J.U., Basavesha K.N., Chikkanna S., Jahagirdar S. and Patil R.R. 2021. Green Nanotechnology and Its Application in Plant Disease Management, pp. 591-609 In: Singh, K.P., Jahagirdar, S. and Sarma, B.K. (Eds.), Emerging Trends in Plant Pathology. Springer Singapore, Singapore.

46- Nuruzzaman M., Rahman M.M., Liu Y. and Naidu R. 2016. Nanoencapsulation, Nano-guard for Pesticides: A New Window for Safe Application. J Agric Food Chem, 64(7): 1447-1483.

47- Onaga G. and Wydra K. 2016. Advances in Plant Tolerance to Abiotic Stresses, p. 167 In: Abdurakhmonov, I.Y. (Ed.), Plant genomics

48- Park H.-J., Kim S.-H., Kim H.-J. and Choi S.-H.J.T.p.p.j. 2006. A new composition of nanosized silica-silver for control of various plant diseases. The plant pathology jornal, 22(3): 295-302.

49- Patel N., Desai P., Patel N., Jha A. and K G.H. 2014. Agronanotechnology for plant fungal disease management: a review. Int J Curr Microbiol App Sci, 3(10): 71-84.

50- Rad S.J., Naderi R., Alizadeh H. and Yaraghi A.S.J.I. 2013. Silver-nanoparticle as a vector in gene delivery by incubation. IRJALS, 2(3): 21-33.

51- Rai M., Deshmukh S. and Gade A. 2012. Strategic nanoparticle-mediated gene transfer in plants and animals-a novel approach. Current Nanoscience, 8(1): 170-179.

52- Rajesh K.M., Ajitha B., Reddy Y.A.K., Suneetha Y. and Reddy P.S. 2018. Assisted green synthesis of copper nanoparticles using *Syzygium aromaticum* bud extract: Physical, optical and antimicrobial properties. Optik, 154: 593-600.

53- Rajiv P., Rajeshwari S. and Venckatesh R. 2013. Bio-fabrication of zinc oxide nanoparticles using leaf extract of *Parthenium hysterophorus* L. and its size-dependent antifungal activity against plant fungal pathogens. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 112: 384-387.

54- Rao K.J. and Paria S. 2013. Use of sulfur nanoparticles as a green pesticide on *Fusarium solani* and *Venturia inaequalis* phytopathogens. RSC advances, 3(26): 10471-10478.

55- Ruffo Roberto S., Youssef K., Hashim A.F. and Ippolito A. 2019. Nanomaterials as Alternative Control Means Against Postharvest Diseases in Fruit Crops. Nanomaterials, 9(12): 1752.

56- Safavi K., Mortazaeinezahad F., Esfahanizadeh M. and Asgari M.J. 2011. In vitro antibacterial activity of nanomaterial for using in tobacco plants tissue culture, World Academy of Science, Engineering and Technology (Conference Paper), p. 372.

57- Sardella D., Gatt R. and Valdramidis V.P. 2017. Physiological effects and mode of action of ZnO nanoparticles against postharvest fungal contaminants. Food Res Int, 101: 274-279.

58- Sarkar J., Chakraborty N., Chatterjee A., Bhattacharjee A., Dasgupta D. and Acharya K. 2020. Green Synthesized Copper Oxide Nanoparticles Ameliorate Defence and Antioxidant Enzymes in *Lens culinaris*. Nanomaterials (Basel), 10(2).

59- Savithramma N., Rao M., Rukmini K. and Devi P.J.I.J.o.C.R. 2011. Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by using medicinal plants. International Journal of ChemTech Research, 3(3): 1394-1402.

60- Servin A., Elmer W., Mukherjee A., De la Torre-Roche R., Hamdi H., et al. 2015. A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. Journal of Nanoparticle Research, 17(2): 1-21.

61- Shah M., Fawcett D., Sharma S., Tripathy S. and Poinern G. 2015. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles via Biological Entities. Materials, 8(11): 7278-7308.

62- Shang Y., Hasan M.K., Ahammed G.J., Li M., Yin H. and Zhou J. 2019. Applications of Nanotechnology in Plant Growth and Crop Protection: A Review. Molecules, 24(14): 2558.

63- Siddiqui M.H. and Al-Whaibi M.H. 2014. Role of nano-SiO2 in germination of tomato (Lycopersicum esculentum seeds Mill.). Saudi J Biol Sci, 21(1): 13-17.

64- Singh B.K., Trivedi P., Singh S., Macdonald C.A. and Verma J.P. 2018. Emerging microbiome technologies for sustainable increase in farm productivity and environmental security. Microbiology Australia, 39(1): 17.

65- Singh R., Singh R., Singh D., Mani J.K., Karwasra S. and Beniwal M. 2010. Effect of weather parameters on karnal bunt disease in wheat in Karnal region of Haryana. J Agrometeorol, 12(1): 99-101.

66- Taniguchi N. 1974. On the basic concept of nano-technology.pp. 18-23 Paper presented at the International Conference of Production Engineering August 26- 29, .

67- Thanighaiarassu R., Sivamai P., Devika R. and Nambikkairaj B. 2014. Green synthesis of gold nanoparticles characterization by using plant essential oil Menthapiperita and their antifungal activity against human pathogenic fungi. J Nanomed Nanotechnol, 5(5): 1.

68- Torney F., Trewyn B.G., Lin V.S. and Wang K. 2007. Mesoporous Silica Nanoparticles Deliver DNA and Chemicals Into Plants. Nature nanotechnology, 2(5): 295-300.

69- Wang P., Lombi E., Zhao F.J. and Kopittke P.M. 2016. Nanotechnology: A New Opportunity in Plant Sciences. Trends Plant Sci, 21(8): 699-712.

70- Wang S., Wang F. and Gao S. 2015. Foliar application with nano-silicon alleviates Cd toxicity in rice seedlings. Environ Sci Pollut Res Int, 22(4): 2837-2845.

71- Wang X., Liu X., Chen J., Han H. and Yuan Z. 2014. Evaluation and mechanism of antifungal effects of carbon nanomaterials in controlling plant fungal pathogen. Carbon, 68: 798-806.

72- Wang Z., Wei F., Liu S.Y., Xu Q., Huang J.Y., et al. 2010. Electrocatalytic oxidation of phytohormone salicylic acid at copper nanoparticles-modified gold electrode and its detection in oilseed rape infected with fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. Talanta, 80(3): 1277-1281.

73- Wani A. and Shah M. 2012. A unique and profound effect of MgO and ZnO nanoparticles on some plant pathogenic fungi. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2(3): 40-44.

74- Xu L., Liu Y., Bai R. and Chen C.J.P.A.C. 2010. Applications and toxicological issues surrounding nanotechnology in the food industry. Pure Appl Chem, 82(2): 349-372.

75- Yadav R.N., Chitara M.K., Zaidi N.W., Khan A.I., Singh U.S. and Singh H.B. 2018. Novel Facets and Challenges in the Mana gement of Phytopathogens Using Myconanoparticles. Int J Curr Microbiol App Sci, 7(12): 3296-3308.

76- Yan J., Huang K., Wang Y. and Liu S. 2005. Study on anti-pollution nano-preparation of dimethomorph and its performance. Chin Sci Bull, 50(2): 108-112.

77- Zhang X., Zhang J. and Zhu K.Y. 2010. Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). Insect Mol Biol, 19(5): 683-693.

The effect of salicylic acid on germination of *Abelmoschus esculentus* L.seeds under copper sulfate stress

Sorur Arefi[1*]; Jalil Khara[2]

1-PhD in Plant Physiology
2- Assistant professor of biology group

Sorur.arefi@yahoo.com

Abstract

Salicylic acid (SA) or orthohydroxy benzoic acid and other compounds which are belong to this group are plant phenolic that play a major role in regulation of many physiological processes e.g. growth, develoment , ion absorption and germination.Copper is an essential plant micronutrient, required for the protein components of several enzymes. However, when present in excess quantities, Cu is also highly toxic to plant growth potentially causing damage resulting in complete in habitation of growth.For observation of interaction effects of salicylic acid on copper stress, 1 levels of salicylic acid (5µm) treatment, 4 levels of copper stress (0, 0.5, 1, 1.5 mM $CuSO_4$) were applied. The experiment was based on a completely randomized dosing with four replicates. We found that excess copper, in both cultivar, cause a decrease in percent and rate germination . Influence of SA was significant and increased percentage of germination and germination rate in stressed and control treatment.

Keywords: Orthohydroxybenzoic acid, Stress, Seedling length, Heavy metal

بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر جوانه زنی بذر بامیه تحت تنش سولفات مس

سرور عارفی[۱]*، جلیل خارا[۲]

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست شناسی،دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه
۲- دانشیار گروه زیست شناسی، گروه زیست شناسی،دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه

S.arefi@urmia.ac.ir jakhara@yahoo.com

چکیده

سالیسیلیک اسید یا اورتوهیدروکسی بنزوئیک اسید به گروهی از ترکیب‌های فنلی تعلق دارد که به عنوان یک آنتی اکسیدانت غیرآنزیمی بالقوه و یک مولکول سیگنالی مهم برای تعدیل پاسخ‌های گیاه به تنش‌های محیطی شناخته شده است. سالیسیلیک اسید نقش اساسی در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف مثل رشد، تکامل گیاه، جذب یون و فتوسنتز و جوانه زنی ایفا می کند. مس یک ریزمغذی اصلی گیاهی است که برای اجزای تشکیل‌دهنده پروتئین چندآنزیم مورد نیاز است اما وجود مقادیر بسیار زیاد مس، برای رشد گیاه بسیار سمی است و اساساً باعث آسیب گردیده و به توقف کامل رشد گیاه ختم می‌گردد. برای مشاهده اثرمتقابل سالیسیلیک اسید برتنش مس، تیماراسید سالیسیلیک در یک سطح ۰.۵ میلی‌مولار و تنش مس در چهار سطح۲۰۰ ، ۱۰۰، ۵۰ ، ۰ میکرومولاراستفاده‌شد و آزمایش‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی و با چهار تکرار انجام شد. نتایج نشان داد که تنش مس باعث‌کاهش درصد جوانه‌زنی وسرعت جوانه‌زنی و طول گیاهچه گردید همچنین مشاهده شد که سالیسیلیک اسید تاثیرمثبتی برجوانه‌زنی داشته و هم در شاهد و هم در تیمارهای تنش دیده سبب افزایش جوانه‌زنی می‌شود.

واژگان کلیدی: اروتو هیدروکسی بنزوئیک اسید ، تنش، طول گیاهچه، فلز سنگین

۱.مقدمه

گیاه بامیه با نام علمی (*Abelmoschus esculentus*) متعلق به خانواده Malvaceae یکی از گیاهان گرمسیری و نیمه گرمسیری است که پراکندگی این گیاه در خاورمیانه (ایران) گزارش شده است (Adelakun et al., 2009). جوانه‌زنی بذر، مرحلهٔ پیچیده و پویایی از رشد گیاه است و با آثاری که بر استقرار گیاهچه دارد، ممکن است بر عملکرد تأثیر بگذارد (Kaur et. al.,2015). سالیسیلیک اسید یا اورتو هیدرکسی بنزوئیک اسوید نقش اساسی در تنظیم فرایندهای فیزیولوژیکی مختلف مانند تکامل گیاه، جذب یون، فتوسنتز، جوانه‌زنی، رسیدن میوه‌گلدهی و پاسخ به تنش زیستی و غیر زیستی را برعهده دارد (Miura and Tada, 2014; Morsi *et al.*, 2018)کاربرد خارجی اسید سالیسیلیک باعث تحریک جوانه‌زنی می‌شود و پیش‌تیمار بذور با اسنتفاده از اسید سالیسیلیک باعث بهبود صفات جوانه‌زنی در گیاهان تحت تنش می‌شود (Hamid et al., 2008; Naser-alavi, 2008). سالیسیلیک اسید نقش محوری در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف مثل جوانه‌زنی بذر، بسته شدن روزنه و مهار بیوسنتز اتیلن گیاه ایفا می‌کند(El-Tayeb, 2005) .گزارش شده است که سالیسیلیک اسید توان جوانه‌زنی را تحت شرایط افزایش مس در گیاهان افزایش داده است (Rajjo et al., 2006).اسید سالیسیلیک می‌تواند باعث افزایش سرعت جوانه‌زنی و کاهش مدت زمان جوانه‌زنی شود (Sivritepe et al., 2006) سالیسیلیک اسید می‌تواند باعث مهار فعالیت کاتالاز شود. کاهش کاتالاز منجر به افزایش H2O می‌گردد. پراکسید هیدروژن که برای بافتهای گیاهی سمی است، می‌تواند جوانه‌زنی

برخی از بذرها را به بهبود بخشد(Nuh et al., 2003). این امکان وجود دارد که سالیسیلیک اسید و 5و 6 دی هیدروکسی بنزوئیک اسید جوانه‌زنی بذر را از طریق بیوسنتز ژیبرلین تحریک کنند و به عنوان القاءکنندگان ترموژن عمل نماید گزارش شده است که پیش تیمار با اسید سالیسیلیک باعث بهبود سرعت و درصد سبزکردن و رشد گیاهچه در گاوزبان شد(Shekari al. et, 2010). هدف از این تحقیق بررسی اثرتنش سولفات مس و تعدیل کننده اسید سالیسیلیک بر سرعت جوانه زنی، درصد جوانه زنی و طول گیاهچه بامیه رقم کلمسون بود.

۲.مواد و روش

در این تحقیق از بذرهای بامیه واریته کلمسون که از شرکت (AvanMashreghZamin)تهیه شده بود استفاده شد۵۰ عدد بذر سالم در پتری حاوی کاغذ واتمن خیس شده به (مقدار مساوی) درژرمیناتور قرار گرفت. تیمار سالیسیلیک اسید در یک سطح ۰.۵ میلی‌مولار و تنش مس در چهار سطح۲۰۰ ، ۱۰۰، ۵۰ ،۰ میکرومولاراستفاده شد و آزمایش‌ها در در قالب طرح کاملا تصادفی و با چهار تکرار انجام شد. در این پژوهش به مدت یک هفته تعداد بذرهای جوانه‌زده در هر پتری به فواصل یک روزه شمارش وثبت گردید. معیار جوانه‌زنی بیرون آمدن نوک ریشه چه از پوسته بذرو رشد آن در نظر گرفته وسپس درصد جوانه زنی وسرعت جوانه زنی (Me Guire, 1962) از رابطه ۱و۲ محاسبه شد وآزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا گردید.

رابطه ۱

$$\mathbf{P\ \ G} = \frac{n_i}{N} \times 100$$

در این معادله PG: درصد جوانه زنی، n_i: تعداد بذرهای جوانه‌زده تا روزiام وN: تعداد کل بذرها می باشد.

رابطه۲

$$Rs = \sum_{i=1}^{n} \left(\frac{Si}{Di} \right)$$

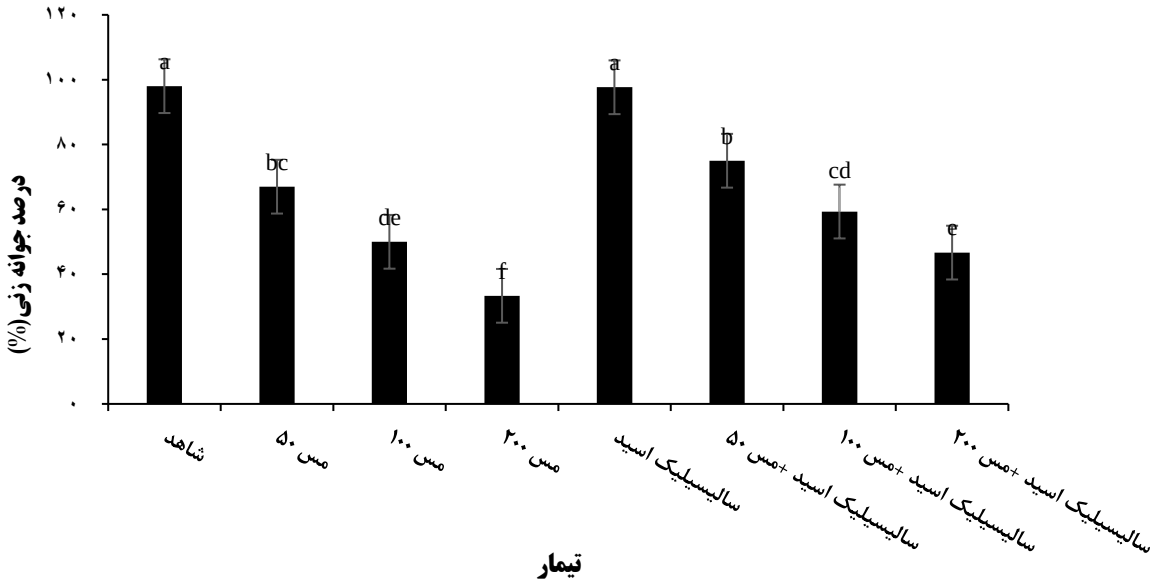
در این معادله RS: سرعت جوانه‌زنی، S_i: تعداد بذرهای جوانه‌زده در هر روز وD: تعدادروزهای سپری شده از شروع آزمایش می باشد.

تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و ترسیم نمودارها با استفاده از برنامه EXCEL صورت گرفت.

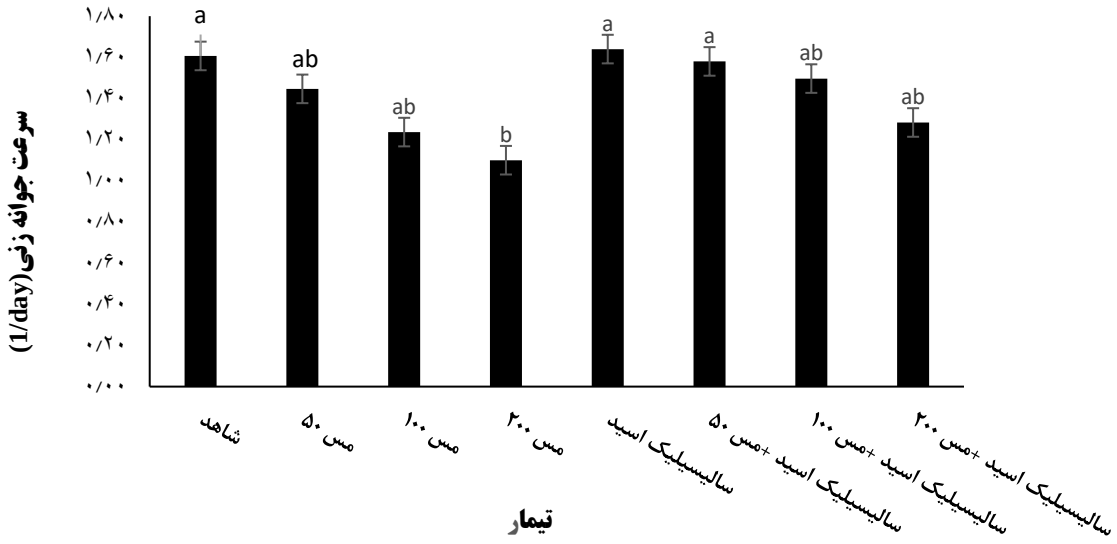
۳.نتایج و بحث:

غلظت‌های مختلف سولفات مس و برهم کنش آن با سالسیلیک اسید نسبت به شاهد روند کاهشی را نشان می‌دهند بیشترین کاهش در سرعت جوانه زنی و درصد جوانه زنی در غلظت ۲۰۰ میکرومولار سولفات مس مشاهده شد(نمودار۱و۲). . در مرحله رشد گیاهچه تغییرات میزان طول گیاهچه تحت تاثیر غلظت سولفات مس بود. با افزایش غلظت سولفات مس به خصوص در

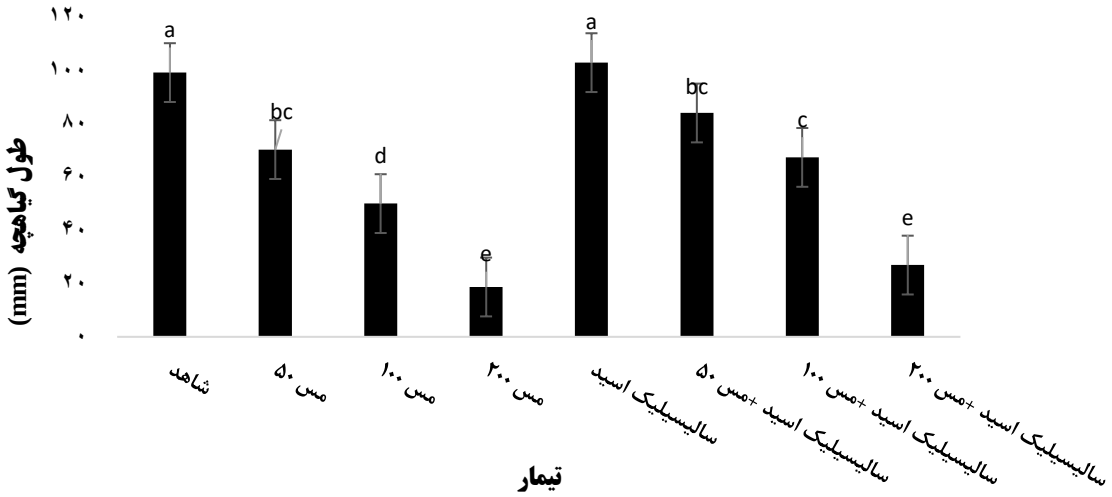
غلظت ۲۰۰ میکرو مولار تا ۷۰ درصد رشد گیاهچه نسبت به شاهد کاهش یافت (نمودار۳). کاربرد سالیسیلیک اسید موجب افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی و طول گیاهچه شد که در سطح (P<%1) معنی‌دار بودند.



نمودار ۱ : اثرات مختلف سولفات مس وبرهم کنش آن با سالسیلیک اسید بر درصدجوانه زنی



نمودار ۲: اثرات مختلف سولفات مس و برهم کنش آن با سالسیلیک اسید بر سرعت جوانه زنی



نمودار۳: اثرات مختلف سولفات مس وبرهم کنش آن با سالسیلیک اسید بر طول گیاهچه

سالیسیلیک اسید هورمونی است که نقش مهمی در مقاومت به تنش‌های محیطی ایفا می‌کند و بر جوانه‌زنی دانه‌ها تأثیر می‌گذارد (Belkhadi et al., 2010). سالیسیلیک اسید در غلظت‌های کم موجب افزایش درصد جوانه‌زنی می‌گردد کاربرد خارجی اسید سالیسیلیک اسید باعث تحریک جوانه‌زنی می‌شود و پیش‌تیمار بذور با استفاده از اسید سالیسیلیک باعث بهبود صفات جوانه‌زنی در گیاهان تحت تنش می‌شود (Hamid et al., 2008). هم‌چنین اسید سالیسیلیک باعث کاهش مدت زمان جوانه‌زنی شد. این امر باعث می‌شود که جوانه‌زنی بذور پیش‌تیمار شده نسبت به شاهد زودتر آغاز شده و در نتیجه در شرایط تنش، این بذرها زودتر از خاک خارج شوند و سریع‌تر استقرار یافته و مدت زمان کمتر در معرض آفات و بیمارگرهای خاکزی قرار گیرند (Soltani et al, 2007). گزارش شده است که افزایش غلظت مس باعث کاهش درصد جوانه‌زنی در بذرها می‌گردد(Davis, 1991). فلزات سنگین اثرات مهارکنندگی خود را بر جوانه‌زنی دانه‌ها به روش‌های گوناگون اعمال می‌کنند، برخی از فلزات سنگین با مهار هیدرولیز نشاسته اندوسپرم از جوانه‌زنی و رشد اولیه دانه‌رست‌ها جلوگیری می‌کند و برخی دیگر، با آسیب رساندن به رویان از جوانه‌زنی دانه جلوگیری می‌کنند. (Mishra and chouhuri, 1997). در پژوهشی اثرات فلزات سنگین را بر روی جوانه‌زنی بذرهای عدس *Lens esculenta* (Ayus Kadioglu, 1997) مورد بررسی قرار دادند که نتیجه آن کاهش درصد جوانه‌زنی بود و هم‌چنین کاهش درصد جوانه‌زنی در دو رقم ۳۰ و ۳۵ بذور *Vigna radiata* L. تحت تنش سولفات مس ثبت شده است(Prakash Verma, 2011).که این نتایج گزارش شده با نتایج پژوهش ما همسو بود. گزارش شده است که غلظت‌های بالاتر از ۱mM سالیسیلیک اسید فرآیند جوانه‌زنی را کاهش می‌دهد(Loic et al., 2006). اثر سالیسیلیک اسید بر بهبود جوانه‌زنی بذور لوبیا (Opoku et al., 1996) و نخود (Mccue, 2000) گزارش شده است که این نتایج گزارش شده با نتایج پژوهش ما همسو بود.

۴.نتیجه گیری

با توجه به نتایج این پژوهش غلظت بالای مس باعث کاهش درصد جوانه‌زنی ، سرعت جوانه‌زنی و طول گیاهچه بامیه شد و سالیسیلیک اسید باعث کاهش اثرات سوء ناشی از تنش مس گردید. سالیسیلیک اسید تاثیرمثبتی برجوانه‌زنی داشته و هم در شاهد و هم در تیمارهای تنش دیده سبب افزایش جوانه‌زنی شد.

منابع

1) Adelakun, O. E., Oyelade, O. J., Ade-Omowaye, B. I. O., Adeyemi, I. A., & Van de Venter, M. (2009). Chemical composition and the antioxidative properties of Nigerian Okra Seed (Abelmoschus esculentus Moench) Flour. *Food and Chemical Toxicology*, *47*(6), 1123-1126. 2) Ayus, F. A. and Kadioglu, A., 1997, Effect of heavy metals (Zn, Cd, Cu, Ni, Hg) on the soluble protein bands of germination lens esculenta L. Seed Turkish Journal of Botany, 21(2), 85-88.

2)Belkhadi, A., Hediji, H., Abbes, Z., Nouairi, I., Barhoumi, Zarrouk, M., Chaibi, W. and Djebali, W., 2010, Effects of exogenous Salicylic acid Pre-treatment on Cadmium toxicity and leaf lipid content in linum usitatissimum L. , Ecotoxicology and Environmental safety, 1-8.

3) Davis, W. J., Jones, H. G., 1991, Abscisic acid physiology and biochemistry, bioss Biochemical changes in barley plant after excessive supply of copper and manganese, Environ exp bot, 52: 253-266.

4)El-Tayeb, M. A., 2005, Response of barley gains to the interactive effect of salinity and salicylic acid, Plant Growth Regulation, 45, 215-225.

5)Hamid, m., Yasin, M., Ashraf, K. R., Arshad, M., 2008, Influence of Salicylic acid priming on growth and some biochemical attributes in wheat grown under saline conditions, Pakistan Journal of Botany, 40(1), 361-367. .

6)Kaya, M. D. and Atak, M., 2005, Effects of salt and drouth stresses on germination and seedling growth of pea (*pisum sativum* L.)

7)Kaur, H., Petla, B., Kamble, N., Singh, A., Rao, V., Salvi, P., Goosch, S. and Majee, M. (2015). Differentially expressed seed aging responsive heat shock protein OsHSP18.2 implicates in seed vigor, longevity and improves germination and seedling establishment under abiotic stress.

8) Loic, R., Belghazi, m., Huget, R., Roin, C., Moreau, A., Job, C., Job, D., 2006, Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on Arrabidopsis seed germination and establishment of early defense metabolism, plant physiology, 141, 910-923.

9)McCue, P., Zheng, Z., Pinkham, J. I., Shetty, K., 2000, A model for enhanced pea seedling vigour following low pH and salicylic acid treatments, process Biochemistry , 35, 603-613.

10)Me Guire, J. D., 1962, Speed of germination aid in selection evaluation for seedling emergence and vigir, Crop Sci, 2, 177-179.

11)Mishra, A., Choudhuri, M. A., 1997, Differential effects of Pb and Hg on inhibition of germination of send of two cultivars, Indian Journal of plant physiology, 2(1), 1-6.

12)Miura, K., & Tada, Y. 2014. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Frontiers in plant science*, *5*, 4.

13)Morsi, M., Abdelmigid, H., & Aljoudi, N. (2018). Exogenous salicylic acid ameliorates the adverse effects of salt stress on antioxidant system in Rosmarinus officinalis L. *Egyptian Journal of Botany*, *58*(2), 249-263.

14)Naser-alvavi, S. M., Safari, G. H., Govahi, M., 2008, The effect of salicylic acid on germination in Brassica napus L. under drought stress, the first national Iranian seed science and technology, Iran, 7-129.

15)Nuh, N. B., Plakhine, D., M., Joel, D. M., Mayer, A., 2003, Changes in the activity of the alternative oxidase in orobanche seeds during conditiong and their possible physiological function, phytochemistry, 64, 235-241.

16)Okcu, G., Kaya, M. D. and Atak, M., 2005, Effects of salt and drouth stresses on germination and seedling growth of pea (*pisum sativum* L.).

17)Opoku, G. F. M., Davies, E., Zetrio, V. and Camble, E., 1996, Relationship between seed vigor and yield of white beans (phaseolos vulgaris), plant variety seed, 9, 119-125.

18)Prakash Verma, J., Singh, V. and Yadav, J., 2011, Effect of copper sulphate on seed Germination, plant Growth and Peroxidase activity of Mung bean (Vigna radiata), International Journal of Botany, 7(2), 200-204.

19)Rajjou, L., Belghazi, M., Huguet, R., Vobin, C. Moreau, A., Job, C., Job, D.,2006, Seed germination and establishment of early defence mechanisims, plant physiology, 141, 910-923.

20) Shekari, F., Baljani, R., Saba, J., Afsahi, K. and Shekari, F. 2010. Effect of seed priming with salicylic acid on growth characteristics of borage (Borago officinalis) plants seedlings. Journal of New Agricultural Science, 6: 47-53.

21)Shah, J., 2003, The Salicylic acid loop plant defense current opinion in plant , plant biology, 6, 365-371.
22)Sheng, K. S., 2007, Effect of copper on the photosynthesis and oxidative metabolism of Amaranthus tricolor seedlings, Agricultural Scienes in China, 6(10), 1182-1192.
23)Simaei, M., Khavari-Nejad, R. A., Saadamand, S., Bernard, F., Fahimi, H., 2011, 2Effect of salicylic acid and nitric oxide on antioxidant capacity and proline accumulation in Glycine max L. treated with NaCl salinity African Journal of Agricultural Research, 6(16), 3775-3782.
24)Sivritep, N., Sivritepe, H. O., Eris, A., 2003, The effects of NaCl priming on salt tolerance in melon seedling grown under saline conditions, scientia Holiticulturae, 97: 229-237.
25)Soltani, E. Akram-Ghadri, F., Maemar, H., 2007, The effect of priming on germination components and seedling growth of cotton seeds under drought, Journal of Agriculure Science and Natural Resource, 14(5), 9-11.

Application of Trichoderma simmonsii and Bacillus megaterium along with chemical fertilizers of potassium and zinc on improving the soybean yield in Babol region

Mohammad Kashi Sasi[*1], Hemmatollah Pirdashti[2], Yasser Yaghoubian[3]

1- Msc. Student in Crop Physiology, Department of Agronomy, Sari Agricultural Sciences and Natural Resource University, Sari, Iran
2 & 3- Professor & Assistant Professor, Department of Agronomy, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resource University, Sari, Iran

kashe.1358@yahoo.com

Abstract

In order to evaluate the effectiveness of *Trichoderma* (*Trichoderma simmonsii*) and potassium solubilizing bacteria (*Bacillus megaterium*) as plant growth-promoting microorganisms (PGPM) an experiment was performed on yield and yield components of soybean '*cv.* Sari' in a spilt-split plot experiment based on a randomized complete block design (RCBD) with three replications in 2019-2020. The main plot was potassium (K) fertilizer at two levels (50 and 100% of recommended dose) and sub and sub-sub plots were zinc (Zn) fertilizer at three levels (0, 50 and 100% of recommended dose) and PGPM in four levels (control, *B. megaterium*, *T. simmonsii*, and co-inoculation of bacteria and fungi), respectively. The results showed that the application of K and Zn fertilizers increased the yield and yield components of soybean plants. The highest number of pods per plant (91.49) and grain yield (6066.9 kg ha^{-1}) were observed under 100% K and Zn fertilizer application condition. Also, the results indicated the positive effect of bacterial and fungal application on yield and yield components (such as pods number per plant, grain number per pod, and grain yield) of soybean plant at different levels of Zn and K fertilizers. The highest grain yield was recorded in bacterial + fungal inoculation with 100% Zn fertilizer level, which was about 93% higher than the control treatment at 0% Zn level. Therefore, the use of these microorganisms in combination with K and Zn chemical fertilizers can increase the yield and production of soybean.

Keywords: Bacillus, growth promoting microorganisms, nutrients, Trichoderma, yield components

کاربرد قارچ Trichoderma simmonsii و باکتری Bacillus megaterium همراه با کودهای شیمیایی پتاسیم و روی بر بهبود عملکرد سویا در منطقه بابل

محمدکاشی ساسی*[۱]، همت‌اله پیردشتی[۲]، یاسر یعقوبیان[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهان زراعی، گروه زراعت، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲ و ۳ – به‌ترتیب استاد و استادیار گروه زراعت، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

kashe.1358@yahoo.com

چکیده

به منظور ارزیابی اثربخشی قارچ تریکودرما (Trichoderma simmonsii) و باکتری حل‌کننده پتاسیم (Bacillus megaterium) به‌عنوان افزاینده‌های رشد گیاهی بر صفات عملکرد گیاه سویا (رقم ساری)، پژوهشی مزرعه‌ای به‌صورت کرت‌های دو بار خرد شده در قالب طرح بلوک‌های های کامل تصادفی با سه تکرار در سال زراعی ۹۹-۱۳۹۸ اجرا شد. عامل اصلی کود شیمیایی پتاسیم در دو سطح (۵۰ و ۱۰۰ درصد توصیه شده)، عامل فرعی کود روی در سه سطح (۰، ۵۰ و ۱۰۰ درصد توصیه شده) و عامل فرعی فرعی ریزجانداران افزاینده رشد در چهار سطح (شاهد، باکتری B. megaterium، قارچ T. simmonsii و تلقیح همزمان قارچ و باکتری) بودند. نتایج نشان داد که استفاده از کودهای شیمیایی پتاسیم و روی عملکرد و اجزای عملکرد گیاه سویا را افزایش داد. بیشترین تعداد غلاف در بوته (۹۱/۴۹ عدد) و عملکرد دانه (۶۰۶۶/۹ کیلوگرم در هکتار) در شرایط کاربرد ۱۰۰ درصد کود پتاسیم و روی مشاهده شد. همچنین، نتایج آزمایش حاکی از تاثیر معنی‌دار باکتری و قارچ بر عملکرد و اجزای عملکرد گیاه سویا (نظیر تعداد غلاف در بوته، تعداد دانه در غلاف، تعداد دانه در بوته، وزن هزار دانه و عملکرد دانه) در سطوح مختلف کود روی و پتاسیم بود. بیشترین عملکرد دانه در تلقیح باکتری + قارچ با سطح ۱۰۰ درصد کود روی ثبت شد که نسبت به تیمار شاهد در سطح روی صفر حدود ۹۳ درصد بیشتر بود. بنابراین، استفاده از این ریزجانداران به‌همراه کودهای شیمیایی پتاسیم و روی می‌تواند افزایش عملکرد و تولید سویا را به دنبال داشته باشد.

واژگان کلیدی: اجزای عملکرد، باکتری باسیلوس، ریزجانداران افزاینده رشد، عناصر غذایی، قارچ تریکودرما

۱. مقدمه

سویا [*Glycine max* (L.) Merril.] به‌دلیل تولید روغن و پروتئین بالا در واحد سطح یکی از مهمترین دانه‌های روغنی جهان است که در بین گیاهان روغنی دارای اهمیت بیشتری بوده (ملکوتی و طهرانی، ۱۳۷۹) و بالاترین میزان تولید (حدود ۶۰ درصد) را به‌خود اختصاص داده است (آنجفی و فارنیا، ۱۳۸۶). بنابراین ضروری است تا برای تولید محصولی با کیفیت مناسب، عناصر غذایی به مقدار لازم در اختیار این گیاه قرار گیرد. پتاسیم (K) به‌عنوان یکی از عناصر پرمصرف اهمیت زیادی دارد، اگرچه جزیی از ساختمان گیاه نیست ولی در انجام واکنش‌های داخل گیاه نقش کلیدی دارد (ملکوتی، ۱۳۷۸). پتاسیم نقش حیاتی در فتوسنتز، سنتز پروتئین، کنترل تعادل یون‌ها، تنظیم روزنه گیاه و استفاده آب و فعالیت آنزیم‌های گیاهی دارد (ردیا و همکاران، ۲۰۰۴). از بین عناصر کم مصرف، روی در بسیاری از سیستم‌های آنزیمی گیاه نقش کاتالیزوری داشته و در ساخته شدن و

تجزیه پروتئین‌ها نیز دخیل است (تیسدال و آل، ۱۹۹۳). رز و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که دو بار محلول‌پاشی سولفات روی به مقدار چهار کیلوگرم در هکتار، عملکرد دانه سویا را از ۵۷ تا ۲۰۸ درصد افزایش داده است.

کاربرد کودهای شیمیایی به‌واسطه مصرف نادرست و غیراصولی موجب مشکلات زیست محیطی از جمله آلودگی آب و خاک، افت کیفیت محصولات کشاورزی و کاهش حاصلخیزی خاک می‌شود (اسدی‌رحمانی و همکاران، ۱۳۹۱؛ شارما، ۲۰۰۱). کودهای زیستی نقش بالقوه و کلیدی در بهره‌وری و پایداری خاک دارند، تجدیدپذیر و سازگار با محیط زیست و از نهاده‌های مقرون به صرفه برای کشاورزی و مکمل کودهای شیمیایی در سیستم کشاورزی پایدار می‌باشند (محمدی و سهرابی، ۲۰۱۲). امروزه استفاده از ریزجانداران محرک رشد گیاه (PGPM) ازجمله قارچ‌های تریکودرما و باکتری‌های خانواده باسیلوس به‌عنوان کود زیستی برای تامین عناصر غذایی و هم‌چنین تعدیل کودهای شیمیایی مورد توجه قرار گرفته و با هدف استفاده از پتانسیل موجودات و مواد آلی موجود در خاک جهت افزایش کمی و کیفی و هم‌چنین ایمنی محیط زیست رواج یافته اند (خاصه سیرجانی و همکاران، ۱۳۹۰؛ یعقوبیان و همکارن، ۲۰۱۴). قارچ‌های تریکودرما از طریق ساز و کارهای خاصی مانند ترشح آنزیم، تولید آنتی بیوتیک، نفوذ به باکتری‌ها و قارچ‌های بیماریزا، دفع مسمومیت، افزایش انتقال قندها و اسیدهای آمینه در ریشه گیاهان علاوه بر افزایش رشد و عملکرد گیاهان موجب ایجاد القای مقاومت در برابر تنش و کنترل زیستی بیماری‌های خاکزی می‌شوند (لهمن، ۲۰۰۷؛ یعقوبیان و همکاران، ۲۰۱۹؛ بهاری ساروی و همکاران، ۲۰۲۲). باکتری‌های محرک رشد نیز سبب بهبود تعداد دانه در خوشه، عملکرد و کیفیت دانه برنج (لاواکوش و همکاران، ۲۰۱۵)، بهبود رشد اولیه گیاهچه ذرت از نظر طول ساقه و سطح برگ (سنگوپتا و همکاران، ۲۰۱۴) و افزایش تعداد پنجه، وزن هزار دانه و عملکرد دانه برنج (حسین و ستار، ۲۰۱۴) شدند. بنابراین، این پژوهش با هدف بررسی اثر تیمارهای زیستی باکتریایی و قارچی بر عملکرد و اجزای عملکرد گیاه جو در سطوح مختلف کود پتاسیم و روی اجرا شد.

۲. مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی کارایی ریزجانداران افزاینده‌ی رشد گیاه روی عملکرد و اجزای عملکرد گیاه سویا رقم ساری، پژوهشی در سال زراعی ۱۳۹۹ تحت شرایط مزرعه‌ای در مزرعه‌ی ایستگاه تحقیقات دو منظوره گاودشت واقع در شهرستان بابل به صورت کرت‌های دوبار خردشده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار انجام شد. تیمارها شامل دو سطح کود پتاسیم (۷۵ و ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار به‌ترتیب معادل ۵۰ و ۱۰۰ درصد کود توصیه شده، از منبع سولفات پتاسیم) به‌عنوان عامل اصلی و کود روی در سه سطح (۰ و ۱۲/۵ و ۲۵ کیلوگرم در هکتار به‌ترتیب معادل صفر، ۵۰، ۱۰۰ درصد کود توصیه شده، از منبع سولفات روی) و چهار تیمار (شاهد، تلقیح باکتری *Bacillus megaterium*، قارچ *Trichoderma simmonsii* و تلقیح همزمان باکتری و قارچ) به‌عنوان عامل فرعی فرعی در نظر گرفته شدند.

قبل از کاشت، تیمارهای کودی پتاسیم و روی اعمال شد. همچنین بذرهای سویا قبل از کاشت با سوسپانسیون ریزجانداران مورد مطالعه که از پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تهیه و تکثیر شدند، تلقیح گردید (محمدی کشکا و همکاران، ۱۳۹۷). کاشت در کرت‌هایی با ابعاد ۴ × ۲ متر به‌صورت دستی در تاریخ ۱۹ اردیبهشت ماه انجام شد. هرکرت شامل ۹ خط کاشت با فاصله ۴۰ سانتی‌متر و فاصله بوته روی ردیف نیز ۸ سانتی متر بود. فاصله بین کرت‌ها ۲ متر و فاصله بین بلوک‌ها ۴ متر در نظر گرفته شد. آبیاری کرت‌ها بسته به شرایط آب و هوایی هر ۱۵ تا ۲۰ روز با استفاده از نوار تیپ انجام شد. برای اندازه‌گیری عملکرد و اجزای عملکرد، در مرحله رسیدگی فیزیولوژیک از هر کرت ۵ بوته به‌طور تصادفی انتخاب و صفت تعداد غلاف در بوته و تعداد دانه در غلاف شمارش شد. همچنین ۱۰ روز بعد از رسیدگی فیزیولوژیک یک متر مربع میانی کرت‌ها برداشت شده و عملکرد دانه اندازه‌گیری گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ و مقایسه میانگین‌ها به روش حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

۳.نتایج و بحث

نتایج حاصل از مقایسه میانگین برهمکنش کود پتاسیم و روی در عملکرد و اجزای عملکرد (جدول ۱) نشان داد استفاده از کود پتاسیم به میزان ۱۰۰ درصد توصیه شده، تعداد غلاف در بوته و عملکرد دانه را در سطوح ۵۰ و ۱۰۰ درصد کود روی افزایش داد، هرچند این افزایش تنها در شرایط استفاده از کود روی به میزان ۱۰۰ درصد توصیه شده معنی‌دار بود. کاربرد کود روی نیز در شرایط کاربرد ۱۰۰ درصد کود پتاسیم، اثر مثبتی بر صفات مورد اشاره داشت. تعداد غلاف در بوته تنها در شرایط کاربرد ۱۰۰ درصد توصیه شده کود روی و عملکرد دانه در شرایط کاربرد ۵۰ و ۱۰۰ درصد آن، افزایش معنی‌داری نسبت به سطح روی صفر نشان دادند. بیشترین مقادیر تعداد غلاف در بوته (۹۱/۴۹ عدد) و عملکرد دانه (۶۰۶۶/۹ کیلوگرم در هکتار) در شرایط کاربرد ۱۰۰ درصد کود پتاسیم و روی مشاهده شد. پیزلی و همکاران (۱۹۸۵) با کاربرد سطوح مختلف پتاسیم بر سه رقم سویا دریافتند که بالاترین غلظت پتاسیم بکار رفته به‌طور معنی داری سبب افزایش سطح برگ در مرحله گلدهی شده و باعث افزایش عملکرد به میزان ۲/۵ درصد می‌شود.

جدول ۱: مقایسه میانگین برهمکنش کودهای پتاسیم و روی در عملکرد و اجزای عملکرد گیاه سویا

تیمار		تعداد غلاف در بوته	عملکرد دانه (کیلوگرم در هکتار)
پتاسیم (درصد توصیه شده)	روی (درصد توصیه شده)		
۵۰	۰	۶۱/۱۰^{b}	۴۷۰۳/۱^{bc}
	۵۰	۶۰/۱۳^{b}	۴۷۶۱/۶^{bc}
	۱۰۰	۶۰/۱۰^{b}	۴۶۲۹/۳^{bc}
۱۰۰	۰	۶۲/۲۳^{b}	۴۴۷۰/۳^{c}
	۵۰	۶۷/۸۳^{b}	۵۲۴۵/۰^{b}
	۱۰۰	۹۱/۴۹^{a}	۶۰۶۶/۹^{a}
عدد LSD		۹۵/۷	۶۸۵/۹۲

در هر ستون میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل کود روی و تیمار زیستی (جدول ۲) نیز حاکی از برهمکنش مثبت این دو تیمار در عملکرد و اجزای عملکرد بود. تقریبا در تمام سطوح تیمار زیستی (بجز در گیاهان تلقیح شده با باکتری) کابرد سطوح ۵۰ و ۱۰۰ درصد کود روی سبب افزایش تعداد غلاف در بوته، تعداد دانه در غلاف و همچنین عملکرد دانه شد. تلقیح بوته‌های سویا در سطوح مختلف کود روی صفات مذکور را به‌صورت چشمگیری افزایش داد. به‌طوری که در سطح صفر کود روی تلقیح باکتری و در سطح ۱۰۰ درصد آن، تلقیح قارچ و باکتری + قارچ اثر بیشتری در افزایش صفات مذکور داشتند. بیشترین تعداد غلاف در بوته و تعداد دانه در غلاف در شرایط تلقیح قارچ تریکودرما و بیشترین عملکرد دانه در شرایط تلقیح باکتری + قارچ حاصل شد. به‌طوری که در سطح ۱۰۰ درصد کود روی، استفاده از مایه تلقیح باکتری + قارچ عملکرد دانه را حدود ۴۲ درصد نسبت به گیاهان شاهد افزایش داد. در گندم، کاربرد تلفیقی باکتری .Entrobacter sp و قارچ Trichoderma hamatum سبب افزایش

صفاتی همچون طول سنبله، عملکرد دانه و زیست توده شد (محمدی‌کشکا و همکاران، ۱۳۹۵). در مجموع، این ریزجانداران از طریق سازوکارهای مختلف نظیر تولید هورمون‌های رشد، حل‌کردن ترکیبات نامحلول، تثبیت نیتروژن، تولید سیدروفور، هیدروژن سیانید و القای مقاومت به طور مستقیم و غیرمستقیم بر رشد گیاهان اثر می‌گذارند (بخشنده و همکاران، ۲۰۱۵).

جدول ۲: مقایسه میانگین برهمکنش کود روی و تیمار زیستی در عملکرد و اجزای عملکرد گیاه سویا

تیمار		تعداد غلاف در بوته	تعداد دانه در غلاف	عملکرد دانه (کیلوگرم در هکتار)
روی (درصد توصیه شده)	تیمار زیستی			
۰	شاهد	۴۹/۹۱^{d}	۱۳۱/۱۶^{c}	۳۳۳۷/۲^{f}
	باکتری	۷۰/۷۸^{bc}	۱۸۹/۳۶^{b}	۵۲۸۵/۳^{bcd}
	قارچ	۶۳/۵۳^{c}	۱۷۸/۷۵^{b}	۵۰۳۴/۲^{bcd}
	باکتری + قارچ	۶۲/۴۳^{c}	۱۶۷/۳۸^{b}	۴۶۹۰/۲^{cde}
۵۰	شاهد	۶۱/۹۶^{c}	۱۵۸/۶۸^{bc}	۴۰۳۶/۲^{ef}
	باکتری	۵۹/۵۶^{cd}	۱۶۰/۷۰^{bc}	۴۴۸۹/۰^{de}
	قارچ	۶۸/۱۰^{c}	۱۹۰/۶۳^{b}	۵۵۷۵/۸^{abc}
	باکتری + قارچ	۶۶/۳۰^{c}	۱۷۵/۵۶^{b}	۵۹۱۲/۲^{ab}
۱۰۰	شاهد	۶۹/۳۲^{c}	۱۸۴/۷۴^{b}	۴۵۴۵/۸^{de}
	باکتری	۶۹/۶۸^{bc}	۱۹۰/۷۴^{b}	۴۷۶۸/۲^{cde}
	قارچ	۸۳/۵۵^{a}	۲۹۹/۷۳^{a}	۵۶۳۰/۷^{abc}
	باکتری + قارچ	۸۰/۶۵^{ab}	۲۵۳/۳۴^{a}	۶۴۴۷/۸^{a}
عدد LSD		۱۱/۲۴	۳۲/۷۴	۹۷۰/۰۴

در هر ستون میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

مقایسه میانگین برهمکنش تیمارهای مورد بررسی در آزمایش نشان داد که ترکیبات تیماری ناشی از کاربرد کودهای پتاسیم، روی و تیمار زیستی، اثر مثبتی بر تعداد دانه در غلاف گیاه سویا داشته است، هرچند این اثرات مثبت در بیشتر موارد از نظر آماری معنی‌دار نبودند. بیشترین تعداد دانه در غلاف (۳/۲۳ عدد) در تیمار باکتری + قارچ با سطح ۱۰۰ درصد کود پتاسیم و ۱۰۰ درصد کود روی مشاهده شد (جدول ۳) که نسبت به تیمار شاهد (عدم تلقیح) که مقادیر ۵۰ درصد پتاسیم و صفر روی را دریافت کرده بود حدود ۱۸ درصد افزایش داشت. تاندون (۱۹۹۵) گزارش داد که با مصرف کود روی به مقدار ۳۸ کیلوگرم در هکتار عملکرد دانه گندم افزایش پیدا کرده است. هوگار و کاردی‌کری (۲۰۰۰) نیز در یک آزمایش مزرعه‌ای نتیجه گرفتند که کاربرد روی موجب افزایش تولید ماده خشک گیاهی، افزایش تعداد غلاف در گیاه و افزایش وزن هزار دانه شد. در آزمایش حاضر نیز کاربرد روی به‌ویژه در شرایط تلقیح باکتری + قارچ بهبود تعداد دانه در غلاف را به دنبال داشته است.

جدول ۳: مقایسه میانگین برهمکنش کودهای پتاسیم و روی و تیمار زیستی در تعداد دانه در غلاف گیاه سویا

پتاسیم (درصد توصیه شده)	روی (درصد توصیه شده)	تیمار زیستی			
		شاهد	باکتری	قارچ	باکتری + قارچ
۵۰	۰	۲/۷۳^{cde}	۲/۶۰^{def}	۲/۸۰^{bcd}	۲/۷۳^{cde}
	۵۰	۲/۶۰^{def}	۲/۵۱^{ef}	۲/۸۷^{bc}	۲/۴۶^{f}
	۱۰۰	۲/۶۰^{def}	۲/۷۳^{cde}	۲/۵۳^{ef}	۳/۰۰^{ab}
۱۰۰	۰	۲/۵۳^{ef}	۲/۷۳^{cde}	۲/۸۰^{bcd}	۲/۶۰^{def}
	۵۰	۲/۵۳^{ef}	۲/۸۷^{bc}	۲/۷۳^{cde}	۲/۸۰^{bcd}
	۱۰۰	۲/۷۳^{cde}	۲/۷۳^{cde}	۲/۸۸^{bc}	۳/۲۳^{a}
عدد LSD		۰/۲۴			

میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

۴.نتیجه گیری

در مجموع نتایج حاصل از بررسی حاضر بیانگر نقش مثبت و معنی‌دار قارچ تریکودرما و باکتری باسیلوس در سطوح مختلف کودهای پتاسیم و روی بر صفات مربوط به عملکرد و اجزای عملکرد در گیاه سویا بود. اینگونه به نظر می‌رسد که بکارگیری همزمان کودهای زیستی باسیلوس و تریکودرما به‌همراه عناصر کم مصرف روی و پرمصرف پتاسیم گزینه مناسبی برای مزارع سویا باشد.

سپاسگزاری

به‌این‌وسیله از پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان و دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به‌خاطر مساعدت‌ها و حمایت‌های مالی از این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

اسدی رحمانی، ه. خاوازی، ک. اصغرزاده، ا. رجالی، ف. و افشاری، م. (۱۳۹۱). کودهای زیستی در ایران: فرصت‌ها و چالش‌ها. مجله پژوهش‌های خاک (علوم خاک و آب)، ۲۶(۱)، ۷۸-۷۷.

آنجفی، م. و فرینا، ا. ۱۳۸۶. بررسی تاثیر تراکم بوته بر خصوصیات مرفولوژیکی و عملکرد دانه ژنوتیپ های سویا در استان مرکزی. یافته‌های نوین کشاورزی، ۲(۶): ۱۱۵-۱۰.

خاصه سیرجانی، ع.، فرحبخش، ح.، راوری، س.ض.ا.، پسندی پور، ن. و کرمی، ع. ۱۳۹۰. بررسی اثر مصرف کود بیولوژیک، سولفات روی و کود نیتروژن بر عملکرد کمی و کیفی گندم. ۲۵(۲): ۱۳۵-۱۲۵.

محمدی کشکا، ف.، پیردشتی، ه.، یعقوبیان، ی. و بخشنده، ا. ۱۳۹۷. نقش تلقیح قارچ تریکودرما و باکتری اینتروباکتر بر بهبود عملکرد گندم (*Triticum aestivum* L.) در سطوح مختلف کود فسفر. نشریه بوم شناسی کشاورزی. ۱۰(۲): ۴۴۳-۴۳۰.

محمدی‌کشکا، ف.، پیردشتی، ه.، یعقوبیان، ی و بخشنده، ا. ۱۳۹۵. ارزیابی صفات رشدی و پایداری عملکرد گندم با کاربرد تریکودرما و اینتروباکتر. نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار، ۲۶(۴). ۱۵-۱.

ملکوتی، م.ج. و طهرانی، م. ۱۳۷۹. نقش ریزمغذیها در افزایش عملکرد و بهبود کیفیت محصولات کشاورزی(عناصر خرد با تاثیر کلان). انتشارات دفتر نشر آثار علمی دانشگاه تربیت مدرس. چاپ دوم. ۲۹۲صفحه.

ملکوتـــی، م. ۱۳۷۸روش‌جامع تشـــخیص وضرورت‌مصـــرف بهینۀکودهای شیمیایی.چاپ چهارم.دفترنشرآثارعلمی‌دانشگاه‌تربیت مدرس.۱۳۱ص.

Bahari Saravi, H., Gholami, A., Pirdashti, H., Firouzabadi, M.B., Asghari, H. and Yaghoubian, Y. 2022. Improvement of salt tolerance in Stevia rebaudiana by co-application of endophytic fungi and exogenous spermidine. Industrial Crops and Products, 177: 114443. doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114443

Bakhshandeh, E., Rahimian, H., Pirdashti, H. and Nematzadeh G.A. 2015 Evaluation of phosphate solubilizing bacteria on the growth and grain yield of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in northern Iran. Journal of Applied Microbiology. 119:1371-1382.

Hossain, M.B., and Sattar, M.A. 2014. Effect of inorganic phosphorus fertilizer and inoculants on yield and phosphorus use efficiency of wheat. Journal of Environmental Science and Natural Resources 7: 75-79.

Hugar, A.B., kurdikeri, M.B. 2000. Effect of application methods and levels of zinc on seed yield and quality in soybean. Karnataka Journal of Agricultural science.

Lavakush, Y.J., Verma, J.P., Jaiswal, D.K., and Kumar, A. 2014. Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa* L.). Ecological Engineering 62: 123128.

Lehmann, J. 2007. Biology-energy in the black. J. Front. Ecol. Environ. 5:381.

Mohammadi, K., and Sohrabi, Y. 2012. Bacterial biofertilizers for sustainable crop production: a review. ARPN Journal of Agricultural and Biological Science, 7(5), 307-316.

Peaslee, D.E., B.F. Hicks and D.B. Egli. 1985. Soil test levels of potassium, yields and seed size in soybean cultivars. Communications in soil science and Plant analysis. 16: 899 - 907.

Reddya, A. R., K. V. Chaitanya and M. Vivekanandanb. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. Journal of Plant Physiology 161: 1189-1202.

Rose, I.A., Felton W.L. and Banks, L.W. 2005. Responses of four soybean varieties to foliar zinc fertilizer. Australian Journal of Experimental Agriculture and animal Husbandry. 21(109): 236- 240.

Sengupta, C., Bhosale, A., and Malusare, S. 2015. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on seed germination and seedling development of *Zea mays*. International Journal of Research in Advent Technology Special Issue, National Conference on Advances and Chalenges in Green Technology, Pune, India, 13-14 February p. 32-40.

Sharma, A.K. 2001. A handbook of organic farming: Agrobios, Singh, J.S., Pandey, V.C., & Singh, D. (2011). Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. Agriculture, ecosystems & environment, 140(3), 339-353.

Tandon, H. 1995. Micronutrients in soil crops and fertilizers. Fertitizer Development and Consuluation Organization, New Dehli, India.

Tisdale, S.L.. W.L. Nelson, J.D. Beaton and J.L. Havlin. 1993. Soil fertility and fertilizers. 5th eds. Macmillan, pub. Co. New york.

Yaghoubian Y., Mohammadi Goltapeh E., Pirdashti H., Esfandiari E., Feiziasl V., Kari Dolatabadi H., Varma A. and Haryani Hassim M. 2014. Effect of *Glomus mossea* and *Piriformospora indica* on defense mechanism and lipid peroxidation of wheat under drought stress. Agricultural Research, 3(3): 239-245.

Yaghoubian Y., Siadat S.A., Moradi Telavat M.R., Pirdashti H., and Yaghoubian, I. 2019. Bio-removal of cadmium from aqueous solutions by filamentous fungi: *Trichoderma* spp. and *Piriformospora indica*. Environmental Science and Pollution Research, 26(8): 7863-72. https://doi.org/10.1007/s11356-019-04255-6

Analysis of structure and spatial distribution pattern of Caucasian walnut using nearest neighbors indices in Noor forest park

Saleh Kahyani*

Assistant Professor, Department of Forest Science, Faculty of Natural Resources and Earth Science, Shahrekord University, Iran

*skahyani@sku.ac.ir

Abstract

Structure is a central ecological issue of the forest, which includes the quantities and spatial order of forest components. One of the important aspects in ecology is the pattern of plant distribution, the knowledge of which is one of the prerequisites and necessities for studying vegetation in any region. Due to the importance of forest structure and the interrelationships between tree species, in this study, the distribution pattern and location, species mingling and size differentiation of caucasian walnut compared to neighboring trees were investigated. For this purpose, 30 caucasian walnut in Noor forest park were identified and structurally investigated. According to the results of the nearest neighbor indices, the uniform angle index was calculated to be 0.77; Indicates the arrangement of caucasian walnut in relation to neighboring trees. In terms of species mixing, caucasian walnut with a mean species mingling index of 0.21 shows low species mixing. The average of size differentiation was calculated to be 0.60, which indicates that the caucasian walnut have a large difference in dimensions compared to neighboring trees. In general, trees in the forest have interrelationships and this interrelationship affects the spatial structure of the forest. Using indicators based on the nearest neighbor, we can examine the changes made over time and space and also the effect of management activities on the structure of species and after recognizing the structural patterns observed in different species, it is necessary to study the ecological reasons for the creation of such patterns.

Keywords: Forest structure, Spatial distribution pattern, Nearest neighbor, Species mingling index, Caucasian walnut

تحلیل ساختار و الگوی پراکنش مکانی لرگ با استفاده از شاخص‌های مبتنی بر نزدیکترین همسایه در پارک جنگلی نور

صالح کهیانی*

*استادیار گروه علوم و مهندسی جنگل دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین دانشگاه شهرکرد

skahyani@modares.ac.ir *

چکیده

ساختار یک موضوع مرکزی بوم‌شناختی جنگل است که شامل کمیت‌ها و نظم مکانی اجزاء جنگل است. یکی از جنبه‌های مهم در اکولوژی، الگوی پراکنش گیاهان است که شناخت آن، از مقدمات و ضروریات بررسی پوشش گیاهی در هر منطقه به حساب می‌آید. با توجه به اهمیت ساختار جنگل و روابط متقابل بین گونه‌های درختی، در این تحقیق به بررسی الگوی پراکنش و موقعیت مکانی، آمیختگی گونه‌ای و تنوع ابعاد گونه‌ای لرگ نسبت به درختان همسایه پرداخته شد. بدین منظور تعداد ۳۰ پایه لرگ در پارک جنگلی نور، شناسایی و از نظر ساختاری بررسی شدند. با توجه به نتایج حاصل از شاخص‌های مبتنی بر نزدیکترین همسایه که زاویه یکنواخت برابر با ۰/۷۷ محاسبه شد؛ نشان‌دهنده چیدمان کپه‌ای لرگ نسبت به درختان همسایه می‌باشد. ازنظر آمیختگی، لرگ با داشتن میانگین شاخص آمیختگی ۰/۲۱ اختلاط گونه‌ای پایینی را از خود نشان می‌دهد. میانگین شاخص تنوع و اختلاف ابعاد ۰/۶۰ محاسبه شد که این مقادیر بیان می‌کنند که گونه لرگ دارای اختلاف زیاد ابعاد نسبت به درختان همسایه است. به‌طور کلی درختان در جنگل روابط متقابل دارند و این رابطه متقابل در ساختار مکانی جنگل تأثیر می‌گذارد، با به‌کارگیری شاخص‌های مبتنی بر نزدیکترین همسایه، می‌توان به بررسی تغییرات ایجاد شده در طی زمان و مکان و همچنین به بررسی تأثیر فعالیت‌های مدیریتی بر روی ساختار گونه‌ها پرداخت و نیاز است که پس از شناخت الگوهای ساختاری مشاهده‌شده در گونه‌های مختلف، به بررسی دلایل بوم‌شناختی ایجاد چنین الگوهایی پرداخت.

واژگان کلیدی: ساختار جنگل، الگوی پراکنش مکانی، نزدیکترین همسایه، شاخص آمیختگی، لرگ

۱. مقدمه

یکی از جنبه‌های مهم در اکولوژی، الگوی پراکنش گیاهان است که شناخت آن، از مقدمات و ضروریات بررسی پوشش گیاهی در هر منطقه به حساب می‌آید (Ludwig and Reynolds, 1988). بسیاری از این الگوها می‌تواند برای توصیف ویژگی‌های ساختاری جوامع درختی توده‌های جنگلی مورد استفاده قرار گیرد (Li *et al*., 2014). الگوی پراکنش جزئی از ساختار جنگل است که بینشی را درباره تاریخچه و فرآیندهای محیطی نظیر زادآوری، آب و هوا، مرگ و میر و رقابت و شکل ساختار موجود توده را معلوم می‌کند (Moeur, 1993). تعیین کمیت پراکنش درختان در یک توده جنگلی یک گام اساسی برای درک پویایی

جوامع جنگلی است. فرآیندهای پراکنش درختان در جنگل تأثیر عمیقی بر بقای آنها در محیط‌های با شرایط گوناگون دارد. همچنین الگوهای متفاوت مکانی درختان که از این فرآیندها ناشی می‌شود، بیانگر مقدار موفقیت گونه‌های درختی در رقابت‌های درون و بین‌گونه‌ای مراحل مختلف توالی است (Law *et al*., 2009؛ Getzin *et al*., 2006). الگوی مکانی درختان در تودهٔ جنگلی نیز یکی از تبعات و اثرات رقابت در جنگل است. ازآن‌جا که رقابت فرآیندی است که ابتدا بین درختان مجاور اتفاق می‌افتد، موقعیت مکانی درختان، اطلاعات مفیدی از تأثیر رقابت در شرایط محیطی را به دست می‌دهد؛ بنابراین، الگوی مکانی موقعیت هر فرد و همچنین از طریق فرآیندهای رقابتی توانایی رشد و توسعه و یا احتمال مرگ آن را تعیین می‌کند. به‌علاوه شانس استقرار نهال‌ها و ظرفیت تجدید حیات توده را تعیین می‌کند (Linares-Palomino, 2005).

ساختار یک موضوع مرکزی بوم‌شناختی جنگل است که شامل کمیت‌ها و نظم مکانی اجزاء جنگل است (Nadkarni *et al*., 2008). یکی از مؤلفه‌های مهم ساختار توده جنگل نظم مکانی موقعیت درختان است (Kint *et al*., 2004; Wolf , 2005). الگوی مکانی موقعیت مکانی درختان در ارتباط با یکدیگر است که به‌صورت یک طیف پیوسته از الگوی یکنواخت (عدم همبستگی بین موقعیت درختان)، تصادفی (فرآیند پواسن)، کپه‌ای (همبستگی بین موقعیت درختان) یا ترکیبی از این‌ها تعریف می‌شود (Packalenab *et al*., 2013). هر سه نوع پراکنش تصادفی، کپه‌ای و یکنواخت امکان دارد در جمعیت‌های طبیعی بر حسب مقیاس‌های مختلف مشاهده شود. گیاهان در هر منطقه جغرافیایی یا در هر رویشگاه به یکی از دو صورت تصادفی و غیرتصادفی پراکنده شده‌اند. پراکنش غیرتصادفی نیز به نوبه خود به دو شکل یکنواخت و کپه‌ای تقسیم می‌شود. وقتی حضور یک فرد بر حضور فرد دیگر تاثیر زیادی نداشته باشد پراکنش این افراد تصادفی است در این حال شکل توزیع فراوانی این افراد به توزیع آماری پواسن شباهت دارد. پراکنش تصادفی درختان ممکن است به طور معمول در سطح جامعه بررسی شود. در طبیعت جمعیت‌ها به ندرت به طور تصادفی پراکنده شده‌اند و اغلب این امکان وجود دارد که پراکنش نمونه‌ها مطابق با توزیع پواسن و الگو پراکنش تصادفی نباشد. پراکنش یکنواخت یا منظم معمولا زمانی بوجود می‌آید که قلمرو افراد معین بوده و این محدوده‌ها برابر و یکسان باشند. پراکنش کپه‌ای وقتی مشاهده می‌شود که اکثر یا تمام افراد جمعیت تمایل دارند تا در قسمت‌های بخصوصی از محیط حضور داشته باشند (مقدم، ۱۳۸۰). در یک جنگل هر دو شکل تغییرپذیری یعنی کپه‌ای و یکنواختی ممکن است در مقیاس‌های مختلف با هم وجود داشته باشند.

تعیین الگوی پراکنش مکانی براساس روش‌های مورد استفاده به سه گروه عمده طبقه‌بندی می‌شوند: روش فاصله‌ای، روش شمارش در قطعه نمونه و روش داده‌های نقشه‌کشی شده. روش‌های متعددی برای مطالعه الگوهای مکانی گیاهان وجود دارد که معمول‌ترین آنها روش‌های نمونه برداری فاصله‌ای و قطعه نمونه با مساحت ثابت است (Stamatellos and Panourgias, 2005). برای کمی کردن پراکنش جمعیت‌هایی که در آنها روش‌های نمونه‌برداری اجرا می‌شود، شاخص‌های متعددی در دسترس است. تاکنون شاخص‌های متعددی به‌منظور بررسی ساختار جنگل توسعه یافته‌اند؛ اما اخیراً مجموعه‌ای از شاخص‌های تک‌درختی مبتنی بر نزدیکترین همسایه توسط گروه تحقیقاتی مؤسسه مدیریت جنگل دانشگاه گوتینگن آلمان توسعه یافته است (پیله‌ور و همکاران، ۱۳۹۳). این شاخص‌ها با دارا بودن عملکردی شبیه به ساختار مولکول‌های شیمیایی به بررسی همسایه‌های هر درخت یا نقطه معین در توده جنگلی می‌پردازد (Pommerening, 2006). به‌منظور تعیین ساختار جنگل Kint و همکاران (۲۰۰۰) از مجموعه‌ای از شاخص‌های مبتنی بر نزدیک‌ترین همسایه استفاده کرده و بیان کردند که این شاخص‌ها در تشریح ساختار توده و همچنین تغییرات ایجاد شده بر اثر تکامل توده دارای توانایی زیادی هستند(پیله‌ور و همکاران، ۱۳۹۳).

شاخص‌های مبتنی بر نزدیکترین همسایه این امکان را برای محققین فراهم آورده‌اند که با کمترین هزینه و زمان به بررسی ساختار گونه‌های نادر بپردازند؛ امری که با بسیاری از شاخص‌ها و توابع به‌راحتی امکان‌پذیر نیست. Pommerening (۲۰۰۲) تاکید کرد که این شاخص‌ها دارای توانایی لازم در تشریح اختلاف بین جنگل‌ها در زمان و مکان‌های مختلف، تعیین ساختار جنگل، تعیین اختلاف ساختار مشاهده شده و مورد انتظار و همچنین بیان تغییرات ایجاد شده بر اثر عملیات بهره‌برداری هستند(پیله‌ور و همکاران، ۱۳۹۳). همچنین Gadow (۲۰۰۶) بیان کرد، تعیین ساختار جنگل با استفاده از این شاخص‌ها نه‌تنها

چگونگی توزیع ویژگی‌های مختلف درختان در اکوسیستم‌های جنگلی را مورد بررسی قرار می‌دهد، بلکه با تعیین وضعیت اکولوژیکی جنگلی و شرایط رقابتی آن‌ها می‌توان به اهداف مدیریتی دست یافت (پیله‌ور و همکاران، ۱۳۹۳). در روش نزدیکترین همسایه، فرض بر این است که فاصله هر درخت تا نزدیکترین درخت به آن به نحوه الگوی پراکنش درختان حساس است و بر روابط بوم‌شناختی آنها با یکدیگر تأثیر می‌گذارد (Illian *et al*., 2008).

با توجه به اهمیت بررسی الگوی مکانی درختان جنگلی، مطالعات متعددی در جنگل‌های شمال کشور در مورد گونه‌های مختلف و با روش‌های مختلف صورت گرفته است که می‌توان به مطالعه حبشی و همکاران (۱۳۸۶) اشاره کرد که در پژوهشی الگوی پراکنش مکانی و ساختارتوده های آمیختهٔ راش را در جنگلهای شصت کلاتهٔ گرگان با استفاده از روش نزدیکترین همسایه بررسی کردند. نتایج این تحقیق وجود تنوع الگوی پراکنش مکانی برای گونه های مختلف در راشستان آمیخته و الگوی جامعه پذیری منفی راش با سایر گونه ها را تأیید می کند که الگوی مکانی گونه راش را با استفاده از شاخص نزدیک‌ترین همسایه به شکل کپه‌ای تعیین کردند. اخوان و همکاران (۱۳۸۹) الگوی مکانی گونه راش را در مراحل تحولی مختلف با استفاده از تابع-Kریپلی به صورت کپه‌ای تعیین کردند. صفری و همکاران (۱۳۸۹) الگوی پراکنش مکانی گونه بنه را با استفاده از روش‌های فاصله‌ای در جنگل‌های باینگان استان کرمانشاه مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که از شاخص‌های پراکنش مختلف، می‌توان الگوی پراکنش مکانی بنه را به شکل کپه‌ای تعیین کرد. در پژوهش علی‌جانی و فقهی (۱۳۹۰) از شاخص زاویه یکنواخت برای بررسی ساختار مکانی ملج استفاده شده است که در این پژوهش دقت و کارایی این شاخص، جهت تعیین الگوی مکانی درختان مورد ارزیابی قرار نگرفته است. ابراهیمی و پورابایی (۱۳۹۲) تاثیر حفاظت بر الگوی پراکنش مکانی درختان غالب راش در جنگل‌های ماسال گیلان با استفاده از شاخص‌های مختلف الگوی پراکنش را بررسی کردند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تمامی شاخص‌های قطعه نمونه‌ای برای گونه‌های غالب در دو منطقه حفاظت شده و غیرحفاظتی الگوی کپه‌ای است. علوی و همکاران (۱۳۹۲) الگوی پراکنش مکانی گونه ملج در بخش نمخانه جنگل خیرود کنار نوشهر را با استفاده از تابع k ریپلی کپه‌ای تشخیص دادند.

آگاهی از الگوی مکانی در در توده جنگلی می‌تواند در موارد زیر مفید باشد (Salas *et al*., 2006): ۱- درک ارتباط درون گونه‌ای (inter specific) درختان درجنگل. ۲- اتخاذ شیوه‌های جنگل‌شناسی با الهام از فرایندهای طبیعی در جنگل. ۳- انتخاب روش آماربرداری در جنگل (Tomppo, 1986). ۴- بهبود مدل‌های پویایی توده با در نظر گرفتن رقابت‌های درون گونه‌ای و بین گونه‌ای. ازاین‌رو در این تحقیق سعی شده تا با استفاده از شاخص‌های مبتنی بر نزدیکترین همسایه‌ها به بررسی تنوع موقعیت مکانی، تنوع آمیختگی و تحلیل ساختار مکانی گونه لرگ (Petrocarya fraxinifolia(Lam.)Spach.) پرداخته شود.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱- منطقه مورد مطالعه

این تحقیق در ذخیره‌گاه سفیدپلت پارک جنگلی نور به وسعت ۲۲ هکتار انجام گرفت .ذخیره‌گاه سفیدپلت در جنوب شرقی پارک جنگلی نور و در ˚۵۰ ´۳۶ عرض شمالی و ˚۵۰ ´۵۱ درجه طول شرقی و در فاصله ۳ کیلومتری شرق شهرستان نور قرار دارد. ارتفاع بیشینه و کمینه آن بین ۴۳-۲۰ متر از سطح دریا و شیب عمومی آن ۵-۳ درصد است. این پارک به‌عنوان بخشی از باقی‌مانده جنگل‌های جلگه‌ای شمال است که در آن هیچ‌گونه عوارض طبیعی از قبیل تپه و دره یا پستی بلندی وجود ندارد. اقلیم منطقه به روش دومارتن مرطوب نوع الف است.

۲-۲- روش تحقیق، جمع‌آوری و تجزیه‌تحلیل داده‌ها

در این تحقیق به‌منظور بررسی ساختار و الگوی پراکنش مکانی گونه لرگ، ابتدا در ذخیره‌گاه سفیدپلت پارک جنگلی نور با استفاده از جنگل‌گردشی و بازدیدهای میدانی تعداد ۳۰ پایه لرگ شناسایی شد. پس از اندازه‌گیری قطر برابر سینه پایه‌های لرگ، هرکدام از آنها یک‌بار به‌عنوان درخت مرجع انتخاب و ویژگی‌هایی ازجمله آزیموت و فاصله تا نزدیکترین چهار درخت همسایه و همچنین نوع گونه و قطر برابر سینه درختان همسایه اندازه‌گیری شد. پس از اتمام عملیات میدانی، با استفاده از شاخص نزدیک‌ترین همسایه برای تعیین الگوی پراکنش مکانی مطلق لرگ در منطقه مورد مطالعه (جدول ۱) و نیز شاخص‌های ارائه‌شده در جدول ۲ ساختار و موقعیت مکانی گونه لرگ در ارتباط با درختان همسایه مورد بررسی قرار گرفت.

۳-۲- شاخص‌های ساختاری و تعیین الگوی پراکنش مکانی مورد بررسی در این تحقیق

۱-۳-۲- شاخص نزدیک‌ترین همسایه (R)

در این مطالعه برای تعیین الگوی مطلق درختان موجود در عرصه مورد آماربرداری از شاخص نزدیکترین همسایه (R) که شاخصی دقیق در تعیین الگوی مکانی است (Pommerening, 2006) استفاده شد. این شاخص که با نام شاخص کلارک و ایوانز هم از آن استفاده می‌شود از نسبت متوسط فاصله هر درخت تا نزدیک‌ترین همسایه‌اش در توده مورد آماربرداری و متوسط فاصله درختان در یک الگوی مکانی کاملاً تصادفی حاصل می‌شود (Goncalves *et al*., 2010؛ Sousa-Souto *et al*., 2013).

این شاخص با استفاده از رابطه (۱) بدست می‌آید. برای آزمون الگوی تعیین شده توسط شاخص نزدیکترین همسایه از آماره z استفاده شد (رابطه ۲)، یعنی مقدار r محاسبه شده با مقدار z محاسبه شده تأیید شد(Krebs, 1999).

رابطه ۱: $R = \frac{\overline{r_A}}{\overline{r_E}}$

R: شاخص نزدیک‌ترین همسایه، $\overline{r_A}$: متوسط فاصله هر درخت تا نزدیک‌ترین همسایه آن در پلات مورد بررسی، $\overline{r_E}$: متوسط فاصله هر درخت تا نزدیک‌ترین همسایه آن در یک الگوی کاملاً تصادفی.

رابطه ۲: $z = \frac{\overline{r_A} - \overline{r_E}}{Sr}$

Sr: انحراف معیار فاصله مورد انتظار تا نزدیکترین همسایه (Krebs, 2001).

مقدار این شاخص در حالت کاملاً کپه‌ای صفر و در بیشینه یکنواختی برابر با عدد ۲/۱۴۹۱، و در حالت تصادفی برابر با عدد ۱ است (گونکالوس و همکاران، ۲۰۱۰). البته در اغلب منابع مقدار شاخص را برای تعیین الگوی مکانی به‌صورت جدول معرفی کرده‌اند. مقدار R و z در این مطالعه توسط نرم افزار ArcGIS محاسبه شد و برای تعیین الگوی مکانی از جدول (۱) استفاده شد.

جدول ۱: تعیین الگوی مکانی بر اساس مقدار r،z و مقدار L(r)

مقدار r	مقدار z	مقدار L(r)	الگوی مکانی
r<۱	Z<-۲/۵۸	۰< L(r)	کپه‌ای
r=۱	-۲/۵۸<Z<+۲/۵۸	۰=L(r)	تصادفی
r>۱	Z>+۲/۵۸	۰>L(r)	یکنواخت

جدول ۲: شاخص‌های ساختاری مورد بررسی در این تحقیق

(Kint *et al*., 2000; Pommerening, 2002; Aguirre *et al*., 2003; Pastorella and Paletto, 2013)

نام شاخص مورد استفاده	دامنه شاخص ها	مشخصات

شاخص زاویه یکنواخت Uniform angle index (W)	۰-۱	W < 0.3 : Regular pattern
		0.3 ≤ W < 0.4 : Random pattern
		W ≥ 0.4 : Clumped pattern
شاخص آمیختگی گونه‌ای Species mingling index (M)	۰-۱	M < 0.3 : Low species mixture
		0.3 ≤ M < 0.5 : Midway species mixture
		M ≥ 0.5 : High species mixture
شاخص تنوع ابعاد Size differentiation (U)	۰-۱	U < 0.3 : Low dimension variation
		0.3 ≤ U < 0.5 : Midway dimension variation e
		U ≥ 0.5 : High dimension variation

۲-۳-۲- شاخص زاویه یکنواخت (W)

شاخص زاویه یکنواخت به بررسی درجه منظم بودن توزیع مکانی موقعیت درختان در جنگل می‌پردازد. اندازه‌گیری این شاخص نیازمند تعیین زاویه بین درختان است، بدین منظور فاصله درخت مرجع تا درختان همسایه با متر اندازه‌گیری شد و با استفاده از قطب‌نما نیز آزیموت بین درختان تعیین گردید، سپس بر اساس فاصله و آزیموت بین درختان، زاویه بین آنها محاسبه شد. ارزش این شاخص برای یک گروه ساختاری و همچنین تمام گروه‌های ساختاری از یک گونه به ترتیب بر اساس روابط ۳ و ۴ قابل محاسبه هست.

رابطه ۳:
$$W_i = \frac{1}{4}\sum_{j=1}^{4} v_j \quad \text{with}$$

رابطه ۴:
$$v_j = \begin{cases} 1, & \alpha_j < \alpha_0 \\ 0, & \text{otherwise} \end{cases} \quad \text{and} \quad 0 \le W_i \le 1$$

در رابطه فوق اگر زاویه بین درختان همسایه (α_j) کمتر از ۱۲۰ درجه باشد، Vj ارزشی برابر با ۱ و اگر بزرگتر یا مساوی با ۱۲۰ درجه باشد برابر با صفر خواهد شد ؛ همچنین n برابر است با تعداد کل درختان مرجع از یک گونه که در این مطالعه ۳۰ می‌باشد و k برابر با چهار درخت همسایه‌ی درخت مرجع است. همان‌گونه که در رابطه ۳ مشخص است این شاخص بر اساس زاویه بین درختان محاسبه می‌شود. اطلاعات بیشتر در رابطه با این شاخص در جدول ۲ ارائه شده است.

۳-۳-۲- شاخص آمیختگی گونه‌ای (M)

دومین شاخص استفاده شده در این تحقیق، شاخص آمیختگی (M) می‌باشد. دومین جنبه که در بررسی ساختار جنگل به آن پرداخته می‌شود، تنوع گونه‌ای است که برای بررسی آن شاخص‌های متعددی تعریف شده‌اند. یکی از شاخص‌هایی که در آن به

رابطه ۵:
$$M_i = \frac{1}{4}\sum_{j=1}^{4} v_j$$

بررسی نحوه چیدمان گونه‌ها در کنار یکدیگر می‌پردازد، شاخص آمیختگی است. مقدار این شاخص برای یک گروه ساختاری از طریق رابطه ۵ قابل محاسبه می‌باشد:

بر اساس رابطه فوق، اگر درخت مرجع (i) و همسایه (j) از گونه‌های مختلف باشند، Vj ارزشی برابر با ۱ و در غیر این صورت ارزش صفر خواهد گرفت. با توجه به فراوانی نسبی و موقعیت قرارگیری گونه‌ها نسبت به یکدیگر این شاخص می‌تواند دارای ارزشی بین ۱-۰ باشد و در هنگام استفاده از چهار همسایه اطراف درخت مرجع، ارزش این شاخص می‌تواند یکی از پنج مقدار صفر، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، و یا ۱ باشد. ارزش‌های نزدیک به صفر نشان‌دهنده آمیختگی کم و ارزش‌های نزدیک به ۱ نشان‌دهنده آمیختگی بالا می‌باشد. اطلاعات بیشتر در رابطه با این شاخص در جدول ۲ ارائه شده است.

۴-۳-۲- شاخص تنوع ابعاد (U)

این شاخص زمانی مفید است که ابعاد نسبی یک گونه خاص نسبت به سایر گونه ها مورد ارزیابی قرار گیرد. مقدار این شاخص از رابطه زیر قابل محاسبه است:

$$U_i = \frac{1}{4}\sum_{j=1}^{4} v_j$$

رابطه ۶:

مقدار این شاخص بین ۱-۰ محاسبه می شود. زمانی که ابعاد درخت مرجع نسبت به همسایه‌های خود بزرگتر و یا مساوی باشد، ارزش این شاخص برابر با ۱ است. در حالی که اگر ابعاد درخت مرجع نسبت به همسایه‌گان خود کوچکتر باشد، ارزش این شاخص به سمت صفر میل می‌کند. محدوده و طبقات این شاخص در جدول ۲ نشان داده شده است.

۳. نتایج و بحث

نتایج حاصل از تحلیل الگوی پراکنش مکانی لرگ در منطقه مورد مطالعه با استفاده از شاخص نزدیکترین همسایه در جدول (۳) آورده شده است. نتایج حاکی از وجود الگوی پراکنش مکانی کپه‌ای برای گونه‌ی لرگ در منطقه مورد بررسی می‌باشد.

جدول ۳: مقادیر شاخص نزدیک‌ترین همسایه (r) و آماره z برای تعیین الگوی پراکنش گونه لرگ در منطقه مورد مطالعه

گونه	مقدار r	مقدار z	الگوی پراکنش مکانی
لرگ	۰/۴۱۲	-۲۷/۸۵	کپه‌ای

در جدول ۴ نتایج حاصل از بررسی‌های اولیه بر روی داده‌های جمع‌آوری‌شده ازجمله حداقل، حداکثر، میانگین و ضریب تغییرات قطر برابر سینه گونه لرگ ارائه شده است.

جدول ۴: مشخصات آماری قطر برابر سینه لرگ در منطقه مورد مطالعه

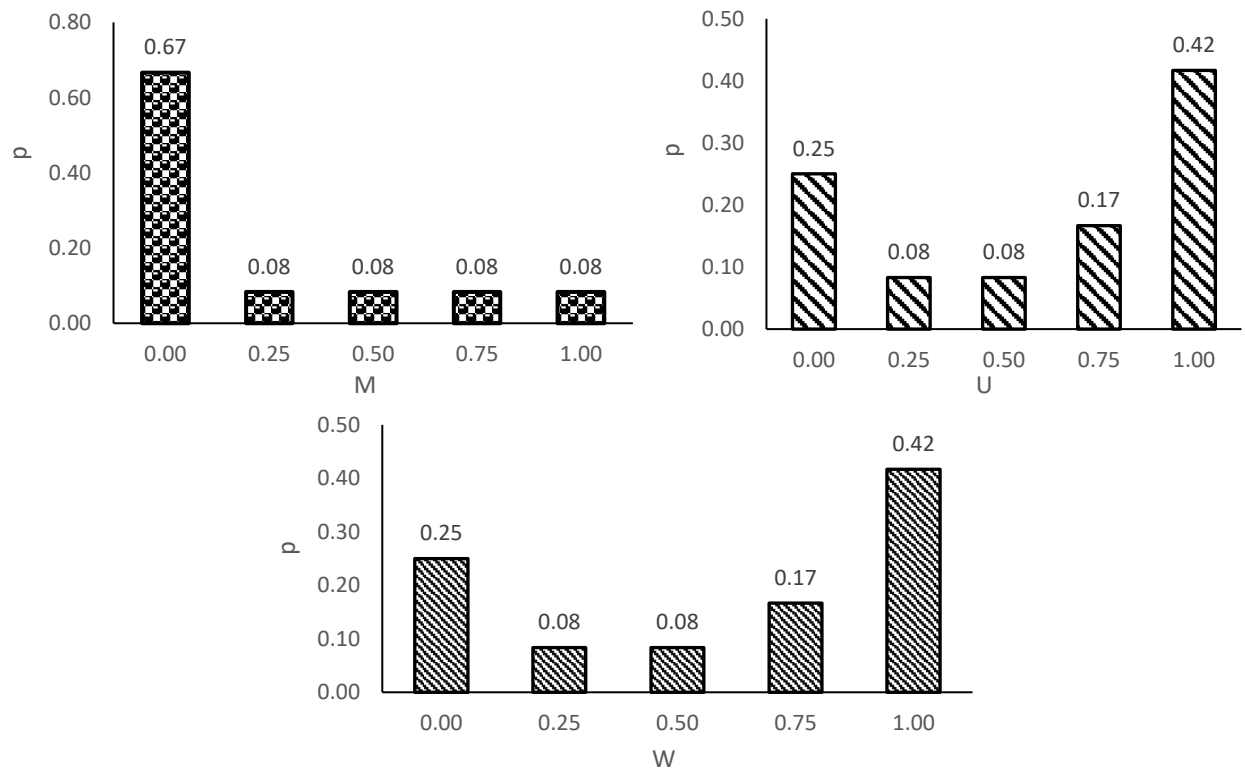
	حداقل	حداکثر	میانگین	ضریب تغییرات
قطر برابر سینه (سانتی‌متر)	۱۰	۶۹	۳۷/۵	۴۳/۸۱

پس از بررسی‌های اولیه بر روی داده‌های جمع‌آوری‌شده، شاخص‌های زاویه یکنواخت، آمیختگی گونه ای و اختلاف ابعاد برای هر کدام از گروه‌های ساختاری (یک درخت مرجع که یک پایه از گونه لرگ بوده و چهار درخت همسایه آن) برای گونه مذکور محاسبه شد؛ مقادیر شاخص ها برای هر گروه ساختاری در شکل ۱ آمده است و نهایتا در جدول ۵ میانگین این شاخص‌ها ارائه

شده است. نتایج نشان می‌دهد که هر گونه لرگ دارای اختلاف ابعاد زیادی نسبت به درختان همسایه است. بر اساس نتایج حاصل در جدول ۵ و بر اساس طبقه‌بندی ارائه‌شده در جدول ۱ که از Pastorella و Paletto (۲۰۱۳) اقتباس شده، مقادیر میانگین شاخص زاویه یکنواخت (Wi) نشان می‌دهد که گونه لرگ نسبت به چهار همسایه خود چیدمان کپه‌ای دارند. با توجه به مقادیر شاخص آمیختگی برای گونه لرگ، آمیختگی گونه‌ای پایینی را نشان می‌دهد. نتایج این شاخص نشان‌دهنده آمیختگی کم گونه مورد بررسی می‌باشد، حضور پایه‌هایی از گونه‌های ون، سفیدپلت، انجیلی و توسکا در اطراف پایه‌های لرگ موجب آمیختگی گونه‌ای کم گردیده است. شاخص اختلاف ابعاد نشان داد که گونه لرگ نسبت به چهار همسایه خود دارای اختلاف زیادی از نظر ابعاد می‌باشد.

جدول ۵:میانگین شاخص‌های ساختاری مورد بررسی برای گونه‌ی لرگ در منطقه مورد مطالعه

گونه	شاخص زاویه یکنواخت (W)	شاخص آمیختگی (M)	شاخص اختلاف ابعاد (U)
لرگ	۰/۷۷	۰/۲۱	۰/۶۰



شکل ۲: نمودارهای توزیع مقادیر شاخص‌های: زاویه یکنواخت (الف)، آمیختگی گونه ای (ب) و اختلاف ابعاد (ج) لرگ در منطقه مورد مطالعه

الگوهای مکانی در شناخت و حل مسائل بوم شناختی و ارائه راهکارهای مدیریتی دارای نقش قابل‌توجهی هستند. ساختار کنونی جنگل‌ها نتیجه ارتباط پیچیده بین درختان با تاریخچه‌های متفاوت است که با تاثیر عواملی چون رویشگاه، اقلیم و آشفتگی (طوفان، آتش سوزی، آفات و امراض، برف و یخبندان و سیل) ترکیب شده است. به‌طور کلی ساختار جنگل، سه جنبه تنوع موقعیت مکانی درختان، تنوع گونه‌ای (آمیختگی) و تنوع ابعاد درختان جنگلی را مورد مطالعه قرار می‌دهد (عسکری و الوانی‌نژاد، ۱۳۹۵). نتایج حاصل از تنوع موقعیت مکانی نشان‌دهنده چیدمان کپه‌ای لرگ نسبت به همسایگان خود بود. به‌طورکلی در جوامع جنگلی الگوی پراکنش بسیاری از گونه‌ها به‌صورت کپه‌ای است، دلیل این امر نیز روابط متقابل درختان با سایر عوامل محیطی است. نتایج حاصل از شاخص آمیختگی نشان‌دهنده آمیختگی پایین لرگ نسبت به درختان همسایه خود می‌باشد. آمیختگی گونه‌ای تحت تأثیر موقعیت مکانی درختان قرار دارد (Pommerening, 2002؛ پیله‌ور و همکاران، ۱۳۹۳). در منطقه مورد مطالعه گونه سفیدپلت غالب است و در کنار درختان مورد بررسی لرگ در تحقیق حاضر پایه‌های سفیدپلت، ون، انجیلی و توسکا هم مشاهده می‌گردند که این امر تا حدودی موجب تنوع درختی در اطراف پایه‌های لرگ گردیده و در نتیجه منجر به وجود مقدار ۰/۲۱ برای شاخص آمیختگی شده است. سومین ویژگی مورد بررسی در این تحقیق تنوع و اختلاف ابعاد درختان بود که بر اساس نتایج حاصل از این شاخص، لرگ دارای اختلاف زیاد با گونه‌های همسایه خود می‌باشد. مدیریت جنگل در کنار سن و مراحل تکاملی توده از عوامل تأثیرگذار بر اختلاف ابعاد در درختان هستند (Pommerening, 2002).

۴. نتیجه‌گیری

بطور کلی درختان در جنگل روابط متقابل دارند و این رابطه متقابل در ساختار مکانی جنگل تأثیر می‌گذارد، با به‌کارگیری شاخص‌های مبتنی بر نزدیکترین همسایه، علاوه بر تشریح وضعیت فعلی توده‌های جنگلی و گونه‌های موجود در آن می‌توان به بررسی تغییرات ایجاد شده در طی زمان و مکان و همچنین به بررسی تأثیر فعالیت‌های مدیریتی بر روی ساختار گونه‌ها پرداخت و نیاز است که پس از شناخت الگوهای ساختاری مشاهده شده در گونه‌های مختلف، به بررسی دلایل بوم‌شناختی ایجاد چنین الگوهایی پرداخت. در نهایت باید خاطر نشان کرد الگوی توزیع و پراکنش گونه‌های درختی که خود متأثر از مجموعه عوامل متعددی است بر دیگر جنبه‌های ساختار گونه‌های درختی تأثیرگذار است.

منابع

۱. ابراهیمی س. س.، و پوربابائی ح. ۱۳۹۲. تأثیر حفاظت بر الگوی پراکنش مکانی درختان غالب در جوامع راش (مطالعه موردی: ماسال، گیلان). بوم شناسی کاربردی، ۲(۴): ۱۳-۲۴.

۲. اخوان ر.، ثاقب طالبی خ. حسنی م. و پرهیزگار پ. ۱۳۸۹. بررسی الگوی مکانی درختان طی مراحل تحولی جنگل در توده‌های دست‌نخورده راش (*Fagus orientalis* Lipsky) در کلاردشت. فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، ۱۸(۲): ۳۳۶-۳۲۲.

۳. پیله‌ور ب.، میرآزادی ز. علی‌جانی و. و جعفری سرابی ح. ۱۳۹۳. کاربرد شاخص‌های مبتنی بر نزدیکترین همسایه در بررسی ساختار گونه‌های زالزالک و کیکم در جنگل‌های زاگرس. مجله تحقیقات جنگلهای زاگرس، ۱(۲): ۱۴-۱.

٤. حبشی ه.، حسینی س.م. محمدی ج. و رحمانی ر. ۱۳۸۶. تعیین الگوی پراکنش و ساختار در جنگل آمیختهٔ راش شصت کلا گرگان، فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، ۱۵(۱): ۵۵-۶۴.

٥. صفری .ا، شعبانیان ن. عرفانی‌فرد س. ی. حیدری ر. ح. و پوررضا م. ۱۳۸۹. بررسی الگوی پراکنش مکانی گونهٔ بنه (مطالعهٔ موردی: جنگل‌های باینگان استان کرمانشاه). مجله جنگل ایران، ۲(۲): ۱۷۷-۱۸۵.

۶. عسکری ی.، و الوانی‌نژاد س. ۱۳۹۵. تحلیل ساختار گونه‌های درختی و درختچه‌ای در جنگل‌های زاگرس مرکزی با تکیه بر شاخص‌های نزدیکترین همسایه. اولین همایش ملی منابع طبیعی و توسعه پایدار در زاگرس مرکزی، ۱۰ و ۱۱ شهریور ماه ۱۳۹۵، دانشگاه شهرکرد، ایران.

۷. علوی س.ج.، زاهدی امیری ق.ا. نوری ز. و مهاجر م.م. ۱۳۹۲. کاربرد تابع k ریپلی در آشکارسازی الگوی پراکنش مکانی گونه ملج در جنگل آموزشی و پژوهشی خیرود نوشهر. نشریه پژوهش های علوم و فناوری چوب و جنگل، ۲۰(۴): ۲۱-۳۹.

۸. علی جانی و.، و فقهی ج. ۱۳۹۰. بررسی ساختار مکانی گونهٔ ملج (*Ulmus glabra* Hudson) به منظور مدیریت پایدار آن (مطالعهٔ موردی: بخش گرازبن جنگل خیرود). محیط شناسی، ۳۷(۶۰): ۴۴-۳۵.

مقدم م.ر. ۱۳۸۰. اکولوژی توصیفی و آماری پوشش گیاهی. انتشارات دانشگاه تهران، ۲۸۵ ص.

9. Aguirre O., Hui G. Gadow K.V. and Jimenez J. 2003. An analysis of forest structure using neighborhood-based variables. Forest Ecology and Management, 183(1): 137-145.
10. Gadow K.V. 2006. Forsteinrichtung Adaptive Steuerung und Mehrpfadprinzip. University of Gottingen, 176p.
11. Getzin S., Dean C. He F. Trofymow J.A. Wiegand K. and Wiegand T. 2006. Spatial patterns and competition of tree species in a Douglas-fir chronosequence on Vancouver Island. Journal of Ecography, 29: 671-682.
12. Gonçalves A.C., Oliveira Â.C. and Dias S.S. 2010. Evolution in multi-species high forest stands in erra da Lousã: Diversity Analysis. Silva Lusitana, nº especial, 79 – 90p.
13. Illian J., Penttinen A. Stoyan H. and Stoyan D. 2008. Statistical Analysis and Modelling of Spatial Point Patterns. John Wiley & Sons Press, UK, 557 p.
14. kint V., Roert W. and Noel D. 2004. Evauation of sampling methods for estimation of structural indices in forest stand, Ecological modeling, 180: 461-476.
15. Kint V., Lust N. Ferris R. and Olsthoorn A.F.M. 2000. Quantification of forest stand structure applied to Scote Pine (*Pinus sylvestris* L.) Forests. Forest Systems, 9(S1): 147-163.
16. Krebs C.J. 1999. Ecological Methodology. Second Edition. Addison – Welsey Educational Publisher, Inc. Benjamin/Cummings imprint, 581pp.
17. Krebs C.J. 2001. Program for ecological Methodology, 2nd ed. Dept. of Zoology university of British Colombia, Vancouver, B.C. Canada V6T 1Z4 (software vesion 6.0).
18. Law R., Illian J. Burslem D.F.R.P. Gratzer G. Gunatilleke C.V.S. and Gunatilleke I.A.U.N. 2009. Ecological information from spatial patterns of plants: insights from point process theory (Essay Review). Journal of Ecology, 97: 616-628.
19. Li Y., Hui G. Zhao Z. Hu Y. and Ye S. 2014. Spatial structural characteristics of three hardwood species in Korean pine broad-leaved forest—Validating the bivariate distribution of structural parameters from the point of tree population. Forest Ecology and Management, 314(0), 17-25.
20. Linares-Palomino R. 2005. Spatial distribution patterns of trees in a seasonally dry forest in the Cerros de Amotape National Park, northwestern Peru. Peruvian Journal of Biology, 12(2): 317-326.
21. Ludwig J.A. and Reynolds J.F. 1988. Statistical Ecology: A Primer in Methods and Computing. John Wiley & Sons, 362pp.
22. Moeur M. 1993. Characterizing spatial patterns of trees using stem- mapped data. Forest science; 39(4): 756-775.
23. Nadkarni N.M., Mclntosh A.C.S. and Cushing J.B. 2008. A framework to categorize forest structure concepts. Forest Ecology and Management, 256: 872-882.
24. Packalenab P., Vauhkonenc J. Kallioa E. Peuhkurinend J. Pitkänene J. and Pip I. 2013. Predicting the spatial pattern of trees by airborne Laser Scanning. International Journal of Remote Sensing, 34(14): 5154-5156.
25. Pastorella F. and Paletto A. 2013. Stand structure indices as tools to support forest management: an application in Trentino forests (Italy). Journal of Forest Science, 59(4):159-168.
26. Pommerening A. 2002. Approaches to quantifying forest structures. Forestry, 75(3): 305-324.
27. Pommerening A. 2006. Evaluating structural indices by reversing forest structural analysis. Forest Ecology and Management, 224(3): 266-277.
28. Salas C., LeMay V. Nunez P. Pacheco P. and Espinosa A. 2006. Spatial patterns in an old-growth Nothofagus oblique forest in south central Chile. Forest Ecology and Management, 231: 38–46.
29. Sousa-Souto L, Viana-Junior AB, Nascimento ES. 2013. Spatial Distribution of Acromyrmex balzani (Emery) (Hymenoptera: Formicidae: Attini) Nests Using Two Sampling Methods. Sociobiology, 60(2): 162-168.
30. Stamatellos G, panourgias G. 2005. Simulating spatial distribution of forest trees by using data from fixed area plots. Forestry, 78(3): 305-312.
31. Tomppo E. 1986. Models and methods for analyzing spatial patterns of trees. In: Communications Institute Forestalis Fenniae, vol. 138, The Finnish forest research institute, Helsinki, Finland, 65 p.
32. Wolf A. 2005. Fifty-year record of change in tree spatial patterns within a mixed deciduous forest, Forest Ecology and management, 215, 212-223.

Applications of spatial statistics in ecology

Shaaban Ghalandarayeshi

Assistant Professor, Department of Mathematics and Statistics, Faculty of Engineering and Basic Science, University of Gonbad Kavous,

Sh.ghalandar@gmail.com

Abstract

Most of the data collected in ecological studies includes spatial and temporal aspects, but these issues have recently been addressed in ecological theories. Spatial statistics provide a quantitative description of the natural variables distributed in space and time. The purpose of this paper is to provide a coherent and simple description of the most common applications of spatial statistics in ecological studies. The study of spatial patterns of points is divided into two groups: spatial patterns of unmarked points and spatial patterns of marked points. In the first case, only the spatial coordinates of the plants are examined and the patterns are classified into three categories: random, regular and clustered distribution. The other category of analyzes also considers the marks of points. In this case, in addition to the location of plants, a qualitative mark (such as species) or a quantitative mark (such as dimensions or diameter) is also examined simultaneously, and the distribution patterns of plants actually show the interactions between plants. Spatial pattern analysis may be performed using spatial indices or spatial functions. The advantages of using indices are related to the ease of calculating the results and interpreting them. Also, collecting data for calculation of these indices is often easier and less costly. In contrast, modern spatial statistics uses functions instead of spatial indices to analyze point processes. These functions depend on the distances between all the individuals in the population or the distances of the nearest neighbors. Therefore, they can be used to simultaneously detect different spatial scales of the observed pattern. Another advantage is that it makes the analysis more precise, but on the other hand, data collection is very costly and time consuming.

Keywords: spatial patterns, structure, repulsion, mingling, pair-correlation function

کاربردهای آمار مکانی در اکولوژی

شعبان قلندرآیشی

استادیار، گروه ریاضی و آمار، دانشکده فنی و علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس

sh.ghalandar@gmail.com

چکیده

بیشتر داده‌های جمع‌آوری‌شده در مطالعات اکولوژیکی شامل جنبه‌های مکانی و زمانی هستند، اما این مباحث اخیراً در تئوری های اکولوژیکی مورد توجه قرار گرفته اند. آمار مکانی توصیف کمی از متغیرهای طبیعی توزیع شده در مکان و زمان را ارائه می دهد. هدف این مقاله ارائه توصیفی منسجم و قابل درک از متداول‌ترین کاربردهای آمار مکانی در مطالعات اکولوژیکی می باشد. مطالعه الگوهای مکانی نقاط به دو گروه الگوهای مکانی نقاط بدون شناسه و الگوهای مکانی نقاط شناسه دار تقسیم می شود. در حالت اول صرفا مختصات مکانی گیاهان مورد بررسی قرار می گیرد و بر این اساس الگوها به سه دسته تصادفی، منظم و کپه ای تقسیم می شوند. دسته دیگر تجزیه و تحلیل ها همزمان شناسه نقاط را نیز در نظر می گیرد. در این حالت علاوه بر موقعیت مکانی گیاهان یک شناسه کیفی (مانند گونه) و یا یک شناسه کمی (مانند ابعاد یا قطر) نیز همزمان مورد بررسی قرار می گیرد و الگوهای پراکنش گیاهان در واقع اثرات متقابل بین گیاهان را نشان می دهد. تجزیه و تحلیل الگوهای مکانی ممکن است با استفاده از شاخص های مکانی یا توابع مکانی انجام شود. مزایای استفاده از شاخص ها به سهولت محاسبه نتایج و تفسیر آنها مربوط می‌شود. همچنین جمع آوری داده ها برای محاسبه این شاخص ها اغلب ساده تر و کم هزینه تر است. در مقایسه، آمار مکانی مدرن برای تجزیه و تحلیل فرایندهای نقطه ای از توابع به جای شاخص های مکانی استفاده می کند. این توابع به فواصل بین همه افراد در جمعیت یا فاصله نزدیکترین همسایه بستگی دارد. بنابراین می توان از آنها برای تشخیص همزمان مقیاس های مکانی مختلف الگوی مشاهده شده استفاده کرد. مزیت دیگر آن این است که تجزیه و تحلیل را دقیق تر می کند، اما از طرف دیگر، جمع آوری داده ها بسیار پرهزینه و زمان بر است.

واژگان کلیدی: الگوهای مکانی، ساختار، دافعه، اختلاط، توابع همبستگی زوجی

۱.مقدمه

ابعاد مکانی و زمانی پدیده‌های اکولوژیکی در اکولوژی خصوصیتی ذاتی است. بیشتر داده‌های جمع‌آوری‌شده در مطالعات اکولوژیکی شامل جنبه‌های مکانی و زمانی هستند، اما این مباحث اخیراً در تئوری های اکولوژیکی، نمونه برداری، طراحی آزمایش ها و مدل ها مورد توجه قرار گرفته اند. پیش از این، ساختار جوامع گیاهی خصوصا در جنگلها اغلب بوسیله توزیع صرف اندازه گیاهان کمی سازی می شد (Emborg *et al.*, 1996; Emborg, 1998; Hui and Pommerening, 2014) و درجه ناهمگنی اندازه ای با استفاده از ضریب جینی (Lexerod and Eid, 2006; Nord-Larsen *et al.*, 2006) ضریب تغییرات و درجه ناهمگنی گونه ای نیز بوسیله شاخص های تنوع مورد بررسی قرار می گرفت. با این وجود، شاخص هایی مانند جینی و شاخص تنوع شانون (Shannon, 1948) شامل ساختار مکانی و در نتیجه اثرات متقابل بین پایه های گیاهی نمی شود.

بسیاری از بوم شناسانی که می خواهند تحلیل مکانی را آغاز کنند، با مفاهیم الگوهای مکانی و اینکه چگونه باید از روش های مختلف به درستی استفاده کنند، آشنا نیستند. آمار مکانی توصیف کمی از متغیرهای طبیعی توزیع شده در مکان را ارائه می دهد. تجزیه و تحلیل مکانی معمولا در بسیاری از رشته ها مانند اکولوژی گیاهی و حیوانی، جغرافیا، باستان شناسی، مهندسی معدن و همچنین علوم جنگل مورد استفاده قرار می گیرد. معمولاً اهداف تحلیل مکانی تشخیص الگوهای مکانی است که نمی توان با تجزیه و تحلیل بصری انجام داد و تایید اینکه آیا یک الگوی مشاهده شده تنها به طور تصادفی پدید آمده است یا از علل خاص ناشی شده است.

در سالیان اخیر محبوبیت تحلیل مکانی در اکولوژی افزایش چشمگیری داشته است که از جمله دلایل آن می توان نیاز به گنجاندن ساختار مکانی سیستم‌های زیستی در تحلیل سیستمها، نیاز به ارزیابی ناهمگونی و تغییر مکانی مناظر که با سرعت فزاینده ای در حال تغییر هستند و همچنین در دسترس بودن بسته های نرم افزاری آمار مکانی اشاره کرد (Fortin and Dale, 2005).

در گذشته، عدم وابستگی مکانی در داده‌های جمع‌آوری شده توسط بوم‌شناسان مشکلی بوده است که موجب مبهم کردن توانایی درک بیولوژی موجودات و پویایی های اکوسیستم های مختلف می شد. تأثیر مکان معمولا در تحقیقات اکولوژیکی نادیده گرفته می شد یا از آن حذف می شد چرا که روش های بسیاری برای حذف یا اجتناب از وابستگی مکانی جمعیت ها ابداع شده است (Legendre and Fortin, 1989; Liebhold and Gurevitch, 2002).

اگرچه بیشتر سیستم‌های موجود در طبیعت از نظر مکانی همگن نیستند، اما نوعی ساختار مکانی را از خود نشان می‌دهند. بوم شناسان می دانند که فرآیندهای بیولوژیکی آثاری را به شکل الگوهای مکانی افراد به جا می گذارند و بطور کلی خصوصیات اکوسیستم را تعیین می کنند (Dale *et al.*, 2002; von Gadow *et al.*, 2012; Wiegand *et al.*, 2013). بدیهی است که فرآیندهای اکولوژیکی مختلف که در مقیاس‌های مکانی و زمانی متفاوت عمل می‌کنند، منتج به پویایی خاص هر سیستم می شوند. بوم شناسانی که به مطالعه الگوی مکانی جمعیت ها می پردازند سعی در استنباط وجود فرآیندها و اثرات متقابل مختلف بین افراد (مانند رقابت، همکاری، تولید مثل یا مرگ و میر) و همچنین اثرات متقابل بین افراد و محیط زیست آنها دارند (Ghalandarayeshi *et al.*, 2017). به عنوان مثال، در جنگل‌ها، ساختارهای مکانی متفاوت آشیان های اکولوژیکی مناسبی را برای پرندگان، پستانداران، حشرات و سایر موجودات زنده ایجاد می کند. واضح است که هر چه ساختارها پیچیده تر باشند، تنوع زیستی بیشتری را می توان مشاهده کرد.

به دلیل پیچیدگی الگوهای مکانی در سیستم های طبیعی استنتاج فرایندهای علت و معلولی از الگوی آشکار شده توسط جمعیت کار آسانی نیست. یک ساختار و الگوی مکانی مشابه می تواند توسط فرآیندهای مختلف ایجاد شود، اما همان فرایند لزوماً ساختار مکانی مشابهی را ایجاد نمی کند (McIntire and Fajardo, 2009). علاوه بر این، تأثیر یک الگو بر روی یک فرآیند ممکن است در یک مقیاس مکانی معین قابل مشاهده نباشد. بنابراین، استنباط در مورد علت یک ساختار مکانی خاص باید با دقت زیادی انجام شود (Lepš, 1990; Brown *et al.*, 2011). سه مرحله ای که برای پیوند الگو و فرآیندهای طبیعی در مطالعات اکولوژیکی پیشنهاد می شود شامل: کمی سازی الگوی مکانی، توسعه فرضیه هایی در مورد فرآیندهای تولید الگوی مشاهده شده و نهایتا ارزیابی فرضیه ها می باشد (Fortin and Dale, 2005; McIntire and Fajardo, 2009).

هدف این مقاله ارائه توصیفی منسجم و قابل درک از متداول‌ترین کاربردهای آمار مکانی در تجزیه و تحلیل ساختار مکانی در مطالعات اکولوژیکی می باشد از این رو، این مقاله روشهای تجزیه و تحلیل و فرمولهای ریاضی آنها را ارائه نمی کند. در واقع این مقاله برای محققانی که قصد شروع تجزیه و تحلیل مکانی را دارند ولی با مفاهیم و کاربردهای آن آشنا نیستند، مفید است. لازم به ذکر است که روش های مربوط به زمین آمار در این مقاله گنجانده نشده است.

۲. مواد و روشها

۲-۱ - انواع مطالعات الگوهای مکانی

۲-۱-۱ -الگوهای پراکنش گیاهان بدون در نظر گرفتن شناسه آنها

در این حالت صرفا مختصات مکانی گیاهان مورد بررسی قرار می گیرد. بر این اساس الگوهای پراکنش گیاهان را می توان به سه دسته کلی تقسیم نمود (Ghalandarayeshi *et al.*, 2017).

۲-۱-۱-۱ -الگوی پراکنش تصادفی

در این الگو گیاهان به صورت تصادفی پراکنده شده اند. بسیاری از گیاهانی که نیاز اکولوژیکی کمی دارند ممکن است در مراحل پایانی توالی این الگو را داشته باشند (شکل ۱).

۲-۱-۱-۲ -الگوی پراکنش منظم

رقابت بین گیاهان معمولاً منتهی به الگوی پراکنش منظم و سیستماتیک گیاهان می شود. این نوع الگو بیشتر در نهالکاری ها و جنگل کاری ها قابل مشاهده است (شکل ۱).

۲-۱-۱-۳ -الگوی پراکنش کپه ای

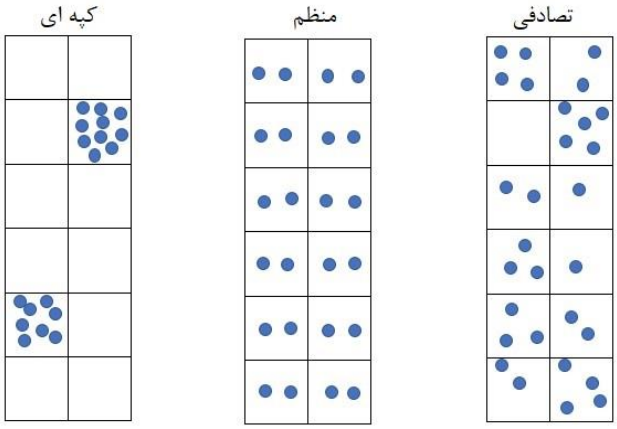
عوامل متعددی ممکن است منجر به ایجاد الگوی پراکنش کپه ای در گیاهان شوند که مهمترین آنها به قرار زیر هستند (شکل ۱):

الف. تکثیر جنسی از طریق پاجوش یا ریشه جوش.

ب. پراکنش محدود بذور گیاهان مخصوصا برای گیاهان دارای بذور درشت و سنگین که سنگینی بذور سبب پراکنش محدود بذر و فاصله اندک زادآوری از پایه های مادری می شود.

ج. نیازهای بالای اکثر گیاهان به نور نسبی بالا در روشنه ها بمنظور زادآوری و استقرار اولیه بخصوص در جنگل های متراکم .

د. نیاز های اکولوژیک خاص و بالای برخی گونه ها که امکان زادآوری را فقط در نقاط خاصی (میکروکلیما) دارند.



شکل ۱: الگوهای پراکنش گیاهان

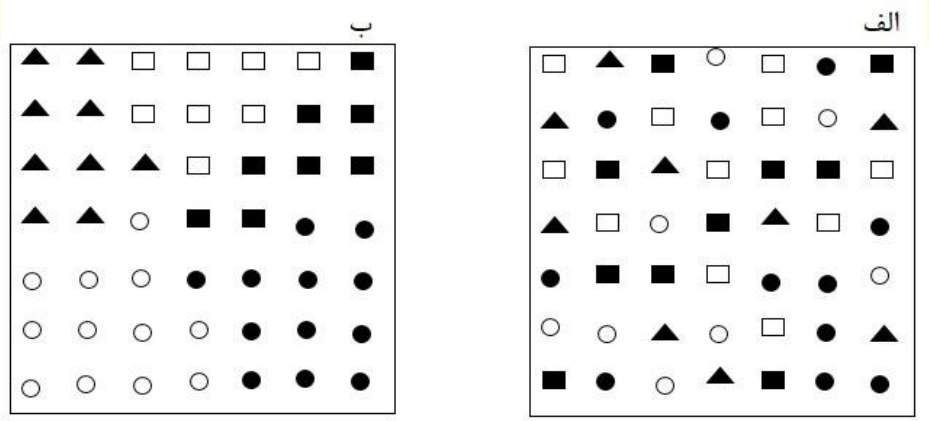
۲-۱-۲ - الگوهای پراکنش گیاهان با در نظر گرفتن شناسه آنها

در این حللت علاوه بر موقعیت مکانی گیاهان یک صـــفت کیفی (مانند گونه) و یا یک صـــفت کمی (مانند ابعاد یا قطر) نیز همزمان مورد بررسی قرار می گیرد و الگوهای پراکنش گیاهان در واقع اثرات متقابل بین گیاهان را نشان می دهد (شکل ۲ و ۳).

۲-۱-۲-۱- نقاط با شناسه کیفی:

اگر صفت مورد بررسی گونه باشد سه حالت ممکن است پیش آید (Ghalandarayeshi *et al.*, 2017).

- گونه ها هیچگونه اثر متقابلی ندارند یعنی پراکنش آنها نسبت به یکدیگر تصادفی و مستقل است.
- گونه ها به دلایل مختلفی ممکن اسـت نسـبت به یکدیگر جاذبه داشـته باشـند در این حالت به صـورت آمیخته با یکدیگر ظاهر می شوند (شکل ۲ الف)
- گونه ها نسبت به یکدیگر دافعه دارند و بصورت جدا از هم در طبیعت پراکنش دارند. لذا درصد آمیختگی آنها کم است (شکل ۲ ب).

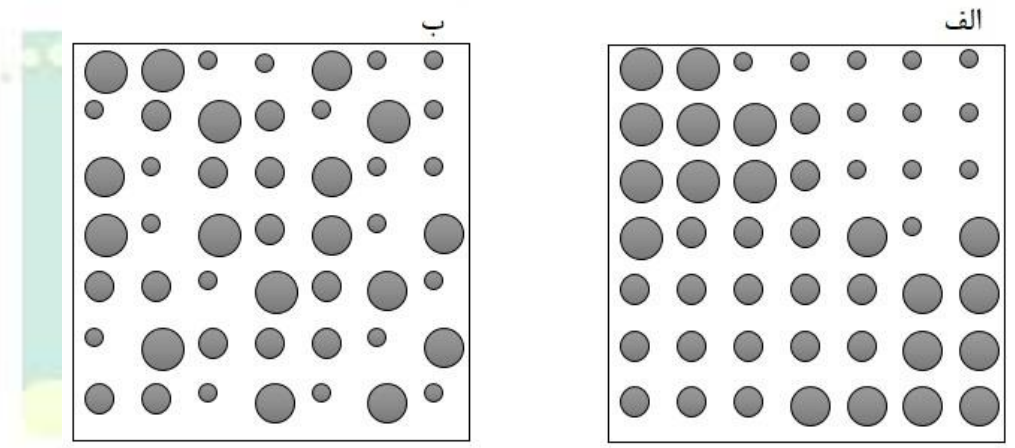


شکل ۲: - الگوهای پراکنش گونه های گیاهی نسبت به یکدیگر. الف: جاذبه بین گونه ای و آمیختگی بالا، ب: دافعه بین گونه ای و جدایی گونه ها

۲-۱-۲-۲- نقاط با شناسه کمی:

اگر شناسه گیاهان قطر یا اندازه باشد، در این حالت نیز سه حالت ممکن است پیش آید (Ghalandarayeshi *et al.*, 2017).

- قطر یا اندازه های گیاهان از لحاظ پراکنش مکانی مستقل از یکدیگر می باشد.
- گیاهان با اندازه های مشابه در کنار یکدیگر ظاهر می شوند یعنی اندازه گیاهان همبستگی مکانی مثبت دارند (شکل ۳ الف).
- گیاهان با اندازه های متفاوت در کنار یکدیگر ظاهر می شوند. یعنی اندازه گیاهان همبستگی مکانی منفی دارند (شکل ۳ ب).



شکل ۳: الگو های پراکنش اندازه ای گیاهان. الف: همبستگی مثبت بین اندازه های گیاهان .ب: همبستگی منفی بین اندازه های گیاهان

۲-۲ -روشهای تجزیه و تحلیل الگوهای مکانی نقاط

۲-۲-۱ -شاخص های مکانی

شاخص‌های مکانی معمولاً به سه گروه اصلی تقسیم می شوند: شمارش در پلات ها یا کوادرات، روش‌های مبتنی بر فاصله و شاخص‌ها بر اساس زوایای بین نزدیک‌ترین همسایگان. مزایای استفاده از این شاخص‌ها به سهولت محاسبه نتایج و تفسیر آنها مربوط می‌شود. اغلب اندازه گیری تعداد افراد، اندازه گیری فاصله نزدیکترین همسایه ها یا زاویه بین افراد به آسانی امکان پذیر هستند. در واقع با قدری تلاش بیشتر در آماربرداری های میدانی معمولی قابل وصول هستند. نقطه ضعف بزرگ آنها از دست دادن اطلاعات دقیق در مورد الگوهای مکانی در مقیاس های مکانی مختلف است. این شاخص ها الگوهای مکانی را فقط در مقیاس های کوچک توصیف می کنند (Ghalandarayeshi *et al.*, 2017). بر اساس نتایج قلندرآیشی و همکاران (۲۰۱۷) استفاده از شاخص های همسایگی گاهی ممکن است به نتایج گمراه کننده منتج شود.

از جمله این شاخص ها می توان نسبت واریانس به میانگین (Krebs, 1999)، شاخص غیرتصادفی پیلو (Pielou, 1960)، شاخص تفکیک پیلو (Pielou, 1977)، شاخص زاویه یکنواخت (von Gadow *et al.*, 1998)، شاخص اختلاط (von Gadow and Hui, 2002)، شاخص تسلط (von Gadow *et al.*, 2012)، تجمع کلارک و ایوانز (Clark and Evans, 1954) و غیره را نام برد.

۲-۲-۲ -توابع مکانی

آمار مکانی مدرن برای فرایندهای نقطه ای از توابع به جای شاخص های مکانی استفاده می کند. این توابع به فواصل بین همه افراد در جمعیت (به عنوان مثال تابع K(r) ریپلی و تابع همبستگی زوجی، g(r)، یا فاصله نزدیکترین همسایه (مانند تابع G و تابع F) بستگی دارد. بنابراین می توان از آنها برای تشخیص همزمان مقیاس های مکانی مختلف الگوی مشاهده شده استفاده کرد (Ripley, 1976; Illian *et al.*, 2008). این یک مزیت بزرگ نسبت به شاخص های مکانی است. نقطه ضعف آنها این است که معمولاً به مجموعه داده های میدانی بسیار دقیق تری نیاز دارند، یعنی نقشه های موقعیت تک تک افراد نمونه. از یک طرف تجزیه و تحلیل را دقیق تر می کند، اما از طرف دیگر، جمع آوری داده ها بسیار پرهزینه و زمان بر است. سپس نتایج ثبت شده به توزیع های نظری (مدل های فرضیه صفر) مربوط می شود. معمولاً یک مدل پواسون همگن (با فرض تصادفی بودن توزیع نقاط) به عنوان مرجع در مرحله اول هر تحلیل است. به لطف آشکار کردن الگوی مکانی در مقیاس‌های مکانی مختلف به طور همزمان، می‌توان فرآیندهای مختلفی را که مسئول ایجاد ساختار مکانی خاصی از جمعیت هستند، تشخیص داد (Ghalandarayeshi *et al.*, 2017).

توابع مکانی مانند تابع K(r) ریپلی و تابع همبستگی زوجی، g(r)، از جمله توابعی هستند که برای تجزیه و تحلیل الگوهای نقطه ای بدون در نظر گرفتن تفاوت در نوع گونه یا اندازه آنها استفاده می شوند. در مقایسه تابع زوجی دو متغیره و علامت واریوگرام که برای تجزیه و تحلیل الکوهای نقطه ای شناسه دار استفاده می شوند، امکان بررسی همزمان موقعیت گیاهان و گونه یا اندازه آنها را فراهم می کنند (Stoyan and Penttinen, 2000; Pommerening, 2002; Wiegand and Moloney, 2004; Wälder and Wälder, 2008; Pommerening and Särkkä, 2013). با این حال، تمام توابع فضایی به مجموعه داده هایی با موقعیت درختی شناخته شده نیاز دارند.

۳. نتیجه گیری

پیش از این، ساختار جوامع گیاهی خصوصا در جنگلها اغلب بوسیله توزیع صرف اندازه گیاهان کمی سازی می شد و درجه ناهمگنی اندازه ای با استفاده از ضریب جینی و ضریب تغییرات و درجه ناهمگنی گونه ای نیز بوسیله شاخص های تنوع مورد بررسی قرار می گرفت. با این وجود، شاخص هایی مانند جینی و شاخص تنوع شانون شامل ساختار مکانی و در نتیجه اثرات متقابل بین پایه های گیاهی نمی شود. توابع مکانی مانند تابع K(r) ریپلی و تابع همبستگی زوجی، g(r)، از جمله توابعی هستند که برای تجزیه و تحلیل الگوهای نقطه ای بدون در نظر گرفتن تفاوت در نوع گونه یا اندازه آنها استفاده می شوند. در مقایسه تابع زوجی دو متغیره و علامت واریوگرام که برای تجزیه و تحلیل الکوهای نقطه ای شناسه دار استفاده می شوند، امکان بررسی همزمان موقعیت گیاهان و گونه یا اندازه آنها را فراهم می کنند. با این حال، تمام توابع مکانی به مجموعه داده هایی با موقعیت درختی شناخته شده نیاز دارند. در مقایسه، برخی از شاخص های مکانی را می توان برای کمی سازی ساختار مکانی گیاهان استفاده کرد که در واقع با قدری تلاش بیشتر در آماربرداری های میدانی معمولی قابل وصول هستند مانند شاخص زاویه یکنواخت، شاخص اختلاط و شاخص تسلط. نسبت واریانس به میانگین، شاخص غیرتصادفی پیلو، شاخص

تفکیک پیلو و شاخص تجمع کلارک و ایوانز. با این حال باید توجه داشت استفاده از توابع مکانی نتایج دقیق تری از شاخص های مکانی بدست می دهد.

منابع

1. Brown, C., Law, R., Illian, J.B., Burslem, D.F.R.P., 2011. Linking ecological processes with spatial and non-spatial patterns in plant communities. J. Ecol. 99, 1402-1414.
2. Clark, P.J., Evans, F.C., 1954. Distance to Nearest Neighbor as a Measure of Spatial Relationships in Populations. Ecology 35, 445-453.
3. Dale, M.R.T., Dixon, P., Fortin, M.-J., Legendre, P., Myers, D.E., Rosenberg, M.S., 2002. Conceptual and mathematical relationships among methods for spatial analysis. Ecography 25, 558-577.
4. Emborg, J., ۱۹۹۸. Understorey light conditions and regeneration with respect to the structural dynamics of a near-natural temperate deciduous forest in Denmark. For. Ecol. Manage. 106, 83-95.
5. Emborg, J., Christensen, M., Heilmann-Clausen, J., 1996. The structure of Suserup Skov, a near-natural temperate deciduous forest in Denmark. Forest & Landscape Research 1, 311-333.
6. Fortin, M.J., Dale, M.R.T., 2005. Spatial analysis: a guide for ecologists. Cambridge University Press, Cambridge.
7. Ghalandarayeshi, S., Nord-Larsen ,T., Johannsen, V.K., Larsen, J.B., 2017. Spatial patterns of tree species in Suserup Skov – a semi-natural forest in Denmark. For. Ecol. Manage. 406, 391-401.
8. Hui, G., Pommerening, A., 2014. Analysing tree species and size diversity patterns in multi-species uneven-aged forests of Northern China. For. Ecol. Manage. 316, 125-138.
9. Illian, J., Penttinen, A., Stoyan, H., Stoyan, D., 2008. Statistical analysis and modelling of spatial point patterns. John Wiley & Sons, England.
10. Krebs, C.J., 1999. Ecological methodology. Benjamin Cummings; 2nd edition.
11. Legendre, P., Fortin, M.J., 1989. Spatial pattern and ecological analysis. Vegetatio 80, 107-138.
12. Lepš, J., 1990. Can underlying mechanisms be deduced from observed patterns. Spatial processes in plant communities. APB Academic Publication, The Hague, 1-11.
13. Lexerod, N.L., Eid, T., 2006. An evaluation of different diameter diversity indices based on criteria related to forest management planning. For. Ecol. Manage. 222, 17-28.
14. Liebhold, A.M., Gurevitch, J., 200 .۲Integrating the Statistical Analysis of Spatial Data in Ecology. Ecography 5, 553–557.
15. McIntire, E.J.B., Fajardo, A., 2009. Beyond description: the active and effective way to infer processes from spatial patterns. Ecology 90, 46-56.
16. Nord-Larsen, T., Damaard, C., Weiner, J., 2006. Quantifying size-asymmetric growth among individual beech trees. Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere 36, 418-425.
17. Pielou, E.C., 1960. A Single Mechanism to Account for Regular, Random and Aggregated Populations. J. Ecol. 48, 575-584.
18. Pielou, E.C., 1977. Mathematical Ecology. John Wiley and Sons, New York.
19. Pommerening, A., 2002. Approaches to quantifying forest structures. Forestry 75, 305-324.
20. Pommerening, A., Särkkä, A., 2013. What mark variograms tell about spatial plant interactions. Ecological Modelling 251, 64-72.
21. Ripley, B.D., 1976. The Second-Order Analysis of Stationary Point Processes. Journal of Applied Probability 13, No. 2, 255-266.
22. Shannon, C.E., 1948. A Mathematical Theory of Communication. At&T Tech J 27, 379-423.
23. Stoyan, D., Penttinen, A., 2000. Recent applications of point process methods in forestry statistics. Stat Sci 15, 61-78.
24. von Gadow, K., Hui, G., Albert, M., 1998. The neigh-bourhood pattern – a new parameter for describing forest structures. Centralblatt Gesamtes Forstwesen 115, 1-10.
25. von Gadow, K., Hui, G.Y., 2002. Characterizing forest spatial structure and diversity. In: Björk, L. (Ed.), SUFOR International Workshop. KFS AB, Lund, Sweden, University of Lunds, Sweden, pp. 20-30.
26. von Gadow, K., Yu Zhang, C., Wehenkel, C., Pommerening, A., Corral-Rivas, J., Korol, M., Myklush, S., Hui, G.Y., Kiviste, A., Zhao, X.H., 2012. Forest Structure and Diversity. In: Pukkala, T., von Gadow, K. (Eds.), Continuous Cover Forestry. Springer, Netherlands, pp. 29-83.

27. Wälder, K., Wälder, O., 2008. Analysing interaction effects in forests using the mark correlation function. Iforest 1, 34-38.
28. Wiegand, T., He, F., Hubbell, S.P., 2013. A systematic comparison of summary characteristics for quantifying point patterns in ecology. Ecography 36, 92-103.
29. Wiegand, T., Moloney, K.A., 2004. Rings, circles, and null-models for point pattern analysis in ecology. Oikos 104, 209-229.

Comparison of pH and elements in leaves and cones of two species of juniper in two habitats of Guynik Jorglan (North Khorasan) and Chaharbagh (Golestan)

Mohammad sehat Parseh[1] *, Sattarian Ali[2], Daneshvar Abolfazl[3], Amini Elham[4]

1*-Corresponding author, Masters Student Systematic discipline and Ecology, Gonbad Kavous University, Gonbad, Golestan.
2- Associate Professor of Biology of Sciences, Gonbad Kavous University, Gonbad, Golestan,
3- Assistant Professor of Biology of Sciences, Gonbad Kavous University,Gonbad, Golestan.
4- PhD graduate, Systematic Molecular Education, Tarbiat Modares University, Tehran, Tehran

* Email: parakhat9@gmail.com

Abstract

Juniperus genus of the Cupressaceae family, with 68 different species, is one of the most endemic coniferous species in the world. Among the native species of Iran *J. polycarpos*, K. Koch and *J. excelsa* M. Bieb is more common than other species. Among their distribution areas in North Khorasan are Goynik habitat and Chaharbagh habitat in Golestan. Whereas the sustainable management of natural plant ecosystems requires the identification of species and their habitats; In these conditions, paying attention to plant species that are able to adapt to harsh climatic and habitat conditions, should be one of the important priorities of researchers. In this study, sampling was performed by implementing 26 plots in a systematic random manner; After transferring the samples to the laboratory, the acidity and elements in the leaves and cones of both juniper species were evaluated in two separate areas. For acidity studies, leaves and fleshy parts of female cones were used, and for studies of available elements, branches and leaves of samples of both species were used. According to the data obtained from laboratory studies, it can be concluded that in Goynik and Chaharbagh regions, the pH of leaves and cones in both plant species *J. polycarpos* and *J. excelsa* differ by one percent, it can also be concluded that this rate is higher in Chaharbagh region than Goynik region. Analysis of elements in the two species indicates that in the Goynik region, the greatest difference between *J. excelsa* and *J. polycarpos* is in the absorption of calcium, potassium, iron, silicon, magnesium and phosphorus, respectively, which are more than 200 ppm in their absorption. There are differences, but in Chaharbagh region, the two species differ in having more than 100 ppm of potassium, aluminum, iron, magnesium and barium, respectively.

Keywords: Juniper, Archa, Goynik Jargalan, J. excelsa, J. polycarpos

مقایسه pH و عناصر موجود در برگ و مخروط دو گونه‌ی ارس، در دو رویشگاه گوی‌نیک جرگلان (خراسان شمالی) و چهارباغ (گلستان)

محمدصحت پارسه [۱*]؛ علی ستاریان[۲]؛ ابوالفضل دانشور[۳]؛ الهام امینی[۴]

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد سیستماتیک و اکولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گنبدکاووس

۲-دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گنبدکاووس

۳- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گنبدکاووس

۴- دکتری سیستماتیک گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

parakhat9@gmail.com *

چکیده

سرده ارس Juniperus از خانواده Cupressaceae، با ۶۸ گونه مختلف، یکی از پایدارترین گونه‌های سوزنی برگ جهان می‌باشد. در میان گونه های بومی ایران، گونه‌های *J. polycarpos* K. Koch و *J. excelsa* M. Bieb بیش‌تر از بقیه‌ی گونه‌ها انتشار دارند. از جمله مناطق انتشار آن‌ها، رویشگاه گوی‌نیک در خراسان شمالی و رویشگاه چهارباغ در گلستان، می‌باشد. از آنجا که لازمه مدیریت پایدار اکوسیستم‌های طبیعی گیاهی، شناخت انواع گونه‌ها و رویشگاه آن‌ها می‌باشد؛ توجه به گونه‌های گیاهی که توان سازگاری با شرایط سخت اقلیمی و رویشگاهی را دارند، می‌بایست یکی از اولویت‌های مهم پژوهشگران و محققان قرار گیرد. در این تحقیق، با پیاده نمودن ۲۶ پلات بصورت تصادفی سیستماتیک، نمونه‌برداری انجام شد؛ و پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، میزان اسیدیته و عناصر موجود در برگ و مخروط در هر دو گونه‌ی ارس، در دو منطقه‌ی مجزا مورد ارزیابی قرار گرفت. برای مطالعات اسیدیته، از برگ و قسمت گوشتی مخروط ماده، و برای بررسی عناصر موجود، از شاخه و برگ نمونه‌های دو گونه استفاده شد. با توجه به داده‌های به‌دست آمده از مطالعات آزمایشگاهی می‌توان نتیجه گرفت که در دو منطقه گوی‌نیک و چهارباغ میزان pH برگ و مخروط در هر دو گونه‌ی گیاهی *J. polycarpos* و *J. excelsa* در سطح معنی‌داری یک درصد با هم اختلاف دارند، همچنین می‌توان نتیجه گرفت که این میزان در منطقه چهارباغ بیش‌تر از منطقه گوی‌نیک است. تحلیل عناصر موجود در دو گونه، حاکی از آن است که در منطقه گوی‌نیک، بیش‌ترین تفاوت *J. excelsa*، با *J. polycarpos*، به‌ترتیب در جذب عناصر کلسیم، پتاسیم، آهن، سیلیسیم، منیزیم و فسفر می‌باشد که بیش از ۲۰۰ ppm در جذب آن‌ها اختلاف دارند ولی در منطقه چهارباغ، دو گونه‌ی مذکور، به ترتیب در داشتن عناصر پتاسیم، آلومینیوم، آهن، منیزیم و باریم با یکدیگر بیش از ۱۰۰ ppm اختلاف دارند.

کلمات کلیدی: سرو کوهی، آرچا، گوینیک جرگلان، J. excelsa، J. polycarpos

۱.مقدمه

پوشش گیاهی، منافع حیاتی و انکارناپذیری از لحاظ زیست‌محیطی، اقتصادی، اجتماعی و حتی سیاسی برای بشر دارد و به‌عنوان پشتوانه‌ای استراتژیک برای هر کشور به شمار می‌رود (گامس و همکاران، ۲۰۰۷). ایران از نظر شاخص پوشش گیاهی در وضعیت مناسبی قرار ندارد چنان‌که فقط حدود ۷٪ از خشکی‌های کشورمان، پوشش گیاهی داشته، بیش از ۶۵٪ مساحت

آن، را مناطق خشک و نیمه‌خشک (بیابانی و نیمه‌بیابانی) شکل می‌دهد (آزادبخت و همکاران، ۲۰۰۹). از آنجا که لازمه مدیریت پایدار اکوسیستم‌های طبیعی گیاهان، شناخت انواع گونه‌ها و رویشگاه آن‌ها می‌باشد (گروسی و همکاران، ۱۳۹۵)، توجه به گونه‌های گیاهی که توان سازگاری با شرایط سخت اقلیمی و رویشگاهی را داشته و برای حفظ بقای خود، با عوامل متعدد طبیعی مبارزه می‌کنند؛ می‌بایست یکی از اولویت‌های مهم پژوهشگران و محققان و مدیران اجرایی فعال در بخش‌های محیط‌زیست، منابع طبیعی، کشاورزی و صنعت قرار گیرد (عمرعطا، ۱۳۹۷).

سرده ارس با نام محلی آرچا (در جرگلان) و اَورَس (در چهارباغ) و نام علمی *Juniperus* L. از شاخه گیاهان مخروط‌دار یا مخروطیان، رده بازدانگان، راسته سوزنی‌برگان و خانواده Cupressaceae S. F. Gray می‌باشد (سایت‌های KEW., IPNI[456], 2020.[457])، که با نام‌های متعددی در نقاط مختلف ایران شناخته می‌شود. توانایی سازگاری با شرایط سخت آب‌وهوایی، تغییرات محیطی و زمین‌هایی با شیب تند و مرتفع، صفات بارز گونه‌های سرده ارس است (کروری و همکاران، ۱۳۸۹). گونه‌های ارس رشد کُندی دارند، بنابراین در سال‌های آغازین رشد خود، مانند چتری سبزرنگ، مانع فرسایش خاک توسط باد و باران و سایر نزولات جوی در ارتفاعات می‌شود (محمدنژاد کیاسری و همکاران، ۱۳۸۸). از طرف دیگر ریشه‌های فراوان و شاخه‌های متراکم، پربرگ و تاج پوشش چترمانند این گیاه؛ باعث حفاظت و تثبیت خاک، تثبیت و نگه‌داری شن‌های روان، حفظ رطوبت خاک، افزایش توان رویشی و زیست‌شناختی خاک، تقویت مواد آلی و معدنی خاک و ممانعت از فرسایش سطحی خاک و شسته شدن لایه غنی خاک مناطق تحت پوشش گردیده، از سوی دیگر با تاثیر بر بارورسازی ابرها در ارتفاعات، تنظیم رطوبت و متعادل کردن دمای هوا را برعهده دارد.

با توجه به روند رو به رشد تخریب رویشگاه‌های ارس کوهی در کشور، در این تحقیق تلاش شد، رویشگاه تخریب و سپس احیاء شده‌ی ارس جرگلان، با رویشگاه مطلوب و حفاظت‌شده‌ی ارس چهارباغ مقایسه گردد و با استفاده از یافته‌های علمی این دو منطقه، و نیز مقایسه دو گونه مهم ارس در ایران با یکدیگر، اطلاعات پایه‌ای مفیدی در اختیار مدیران قرار دهد تا از نتایج آن، جهت تعیین راهبردهای حفاظتی، اجرایی، مدیریتی و تحقیقاتی آینده زیست محیطی و منابع طبیعی در این گونه مناطق، به‌صورت علمی و مطلوب استفاده گردد.

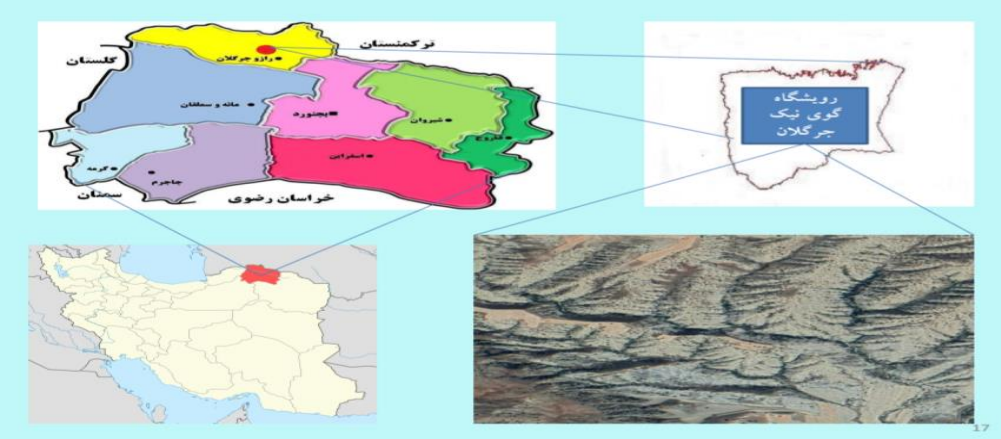
۲.مواد و روش

۲-۱-مناطق مورد مطالعه

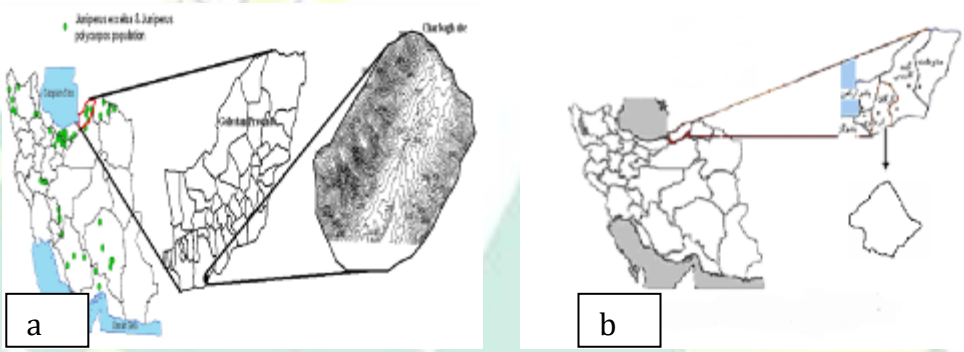
رویشگاه ارس در منطقهٔ حفاظت شده گوی‌نیک جرگلان در استان خراسان شمالی و در شهرستان راز و جرگلان، و در حد فاصل″۱۵ ′۵۵ °۵۶ تا ″۳۵ ′۰۱ °۵۷ طول شرقی و ″۳۵ ′۵۸ °۳۷ تا ″۵۰ ′۰۲ °۳۸ عرض شمالی واقع شده، مساحت کل این منطقه که علاوه بر سایر رستنی‌های درختی و درختچه‌ای متنوع، دارای درختان ارس می باشد، ۴۷۶۴ هکتار (۴۷۶۴۰۰۰ مترمربع) است (شکل ۱). میانگین بارش سالانه ۲۴۵ میلی‌متر و متوسط دمای سالانه c° ۱۷ است (عابدی، ۱۳۹۵). منطقه مورد مطالعه دیگر، چهارباغ استان گلستان می‌باشد. این منطقه، در عرض جغرافیایی شمالی ′۳۴ °۳۶ تا ′۴۰ °۳۶ و طول جغرافیایی ′۲۳ °۵۴ تا ′۴۴ °۵۴ بین استان‌های سمنان و گلستان واقع شده است (کروری، ۲۰۱۰). آب‌وهوای ارتفاعات سرد و میانگین دمای سالیانه، ۶/۵- درجه سانتی‌گراد و میانگین بارندگی سالانه، ۳۰۵ میلی‌متر می‌باشد. (شکل ۲).

[456] - www.IPNI.org (International Plant Names Index)

[457] - www.kew.org



شکل ۱: نقشه پراکنش ارس و موقعیت منطقه حفاظت شده گوی نیک جرگلان در خراسان شمالی.



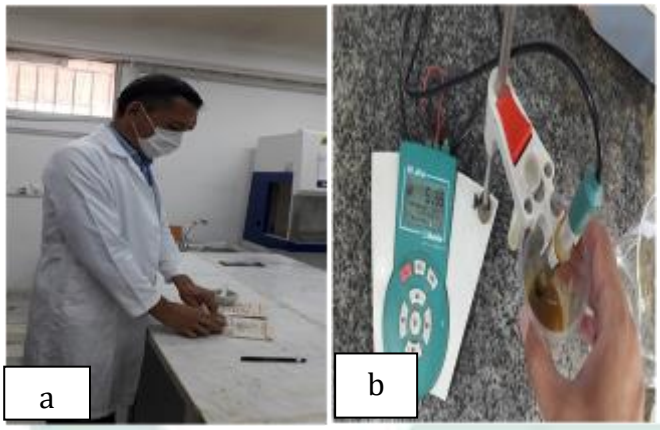
شکل ۲: موقعیت جغرافیایی منطقه چهارباغ گلستان. a- سیمای عمومی ذخیره‌گاه ارس چهارباغ (دانشور و همکاران، ۲۰۱۴). b- موقعیت رویشگاه منطقه چهارباغ (بهمنش و همکاران، ۱۳۸۷).

نمونه‌های مورد نیاز از نیمه دوم اسفندماه ۱۳۹۶ (۱۳۹۶/۱۲/۱۸) تا نیمه دوم اردیبهشت ۱۳۹۸ از مناطق مورد مطالعه پس از حدود ۱۲ سفر کاری و تیمی براساس طرح از پیش تعیین شده و با دقت کافی جمع‌آوری، پرس و بسته‌بندی شد؛ سپس به هرباریوم دانشگاه گنبد کاووس انتقال یافت. در این تحقیق، به‌صورت تصادفی سیستماتیک (زبیری، ۱۳۸۸)، نمونه‌برداری میدانی از رویشگاه‌های طبیعی انجام شد. در مجموع ۲۶ پلات با ابعاد ۲۰ متر در ۲۰ متر درون سه ترانسکت عمودی و یک ترانسکت افقی در هر دو منطقه گوی‌نیک جرگلان و چهارباغ گلستان، به‌طور یکسان، به‌کار گرفته شد، موقعیت جغرافیایی آن‌ها، با جی‌پی‌اس یادداشت و اطلاعات فیزیولوژیکی درختان، به‌وسیله، فریم ۰/۵ متر در ۰/۵ متر، در چهار جهت اصلی جغرافیایی (شمال، جنوب، شرق، غرب) پوشش تاج هر یک از دو گونه ارس در دو منطقه مورد مطالعه، اندازه‌گیری، ثبت و نمونه‌برداری از شاخه، برگ و مخروط‌های نر و ماده، انجام شد.

۲-۲-شناساگرها و چگونگی اندازه‌گیری pH نمونه‌ها

شناساگر (معرف) های معمولی ماده‌ای رنگی‌اند که غالبا رنگ آن‌ها در محیط‌های اسیدی، قلیایی یا خنثی دچار تغییر می‌شود (جانس و همکاران، ۱۹۹۸). در صورت مشخص بودن pH و میزان تغییررنگ شناساگر، با توجه به رنگ جدید ایجاد شده، می‌توان pHمحلول را مشخص کرد. معروف‌ترین آن‌ها، لیتموس (تورنسل) است که در محیط اسیدی، قرمز و در محیط بازی، آبی و در محیط خنثی، بنفش رنگ می‌باشد. (سابنیس، ۲۰۰۷). روش دقیق دیگر، استفاده از pH سنج دیجیتال است. این pH سنج با تقویت ولتاژ ناچیزی که در الکترود دستگاه درون محلول مورد نظر ایجاد می‌شود و نمایش نتیجه آن روی نمایشگر، مقدار pH

محلول را می‌سنجد. برای اندازه‌گیری قسمت‌های زایشی و رویشی دو گونه مورد مطالعه، یک گرم از قسمت گوشتی مخروط‌های ماده (بدون در نظر گرفتن بذرهای درون آن‌ها)، همچنین یک گرم از برگ های هر کدام از گونه‌های یاد شده بطور جداگانه در هاون کوبیده شد، سپس با ۱۰ سی‌سی آب مقطر مخلوط و پس از صاف کردن، با دستگاه pH سنج دیجیتالی مقدار pH آن‌ها اندازه گیری گردید (شکل ۳).



شکل ۳: اندازه‌گیری pH برگ و مخروط میوه ارس a- ساییدن و له کردن نمونه‌ها b- اندازه‌گیری پی اچ با دستگاه دیجیتالی

۲-۳-استفاده از دستگاه طیف‌سنج پلاسما یا ICP

دستگاه طیف سنج پلاسمای جفت القائی (ICP[458]) از تجهیزات پشیرفته آزمایشگاهی در تجزیه و آنالیز دهها مورد از عناصر سازنده نمونه‌های آزمایشگاهی، صنعتی یا معدنی محسوب می‌شود. دستگاه ICP در واقع نوعی دستگاه طیف‌سنجی است که با استفاده از القای الکترومغناطیسی (در دمای ۶ تا ۱۰۰۰۰ درجه کلوین) توانایی تبدیل نمونه به حالت پلاسما و آنالیز با دقت و حساسیت بالا در حد ppb[459] (واحد در میلیارد یا ۱×۱۰^{-۹}) را در آزمایشگاه تجزیه‌ای فراهم می‌آورد. از دستگاه ICP برای آنالیز عناصر فلزی به‌خصوص، فلزات سنگین و برخی نافلزات استفاده می‌شود. برای انجام این کار، حدود ۳۰ گرم از شاخه و برگ، هر یک از گونه‌های مورد آزمایش، از هر دو منطقه، انتخاب و با بسته‌بندی مناسب، به سازمان زمین‌شناسی ایران در تهران ارسال گردید.

۳.نتایج وبحث

۳-۱-اسیدیته برگ و مخروط میوه

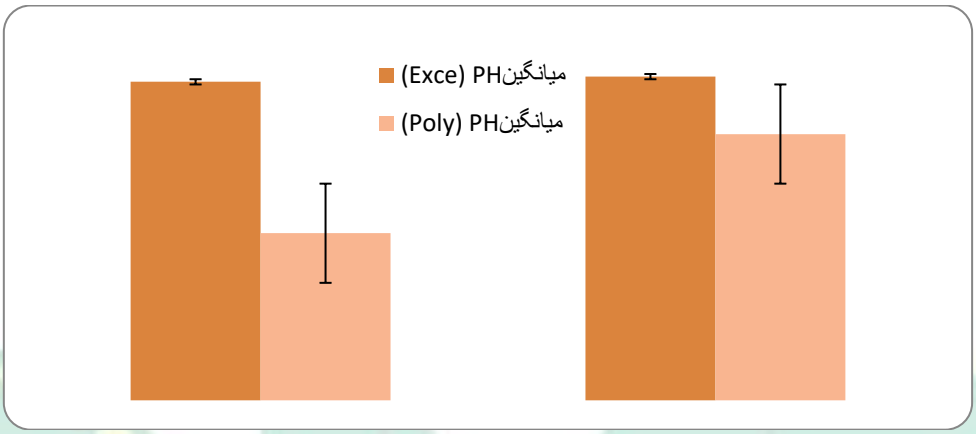
از مقایسه‌ی میزان اسیدیته برگ و مخروط میوه دو گونه *J. polycarpos* و *J. excelsa* با یکدیگر می‌توان پی برد که، درجه اسیدیته برگ دو گونه مورد مطالعه، هم در گوی‌نیک وهم در چهارباغ، اختلاف معناداری در سطح یک درصد با هم دارند. هر چند در منطقه گوی‌نیک، درجه اسیدی برگ و مخروط ماده *J. excelsa* نسبت به *J. polycarpos*، اندکی کمتر است ولی همین شاخص برگ در چهارباغ با اختلاف ناچیزی برعکس بوده، میزان اسیدیته برگ و مخروط ماده *J. excelsa* از گونه دیگر کمی بیشتر است. به همین ترتیب بررسی اسیدیته مخروط میوه نشان می‌دهد این دو گونه در مناطق مذکور با یکدیگر اختلاف معنی‌دار در حد یک درصد دارند. (جدول ۱).

جدول ۱: مقایسه pH برگ و مخروط در هر دو گونه‌ی گیاهی مورد مطالعه، در گوی‌نیک و چهارباغ

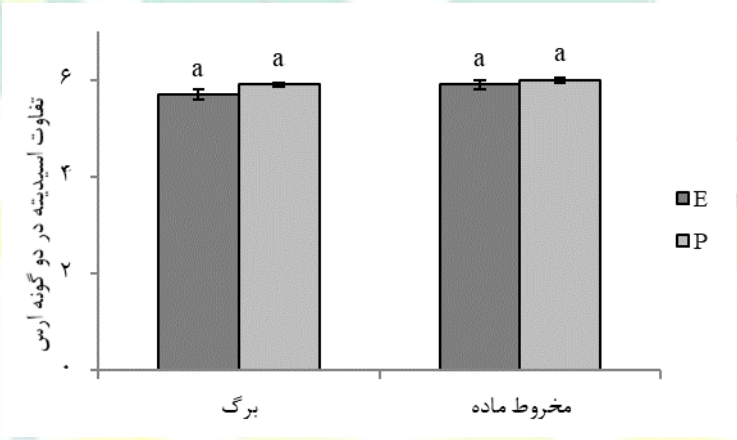
458 - Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometer
459 - Part Per Billion

نام منطقه / نام گونه	pH J.excelsa برگ	pH J.excelsa مخروط	pH J.polycarpos برگ	pH J.polycarpos مخروط
گوی‌نیک	۵/۶۱	۵/۶۳	۵/۳۲	۵/۳۵
چهارباغ	۵/۷۰	۵/۷۱	۶/۰۴	۶/۰۲
سطح معنی داری	۰/۰۰۰**	۰/۰۰۰**	۰/۰۰۳**	۰/۰۰۲**

*: معنی‌دار در سطح ۵ درصد **: معنی‌دار در سطح ۱ درصد ns عدم تفاوت معنی دار



شکل ۴: نمودار تفاوت اسیدیته برگ و مخروط میوه گونه *J. excelsa* و *J. polycarpos* در گوی‌نیک



شکل ۵: نمودار تفاوت اسیدیته برگ و مخروط میوه دو گونه *J. excelsa* و *J. Polycarpos* (حروف یکسان روی ستون‌ها نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار هستند) در چهارباغ. E مخفف گونه *excelsa* و P مخفف گونه *polycarpos*

۳-۲-نتایج ICP

تحلیل عناصر موجود در دو گونه، در جداول (جداول ۲ و ۳) حاکی از آن است که در منطقه گوی‌نیک، بیشترین تفاوت *J. excelsa*، با *J. polycarpos* به‌ترتیب در جذب عناصر کلسیم (Ca)، پتاسیم (K)، آهن (Fe)، سیلیسیم (Si)، منیزیم (Mg) و فسفر (P) می‌باشد که بیش از ۲۰۰ ppm در جذب آن‌ها اختلاف دارند ولی در منطقه چهارباغ، دو گونه‌ی مذکور، به ترتیب در داشتن عناصر پتاسیم، آلومینیوم، آهن، منیزیم و باریم با یکدیگر بیش از ۱۰۰ ppm تفاوت دارند؛ البته در هر دو منطقه، همه‌ی

این عناصر بجز باریم جزو ده عنصر فراوان در ساختار شاخه و برگ ارس می‌باشند. اما این دو گونه در داشتن سایر عناصر، که غالبا به مقدار ناچیز و کمتر از ppm ۱ جذب گیاه شده‌اند، تفاوت چندانی با هم ندارند.

جدول ۲: مقایسه عناصر موجود در دو گونه، در گوی‌نیک با آزمون تعیین عناصر به‌روش ICP-OES E: J. excelsa و P: J. polycarpos و G: Goynik

عناصر[460] موجود	*J. excelsa* (E_1G_1)	*J. polycarpos* (P_1G_1)
Ca (ppm)	12100	10500
K (ppm)	4070	4560
Na (ppm)	3900	4000
S (ppm)	1730	1630
Mg (ppm)	1400	1140
P (ppm)	714	505
Si (ppm)	653	382
Fe (ppm)	648	293
Al (ppm)	451	281
Sr (ppm)	128	75
Cu (ppm)	15	107
Ba (ppm)	32	57
Ni (ppm)	63	<1
Mn (ppm)	30	30
Ag (ppm)	5	49
Cr (ppm)	15	13
Se (ppm)	12	8
Zn (ppm)	9	9
Sn (ppm)	11	<1
Nb (ppm)	<1	8
Pb (ppm)	<1	5
Li (ppm)	<1	<1
Lu (ppm)	<1	<1
Be (ppm)	< 1	<1
Dy (ppm)	<1	<1
Mo (ppm)	<1	<1
As (ppm)	< 1	<1
La (ppm)	<1	<1
Cd (ppm)	< 1	<1
Bi (ppm)	<1	<1
Pr (ppm)	<1	<1
Rb (ppm)	<1	<1
Cs (ppm)	<1	<1
Sb (ppm)	<1	<1
Sc (ppm)	<1	<1
Gd (ppm)	<1	<1
Eu (ppm)	<1	<1
Sm (ppm)	<1	<1
Ce (ppm)	<1	<1
Co (ppm)	< 1	<1
Ta (ppm)	<1	<1
Tb (ppm)	<1	<1
Te (ppm)	<1	<1
Th (ppm)	<1	<1
Ti (ppm)	<1	<1

[460] - عناصر به ترتیب مقدار فراوانی جذب آن‌ها در گیاه مرتب شده‌اند و نه بر حسب حروف الفبا

Tl (ppm)	<1	<1
U (ppm)	<1	<1
V (ppm)	<1	<1
W (ppm)	<1	<1
Y (ppm)	<1	<1
Yb (ppm)	<1	<1
In (ppm)	<1	<1

جدول ۳- مقایسه عناصر موجود در دو گونه چهارباغ با آزمون تعیین عناصر به‌روش .ICP-OES

عناصر	*J. excelsa*	*J. polycarpos*
K (ppm)	5282	4801
P (ppm)	1198	1220
Mg (ppm)	814	912
Fe (ppm)	678	1029
Al (ppm)	270	661
Na (ppm)	120	151
Sr (ppm)	89	100
Ba (ppm)	91	12
Mn (ppm)	36	25
Rb (ppm)	20	22
Zn (ppm)	27	18
B (ppm)	17	13
Cr (ppm)	6	9
Pb (ppm)	10	1
Ca (ppm)	1	2
Ni (ppm)	1	2
Cu (ppm)	1	1
Cd (ppm)	< 1	1
As (ppm)	< 1	< 1
Mo (ppm)	< 1	< 1
Se (ppm)	< 1	< 1
Co (ppm)	< 1	< 1
Th (ppm)	< 1	< 1
U (ppm)	< 1	< 1
V (ppm)	< 1	< 1
Hg (ppm)	< 1	< 1

۴.نتیجه‌گیری

نتایج آماری، تعداد کل درختان شمارش شده در مجموع پلات‌ها در دو منطقه، حاکی از آن است که به‌طور کلی، تراکم در هکتار پایه‌های درخت ارس در منطقه گوی‌نیک جرگلان (۱۵۸ پایه در هکتار) به‌طور محسوسی، (۱۴٪) کمتر از تراکم در هکتار درختان ارس در منطقه چهارباغ گلستان (۱۸۳ پایه در هکتار) می‌باشد، اما در منطقه گوی‌نیک جرگلان، در بین پایه‌های بالغ از هر ۵ درخت، یک پایه آن، *J. excelsa* می‌باشد در حالی که در چهارباغ گلستان، از هر ۱۴ درخت فقط یک پایه را گونه *J. excelsa* تشکیل می‌دهد. (جدول ۱).

جدول ۱: درصد تراکم پایه در هکتار و درصد پراکنش دو گونه، در منطقه گوی‌نیک جرگلان و رویشگاه چهارباغ گلستان

نام منطقه / گونه	تعداد درخت در هکتار (پایه)	*J. excelsa*	*J. polycarpos*	گونه نامشخص
گوی‌نیک	۱۵۸	٪ ۱۴/۰۳	۴۸٪/۱۶	٪ ۳۷/۸۱
چهارباغ	۱۸۳	٪ ۵/۱۶	٪ ۶۷/۳۵	٪ ۲۷/۴۹

با توجه به داده‌های به‌دست آمده از مطالعات آزمایشگاهی و آنالیز عناصر خاک می‌توان نتیجه گرفت که در منطقه گوی‌نیک و چهارباغ میزان pH برگ و مخروط در هر دو گونه‌ی گیاهی J. polycarpos و J. excelsa در سطح معنی‌داری یک درصد با هم اختلاف دارند، از طرفی در منطقه گوی‌نیک pH برگ و مخروط ماده *J. excelsa* ، بیش‌تر از گونه دیگر است، در حالی که همین شاخص در منطقه چهارباغ برعکس می‌باشد. به نظر می‌رسد افزایش pH اندام‌های رویشی (برگ) و زایشی (مخروط ماده) می‌توانند به عنوان یکی از عوامل محیطی تاثیرگذار محیطی چون: خاک غنی از عناصر و مواد معدنی، pH بیشتر خاک به همراه سایر عوامل محیطی (اقلیم و دمای مناسب‌تر، ارتفاع کمتر و غیره) در زادآوری، تکثیر و استقرار طبیعی گونه‌های ارس،در رقابت با سایر رستنی‌های منطقه به ویژه گونه *J. excelsa* مورد توجه قرار گیرند.

سپاسگزاری

نگارندگان مقاله لازم می‌دانند تا از زحمات اساتید فرهیخته‌ی دانشکده‌ی علوم دانشگاه گنبد کاووس، کارشناسان محترم آزمایشگاه‌های دانشگاه، مردمان خونگرم گوینیک جرگلان استان خراسان شمالی، جهت همکاری‌های بسیار برای انجام تحقیق حاضر، کمال تشکر و قدردانی را به عمل آورند.

منابع

۱. بهمنش، ب. حشمتی، غ. باغانی، م. ۱۳۸۷. تعیین تنوع گونه‌ای گیاهان دارویی مراتع کوهستانی چهارباغ، استان گلستان، مجله علمی پژوهشی مرتع، سال دوم، شماره۲، ص ۱۵۰-۱۴۱.
۲. زبیری، محمود، ۱۳۸۸. آماربرداری در جنگل (اندازه‌گیری درخت و جنگل). انتشارات دانشگاه تهران. ص ۳۲۱.
۳. عمرعطا، تاج محمد، ۱۳۹۷. مطالعه بیوسیستماتیکی دو گونه ارس (*Juniperus excelsa & J. polycarpos*) استان گلستان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی دانشگاه گنبد کاووس. ص۶۲ – ۲.
٤. کروری، ع. ا. س. خوشنویس، م. متینی زاده، م. ۱۳۸۹. مطالعات جامع ارس در ایران، چاپ اول، انتشارات پونه، ص ۴۷۸.
۵. گروسی، ا. بهمنش، ب. محمداسمعیلی، م. عجم نوروزی، ر. ۱۳۹۵. بررسی برخی عوامل بوم‌شناختی مثر بر پراکنش مهمترین گیاهان دارویی در مرتع اولنگ استان گلستان. نشریه حفاظت زیست بوم گیاهان، دوره ۴و شماره۸
۶. محمدنژاد کیاسری، ش. م. صفایی، ش. ۱۳۸۹. ارزیابی تاثیر عملیات آبیاری بر میزان حفاظت و بهبود بذردهی (تولید بذر) درخت ارس یونانی (*Juniper excelsa* Bieb). (مطالعه موردی: مازندران، حوضه آبخیز پشت‌کوه). علوم و تکنولوژی کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۳ (۴۸): ص ۴۲۵ – ۴۱۵.

7. Azadbakht, B., and Norouzi, Gh., (2009). Geography of Iran Waters, National Geographical Organization, Ministry of Defense Press, Tehran, 302p.
8. Daneshvar, A., Tigabu, M., Karimidoost, A., Farhadi, M., and Oden P.C., (2014). Growth characteristics and reproductive output of dwarf mistletoeinfected *Juniperus polycarpos* in Iran. Journal of Forestry Research, 25(4): 827−834.
9. Daneshvar, A., Tigabu, M., Karimidoost, A., and Oden P.C., (2016). Flotation techniques to improve viability of Juniperus polycarpos seed lots. Journal of Forestry Research, DOI 10.1007/s11676-016-0306-2.
10. Gumus, S., Acar, H.H., and Toksoy, D., 2007. Functional forest road network planning by nsideration of environmental impact assessment for wood harvesting. Environ Moint Assess. DOI 10.1007/s10661-007-9912-y.
11. Janes, L.E., Löwendahl, A.C., and Kazlauskas, R.J., 1998. Quantitative screening of hydrolase libraries using pH indicators: identifying active and enantioselective hydrolases. Chemistry-A European Journal, 4(11), pp.2324-2331.
12. Sabnis, R.W. 2007. Handbook of acid-base indicators. CRC Press, pp.226-233.
13. www.Kew.org
14. www.powo.science.kew.org

Cold and freezing stress and resistance mechanisms in plants

Nasibe khandan[1], Hossein Arouiee[2*], Bhram Abedi[3], Atiyeh Oraee [4]

1-Masters student, Horticultural Science and Landscape, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

2-Associate professor, Department of Horticultural Science and Landscape, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

3-Assistant professor, Department of Horticultural Science and Landscape, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

4- Postdoctoral research, Department of Horticultural Science and Landscape, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

***** *aroiee@um.ac.ir*

Abstract

Plants need a particular temperature range for optimal growth, and getting out of this range is considered stress. Plants face a variety of stresses, including biological and abiotic stresses. Among different abiotic stresses, low-temperature stress alters various vital processes and morpho-physiological and biochemical properties of plants. Cold stress is one of the most significant non-biological stresses that lead to reduced crop growth and productivity. Numerous studies have been conducted during the years 1986 to 2021 on the mechanisms of cold resistance and various morphological and biochemical reactions of plants to cold stress and frost. Production and quality of crops and horticultural plants are often reduced by a wide range of abiotic stresses, including cold. The quality reduction in stressed plants is not 100% but depends on the genus, species, and variety of the plant, the length of time that the plant is exposed to stress, and also the severity of the temperature drop. The plant's immediate response to stress reduces activity. In this regard, plants with the mechanisms of tolerance, adaptation, and avoidance, increase their resistance to frost and cold stress. On the other hand, biochemical and morpho-physiological plants changes during the cold are obvious. Most research so far has shown that plant growth regulators also play a role in resistance to cold stress. Probably, they reduce cold damage and increase plant tolerance to cold by changing the activity of antioxidant enzymes, carbohydrates, proline content, hydrogen peroxide metabolism, etc., Also, the ability of different species to tolerate cold and frost is varied.

Keywords: Tolerance, cold acclimation, Osmotic changes, Low temperature

تنش سرما و یخ زدگی و مکانیسم های مقاومت در گیاهان

نسیبه خندان[۱]؛ حسین آروئی[۲*]؛ بهرام عابدی[۳]؛ عطیه اورعی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- دانشیار، گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استادیار، گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۴- محقق پسادکتری، گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

aroiee@um.ac.ir

چکیده

گیاهان برای رشد بهینه به محدوده دمایی خاصی احتیاج دارند و خارج شدن از این محدوده به عنوان یک تنش محسوب می‌شود. گیاهان با انواع مختلفی از تنش ها از جمله تنش‌های زیستی و غیرزیستی مواجه هستند. در میان تنش‌های غیرزیستی مختلف، تنش دمای پایین فرآیندهای مختلف حیاتی و خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان را تغییر می‌دهد. تنش سرما یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیر زیستی محسوب می‌شود که منتج به کاهش رشد و بهره‌وری محصول می‌گردد.

مطالعات زیادی در طی سال‌های ۱۹۸۶ تا ۲۰۲۱ در زمینه مکانیسم‌های مقاومت به سرما و عکس العمل‌های مختلف مرفولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان به تنش سرما و یخزدگی صورت گرفته است. تولید و کیفیت گیاهان زراعی و باغی با طیف وسیعی از تنش‌های غیرزیستی از جمله سرما در غالب اوقات کاهش می‌یابد.کاهش کیفیت در گیاهان تحت تنش، امری ۱۰۰ درصد نیست بلکه به جنس، گونه و واریته گیاهی، مدت زمانی که گیاه در معرض تنش قرار می گیرد و همچنین شدت افت درجه حرارت بستگی دارد. واکنش فوری گیاه به تنش سبب کاهش فعالیت می‌شود. در این راستا گیاهان با مکانیسم‌های تحمل، تطابق و اجتناب، مقاومت خود را در برابر تنش یخزدگی و سرما افزایش می‌دهند. از طرفی تغییرات بیوشیمیایی و مورفوفیزیولوژیکی گیاهان طی سرما امری بدیهی می‌باشد. طی تحقیقاتی که تاکنون انجام شده است مشخص شده که تنظیم کننده‌های رشد گیاهی نیز در مقاومت به تنش سرما نقش دارد و احتمالا از طریق تاثیر بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت، کربوهیدرات، پرولین، متابولیسم هیدروژن پر اکسید و ... زمینه کاهش خسارت سرما و افزایش تحمل گیاه به سرما را فراهم می‌آورد. همچنین توانایی گونه‌های مختلف در تحمل به سرما و یخزدگی متفاوت است.

کلمات کلیدی: تحمل، خوسرمایی، تغییرات اسمزی، دمای پایین

۱.مقدمه

گیاهان طی چرخه زندگی خود به صورت طبیعی و یا با دخالت انسان، در معرض تنش[۴۶۱] قرار می‌گیرند. برای مثال گیاهان مناطق گرمسیری و معتدله با دماهای پایین، گیاهان مناطق کوهستانی با بادهای سرد و خشک همراه با تشعشع ماورای بنفش و گیاهان مناطق کویری و خشک با کمبود آب مواجه می‌شوند. در اکثر تعریف‌ها تنش را شرایطی در نظر می‌گیرند که گیاه

[461] Stress

به‌طور قابل توجهی از حالت مطلوب برای رشد طبیعی خارج می‌شود. ویژگی تنش های محیطی به شدت، مدت، تعداد و ترکیب آن‌ها بستگی دارد. واکنش گیاه از نظر حساسیت یا مقاومت به تنش‌های محیطی، به اندام یا بافت مورد نظر، مرحله توسعه تنش و ژنوتیپ آن بستگی دارد. در نتیجه این پدیده، گیاهان حساس از بین می‌روند و گیاهان مقاوم قادر به زنده ماندن و ادامه رشد می‌باشند (جلیلی مرندی، ۱۳۸۹).

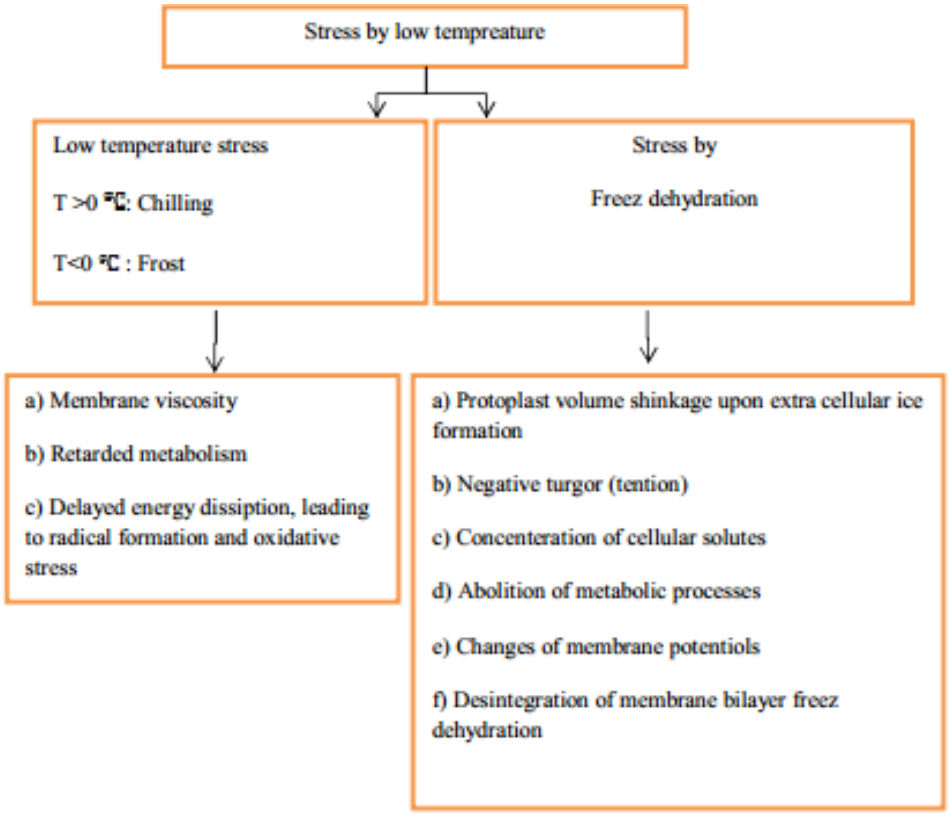
۱-۱-تنش سرما وانواع آن

تنش سرما به دو صورت تنش سرمازدگی و تنش یخزدگی اتفاق می‌افتد. تنش سرمازدگی[۴۶۲] در دماهای بالاتر از صفر درجه سانتی‌گراد و کمتر از صفر فیزیولوژیک به‌وجود می‌آید. به‌ویژه گیاهان مناطق گرمسیری، هنگام مواجه شدن با دماهای پایین در معرض سرمازدگی قرار می‌گیرند این نوع گیاهان در دمای ۱۰ الی ۱۵ درجه سانتی‌گراد دچار آسیب می‌شوند (جلیلی مرندی، ۱۳۸۹). زمانی که گیاهان در معرض دماهای پایین‌تر از صفر درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرند آب درون سلولی به کریستال‌های یخ تبدیل می‌شوند و این کریستال‌های یخ موجب آسیب به سلول، بافت های آبدار و سخت نشده [۴۶۳] و در نهایت به گیاه شده و تنش یخ زدگی[۴۶۴] اتفاق می‌افتد (عسیوند و عشوری، ۱۳۸۸). تنش یخ زدگی یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که در بسیاری از مناطق دنیا، از طریق صدمه به سلول‌ها و بافت‌های گیاهی رشد گیاهان را محدود می‌کند (پسکادور و همکاران، ۲۰۱۷). حساسیت به سرما یکی از عوامل اصلی در کاهش عملکرد محصولات است. زمانی که گیاهان در معرض دماهای یخ زدگی قرار می‌گیرند برای سازگاری خود با تنش و افزایش تحمل به سرما بسیاری از تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را در خود ایجاد می‌نمایند (حیدروند و امیری، ۲۰۱۰).

۱-۲-اثرات تنش سرما در گیاهان

هر ساله، محصولات کشاورزی در سرتاسر جهان، تحت تأثیر دمای پایین قرار می گیرند که در سال های اخیر به دلیل تغییرات آب و هوایی بیشتر دیده می‌شود. در ایالات متحده آمریکا، خسارات اقتصادی ناشی از خسارت یخبندان در کشاورزی بیش از سایر پدیده‌های مرتبط با آب و هوا وجود دارد (فائو،۲۰۲۱). در شیلی در سال ۲۰۱۳، یخبندان باعث کاهش ۲۲ درصدی میوه‌های صادراتی شد که نشان دهنده زیان بیش از ۸۰۰ میلیون دلار آمریکا بود (دومن و همکاران، ۲۰۱۴). به دلیل تغییرات آب و هوایی، رویدادهای شدید آب و هوایی مانند یخبندان در حال افزایش است. بنابراین، تنش سرما یک چالش مهم برای کشاورزی است (بگاتی و همکاران، ۲۰۱۸). مهم‌ترین نشانه‌های اثر سرما در بیشتر گیاهان، کاهش و یا توقف رشدگیاه، کاهش تولید ماده خشک و کلروزه شدن برگ‌های مسن و در نهایت مرگ گیاه می‌باشد (خیرخواه و همکاران،۲۰۱۵). تنش سرما باعث شکسته شدن زنجیره انتقال الکترون و تولید اکسیژن آزاد یا اکسیژن فعال مانند سوپراکسید و پراکسید هیدروژن می شود. مهم‌ترین اثر منفی استرس سرما این است که باعث آسیب شدید غشاء می‌شود. این آسیب تا حد زیادی به دلیل کم آبی حاد همراه با یخ زدگی در طول تنش سرما است (یاداو و کومار، ۲۰۱۰). در بسیاری از گیاهان که نسبت به دماهای پایین مقاوم هستند، تجمع قند در برگ‌ها رخ می‌دهد که نقش مثبتی را در مقابله با سرما دارد. همچنین دمای پایین باعث تغییر در ترکیبات پروتئینی، پرولین و کربوهیدرات‌ها می شود. استرس سرما باعث انقباض دیواره‌های سلولی و تخریب سیستم غشایی می‌شود. تیلاکوییدها در دمای انجماد مخدوش یا متورم می‌شوند (جلیلی مرندی، ۱۳۸۹).
دمای پایین به بسیاری از گیاهان گرمسیری و نیمه‌گرمسیری که به سرما حساس هستند خسارت وارد می‌کند. چند مدل از چگونگی اثر این تنش دهنده‌ها روی گیاه در در شکل۲-۱نمایش داده شده است (بک و همکاران، ۲۰۰۴).

[462] Chilling stress
[463] Nonhardy
[464] Freezing stress



شکل۲-۱:تاثیر تنش بر روی گیاه (بک و همکاران،۲۰۰۴)

۱-۳-مکانسیم های مقاومت در برابر تنش سرما

به طور کلی روشهای مقابله با سرما دو گروه "بهنژادی و به زراعی" هستند که برای بدست آوردن هریک از اینها روشهای مختلفی را بکار می برند. یک روش کاربردی جهت استفاده از مناطق دارای مشکل سرما انتخاب گیاهانی است که حساسیت کمتری به سرما دارند (برانکو و رویز، ۲۰۰۵).

درک مکانیسم تحمل به تنش سرما برای بهبود محصول مهم است. گیاهان برای مقابله و مقاومت در برابر خسارت رادیکال‌های آزاد اکسیژن از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مانند سوپر اکسید دیسموتاز،کاتالاز و پراکسیداز استفاده می کنند. اولین حس کننده حرارتی در سلول، درجه سیالیت لیپیدهای غشا است که وقتی سلول های گیاه در معرض سرما قرار می گیرد نظم مولکولی توده چربی های غشایی به هم می ریزد و این تغییر حالت می تواند ناشی از گونه های فعال اکسیژن باشد که باعث اکسید شدن غشا شده و در نتیجه نشت الکترون در شرایط تنش سرما اتفاق می افتد (جلیلی مرندی، ۱۳۸۹). گیاهان برای مقابله با تنش، از سه روش تطابق، تحمل و اجتناب استفاده می نمایند.

۱-۴- تطابق با تنش یخزدگی

اگر افزایش مقاومت، ناشی از قرار گرفتن گیاه در معرض تنش های اولیه[۴۶۵] باشد گفته می‌شود که گیاه به آن تطابق[۴۶۶] یافته و یا سخت شده[۴۶۷] است. تطابق عبارت است از خوپذیری فیزیولوژیکی یا ریخت‌شناسی گیاه برای جبران کاهش فعالیت‌های

[465] Prior stress
[466] Acclimated
[467] Hardened

ناشی از تنش (جلیلی مرندی،۱۳۸۹). فرآیند خوسرمایی[۴۶۸]در شرایط طول روز کوتاه و دمای پایین اتفاق می‌افتد که در طی آن تغییرات بیوشیمیایی و حتی مورفولوژیکی در گیاه ایجاد می‌شود. بسته به مدت خوسرمایی و دمای لازم جهت بروز آن، پاسخ‌های گیاهان متفاوت است (هافمن و همکاران، ۲۰۱۲). هرچند میزان تحمل به سرما و یخزدگی بستگی به عوامل مختلفی دارد، اما خوسرمایی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین علل افزایش مقاومت گیاهان به تنش سرما و دماهای یخزدگی گزارش گردیده است (دالمانس دوتیر و همکاران،۲۰۱۷). بر اساس تحقیقات متعدد، القای خوسرمایی باعث افزایش تحمل به یخزدگی در گیاهان می‌شود (شولز و همکاران،۲۰۱۶؛ هینچا و همکاران، ۲۰۱۸).

سازگاری به سرمای پاییزی نه تنها با قرار گرفتن در معرض دمای پایین، بلکه با ترکیبی از کاهش دما، کاهش دوره نوری و تغییر در کیفیت نور ایجاد می‌شود. این نشانه‌های محیطی شبکه‌ای از مسیرهای سیگنالی را کنترل می‌کنند که سازگاری به سرما و یخزدگی را در مخروطیان همیشه سبز هماهنگ می‌کند و منجر به توقف رشد، خواب جوانه‌ها، تحمل یخزدگی و تغییر در متابولیسم انرژی می‌شود (چانگ و همکاران،۲۰۲۱). دوره نوری به عنوان پیام اولیه، نقش مهمی را در شروع تطابق با سرما بر عهده دارد. قرارگیری در معرض دماهای پایین عامل اصلی مورد نیاز برای افزایش مقاومت به یخزدگی است. راهکارهایی که در تحمل به سرما شرکت دارند شامل جلوگیری از تغییر ماهیت غشاء، جلوگیری ازنشت مواد محلول و کاهش خسارت فیزیکی به غشاء در نتیجه تجمع کریستال‌های یخ در فضای بین سلولی می‌باشد (کافی و همکاران، ۲۰۰۹). طی فرآیند خوسرمایی، گیاهان در معرض دماهای ۲ تا ۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرند و مکانیسم‌های موثر در تحمل به یخزدگی، فعال می‌شوند (ژین و بروز، ۲۰۰۰). این مکانیسم‌ها با تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاهان از جمله تغییر در آنزیم‌ها، افزایش سطح آنتی اکسیدان‌ها و تجمع اسمولیت‌ها مانند قندهای محلول و پرولین همراه است که از طریق تغییر در بیان ژن‌ها در دمای پایین، موجب افزایش تحمل به یخزدگی می‌شوند (چن و موراتا، ۲۰۰۸).

۱-۵- اجتناب از یخزدگی

بسیاری از گیاهان، مقاومت در مقابل تنش را از راه اجتناب از تنش[۴۶۹] و یا تحمل تنش[۴۷۰] بدست می‌آورند. روش‌های اجتناب، بر خلاف وجود تنش در محیط اطراف گیاه ، از تاثیر تنش می‌کاهند. برای مثال برخی از گیاهان با تولید ریشه‌های عمیق که به سفره‌های آب می‌رسند در شرایط خشکی قادر به ادامه حیات می‌باشند و یا برخی دیگر مثل کاکتوس‌ها با تولید بافت‌های پارانشیم ذخیره آب در ساقه‌های گوشتی خود، آب را ذخیره نموده و در فصول خشک سال از آن استفاده می‌کنند (جلیلی مرندی،۱۳۸۹). در حالت اجتناب از تنش سرما بافت‌ها حالت فوق سرد شدن پیدا می‌کنند. در این حالت آب سلول در دمای بسیار پایین‌تر از نقطه انجماد به شکل مایع باقی می‌ملند و سلول‌ها برای حفظ خود، مولکول‌هایی با وزن پایین مانند: کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها (تثبیت غشاء سلولی)، پرولین (بازدارنده تشکیل هسته‌های یخ) و پلی ساکاریدها را در درون خود افزایش می‌دهند (سانگ و همکاران، ۲۰۰۳).

۱-۶- تحمل به یخزدگی

تحمل؛ توانایی یک گیاه در تحمل دماهای پایین بدون رخدادن صدمه یا خسارت است. در روش تحمل، گیاه باید با تنش به‌وجود آمده به تعادل ترمودینامیکی برسد (جلیلی مرندی،۱۳۸۹). یکی از رخدادهای مهم که در طول مکانیسم تحمل، درون گیاه رخ می‌دهد تولید انواع متفاوتی از نمک‌های آلی حل‌شونده است. این نمک‌ها ترکیباتی با وزن مولکولی پایین هستند که حتی در غلظت‌های بالای سلولی هم غیرسمی هستند. این ترکیبات نقش‌های متفاوتی را در گیاه بازی می‌کنند که به واسطه وظایفشان سبب تحمل به تنش در گیاهان می‌شوند (دس و همکاران،۱۹۸۱؛ کیمبال و سالیسبری،۱۹۷۳).

[468] Cold acclimation
[469] Stress avoidance
[470] Stress tolerance

۱-۷- ارزیابی تحمل به سرمای گیاهان در شرایط مزرعه و کنترل شده

تحمل گیاهان به تنش سرما و یخزدگی مورد توجه محققان زیادی می‌باشد و برخی از محققان شاخص بقاء زمستانه را برای ارزیابی میزان تحمل به سرما پیشنهاد کرده‌اند (اندرسون و گسیک، ۲۰۰۴). نحوه ارزیابی در این روش به‌صورت مقایسه توانایی بقاء گیاهان مورد آزمایش با کاشت آن‌ها در طبیعت، قرار گرفتن در معرض سرمای طبیعی و مقایسه با نمونه شاهد است. با وجود اینکه شاخص بقاء زمستانه آزمون مناسبی به نظر می‌رسد، اما به دلیل نوسان در شدت سرما در طول سال‌های آزمایش و در طی زمستان ممکن است بین ژنوتیپ‌های حساس و متحمل به سرما تفاوت بقاء مشاهده نشود و عواملی مانند پوشش برف و دوره های انجماد -ذوب، یکنواختی بررسی دقیق را امکان پذیر نمی‌سازد (گوستا و همکاران، ۱۹۸۲). در گیاه زینتی مینای چمنی[۴۷۱] کاهش دما سبب کاهش درصد بقاء شد در صورتی که درصد بقاء گیاهان تا دمای ۱۶- درجه سانتی‌گراد تحت تأثیر قرار نگرفت و بعد از آن به شدت کاهش یافت، به نحوی که در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد هیچ گیاهی زنده نماند (موسوی و همکاران، ۲۰۱۱).

محققین به دنبال روش‌هایی سریع و قابل تکرار می‌باشند. به دلیل اهمیت مقاومت به سرما آزمون انجماد کنترل شده و ارزیابی میزان صدمات ناشی از انجماد برای بررسی بقاء گیاهان به کار گرفته می‌شود، یکی از آزمون های محققین قرار دادن گیاهان در معرض کاهش تدریجی دما است. (اورعی و همکاران، ۲۰۲۱).

۱-۸- تنش سرما و تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاهان

از روش‌های سریع و قابل تکرار برای تخمین میزان خسارت، آزمون نشت الکترولیت است. خسارت اصلی دماهای زیر صفر، بدلیل تشکیل یخ درون سلولی می‌باشد (برانکو و همکاران، ۲۰۰۵). اولین مکان خسارت در اثر سرما، غشاء سلولی است و مختل شدن فعالیت غشاء به دلیل تغییر حالت غشاء از کریستال -مایع، بحالت جامد -ژل می‌باشد. به همین دلیل اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت‌ها از بافت‌های گیاهی، یک روش مناسب برای تخمین تراوایی غشاء و ارزیابی اثر تنش‌های محیطی بر ژنوتیپ‌های مختلف گیاهان شناخته شده و دمایی که باعث شود ۵۰ درصد نشت در سلول‌ها انجام شود به عنوان دمای ۵۰ درصد کشندگی (LT_{50el})[۴۷۲] پیشنهاد می‌گردد (نظامی و همکاران، ۲۰۱۴).

بر اساس پژوهش نظامی و همکاران (۲۰۱۴) در ۱۰ ژنوتیپ کلزا[۴۷۳] کاهش دما منجر به افزایش میزان نشت یون‌ها شد. میرعشقی و خلیل‌زاده (۱۳۸۱) در آزمایشی بر گیاه گندم[۴۷۴] ثابت کردند که ژنوتیپ‌های متحمل، دارای غشای سیتوپلاسمی پایدارتر و نشت یونی کمتری نسبت به ژنوتیپ‌های حساس هستند. نظامی و همکاران (۲۰۱۲) پس از اعمال تیمارهای دمایی (۰، ۳-، ۶-، ۹-، ۱۲- و ۱۵-) پایداری غشاء سیتوپلاسمی گیاهچه شش توده بومی گیاه زیره[475] را مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که با کاهش دمای تنش، درصد نشت یونی به طور معنی‌داری تغییر نشان داد، به طوری که بیشترین درصد نشت در دمای ۱۵- درجه سانتی‌گراد ۸۵/۴ درصد بود.

در طی سرما بافت‌ها و سلول‌های گیاهی دستخوش تغییراتی می‌شوند تا از گیاه در برابر تنش‌های محیطی محافظت نمایند. این سازگاری با تجمع ترکیبات محافظت کننده مانند کربوهیدرات‌ها، پرولین و آنتی اکسیدان‌ها و کاهش محتوای آب بافت‌ها همراه است، یا تغییراتی در سیالیت غشاء رخ می‌دهد (گای و همکاران، ۱۹۹۲). کربوهیدرات‌ها موادی هستند که از سلول در مقابل سرما محافظت می‌کنند. کربوهیدرات‌ها در افزایش پتانسیل اسمزی سلولی، جلوگیری از رشد کریستال‌های یخ درون سلولی و صدمات ناشی از یخزدگی نقش دارند (والورا و وندن اند، ۲۰۰۸). یکی از علل افزایش میزان قند بافت‌ها در طی سرما

---

[471]- *Bellis perennis L*
[472] - Lethal temperature resulting in 50 % mortality according to electrolyte leakage
[473] - *Brassica napus*
[474] - *Triticum aestivum L*
[475] - Cuminum cyminum L

تجزیه نشاسته می‌باشد، در تحقیقات مشخص شده که میزان نشاسته با کربوهیدرات‌های محلول همبستگی منفی دارد و بین کربوهیدارت‌ها و مقاومت به سرما همبستگی مثبتی وجود دارد. کربوهیدرات‌های محلول در آب از کربوهیدرات‌های غیرساختاری هستند که نقش مهمی در مقاومت به یخزدگی دارند (لی و همکاران، ۲۰۱۲). طی تحقیقاتی که تاکنون انجام شده است به نظر می‌رسد که تنظیم کننده های رشد گیاهی نیز در مقاومت به تنش سرما نیز نقش دارد و احتمالا از طریق تاثیر بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و متابولیسم هیدروژن پر اکسید، زمینه کاهش خسارت سرما و افزایش تحمل گیاه به سرما را فراهم می‌آورد (کشاورز و همکاران،۱۳۹۰).

پرولین از غیرفعال شدن غشاهای تیلاکوئید چلوگیری می‌کند و بعد از سازگاری با سرما، محتوای پرولین در گیاهان افزایش می‌یابد (کوک و همکاران، ۲۰۰۴). معصومی و همکاران (۲۰۱۳) با تحقیق بر روی تحمل به سرمای گیاه کلم زینتی[۴۷۶] پی بردند که بیشترین میزان پرولین به طور میانگین در دماهای ۵- و ۱۰- درجه سانتی‌گراد بدست آمد. هائو و همکاران (۲۰۱۲) واکنش‌های سالیسیلیک اسید در کوتیلیدون‌های خیار را براساس آنالیز پروتئومیکی مقایسه‌ای بررسی کردند. نتایج نشان داد که آنالیز ۱۵۰۰ پروتئین از هر ژل نشان‌دهنده بیان متفاوت ۶۳ پروتئین می‌باشد. پروتئین‌های شناسایی شده درگیر بسیاری از پاسخ‌های سلولی و پروسه‌های متابولیکی بودند که شامل فعل و انفعالات آنتی اکسیدانتی، پاسخ‌های دفاعی، فتوسنتز، متابولیسم کربوهیدرات‌ها، تنفس و هم‌ایستائی انرژی می‌باشد. ۲۳ درصد این پروتئین‌ها در فعل و انفعالات آنتی‌اکسیدانتی نقش داشته که باعث مقاومت به سرما شد و ۱۸. ۶ درصد آن‌ها در فتوسنتز موثر بودند.

۱-۹-تنش سرما و تغییرات مرفولوژیکی در گیاهان

در تنش‌های محیطی، تغییرات مورفولوژیکی مانند تغییر در ارتفاع، تعداد برگ، رنگ برگ، ضخامت برگ، چین و چروک برگ، تعداد گره، وزن خشک و ... در گیاهان رخ می‌دهد. ایزدی دربندی و همکاران (۱۳۹۰) در بررسی تحمل به یخزدگی گیاه زینتی قرنفل[۴۷۷] نشان دادند که با افزایش شدت سرما تعداد گره، برگ، تعداد شاخه و ارتفاع گیاه کاهش یافت. به طوری که تعداد شاخه در گیاهان تحت تنش در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد معادل ۵۰ درصد گیاهان تحت تنش در دمای صفر درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در تحقیق راشد محصل و همکاران (۲۰۰۹) مشخص شد که افزایش شدت یخزدگی پس از تیمار دمایی ۳- درجه سانتی‌گراد باعث کاهش ارتفاع در رازیانه شد. اورعی و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که تنش یخ زدگی تعداد گره، ارتفاع و وزن خشک گیاهان بنفشه را کاهش داد.

منابع

۱- ایزدی دربندی، الف.، یوسف ثانی، م.، نظامی، الف.،جواد موسوی، م.، کیخا. و نظامی، س. ۱۳۹۰. اثر تنش یخ زدگی بر گیاه قرنفل (*Dianthus barbatus*) در شرایط کنترل شده. مجله تنش‌های محیطی در علوم زراعی، ۴ (۲): ۱۱۷ تا ۱۲۵.
۲- جلیلی مرندی، ر. ۱۳۸۹. فیزیولوژی تنش‌های محیطی و مکانیسم‌های مقاومت در گیاهان باغی. جلد اول. چاپ اول، انتشارات جهاد دانشگاهی واحد ارومیه ، ۶۳۶ ص.
۳- جلیلی مرندی، ر. ۱۳۸۹. فیزیولوژی تنش‌های محیطی و مکانیسم‌های مقاومت در گیاهان باغی. جلد دوم. چاپ اول، انتشارات جهاد دانشگاهی واحد ارومیه ، ۱۲۸۵ ص.
۴- عسیوند ح. عشوری، پ . ۱۳۸۸. فیزیولوژی تنش (ترجمه). دانشگاه لرستان. ۲۸۸ ص.

476 - *Brassica oleraceae*
477 - *Dianathus barbatus*

۵- کشاورز ح. , مدرس ثانوی, س. م. , زرین کمر, ف. , دولت آبادیان, آ. , پناهی, م. , و اسیلان, ک. س. ۱۳۹۰. بررسی اثر محلول پاشی سالیسیلیک اسید بر برخی خصوصیات بیوشیمیایی دو رقم کلزا تحت شرایط تنش سرما. مجله علوم گیاهان زراعی ایران, ۷۲۳

۶- میرعشقی الف.، خلیل زاده، الف.غ. ۱۳۸۱. ارزیابی برخی از صفات فیزیولوژیک مرتبط با مقاومت سرما در ۲۲ ژنوتیپ گندم نان. سومین همایش کاهش ضایعات ناشی از سرما و یخزدگی گیاهان زراعی و باغی کشور. معاونت زراعت سازمان حفظ نباتات. ۶۱ ص.

7-Anderson, N.O., and Gesick, E. 2004. Phenotypic markers for selection of winter hardy garden chrysanthemums (*Dendranthema grandiflora Tzvelv*). *Scientia Horticulturae, 101 (2)*, 153–167.

8- Bagati, S.; Mahajan, R.; Nazir, M.; Dar, A.A.; Zargar, S.M. "Omics" .2018. A gateway towards abiotic stress tolerance. In Abiotic Stress-mediated Sensing and Signaling in Plants: An Omics Perspective; Zargar, S., Zargar, M., Eds.; Springer: Singapore; pp. 1–45.

9-Barlow, K.M.; Christy, B.P.; O'Leary, G.L.; Riffkin, P.A.; Nuttall, J.G. 2015. Simulating the impact of extreme heat and frost events on wheat crop production: A review. Field Crops Res, 171, 109–119. [CrossRef].

10-Barranco, D., Ruiz, N., Gomez del Campo, M. 2005. Frost tolerance of eight olive cultivars. *HortScience, 40* (3), 558-560.

11- Beck, E. H.; Heim, R.; Hansen, J.٢٠٠٤ .Plant resistanse to cold stress: Mechanism and environ mental signals triggering frost hardening and dehardening. J. Bio Sci, ٢٩, ٤٤٩.

12-Chang, C. Y. Y., Bräutigam, K., Hüner, N. P., & Ensminger, I. 2021. Champions of winter survival: cold acclimation and molecular regulation of cold hardiness in evergreen conifers. *New Phytologist*, *229*(2), 675-691.

13-Chen, T.H.H., and Murata, N. 2008. Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends in Plant Science, 13 (9)*, 499–505.

14-Cook, D., Fowler, S., Fiehn, O., and Thomashow, M.F. 2004. A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of Arabidopsis. *Proceeding of the National Academey of Sciences of the United Stataes of American, 101 (42),* 15243-15248.

15-Dalmannsdottir, S., Jørgensen, M., Rapacz, M., Østrem, L., Larsen, A., Rødven, R., and Rognli, O.A. 2017. Cold acclimation in warmer extended autumns impairs freezing tolerance of perennial ryegrass (Lolium perenne) and timothy (Phleum pratense). Physiologia Plantarum 160 (3): 266-281.

16- Dathe, W.; Ronsch, H.; Preiss, A.; Schade, W.; Sembdner, G.; Schreiber, K.١٩٨١ ; Endogenous plant hormones of the broad bean, Vicia faba L. Jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. Planta, 153, 530.

17-Duman, J.G. 2014. Wisniewski, M. The use of antifreeze proteins for frost protection in sensitive crop plants. Environ. Exp. Bot. 106, 60–69. [CrossRef].

18-FAO. 2005. Frost Protection: Fundamentals, Practice and Economics; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, Available online: http://www.fao.org/3/y7223e/y7223e00.htm (accessed on 3 February 2021).

19-Gusta, L.V., Fowler, D. B., and Tyler, N. J. 1982. Factors influencing hardening and survival in winter wheat. Li, P.H. and Sakai, A. (Ed.) In: Plant Cold Hardiness and Freezing Stress. Mechanisms and Crop Implications. Academic Press, London.

20-Guy, C., Haskell, D., Neven, L., Klein, P., and Smelser, C. 1992. Hydration-state responsive proteins link cold and drought stress in spinach. *Planta. 188 (2)*, 265-270.

21-Hao, J. H. , Dong, C. J. , Zhang, Z. G. , Wang, X. L. , & Shang, Q. M. 2012. Insights into salicylic acid responses in cucumber (Cucumis sativus L.) cotyledons based on a comparative proteomic analysis. Elsevier, 69.

22-Heidarvand, L., and Maali Amiri, R. M. 2010. What happens in plant molecular responses to cold stress? Acta Physiologiae Plantarum 32 (3): 419-431.

23-Hincha, D. K., Schaarschmidt, S., Fischer, A., Erban, A., Pagter, M., Mubeen, U., Walther, D., Giavalisco, P., Kopka, J., Sprenger, H., and Zuther, E. 2018.Cold acclimation, deacclimation and memory in Arabidopsis. pp. 228. In: Plant biology abstracts of the Society of Experimental Botany, Florence 2018.

24-Kafi, M., Borzoee, A., Salehi, M., Kamandi, A., Masoumi, A., and Nabati, J. 2009. Physiology of Environmental Stresses in Plants. Jihad-e Daneshgahi of Mashhad, Mashhad, Iran. (In Persian).

25-Kheirkhah,T., Nezami, A., Kafi, M., and Asadi, G.A.2015. Evaluation of cold tolerance in field grown mentha (Mentha piperita L). rednu yroburobul sbeddodbec . Iranian Journal of Field Crops Research 13(2): 269 -277. (In Persian with English Summary).

26- Kimbal, S. L.; Salisbury, F. B.۱۹۷۳; Ultrastractural changes of plant exposed to low temperature. Americal Jornal of Botany, 60, 1028.

27-Lee, J.H., Yu, D.J., Kim, S.J., Choi., D. and Lee, H.J. 2012. Intraspecies differences in cold hardiness, carbohydrate content and β-amylase gene expression of *Vaccinium corymbosum* during cold acclimation and deacclimation. *Tree Physiology, 32 (12), 1533-1540.*

28-Liu, W., Yu, K., He, T., Li, F., Zhang, D., and Liu, J. 2013.The low temperature induced physiological responses of Avena nudaL., a cold-tolerant plant species. The Scientific World Journal: 1-7.

29-Masoumi, K., asgharzadeh,A., Ganji Moghadam, E., Reyhani, M., and keshmiri, F.S. 2013. Evaluation of freezing tolerance of *Brassica oleraceae* purple rosetteand *Brassica oleraceae* white rosetteunder controlled conditions. *Advance in Agriculture and Biology, 1*(4), 84-88.

30-Mousavi J.M., Nezami S., Izadi E., Nezami A., Yousef Sani M., Keykha Akhar F. 2011. Evaluation of freezing tolerance of English daisy (Bellis perennis) under controlled conditions. J. Water and Soil 25: 380-388. (In Persian with English abstract).

31-Nezami A., Javad Mousavi M., Nezami S., Izadi Darbandi E., Yousef Sani M., and Keykha Akhar F.2014. Study on freezing tolerance of calendula (Calendula officinalis L.) in vegetative and reproductive stages. Journal of Horticultural Science 28: 378-369. (In Persian with English abstract).

32-Oraee, A., Tehranifar, A., Nezami, A., & Shoor, M.2018. Effects of drought stress on cold hardiness of non-acclimated viola (Viola× wittrockiana 'Iona Gold with Blotch') in controlled conditions. Scientia Horticulturae, 238, 98-106.

33-Oraee, A., Tehranifar, A., Nezami, A., & Shoor, M.2020. The effects of three levels of irrigation water on the improvement of cold tolerance of acclimated viola. Acta Physiologiae Plantarum, 42(7), 1-10.

34-Pescador, D. S., Sánchez, A. M., Luzuriaga, A. L., Sierra-Almeida, A., and Escudero, A.2017.Winter is coming: plant freezing resistance as a key functional trait for the assembly of annual Mediterranean communities. Annals of Botany 121 (2): 335-344.

35-Rahman, A. 2013. Auxin: a regulator of cold stress response. *Physiologia plantarum*, *147*(1), 28-35.

36-Rashed Mohassel M.H., Nezami A., Bagheri A.R., Hajmohammadnia K., and Bannayan M.2009. Evaluation of freezing tolerance of two fennel (Foeniculum vulgar L.) ecotypes under controlled conditions. Journal of Herbs Species and Medicinal Plants 15: 131–140.

37-Saleem, M., Fariduddin, Q., & Janda, T.2021. Multifaceted role of salicylic acid in combating cold stress in plants: a review. *Journal of Plant Growth Regulation*, *40*, 464-485.

38-Schulz, E., Tohge, T., Zuther, E., Fernie, A. R., and Hincha, D. K. 2016.Flavonoids are determinants of freezing tolerance and cold acclimation in Arabidopsis thaliana. Scientific Reports 6: 34027.

39-Sung, D.Y., Kaplan, F., Lee, K.J., and Guy, C.L.2003. Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends in Plant Science, 8 (4)*, 179–187.

40-Valluru, R., and Van den Ende, W. 2008. Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *Journal of Experimental Botany*, *59* (11), 2905-2916.

41-Vega-Celedón, P., Bravo, G., Velásquez, A., Cid, F. P., Valenzuela, M., Ramírez, I., & Seeger, M. 2021. Microbial diversity of psychrotolerant bacteria isolated from wild flora of andes mountains and patagonia of chile towards the selection of plant growth-promoting bacterial consortia to alleviate cold stress in plants. *Microorganisms*, *9*(3), 538.

42-Wang, H.; Wang, H.; Shao, H.; Tang, X. 2016. Recent advances in utilizing transcription factors to improve plant abiotic stress tolerance by transgenic technology. Front. Plant Sci, 7, 1–13. [CrossRef].

43- Yadav, S. K. 2010. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agronomy for sustainable development*, *30*(3), 515-527.

Resistance Mechanisms in Plants

Hossein Moradi

Higher Education Complex of Saravan

Hossmor@gmail.com

Abstract

During its life cycle, the plant is exposed to a community of different pathogens. Surprisingly, these plants, although they may be more or less damaged, have survived numerous attacks and usually continue to grow well. One of the most important methods of plant disease management is production and application of cultivars resistant to plant diseases. These cultivars act in such a way that they escape from pollution or resist pollution or show less reaction and tolerate it. Induction resistance is an alternative potential or complementary strategy to intrinsic resistance, and resistance based on the R gene helps to protect plants against stress; Therefore, disease resistance strategy is one of the important principles of desirable and modern agriculture. As a result, different mechanisms are involved in inducing induction resistance when pathogenic or non-pathogenic agents collide with plants. This study have been investigated the mechanisms of inductive resistance.

Keywords: Plant, Systematic acquired resistance, Induced systemic resistance

مکانیسم های مقاومت در گیاهان

حسین مرادی

مجتمع آموزش عالی سراوان

ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: (Hossmor@gmail.com)

چکیده

گیاه در طول دوره‌ی زندگی خود با اجتماعی از بیمارگرهای مختلف مواجه می‌گردد. ولی شگفت آور است که این گیاهان اگرچه ممکن است که به میزان کم یا زیادی صدمه ببینند ولی از حملات متعددی جان به در برده و معمولاً به رشد مطلوب خود ادامه می‌دهند. تولید و بکارگیری ارقام مقاوم به بیماری های گیاهی یکی از مهمترین روش های مدیریت بیماری های گیاهی می باشد. این ارقام به گونه ای عمل نموده که از آلودگی فرار نموده و یا در مقابل آلودگی مقاومت کرده و یا عکس العمل کمتری بروز داده و آنرا تحمل نماید. مقاومت القایی به عنوان یک پتانسیل جایگزین یا استراتژی تکمیلی در کنار مقاومت ذاتی است و مقاومت براساس ژن R سبب حمایت از گیاهان در برابر تنش‌ها می‌گردد ؛ بنابراین استراتژی مقاومت به بیماری یکی از اصول مهم کشاورزی مطلوب و مدرن می‌باشد. در نتیجه در زمان برخورد عوامل بیمارگر یا غیربیمارگر با گیاهان، مکانیسم‌های مختلفی در ایجاد مقاومت القایی دخالت دارند. این مطالعه به بررسی مکانیسم های مقاومت القایی پرداخته است.

واژگان کلیدی: گیاه، مقاومت اکتسابی سراسری، مقاومت سیستمیک القایی

۱.مقدمه

تولید و بکارگیری ارقام مقاوم به بیماری های گیاهی یکی از مهمترین روش های مدیریت بیماری های گیاهی می باشد. این ارقام به گونه ای عمل نموده که از آلودگی فرار[۴۷۸] نموده و یا در مقابل آلودگی مقاومت کرده[۴۷۹] و یا عکس العمل کمتری بروز داده و آنرا تحمل[۴۸۰] نماید. کشاورزان در گذشته سعی می کردند بذور گیاهی را که سالم و قوی به نظر می رسند جهت کشت بعدی ذخیره و نگهداری کنند. بدین ترتیب می توان در نظر گرفت که انسان بذوری را که به صورت طبیعی دارای مقاومت بوده اند انتخاب نموده است. مقاومت به بیماریها و آفات یک پدیده طبیعی است که در گیاهان اتفاق می افتد. تکامل محصولات گیاهی امروزی ازاجدادوحشی آنها به آهستگی و در طی دوره های خیلی طولانی در یک یا چند منطقه ژنی اتفاق افتاده و بدین وسیله گیاهان زیادی تولید شده که از نظر ژنتیکی متنوع می باشند. طی تکامل گیاهان فشار عوامل بیماری زا سبب تحریک ژنهای مقاومت شده است. بر این اساس میزبان و بیمارگر هردو برای مدت طولانی در مراکز اصلی خود تحت فاکتورهای انتخابی

[478] Escape
[479] Resistance
[480] Tolerance

تکامل با هم همراه بوده، و تحت تغییرات ژنتیکی بوده اند. گیاه نتاجی را تولید می کرده که قدرت مبارزه با یک نژاد یا نژادهای بیمارگر را داشته باشد و در مقابل بیمارگر نژادها، سویه ها و بیوتیپ هایی را توسعه می داد. که سعی در شکستن این مقاومت در میزبان را داشته اند. این جریان منجر به تولید ارقام خیلی مقاوم از میزبان به خصوص میزبان های وحشی در منطقه مبدا میزبان شده است. به عنوان مثال در محل مبدا سیب زمینی که نواحی مرتفع و مرکزی آمریکای جنوبی می باشد قارچ عامل بادزدگی نیز وجود داشته و خسارت روی میزبان های وحشی(نواحی مکزیکو و گواتمالا) ایجاد نمی کند. منشاء نخود آسیای صغیر بوده که اغلب واریته ها در مقابل بلایت آسکوکتیایی مقاومند (Singh, 2001).

مکانیسم های مقاومت القایی

گیاه در طول دوره‌ی زندگی خود با اجتماعی از بیمارگرهای مختلف مواجه می‌گردد. ولی شگفت آور است که این گیاهان اگرچه ممکن است که به میزان کم یا زیادی صدمه ببینند ولی از حملات متعددی جان به در برده و معمولاً به رشد مطلوب خود ادامه می‌دهند. و این پدیده می‌تواند به دلیل القای مقاومت در گیاهان در زمان مواجه با بیمارگر باشد (Agrios, 2005). مکانیسم مقاومت القایی توسط برخی میکرارگانیسم‌ها، مواد شیمیایی طبیعی و یا مصنوعی و یا با ایجاد زخم در گیاه تحریک و فعال می‌گردد و میزان مقاومت گیاهان را علیه عوامل بیماری‌زا افزایش می‌دهد (Sticher *et al*., 1997). مقاومت القایی به عنوان یک پتانسیل جایگزین یا استراتژی تکمیلی در کنار مقاومت ذاتی است و مقاومت براساس ژن R سبب حمایت از گیاهان در برابر تنش‌ها می‌گردد ؛ بنابراین استراتژی مقاومت به بیماری یکی از اصول مهم کشاورزی مطلوب و مدرن می‌باشد. در نتیجه در زمان برخورد عوامل بیمارگر یا غیربیمارگر با گیاهان، مکانیسم‌های مختلفی در ایجاد مقاومت القایی دخالت دارند. از میان آن‌ها دو مکانیسم اصلی در این رابطه شناسایی شده‌اند (Vidhyasekaran, 2002). مقاومت اکتسابی سرتاسری و مقاومت سیستمیک القایی مکانیسم های دفاعی گیاه هستند که به دنبال تحریک گیاه با پاتوژن یا عوامل القایی دیگر، در گیاه القا می شوند.

مقاومت اکتسابی سراسری[۴۸۱]

مقاومت اکتسابی سراسری یکی از مکانیسم های دفاعی گیاه است که پاسخ دفاعی وسیع الطیف در گیاه را فعال می کند. این پاسخ دفاعی به صورت موضعی در محلی که مورد حمله پاتوژن قرار گرفته است و همچنین به صورت سیستمیک در بخش های دورتر غیر آلوده گیاهی که مورد حمله پاتوژن قرار گرفته است القا می شود. پدیده SAR توسط راس در توتون آلوده به ویروس موزاییک توتون *Tobacco mosaic virus*(TMV) کشف شد. راس در سال۱۹۶۱ فهمید که آلودگی TMV در گیاهی که قبلاً آلوده شده بود، کاهش می‌یابد. این مقاومت نه تنها در برابر TMV، بلکه باعث مقاومت در مقابل ویروس نکروز توتون و پاتوژن‌های باکتریای نیز بود. او نام این مکانیسم را SAR نامید (Ross, 1961). سالیسیلیک اسید باعث فعال شدن مسیر SAR می‌شود و در القای ژن‌های دفاعی نقش بسیار مهمی دارد. سالیسیلیک اسید یک ترکیب فنلی در مسیر انتقال سیگنال سیستمیک است که در سال ۱۹۷۹ کشف شد که می‌تواند باعث القای مقاومت به بیمارگرهای مختلف شود (White, 1979). این مکانیسم می تواند باعث مقاومت علیه بسیاری از عوامل بیماریزا (قارچ، باکتری و ویروس) شود. این مقاومت همراه با تغییرات بیوشیمیایی و

[481] Systematic acquired resistance

سیتولوژیکی در سلول است و سیگنالی را تولید می کند که به بخش های دیگر گیاه منتقل می شود. شناسایی پاتوژن غالبا سبب واکنش موضعی می شود که به عنوان پاسخ فوق حساسیت(HR) شناخته شده، و توسط مرگ سلولی سریع در مکان آلودگی مشخص می شود. تشخیص پاتوژن و متعاقب آن HR منجر به القای SAR در گیاهان می شود. ویژگی مهم SAR این است که باعث مقاومت در مقابل پاتوژن هایی می شود که می توانند بسیار متفاوت از عامل آلودگی اولیه باشند. اگرچه گیاهان ایمنوگلوبولین ها را ندارند، پدیده عمومی SAR را می‌توان با ایمنی در جانوران و انسان مقایسه کرد.مکانیسم SAR کاملا وابسته به مولکول سیگنال سالیسیک اسید است. مقاومت اعطا شده توسط SAR، دراز مدت، گاهی برای کل زندگی گیاه باقی می ماند، و موثر علیه پاتوژن های ویروسی، باکتریایی و قارچی است.مکانیسم SAR همچنین می تواند توسطاسید سالیسیلیک و آنالوگهایش مثل ۲و۶ دی کلرو ایزونیکوتینیک اسید (DCINA) و بنزولار- s- متیل [بنزو (۱و۲و۳) تیادیازول-۷-کربوتیوئیک اسید s –متیل استر(BTH)] القا شود، که ممکن است اثرات مشابه در مقاومت به بیماری در برابر پاتوژن های مختلف داشته باشند. این القاکننده ها بیان ژن های دفاعی را توسط *NPR1* (به عنوان واسطه در القای SAR) ، فعال می کنند(Babaeizad *et al*., 2009). لوتی (۲۰۱۵) نشان داد که چگونه سالیسیلیک اسید ترانویسی سیگنالهای اسید جاسمونیک را کنترل می‌کند. تنظیم ترانویسی یک فرایند مرکزی در ایمنی گیاهی است. القاء یا سرکوب ژنهای دفاعی با شبکه‌های سیگنالیک توسط هورمون‌های گیاهی هدایت می‌شوند کهاسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک نقش مهمی ایفا می‌کنند. ارتباط متقابل گسترده بین مسیرهای سیگنالیک هورمون اجازه می‌دهد تا تنظیم برنامه‌های رونویسی، تعیین مقاومت در برابر مهاجمین و ایجاد اختلافات با توسعه گیاهان صورت گیرد. سالیسیلیک اسید می‌تواند بر فعالیت و یا محلی سازی تنظیم کننده‌های رونویسی با تغییرات پس از ترجمه از عوامل رونویسی و تنظیم کننده‌های مشترک تاثیر بگذارد. تغییرات ردکس ناشی ازاسید سالیسیلیک به وسیله‌ی تریوریدوکسین‌ها و گلوتارانوسوین باعث تغیر رژیم‌های رونویسی می‌شود. که در سرکوب ژنهای وابسته به اسید جاسمونیک وابسته هستند. مانند عوامل *NPR1* و TGA (فاکتور رونویسی) که با اتصال به DNA تاثیر می‌گذارند. علاوه بر این اسید سالیسیلیک می‌تواند جداسازی فاکتورهای رونویسی واکنش اسید جاسمونیک نسبت به ژنهای هدف خود را از طریق متوقف کردن آنها در سیتوزول یا در مجتمع‌های پروتئین‌های سرکوبگر در هسته انجام دهد.اسید سالیسیلیک می‌تواند تنظیم کننده‌ی منفی ایجاد کند به طوری که عوامل رونویسی *WRKY* به طور مستقیم یا غیر مستقیم می‌تواند بیان ژن واکنش اسید جاسمونیک را مهار کند در نهایت در سطح DNA با اتصال به عوامل وابستهاسید سالیسیلیک می‌تواند منجر به سرکوب ژنهای واکنش اسید جاسمونیک شود(Loti, 2015). دو روش برای تولید سالیسلیک اسید در گیاهان پیشنهاد شده است: ۱. فنیل آلانین توسط فنیل آلانین آمونیالیاز تبدیل به سینامات می‌شود و سپس به دو روش تولید سالیسیلیک اسید می‌کند. با سرکوب ژن فنیل آلانین آمونیالیاز در تنباکو یا ممانعت از بیان این ژن از طریق شیمیایی در خیار و سیب‌زمینی میزان تجمع سالیسیلیک اسید کاهش پیدا کرده است (Ribnicky *et al*,. 1998 ؛ Yalpani *et al*,. 1993). ۲. مقدار زیادی از اسید سالیسیلیک از isochorismate تولید می‌شود. در آرابیدوپسیس دو ژن PBS3 و EPS1 شناسایی شده است که در انباشتن سالیسیلیک اسید در اثر تحریک بیمارگر اهمیت دارد (Chen *et al*,. 2009). مرادی و همکاران اثر مثبت سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید را در القا بیان ژن های ژن های *PAL*، PR1، PR2، PR5 و POX نشان دادند (Moradi *et al*., 2021). ژن های القا شده همراه SAR شامل PR1، 1,3-βگلوکوناز(*PR2*)، کیتیناز(*PR3*)، پروتئین شبه توماتین(*PR5*) و پراکسیداز می باشند. زمان مورد نیاز برای ایجاد SAR به گیاه و نوع ارگانیسم القا کننده بستگی دارد. میزان حفاظت نیز به ارگانیسم مورد استفاده برای آلودگی اولیه

و به ویژه اندازه نکروز تولید شده بستگی دارد. این مکانیسم هم در تک لپه‌ای‌ها و هم دو لپه‌ای ها القا می‌شود (Sticher *et al.*, 1997). شروع SAR اغلب به بیان پروتئین های مرتبط با بیماری‌زایی بستگی دارد.

مقاومت سیستمیک القایی[۴۸۲]

مقاومت سیستمیک القایی نوعی مقاومت است که در اثر سودوموناس، رایزوباکترهای غیر بیماری زا بر روی ریشه گیاه و نیز عوامل همزیست گیاهان القا می شود و حفاظت سیستمیکی علیه قارچ ها، باکتری ها و ویروس ها ایجاد می کند(Van Loon et al., 2006). در اکثر موارد پدیده ISR مستقل از تولید و تجمع سالیسیلیک اسید و PR پروتئین ها می باشد و نیازمند پاسخ های دفاعی وابسته به جاسمونیک اسید و اتیلن است(Pieterse et al,. 1998). در گیاهان به طور طبیعی سیگنال‌های متیل جاسمونات و جاسمونیک اسید یافت می‌شوند. این سیگنال‌ها از فنولیک اسید مشتق می‌شوند و بسیاری از ژن‌های دفاعی گیاه را از مسیر مقاومت القایی سیستمیک فعال می‌کنند. از ژن‌هایی که توسط این مولکول‌ها القاء می‌شود می‌توان به ژن‌های تولید کننده فنیل آلانین آمونیالیاز، فیتوآلکسین‌ها و .... اشاره کرد. همچنین انتقال دهنده پیام ثانویه در مسیر مقاومت اکتسابی سیستمیک می‌باشند (Sticher et al,. 1997). مولکول‌های سیگنال از نظر فعال کردن ژن‌های دفاعی مختلف، متفاوت‌اند. در بعضی از مواقع مجموعه‌ای از مولکول‌های سیگنال برای فعال کردن یک ژن دفاعی مورد نیاز است. به دلیل اینکه فعالیت حداکثر پروتئین‌های دفاعی نیازمند چندین سیگنال است، بنابراین چندین سیستم انتقال در گیاهان وجود دارد (Agrios, 2005). مکانیسم ISR مشابه SAR علیه طیف گسترده‌ای از بیمارگرهای قارچی و باکتریایی فعال می‌شود. گسترش برخی بیمارگرها توسط SAR و هم ISR محدود و کنترل شده و باعث افزایش مقاومت گیاه می‌شود که این نتایج نشان دهنده این است که هر دو مکانیسم می‌توانند تکمیل کننده یکدیگر در مقاومت القایی گیاهان باشند (Van Loon et al. 2006)

منابع

1- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. Elsevier Academic Press, San Diego, California, p: 922.
2- Babaeizad, V., Imani, J., Kogel, K. H., Eichmann, R., and Hückelhoven, R. (2009). Over-expression of the cell death regulator BAX inhibitor-1 in barley confers reduced or enhanced susceptibility to distinct fungal pathogens. Theoretical and Applied Genetics, 118(3), 455-463.
3- Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z., and Fan, B. (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. Plant signaling and behavior, 4(6), 493-496.
4- Loti Symbiosis, M. (2015). Genetic Regulation of Symbiosis Island Transfer in Mesorhizobium loti. Biological Nitrogen Fixation, 219.
5- Moradi Beidokhti, H., Babaeizad, V., Rahimian, H., Tajick Ghanbary, M., Pakdin-Parizi, A. (2021). Resistance genes expression pattern analysis of *Piriformospora indica* - colonized sour orange plants in challenging with citrus bacterial blast (*Pseudomonas viridiflava*). *Journal of Plant Molecular Breeding*,.doi:10.22058/jpmb.2021.539222.1241
6- Pieterse, C. M., Van Wees, S. C., Van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., and Van Loon, L. C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. The Plant Cell, 10(9), 1571-1580.
7- Ribnicky , D. M., Shulaev, V., and Raskin, I. (1998). Intermediates of salicylic acid biosynthesis in tobacco. Plant Physiology, 118(2), 565-572.
8- Ross, A. F. (1961). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. Virology, 14(3), 340-358.
9- Singh, R. S. 2001. Plant disease management. Enfield, NH : Science Publishers. 238 pages
10- Sticher, L., Mauch-Mani, B., and Métraux, A. J. (1997). Systemic acquired resistance. Annual review of phytopathology, 35(1), 235-270.

[482] Induced systemic resistance

11- Van Loon, L. C., Rep, M., and Pieterse, C. M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annu. Rev. Phytopathol., 44, 135-162.
12- Vidhyasekaran, P. (2002). Bacterial disease resistance in plants: molecular biology and biotechnological applications. CRC Press.
13- White, R. F. (1979). Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. Virology, 99(2), 410-412.
14- Yalpani, N., León, J., Lawton, M. A., and Raskin, I. (1993). Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. Plant physiology, 103(2), 315-321.

Identification of diatoms in Zav Spring, Golestan Province

Hanieh Yousefiy[1*]; Jamileh Panahy Mirzahasanlou[2] Mojtaba Qara Mahmoudloo[3] Arsalan Behlkeh[4]

1- MSc student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavous University
2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Gonbad Kavous University
3- Assistant Professor, Department of Rangeland and Watershed Management, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University
4- Department of Fishery, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University

Email: hanieh.usefi96@gmail.com

Abstract

Diatoms, algae belong to the phylum Bacillariophyta, constitute the dominant algal flora in aquatic ecosystems. Zav Spring is located in western end of the Golestan National Park, in Golestan Province. Due to the importance of spring habitats in biodiversity trend and lacking the algal studies in the region, this study was done in order to identification of diatoms in this spring. For this purpose, sampling was performed during the autumn 2020 to the spring 2021 from rock beds and sediment. In general, during this study, 43 species belonging to 20 genera were identified in the epilithic and epipelic samples. The largest genera are *Nitzchia* with 5 sp. and *Navicula*, *Surirella* and *Cymbella* each with 4 sp. The most abundant species are *Achnanthidium minutissimum*, *Gomphonema pumilum* and *Cymbella excisa*. In general, diatom flora of Zav Spring is combination of cosmopolitan taxa and taxa with narrow distribution.

Keywords: Epilithic, Epipelic, Taxonomy, Flora

شناسایی دیاتوم های چشمه زاو استان گلستان

هانیه یوسفی[1*]؛ دکتر جمیله پناهی میرزاحسنلو[2]؛ دکتر مجتبی قره محمودلو[3]؛ مهندس ارسلان بهلکه[4]

۱- دانشجو کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه گنبدکاووس

۲- استادیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه گنبدکاووس

۳- استادیار گروه مرتع و آبخیزداری دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس

۴- مربی گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس

*Email: hanieh.usefi96@gmail.com**

چکیده

دیاتوم‌ها جلبک‌های متعلق به شاخه Bacillariophyta بوده و فلور جلبکی غالب را در اکوسیستم‌های آبی تشکیل می دهند. چشمه زاو (پل چشمه) در انتهای غربی پارک ملی گلستان در استان گلستان واقع شده است. با توجه به اینکه چشمه‌ها زیستگاه‌های بسیار مهمی برای روند تنوع زیستی هستند و تاکنون مطالعه ای روی جلبک های چشمه زاو انجام نشده است، این مطالعه با هدف شناسایی دیاتوم های این چشمه انجام گرفت. برای این منظور نمونه برداری طی پاییز ۱۳۹۹ تا بهار ۱۴۰۰ از بستر های سنگی و رسوب انجام گرفت. در این مطالعه بطور کلی در نمونه های اپی لیتیک و اپی پلیک ۴۶ گونه دیاتوم متعلق به ۲۰ جنس شناسایی گردید، بزرگترین جنس ها به ترتیب Nitzchia با ۵ گونه و Navicula ، Surirella و Cymbella هرکدام با ۴ گونه می باشند. بیشترین فراوانی مربوط به گونه های Achnanthidium minutissimum ، Gomphonema pumilum، Cymbella excisa می باشند. بطور کلی فلور دیاتومی چشمه زاو ترکیبی است از گونه های جهان وطنی و گونه هایی با پراکنش محدود.

کلید واژگان : اپی لیت، اپی پل، تاکسونومی، فلور

۱. مقدمه

دیاتوم ها ریز جلبک های تک سلولی فتوسنتز کننده هستند. آنها بخش اعظمی از فیتوپلانکتون ها را تشکیل می دهند که خود پایه اصلی زنجیره غذایی در اکوسیستم های آبی هستند. فراوانی این موجودات به همراه توزیع گسترده آنها در زیست گاه های مختلف کاربرد های گسترده ای را برای آنها ایجاد کرده است. دیاتومه ها میکروارگانیسم هایی یوکاریوت و اتوتروف هستند که هم به صورت منفرد و هم کلنی (به شکل زنجیره‌ای) یافت می شوند. یکی از متخصصان به نام (پاسچر، ۱۹۲۱)، اعتقاد داشت که دیاتوم ها با گزانتوفیسه ها و کریزوفیسه ها از نظر تشابه در رنگیزه ها با یکدیگر در تقابل نزدیک هستند، بنابراین او سه خانوادهٔ Bacillariophyceae (دیاتوم ها) و Xanthophyceae و Chrysophyceae را در یک شاخه Chrysophyta باهم قرار داد. برخی از متخصصان دیگر همچون (موریس، ۱۹۶۸) و (چاپمن و چاپمن، ۱۹۴۳). دیاتوم ها را در یک شاخهٔ مجزا در نظر گرفته اند که دارای تنها یک رده به نام Bacillariophyceae می باشد. آنها به وفور در دریا و آب شیرین وجود دارند. بیشتر دیاتوم ها

خاکزی اند، برخی از آنها نیز هوازی هستند. در حدود ۲۰۰ جنس و ۶۰۰۰ گونه دیاتوم وجود دارد (کیانمهر، ۱۳۸۴). بسیاری از آنها تک یاخته هستند که در اطراف خود دیواره های سلولی ظریف ایجاد میکنند که به آنها فراستول می گویند. دیاتومها از اوپال (نوعی سیلیس) ساخته شده اند. و از دو نیمه به نام والو تشکیل می شود. نیمه بالایی را اپی تکا و نیمهٔ پایینی را هیپوتکا می گویند (باسروست و همکاران، ۲۰۱۱؛ باساربی، ۱۹۹۸).

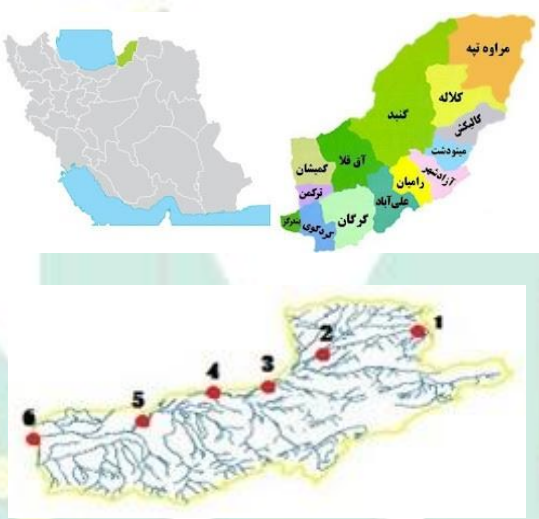
اهمیت زیستگاه چشمه ها ب عنوان نقاط مهم تنوع زیستی و پناهگاهی برای حفاظت از تنوع زیستی (کانتوناتی و همکاران، ۲۰۱۲ ، تاکسباک و همکاران، ۲۰۱۷) ، با توصیف تعداد زیادی از گونه های جلبک نادر و در معرض خطر تاکید شده است (صابر و روکا، ۱۹۹۰، ۱۹۹۲، کانتوناتی، ۱۹۹۸، وروم، ۲۰۰۱، پولیکوا و همکاران، ۲۰۰۵، ناسکیمبن و همکاران، ۲۰۱۱). نتایج حاصل از مطالعه بوم شناسی جلبک در چشمه ها (کانتوناتی و همکاران، ۲۰۱۲) در نظارت بر اکوسیستم های آب شیرین کاربرد دارد. به عنوان یک گروه جلبک مورد مطالعه، دیاتوم ها یک شاخص مفید برای کیفیت آب است و منعکس کننده خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب است (کلی و ویتون، ۱۹۹۵، روت و همکاران، ۱۹۹۹، وروم و لانگ_برتالوت، ۲۰۰۴، وجنال، ۲۰۱۳).

در بررسی دیاتوم های رودخانه بالیخلو، ۱۰۹ تاکسون دیاتوم را شناسایی کردند که از این میان، جنس های Nitzchia ، Gomphonema و Navicula بزرگترین جنس های موجود در رودخانه بودند. در این بررسی ۲۰ گونه برای اولین بار از ایران گزارش گردید (پناهی و همکاران، ۲۰۱۸).
با تحقیق در رودخانه زرین گل در استان گلستان ۳۱ گونه دیاتوم متعلق به ۱۳ تیره و ۱۹ جنس شناسایی نمودند که تیره Gomphonemataceae با ۶ گونه و تیره های Cymbellaceae و Naviculaceae هرکدام با ۴ گونه بیشترین فراوانی را داشتند (دادگر، ۱۳۹۶).
با بررسی دیاتوم ها در بستر اپی لیتیک و اپی پلیک رودخانه چهل چای ۳۲ گونه متعلق به ۱۸ جنس و ۱۵ تیره و ۲ رده شناسایی نمودند، بزرگترین جنس ها Nitzchia و Gomphonema بودند (لک زایی، ۱۳۹۶).
با بررسی دیاتوم ها در دو سطح بستر سنگی (اپی لیت) و رسوبی (اپی پل) رودخانه خرمارود در استان گلستان تعداد ۶۲ گونه دیاتوم متعلق به ۲ رده و ۳۱ جنس و ۲۰ تیره شناسایی نمودند. از این تعداد ۶۱ گونه متعلق به رده *Navicula* و تنها یک گونه متعلق به رده Coscinodiscophyceae بود و بزرگترین Nitzchia جنس با ۱۰ گونه بود (آق آتابای، ۱۳۹۷).
با بررسی دیاتوم های اپی لیتیک رودخانه قره چای در استان گلستان بطور کلی در این بررسی ۳۹ گونه متعلق به ۱۹ جنس و ۱۳ تیره شناسایی شد. تمام گونه های شناسایی شده متعلق به ردهٔ باسیلاریوفیسه بودند(بیانی، ۱۳۹۷).

۲. مواد و روش ها

اقلیم پارک ملی گلستان بر اساس طبقه‌بندی آمبرژه از بسیار مرطوب و جنگلی تا قسمت‌های نیمه‌خشک و استپی و شوره‌زار را شامل می‌شود. میانگین سالیانه بارش بین ۱۴۲ تا ۸۶۶ میلی‌متر و دمای متوسط سالیانه حدود ۱۰ درجه سانتی‌گراد است. در این پارک رودخانه‌های متعددی جریان دارد و بیش از ۲۱ دهنه چشمه در آن شناسایی شده است که از مهمترین رودخانه موجود در پارک، می‌توان رودخانه‌های مادرسو یا دوغ، زاو، آق سو را نام برد که از سر شاخه‌های گرگان رود است که در حدود ۳۵ کیلومتر از مسیر خود را در پارک طی می‌کند (عباس‌زاده تهرانی، ۱۳۸۱). رودخانه گرگانرود در جنوب شرقی دریای خزر واقع شده که اغلب انشعابات آن از رشته کوه‌های البرز سرچشمه می‌گیرند. تلاقی رود خانه‌های زاو و مادرسو در غرب پارک ملی گلستان در حوضه آبخیز بزرگ گرگانرود قرار می‌گیرند (کیابی و همکاران، ۱۳۷۸).

نمونه برداری از رودخانه زاو (پل چشمه) در طی پاییز ۱۳۹۹ و بهار ۱۴۰۰ انجام شد و همانطور که در (شکل۱) مشاهده میشود نقطه قرمز یک نشان دهنده ایستگاه اول میباشد. در هر ایستگاه، دیاتوم ها ازسطح بسترهای سنگی و رسوب جمع آوری شدند. بسترهای اپیلیتیک یا سنگی را ابتدا جهت پاک شدن از گل و لای با آب شسته و سپس با استفاده از مسواک، نمونه ها از سطح سنگ تراشیده شدند، برای نمونه برداری جلبک های اپیپل نیز بخشی از رسوب به آرامی به ظرف نمونه برداری منتقل شدند (بلینگر و سیجی، ۲۰۱۰) نمونه های جمع آوری شده با فرمالین ۴ % تثبیت شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. در هر ایستگاه نمونه برداری، همراه با نمونه های جلبکی، نمونه های آب نیز در ظروف یک لیتری برداشته شد و جهت آنالیز میزان نیترات، آمونیوم، فسفات به آزمایشگاه منتقل گردید. میزان اکسیژن محلول، دما، هدایت الکتریکی، شوری، PH و TDS با استفاده از دستگاه پرتابل HQ-40d در محل اندازه گیری شد.



شکل۱: موقعیت رودخانه مورد مطالعه و ایستگاه های نمونه برداری

دیاتوم ها قبل از شناسایی و شمارش نیاز به آماده سازی دارند .برای این کار نمونه ها در زیر هود در اسید نیتریک غلیظ جوشانده شدند، سپس اسید اضافی با شستشوی متوالی و آبکشی با آب مقطر حذف شد. سپس با استفاده از چسب Canada Balsam اسلایدهای دائمی تهیه شد. برای شناسایی دیاتومها، نمونه ها در زیر میکروسکوپ نوری دوربیندار بررسی شده، سپس عکس های میکروسکوپی تهیه شد و با استفاده از منابع موجود شناسایی شدند. (کرامر و لانگ برتالوت، ۱۹۹۳b ، ۱۹۹۱a ، ۱۹۹۸ ، ۱۹۸۶ ، کرامر، ۲۰۰۰ ، لانگ برتالوت و کرامر، ۲۰۰۱ ، ۲۰۰۳ ، باهلز، ۲۰۰۶ ، بیشاپ و همکاران، ۲۰۱۷ ، جاتنر و همکاران، ۲۰۱۹) برای شمارش دیاتوم ها نیز ۳۰۰ تا ۴۰۰ والو در زیر میکروسکوپ شمارش گردید و فراوانی نسبی هر کدام از گونه ها بدست آمد.

۳. نتایج و بحث

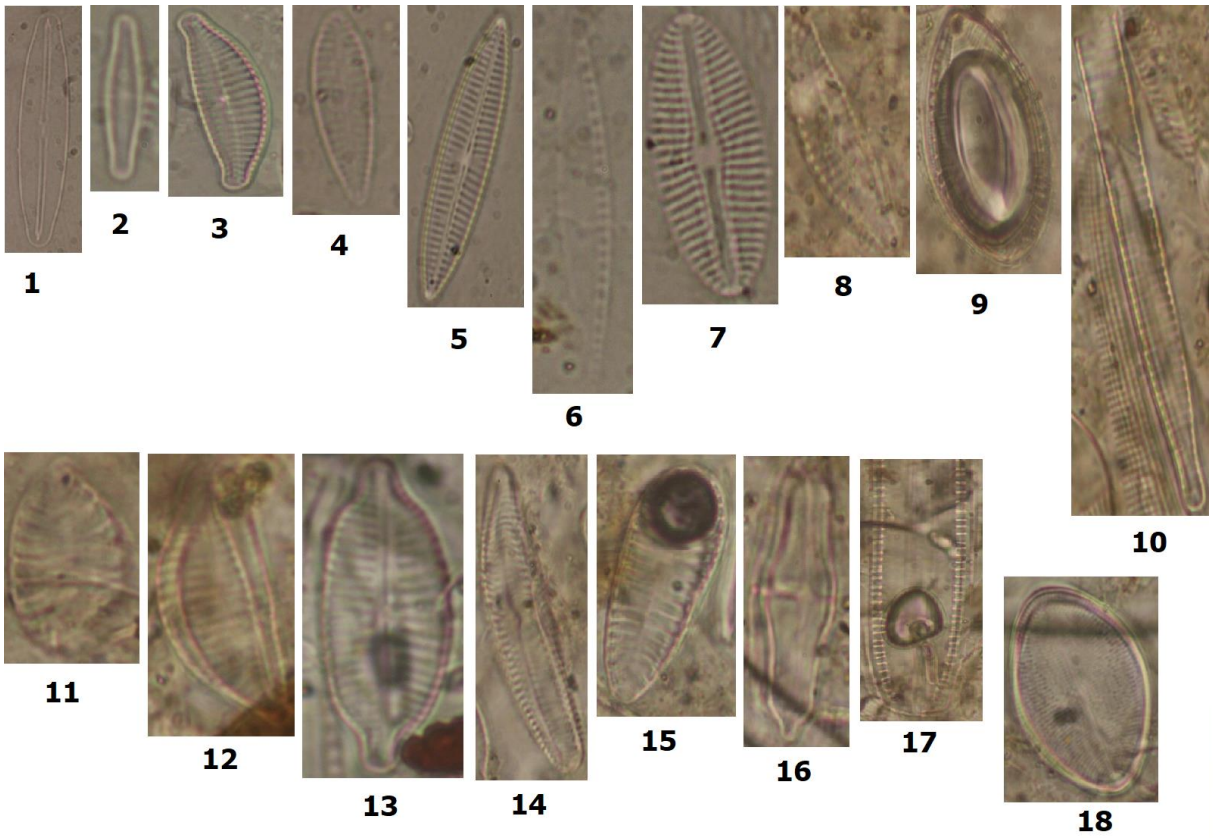
طی دوره مورد مطالعه دامنه نوسانات دما در رودخانه مورد نظر بین $6/14-7/13^{\circ}C$، میزان نیترات بین $31-37 mg.l^{-1}$، فسفات بین $0/005-0/026 mg.l^{-1}$، آمونیوم بین $0/013-0/021 mg.l^{-1}$، میزان هدایت الکتریکی بین $502/0-535/0 \mu s.cm^{-1}$، TDS بین $249/0-271/0 mg.l^{-1}$، میزان PH بین ۴۶/۷-۳۱/۷، اکسیژن محلول بین $4/13-6/12 mg.l^{-1}$ و میزان شوری بین ۰/۲۵-۲/۰ متغیر بود.

در این مطالعه بطور کلی در نمونه های اپی لیتیک و اپی پلیک ۴۶ گونه دیاتوم متعلق به ۲۰ جنس شناسایی گردید، بزرگترین جنس ها به ترتیب Nitzchia با ۵ گونه و Navicula ، Surirella و Cymbella هرکدام با ۴ گونه می باشند. بیشترین فراوانی مربوط به گونه های Achnanthidium minutissimum ، Gomphonema pumilum، Cymbella excisa ، Achnanthidium minutissimum، *Navicula* tripunctata ، Diploneis sp و Amphora pediculus می باشند. ۱۵/۳۵درصد نمونه های دیاتومی چشمه زاو شناسایی شده در هر دو نمونه (اپی پل و اپی لیت) حضور داشتند. ۵۴/۶۵ درصد از نمونه ها تنها در نمونه اپی پل حضور داشتند و ۳۰ درصد فقط در نمونه اپی لیت شناسایی شدند.

جدول۱: فهرست دیاتوم های شناسایی شده در رودخانه گرگان رود به تفکیک رده و تیره

نام علمی	اپی لیت	اپی پل
Achnanthidium minutissimum	+	+
Amphora pediculus	+	+
Amphora sp	+	+
Cocconeis placentula	+	+
Cocconeis pediculus	+	
cymbella excise	+	+
Cymbella cymbiphormis		+
Cymbella compacta	+	
Cymbella tumida	+	
Cymbopleura amohicephala		+
Cymbopleura citrus		+
Diploneis sp	+	+
Diploneis krammeri	+	
Diploneis separanda	+	
Diatoma moniliformis	+	
Encyonema lang-bertalotti		+
Encyonema minuta	+	
Frustulia vulgaris		+

نام علمی	اپی لیت	اپی پل
Fallacia subhamulata	+	
Gomphonema parvulum		+
Gomphonema pumilum	+	
Gomphonema acuminutum		+
Gyrosigma sp	+	+
Gyrosigma sp		+
Halamphora sp		+
Navicula criptotenla		+
Navicula tripunctata		+
Navicula menisculus		+
Navicula sp		+
Nitzchia dissipata	+	
Nitzchia clausii		+
Nitzschia incognita		+
Nitzschia recta	+	
Nitzchia sigmoidea		+
Nitzchia sp	+	
Rhoicosphenia abbreviate	+	
Stauroneis separanda		+
Stauroneis smitti		+
Stenopterobia sp		+
Surirella ovalis		+
Surirella minuta		+
Surirella sp		+
Syrirella brebissonii		+
Ulnaria ulna	+	+



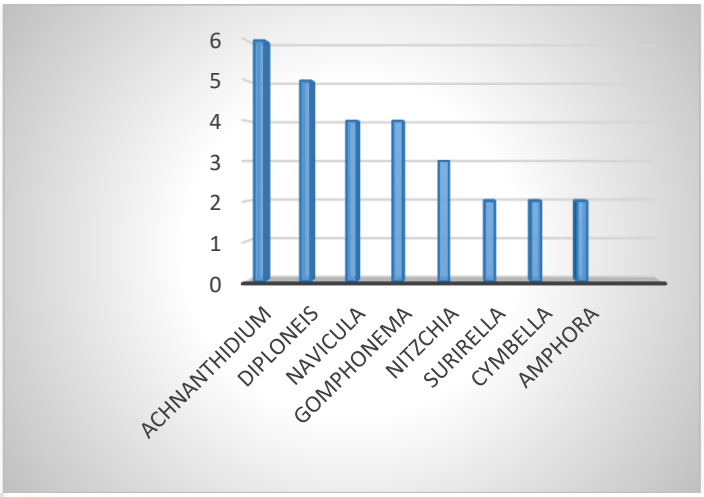
شکل۱: تصاویر میکروسکوپ نوری برخی از دیاتوم های شناسایی شده ایستگاه اول در چشمه زاو

۴. نتیجه گیری

مطالعه حاضر اولین بررسی و معرفی دیاتوم های چشمه زاو می باشد. بزرگترین جنس ها از نظر تعداد گونه Nitzchia و بعد از آن Navicula ، Surirella و Cymbella گزارش شدند. جنس های Achnanthidium، Gomphonema، Cymbella دارای تعداد گونه های زیادی بوده و در اکوسیستم های آبی معمول هستند (Fourtanier and Kociolek ،۲۰۰۹).

در مطالعه حاضر دیاتوم های متعلق به دو بستر سنگی و رسوب مورد مطالعه قرار گرفتند. بطور کلی به اعتقاد برخی محققان ترکیب گونه ای و فراوانی دیاتوم های یک ایستگاه می تواند در بسترهای مختلف متفاوت باشد. چون گونه ها به یک بستر بهتر از بستر های دیگر سازگاری پیدا می کنند (Fisher and Dunbar, *2007;*Potapova and Charles, *2005*). نوع بستر می تواند پاسخ جمعیت های دیاتومی به استرسهای انسانی را تحت تاثیر قرار دهد (*Bere, 2010*). در این مطالعه قسمت عمده ی گونه های شناسایی شده در هر دو بستر یافت شدند. تعدادی از آنها تنها در بستر اپی لیت و تنها اندکی منحصرا در بستر اپی پل یافت شدند. البته این نتایج می تواند تحت تاثیر تعداد دفعات و ایستگاه های نمونه برداری قرار گیرد چون گرچه در خیلی از موارد نتایج ما با نتایج (پناهی میرزاحسنلو و همکاران، ۲۰۱۸) در رودخانه شباهت نشان میدهد، اما تفاوتهایی نیز مشاهده می شود، از جمله اینکه در مطالعه ی ما گونه در هر دو بستر سنگی و رسوب مشاهده شد، در حالیکه در مطالعه ذکر شده تنها در بستر رسوب مشاهده شد. (Salusso and Morana, *2000*) طبقه بندی را بر اساس شاخص شانون پیشنهاد کرده اند که مقادیر شاخص تنوع شانون بالاتر از ۳ نشان دهنده وضعیت آب تمیز، مقادیر ۳-۱ بیانگر وضعیت کمی آلوده و مقادیر کمتر از ۱، نشان دهنده وضعیت شدیدا آلوده می باشد؛ که طبق این تقسیم بندی نیز ایستگاه سوم بر اساس داده های اپی لیت دارای وضعیت شدیدا آلوده و بقیه ایستگاه ها کمی آلوده هستند. همچنین در مطالعه حاضر بطور کلی نمونه های اپی پل در هر ایستگاه تنوع بالایی نسبت به نمونه های اپی لیت داشتند. نتایج بررسی ها نشان داده است که تنوع و ترکیب گونه ای دیاتوم ها در بین سوبستر های نرم و سخت در مقیاس کوچک متفاوت است. همچنین جلبک هایی که در رسوبات رشد می کنند. نسبت به نمونه های اپی لیت بیشتر تحت تاثیر وضعیت شیمیایی رسوب قرار می گیرند (Potapova and Charles, 2005).

بطور کلی چشمه زاو با داشتن ۴۶ گونه متعلق به ۲۰ جنس و گونه هایی که در این مطالعه یافت شد. نسبت به رودخانه های همجوار مطالعه شده از تنوع خوبی برخوردار بود. اگرچه نیاز به مطالعات جامع تر با تعداد دفعات نمونه برداری بیشتر برای معرفی دقیق تر فلور دیاتومی این رودخانه و یافتن ارتباط پراکنش دیاتوم ها با پارامتر های محیطی ضروری به نظر می رسد. بررسی نتایج شاخص های تنوع نیز نشان دهنده ی توان خودپالایی رودخانه می باشد.



شکل ۲: تعداد گونه ها متعلق به جنس های شناسایی شده در چشمه زاو

منابع

۱- آق آتابای، ع. ۱۳۹۷. بررسی دیاتومه های اپی لیت و اپی پل رودخانه خرمارود شهرستان آزادشهر در استان گلستان. پایان نامه.ص۹۷ کارشناسی ارشد، دانشگاه گنبدکاوس،

۲- لگزایی، ف. ۱۳۹۶. بررسی دیاتوم های اپی لیت و اپی پل رودخانه چهل چای شهرستان مینودشت در استان گلستان. پایان نامه. ص۵۱ کارشناسی ارشد، دانشگاه گنبدکاوس،

۳- دادگر، آ. ۱۳۹۶. بررسی دیاتوم های اپی لیت و اپی پل رودخانه زرین گل شهرستان علی آباد در استان گلستان. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه گنبد کاوس.

٤- بیانی، م. ۱۳۹۷. بررسی دیاتوم های اپی لیتیک رودخانه قره چای شهرستان رامیان در استان گلستان. پایان نامه کارشناسی ارشد، ص۹۷ دانشگاه گنبدکاوس،

٥- عباس زاده تهرانی، ن. ۱۳۸۱. بررسی نقش تغییر کاربری اراضی بر روی میزان دبی سیلاب ها با استفاده از GIS/RS منطقهٔ مور مطالعه: حوزهٔ آبریز رودخانهٔ دوغ. پایان نامهٔ کارشناسی ارشد. دانشکده محیط زیست. انتشارات دانشگاه تهران، ۲۳۴ صفحه.

٦- کیابی، ب.، زهزاد، ب.، فرهنگ دره‌شوری، ب.، مجنونیان، ه.، گشتاسب میگونی، ح. ۱۳۷۲. پارک ملی گلستان. انتشارات سازمان حفاظت محیط زیست، تهران، ۱۲۹ صفحه.

۷- کیابی، ب.، عبدلی، ا.، قائمی، ر. ۱۳۷۸. اکوسیستم های تالابی و رودخانه ای استان گلستان. سازمان حفاظت محیط زیست استان گلستان. ۱۸۲ص.

8- Bahls LL. (2006). Northwest Diatoms, A Photographic Catalogue of Species in The Montana Diatom Collection. Montana Diatom Collection.481 pp.

9- Bellinger, E.G. and Sigee, D.C. 2010. Freshwater Algae, Identification and Use as Bioindicators. Wiley-Blackwell

10- Bellinger, E.G. and Sigee, D.C. 2010. Freshwater Algae, Identification and Use as Bioindicators. Wiley-Blackwell. 271p.

11- Bere, T., 2010. Benthic diatom community structure and habitat preferences along an urban pollution gradient in the Monjolinho River, Sao Carlos, SP, Brazil. Acta Limnologica Brasiliensia 22(1):80-92.

12- Berthon, V. Bouchez, A. & Rimet, F. 2011. Using diatom life-forms and ecological guilds to assess organic pollution and trophic level in rivers: a case study of rivers in south-eastern France. Hydrobiologia, 673:259-271.
13- Bishop IW, Esposito RM, Tyree M, Spaulding SA. (2017). A diatom voucher flora from selected southeast rivers (USA). Phytotaxa. 332(2): 101-140.
14- Cantonati, M. 1998. Diatom communities of springs in the southern alps. Diaom Research 13(2): 201 220.
15- Cantonati M, Angeli N, Bertuzzi E, Lange-Bertalot H. (2012). Diatoms in springs of the Alps: spring types, environmental determinants and substratum. Freshwater Science. 31(2): 499-524.
16- Fisher, J. and Dunbar, M.J., 2007. Towards a representative periphytic diatom sample. Hydrology and Earth Systems Science 11: 399-407.
17- Fourtanier, E. and Kociolek, J.P., 2009. Catalogue of diatom names. San Francisco, California, USA, California Academy of Sciences.
18- Juttner, I., H. Rothfritz and S. J. Ormerod. 1996. Diatoms as indicators of river quality in the Nepalese Middle Hills with consideration of the effects of habitat-specific sampling. Freshwater Biology 36: 475–486.
19- Krammer, K. and Lange-Bertalot, H. 1986. Bacillariophyceae, 1. Naviculaceae. In: Etti, H. Gerloff, J. Heyning, H. Mollenhauer, D. (eds), Susswasserflora von Mitteleuropa, Gustav Fischer Verlag. Jena. Vol. 1, 876 p.
20- Krammer, K. and Lange-Bertalot, H. 1988. Bacillariophyceae, 2. Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. In: Etti, H. Gerloff, J. Heyning, H. Mollenhauer, D. (eds), Susswasserflora von Mitteleuropa, Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. Vol. 2. 596 p.
21- Krammer, K. and Lange-Bertalot, H. 1991 a. Bacillariophyceae, 3. Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. In: Etti, H. Gerloff, J. Heyning, H. Mollenhauer, D. (eds), Susswasserflora von Mitteleuropa, Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. Vol. 3, 576 p.
22- Krammer, K. and Lange-Bertalot, H. 1991 b. Bacillariophyceae, 4. Achnanthaceae. KritischeErganzungenzuNavicula (Lineolatae) und Gomphonema. In: Etti, H. Gerloff, J. Heyning, H. Mollenhauer, D. (eds), Susswasserflora von Mitteleuropa, Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. Vol. 4, 437 p.
23- Krammer K and LangeBertalot H.(1991b). Bacillariophyceae, Achnanthaceae. KritischeErganzungenzuNavicula (Lineolatae) und Gomphonema. In: Etti, H. Gerloff, J. Heyning, H. Mollenhauer, D. (eds), Susswasserflora von Mitteleuropa. Vol. 4.Gustav Fischer Verlag. Stuttgart.
24- Krammer K. (2000). Diatoms of Europe. Diatoms of the European inland waters and comparable habitats 1, the Genus Pinnularia. A.R.G. Gantner Verlag. K.G.
25- Krammer K. (2002). Cymbella. Diatoms of Europe. Diatoms of the European inland waters and comparable habitats 3: 1-584.
26- Krammer K. (2003).Cymbopleura, Delicata, Navicymbula, Gomphocymbellopsis, Afrocymbella. Diatoms of Europe 4: 1-530
27- Lange-Bertalot H. (2001). Naviculasensulato. Diatoms of Europe. Diatoms of European Inland Waters and Comparable Habitats. 2: 1-526. Lange-Bertalot H. (2001).
28- Lange-Bertalot, H., Hofmann, G., Werum, M. and Cantonati, M. 2017. Freshwater Benthic Diatoms of Central Europe: Over 800 Common Species Used in Ecological Assessment. English edition with updated taxonomy and added species. Koeltz Botanical Books, Schmitten-Oberreifenberg, 942 pp.
29- PanahyMirzahasnlou J, Nejadsattari T, Ramezanpour Z, ImanpourNaminJ,Asri Y. (2018). The epilithic and epipelic diatom flora of the Balikhli River, Northwest Iran. Turkish Journal of Botany. 42:518-532.
30- Potapova, M. and Charles, D.F., 2005. Choice of substrate in algae-based water quality assessment. Journal of North American Benthological Society 24: 415-427.
31- Sabater, S., Roca, J. R., 1990: Some factors affecting distribution of diatom assemblages in Pyrenean springs. Freshwater Biology 24, 493–507.
32- Sabater, S., Roca, J. R., 1992: Ecological and biogeographical aspects of diatom distribution in Pyrenean springs. British Phycological Journal 7, 203–213.
33- Salusso, M.M. and Moraña, L.N., 2000. Caracteristicas fisicas, quimicas y fitoplancton de rios y embalses de la alta Cuenea del Rio Juramento (Salta, Argentina). Natura Neotropicalis 31:29-44.
34- Taxböck L., Linder H. P., Cantonati M. 2017: To what extent are Swiss springs refugial habitats for sensitive and endangered diatom taxa? Water 9, 967. University of Ireland, Galway. http://www.algaebase.org

A review of technology for the use of weeds and medicinal plants in the synthesis of bio-herbicides

Ebrahim Gholamalipour Alamdari*

Assistance professor of Plant Production Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University

Corresponding author: e- mail: eg.alamdari@gonbad.ac.ir

Abstract

Interference in plants includes competition and allelopathy. Allelopathic substances are bioactive compounds that form the plant defense system. As we know, weeds, wild plant and medicines are rich in secondary metabolites. These compounds are abundant in some plants, especially weeds, which are under stress of other plant species. These plants are destroyed every year by weeding and other activities, while they are rich hetrotoxic compounds, especially phenolic. Therefore, due to the high biomass of weeds and as well as medicinal plants from which specific organ or organs are used, they can be used in the production of herbicides of biological origin or to treat patients.

Keywords: Competition, Allelopathy, Hetrotoxic compounds, Phenol

مروری بر فناوری استفاده از گیاهان هرز و دارویی در سنتز علفکش‌های زیستی

ابراهیم غلامعلی‌پور علمداری*

استادیار گروه تولیدات گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس

نویسنده مسئول مکاتبات: E- mail: eg.alamdari@gonbad.ac.ir

چکیده

دخالت در گیاهان شامل رقابت و آللوپاتی است. مواد آللوپاتیک، ترکیبات زیست فعال می‌باشند که سیستم دفاعی گیاهان را شکل می‌دهند. همان‌طوری‌که می‌دانیم گیاهان هرز، خودرو و دارویی سرشار از متابولیت‌های ثانویه می‌باشند. این ترکیبات در برخی از گیاهان به‌ویژه علف‌های هرز که در شرایط تنش سایر گونه‌هایی از گیاهان می‌باشند، زیاد است. این گیاهان در اثر وجین و سایر فعالیت‌ها هر ساله از بین می‌روند، این در حالی است سرشار از ترکیبات دگرآسیب به‌ویژه فنلی می‌باشند. بنابراین با توجه به زیتوده بالای علف‌های هرز و هم‌چنین گیاهان دارویی که اندام و یا اندام‌های خاصی از آن مورد استفاده قرار می‌گیرند، می‌توان از آن‌ها در تولید علفکش‌ها با منشاء زیستی و یا درمان بیمارها استفاده نمود.

کلمات کلیدی: رقابت، آللوپاتی، ترکیبات دگرآسیب، فنل.

۱.مقدمه

اصولاً در آگرواکوسیتم‌ها، تأثیر زیانبار اثر علف‌های‌هرز بر گیاهان زراعی از طریق رقابت بر سر منابع محدود و آللوپاتی است. آللوپاتی نتیجه تولید مولکول‌های فعال بیولوژیکی توسط گیاهان در حال رشد یا بقایای آن‌ها می‌باشد که ممکن است بر رشد و توسعه افراد همان گونه یا گونه‌های دیگر تاثیر مستقیم یا غیر مستقیم بگذارد (Machado, 2007; Vyvyan, 2002). برآوردهای انجام شده نشان می دهد حدود ۱/۴ میلیون ترکیب گیاهی دارای خاصیت دگرآسیبی هستند که فقط ۳ درصد آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته‌انـد (Amini *et al.*, 2014).

متابولیت‌های ثانویه به سه گروه شیمیایی مجزا ترپن‌ها، ترکیبات فنلی و ترکیبات نیتروژن‌دار تقسیم بندی می شوند. میزان فراوانی ترپن‌ها، ترکیبات فنلی و نیتروژن‌دار در طبیعت به‌ترتیب در حدود ۵۵، ۱۸ و ۲۷ درصد است (Ramawat and Merillon, 2013). ترکیبات آللوشیمیایی به مواد شیمیایی گفته می‌شود که از گیاهان تولید می‌شوند، این گونه ترکیبات دارای خصوصیتات ردوکس و یا فیتوتوکسیته بوده و احتمالاً می‌توانند گیاهان، میکروب‌ها و یا حتی برخی عملکردهای جانوری را تحت تأثیر تاثیر خود قرار دهند (Cartea *et al*., 2010; Vasilakoglou *et al*., 2013; Saxena *et al*., 2016).

روش‌های فراوانی برای ورود مواد آللوپاتیک به محیط وجود دارد که می‌توان به ترشح از ریشه زنده، آبشویی از روی برگ‌ها، ساقه‌ها و میوه‌ها یا آزادشدن گازهای سمی به اتمسفر اشاره کرد در زمینه دگرآسیبی، زیست‌سنجی‌های متفاوتی وجود دارد که بیشترین آن‌ها با تغییر در سرعت جوانه‌زنی و نیز رشد گیاهچه ناشی از توان دگرآسیب گیاهان مرتبط است (Omid Panah *et al*., 2012).

گیاهان هرز، خودرو و دارویی طیف گستردهای از متابولیت‌های ثانویه مانند فنل‌ها، تانن‌ها، ترپنوئیدها، آلکالوییدها، اسیدهای چرب و استروئیدها را تولید می‌کنند که دارای خاصیت آللوپاتیک قابل توجهی هستند (Piani and Noguchi, 2012).

۲.مواد و روش ها

نتایج نباتی سوها و آل ابراهیم (Nabati Soha and Al- Ebrahim, 2019) نشان داد که عصاره‌های آویشن، رازیانه، بابونه، نعناع صفات درصد جوانه‌زنی، طول گیاهچه و وزن تر گیاهچه گاوپنبه را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. در بین عصاره‌های مورد استفاده آویشن بیش از نعناع، بابونه و رازیانه صفات مورد بررسی را کاهش داد. تحقیقات در بررسی اثر ترکیبات فنلی رزماری بر علف‌هرز یولاف نشان داده است که سرعت جوانه‌زنی با افزایش غلظت عصاره آبی رزماری کاهش یافت. بنابراین این ترکیبات قادرند از تقسیم سلولی جلوگیری نمایند (Piraste Anoshe *et al.*, 2010).

نتایج آزمایش تهامی زرندی و رضوانی مقدم (Tahami Zarandi and Rezvani Moghadam., 2011) نشان داد که عصاره ریحان و مرزه، خصوصیات جوانه‌زنی علف‌هرز یولاف وحشی را کاهش داد. عطایی و همکاران (Ataei *et al.*, 2020) در آزمایشی دیگر نیز گزارش نمودند که کاهش مولفه‌های مورفولوژیکی، محتوی رنگیزه کلروفیل کل و پروتئین یولاف‌وحشی تحت تاثیر عصاره آبی اندام‌های علف‌هرز شاتره علی‌رغم افزایش اسمولیت سازشی پرولین و آنتی‌اکسیدان‌های مورد بررسی می‌تواند به‌دلیل عدم کفایت این متابولیت‌ها که منجر به پاسخ ناقص آن‌ها در برابر تنش آللوپاتیک می‌گردد.

نتایج مطالعه طاطاری و همکاران (Tatari *et al.*, 2020) نشان داد که علف‌هرز سوروف و کاسنی رفتارهای متفاوتی نسبت به ترکیبات حاصل از اندام‌های مختلف پنیرک داشتند، به‌طوری‌که احتمالاً تفاوت در تاثیر آللوپاتیک اندام‌های مختلف علف‌هرز پنیرک بر صفات مورفولوژیکی، کلروفیلی و فنلی گیاه سوروف و کاسنی مربوط به نوع و میزان غلظت آللوکمیکال‌ها می‌باشد. بر اساس نتایج، ارتفاع، سطح برگ، وزن خشک زیست توده و رنگیزه کلروفیل کل علف‌هرز سوروف تحت عصاره آبی اندام‌های مختلف پنیرک و مخلوطی از آن‌ها افزایش یافت؛ این امر می‌تواند به‌واسطه افزایش میزان کمپلکس‌های محافظت کننده نوری نظیر کلروفیل b، کاروتنوئیدها و بیوشیمیایی فنل کل در علف‌هرز سوروف تحت عصاره آبی پنیرک باشد؛ که موجب تقویت قدرت آنتی‌اکسیدانی علف‌هرز سوروف در برابر ترکیبات آللوپاتیک اندام‌ها باشد.

در مطالعه‌ای سعیدی‌پور و همکاران (۲۰۲۰) گزارش نمودند که شدت اثرات آللوپاتیک 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 بقایای اویارسلام 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.

نتایج رسام و همکاران (Rasam *et al.*, 2014) در رابطه با غلظت‌های مختلف عصاره کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides* Lam) بر مولفه‌های جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ای ارقام گندم نظیر پیشتاز، پیشگام و سایونز نشان داد که مقادیر درصد و سرعت جوانه‌زنی، وزن خشک گیاهچه، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه در تمامی ارقام با افزایش غلظت عصاره به‌طور خطی کاهش یافت. در هر سه رقم زمان تا شروع و پایان جوانه‌زنی تحت تأثیر عصاره افزایش معنی‌داری پیدا نمود. نتایج تحقیقی در خصوص تأثیر عصاره آبی برگ گیاه دارویی موخورش بر جوانه‌زنی و محتوای کلروفیل گندم نشان داد که با افزایش غلظت عصاره از درصد جوانه‌زنی و محتوای کلروفیل گندم کاسته شد (Omid Panah *et al.*, 2012). در تحقیقی گزارش شد که کاهش رنگیزه‌های کلروفیلی تحت تنش عصاره سنتزی فنلی می‌تواند نتیجه

تخریب ساختار کلروپلاست توسط گونه‌های فعال اکسیژن (Noreen and Ashraf. 2009)، تغییر نسبت چربی- پروتئین رنگیزه‌ها، افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز و بمراتب کاهش سنتز رنگیزه‌های کلروفیلی باشد.

۳.نتیجه‌گیری

اکثر گیاهان هر و دارویی دارای ترکیبات ثانویه به‌ویژه ترکیبات فنلی می‌باشند. با توجه به این‌که در فرمول عمومی اکثر سموم سنتزی ترکیبات فنلی موجود است. بنابراین در مجموع در صورت اثبات اثر دگرآسیبی برخی از گیاهان هرز و دارویی روی سایر گونه‌ها، شاید بتوان از زیست توده تولیدی بالای آن‌ها به‌عنوان کاندیدی برای تولید علفکش با منشاء زیستی و یا مدلی برای سنتز علفکش استفاده نمود. البته این امر نیازمند به درکی عمیق‌تر از ساز و کارهای مولکولی بیان ژن‌های گیاهان گیرنده در حضور ترکیبات دگرآسیب گیاهان هرز و دارویی می‌باشد.

منابع

1- Cartea M.E., Francisco M., Soengas P. and Velasco P. 2010. Phenolic compounds in Brassica vegetables. Molecules, 16(1): 251-80.
2- Amini S., Azizi M. and Joharchi M.R. 2014. Determination of allelopathic potential in some medicinal and wild plant species of Iran by dish pack method. Theoretical and Experimental Plant Physiology, 26 (3-4):189-199. (In Persian)
3- Machado S. 2007. Allelopathic potential of various plant species on downy brome implications for weed control in wheat production. Agronomy Journal, 99:127-132.
4- Nabati Soha L. and Al Ebrahim M.T. 2019. Study of plant extracts effect on germination of Abutilon theophrasti. 2nd international and 6th national conference on organic and conventional Agriculture.
5- Noreen Z. and Ashraf M. 2009. Assessment of variation in antioxidative defense system in salttreated pea (*Pisum sativum*) cultivars and its putative use as salinity tolerance markers. Journal of Plant Physiology, 166: 1764-1774.
6- Omid Panah N., Moradshahi A. and Asrar Z. 2012. Investigation on allelopathic potential of *Zhuceria majdae* Rech. Essential oil on two wheat cultivars. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic plants, 28(3): 198-209. [In Persian with English Summary]
7- Piani B. and Noguchi, B. 2012. Allelopathy and its potential for weeds control: A Review Research. Journal of Biological Research, 3 (1): 21-29.
8- Piraste Anoshe H., Emam Y. and SaharKhiz, M.J. 2010. Evaluation of allelopathic characteristics of medicinal plants on germination and early growth of wheat. Iranian Journal of Agricultural Research, 9(12): 95-102.
9- Ramawat K.G., Merillon J.M. 2013. *Natural products photochemistry, Botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes*. Springer – Verlag Berlin Heidelberge. 4242p.
10- Rasm Gh., Torabi B., Garosi, F. and Badri, A. 2014. Allelopathic effect of *Ziziphora clinopodioides* Lam on germination and growth seedlings of wheat cultivars. Seed Research. 5(14):68-77.
11- Saeedipour A., Gholamalipour Alamdari E., Biabani A., Avarseji Z. and Nakhzari Moghadam, A. 2020. Evaluation of allelopathic stress of Cyperus esculentus remains on some invasive weeds. Applied Biology, 33(4): 42-60.
12- Saxena R., Tomar R.S. and Kumar M. 2016. Allelopathy: A Green Approach for Weed Management and Crop Production. International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology, 3(4): 43-50.
13- Tahami Zarandi M.K. and Rezvani Moghadam, P. 2011. Study of germination and seedling morphological characteristics of wild oat (*Avena ludoviciana*) under aqueous extract of the aerial parts of medicinal plants. Crop Protection, 25: 398-406. [In Persian with English Summary]
14- Vasilakoglou I., Dhima K., Paschalidis K. and Ritzoulis C. 2013. Herbicidal components and their synergy. Journal of Essential Oil Research, 25(1): 1-10.
15- Vyvyan J.R. 2002. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. Tetrahedron, 58: 1631-1646.

Investigation the colorability of cut flowers of roses by artificial colors

Abstract

The rose is a perennial plant of great economic value, of which there are many cultivars worldwide. Flower colour is one of the most important quality factors in the marketing discussion and attracts the attention of the public. Post-harvest is also the most important issue for cut flowers, and high durability is considered one of the signs of quality and popularity of cut flowers. Attention to these two factors is particularly important for flowers such as roses, which are among the most important and popular cut flowers in the world. Nowadays, efforts are being made to use methods that create colour diversity and improve post-harvest quality of cut flowers. The cut flowers that have been dyed with artificial colours after harvesting are more important because besides creating a new colour, the issue of post-harvest durability has to be considered. Previous books, dissertations, articles and research papers were used as sources. Studies from 1986 to 2021 in the field of botany, rose production, flower colour, post-harvest shelf life, types of dyes and factors affecting flower colouring are discussed in this article. Since one of the most important factors in the marketing of cut flowers is their colour, efforts are being made to create a variety of colours and to create a new colour palette. Since the use of breeding methods nowadays requires a lot of time and high costs, the use of different artificial colours is effective in increasing the income of producers, in addition to diversity. The use of colours is a simple, quick, inexpensive and efficient method in flower and ornamental plant industrial that does not require any special technology.

Keywords: Postharvestlife,flowercolor,colorants,cutflowers

بررسی رنگ‌پذیری گل شاخه بریده رز توسط رنگ‌های مصنوعی

سهیلا سادات جغتایی[۱]، علی تهرانی فر [۲]*، عطیه اورعی[۳]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲-استاد گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳-دکترا، گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

* *tehrnifar@um.ac.ir*

چکیده

گل رز گیاهی چندساله است که از نظر اقتصادی ارزش بالایی دارد و دارای ارقام زیادی در سرتاسر دنیا می‌باشد. رنگ گل یکی از فاکتورهای کیفی مهم در بحث بازارپسندی و جلب نظر مخاطب می باشد. همچنین عمر پس از برداشت مهم‌ترین مسئله مورد توجه گل‌های شاخه بریده است که بالا بودن عمر یکی از نشانه های مرغوبیت و محبوبیت گل شاخه بریده در نظر گرفته می شود. توجه به این دو فاکتور برای گل‌هایی مانند رز که جزو اصلی‌ترین و پرطرفدارترین گل‌های شاخه بریده در دنیا می‌باشد از اهمیت ویژه ای برخوردار است. امروزه سعی بر این است که روش‌هایی برای ایجاد تنوع رنگی و بالابردن کیفیت پس از برداشت گل‌های شاخه بریده به کار برده شود. عمر پس از برداشت گل های شاخه بریده که توسط رنگ های مصنوعی رنگ شده اند بیشتر مورد توجه است زیرا در کنار ایجاد رنگ جدید، باید مسئله عمر پس از برداشت هم در نظر گرفته شود. از کتاب‌ها، پایان نامه‌ها و مقالات و پژوهش‌های پیشین به عنوان منابع استفاده شدند. مطالعات از سال‌های ۱۹۸۶ تا ۲۰۲۱ در زمینه گیاه‌شناسی، تولید گل رز، رنگ گل، عمر پس از برداشت، انواع رنگزا و عوامل مؤثر بر رنگ‌پذیری گل‌ها در این مقاله مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به اینکه یکی از مهمترین عامل های موثر در بازاریابی گل‌های شاخه بریده رنگ آن ها می باشد، بنابراین تلاش در جهت ایجاد تنوع رنگی و ایجاد طیف های جدیدی از رنگ صورت می گیرد و از آنجایی که امروزه استفاده از روش‌های اصلاحی مستلزم صرف وقت و هزینه بالایی می‌باشد، لذا استفاده از رنگ‌های مختلف مصنوعی علاوه بر تنوع، در افزایش درآمدزایی تولیدکنندگان نیز مؤثر است. استفاده از رنگ ها، روشی آسان، سریع، مقرون به صرفه، کارآمد در صنعت پرورش گل و گیاهان زینتی می باشد که نیاز به تکنولوژی خاصی ندارد.

واژه‌های کلیدی: عمر پس از برداشت، رنگ گل، مواد رنگزا، گل‌های شاخه بریده

۱.مقدمه

۱-۱-گیاه‌شناسی گل رز

رز (Rosa hybrid L.) گیاهی از خانوادهٔ گل‌سرخیان می‌باشد(Anderson, 2006) و تمامی رزها متعلق به خانواده Rosaceae هستند. رزها بومی مناطق نیمکرهٔ شمالی هستند که عمدتاً در نواحی مرطوب پرورش داده می‌شوند,(Esselink et al., 2003). در این خانواده حدود ۱۰۷ جنس و ۳۱۰۰ گونه وجود دارد. حدود ۷۰ جنس از خانواده رز به عنوان گیاهان زینتی، خوراکی و دارویی معرفی شده‌اند. جنس رز حدود ۱۴۰ گونه دارد که بیش از ۲۰۰۰۰ کولتیوار آن نتیجه دورگ‌گیری و انتخاب گونه‌های جدید می‌باشند. ۹۵ گونه از رزها منشأ آسیایی، ۱۸ عدد منشأ آمریکای شمالی و مابقی از اروپا و آفریقا منشأ گرفته‌اند. در نیمکره جنوبی هیچ رزی به شکل بومی وجود نداشته است (قاسمی قهساره و کافی، ۱۳۸۹).

۱-۲-اهمیت تولید گل رز در ایران

گل رز یکی از مهم‌ترین گل‌های شاخه بریده دنیا محسوب (Hasanzadeh-Naemi et al., 2021) و در حال حاضر، حدود ۴۰ درصد از کل گل‌های بریدنی در ایالت متحده آمریکا را به خود اختصاص داده و در کشورهای دیگر نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Acquaah, 2002). رزها گل‌های بسیار ارزشمندی می‌باشند و در تولید محصولات دارویی، آرایشی و عطری و صنایع غذایی کاربرد فراوانی دارند. تولید گیاهان زینتی به‌ویژه گل‌های شاخه بریده در دهه اخیر در جهان رشد چشمگیر و قابل‌توجهی داشته است (Fang et al., 2021). تعیین شرایط پرورش این گل ها که در هوای آزاد یا گلخانه باشد بسته به نوع گیاه، شرایط آب‌وهوایی، زمان رسیدن گل و یا سایر عوامل می‌باشد. کشور ایران به دلیل برخوردار بودن از تنوع اقلیمی مناسب قابلیت این را دارد که در سطح بین‌المللی، یکی از تولیدکنندگان مهم گل‌وگیاه باشد. باوجوداینکه ایران هفتمین کشور تولیدکنندهٔ گل دنیاست، اما در جایگاه ۱۱۷ از نظر صادرات و رتبهٔ ۱۰۷ در بین کشورهای تولیدکننده قرار دارد و به دلیل همین جایگاه نامناسب در زمینهٔ صادرات، سهم اندکی را از صادرات جهانی گل‌وگیاه زینتی برای کشورمان به وجود آورده است. از پتانسیل‌های برجستهٔ کشور، تولید گیاهان زینتی می‌باشد و علت این امر برخورداری ایران از تنوع آب‌وهوایی مناسب، نیروی کار مناسب، میزان نور کافی، منابع انرژی مناسب و نزدیکی به بازارهای مصرف می‌باشد(کامیاب ، ۲۰۱۶). در تولید رزهای شاخه بریده نور و دما نقش مهم‌تری داشته و تولید محصول باکیفیت مناسب در شرایط نور زیاد و دمای خنک قابل حصول است. در حال حاضر بیشتر تولیدکنندگان گل رز در استان‌های تهران، مرکزی، اصفهان و خوزستان متمرکز هستند(عظیمی و نصیری، ۱۳۸۹).

۱-۳-عمر پس از برداشت گل‌های شاخه بریده

مرحله‌ی پس از برداشت در گل‌های شاخه بریده، دوره‌ای است که از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. در واقع مهمترین هدف در تولید گل‌های شاخه بریده، ارزش زینتی هر گل می‌باشد و با توجه به مدت زمان نگهداری گل در دست مصرف کننده ارزش‌گذاری می‌گردد(Fanouraki et al., 2021). عمر گلجایی فاکتور مهم به‌منظور بررسی کیفیت گل شاخه بریده در بازارهای داخلی و خارجی می‌باشد. ازلحاظ تجاری به بازه‌ی زمانی بین برداشت محصول تا پیری و تغییر شکل گل شاخه بریده، عمر پس از برداشت گفته می‌شود. دوام گل‌های بریده یکی از مهمترین معیارهای کیفی و شاخصی مهم برای ارزیابی گونه‌ها و ارقام جدید محسوب می‌شود (Li et al., 2021). از جمله عواملی که روی عمر پس از برداشت گل تاثیرگذار می‌باشند می‌توان هورمون‌های گیاهی، بیماری‌ها و آفات، نحوه‌ی برداشت، شیوه‌ی انتقال، محلول گلجای، رطوبت نسبی انبار، کیفیت هوای انبار، شدت و کیفیت نور انبار، دمای انبار، مواد غذایی مصرفی در زمان رشد را نام برد. علاوه بر اینکه در طی انتقال، انبارداری و فروش، عمر پس از برداشت تحت تأثیر قرار میگیرد، شرایط پیش از داشت و برداشت نیز تاثیرگذار می‌باشند محسوب (Hasanzadeh-Naemi et al., 2021) و(Nguyen ,.2020 et al). انسداد انتهای ساقه و آوندهای چوبی توسط میکروب‌ها، انسداد فیزیولوژیک و وجود هوا در آوندهای چوبی، عمر پس از برداشت

گل های بریده را تحت تأثیر قرار می‌دهند که این امر باعث عدم جذب آب یا ترشح آنزیم‌های خارج سلولی می‌گردد که می‌تواند عامل تخریب دیواره ی سلولی لوله های آوندی باشد(Damunupola et al., 2010). همچنین به علت ذخیره‌ی کم کربوهیدرات، تولید اتیلن زیاد عاملی برای کاهش عمر گل های شاخه بریده می‌باشد (Baron et al., 2021). طول عمر گل‌ها مربوط به عوامل ژنتیکی آنها بوده و در میان رقم‌های یک گونه نیز تفاوت معنی‌داری وجود دارد. اختلاف در طول عمر رقم‌های مختلف گل‌های بریدنی با قطر و سفتی ساقه آنها همبستگی دارد. ساقه‌های گل ضخیم‌تر، از خم شدن و شکستگی مصون مانده و ذخیره کافی برای تنفس گل‌ها را دارا می‌باشند و بنابراین دوام این نوع گل‌ها بیشتر است. این اختلافات همچنین به آناتومی و فیزیولوژی گیاه بستگی دارد. عوامل محیطی نیز در طول عمر گل ها موثرند (Fanourakis et al., 2013). با به کارگیری روش‌های مدیریت پس از برداشت، می‌توان عمر پس از برداشت کوتاه گل‌های شاخه بریده را بهبود بخشید. پیری طبیعی، عامل اصلی پایان عمر گلجایی گل‌های بریده، نمی‌باشد. پژمردگی به دلیل کاهش جذب آب عامل اصلی آن می‌باشد پژمردگی از علائم تنش آبی محسوب می‌گردد و عمدتاً به دلیل انسداد آوندی ایجاد می‌شود (LE, 2021). دما یکی از موثرترین عوامل در عمر گل‌های شاخه بریده می‌باشد. به منظور کاهش فعالیت‌های فیزیولوژیکی و تخریب‌های پاتولوژیکی گل‌های شاخه بریده، کاهش دما راهکاری موثر می‌باشد (Jahnke et al., 2020) .

۱-۴-رنگدانه‌های گیاهی

دو نوع رنگدانه اصلی در گیاهان وجود دارد که شامل فلاونوئیدها و کارتنوئیدها است. فلاونوئیدها دامنه ای از رنگ‌های زرد تا قرمز و آبی را ایجاد می‌نماید. مولکول‌های فلاونوئید، آنتوسیانین‌هایی هستند که مشتقات گلیکو سیلیت شده ازدلفینیدین (ایجاد رنگ آبی)، سیانیدین (ایجاد رنگ قرمز)، پلارگونیدین (ایجاد رنگ قرمز آجری)، مالویدین و پتونیدین می‌باشند. این رنگدانه‌ها در واکوئل سلول واقع شده‌اند.کارتنوئیدها رنگدانه‌ای برای ایجاد رنگ زرد تا نارنجی درگل‌ها می‌باشند (Okitsu et al., 2018). رنگ گل‌ها در اثر توانایی آنها برای بیوسنتز رنگدانه‌ها ایجاد می‌گردد. رنگ گل‌ها در اثر رنگدانه‌ها همراه با فلاونوئیدهای بی‌رنگ، کمپکس‌های فلزی، گلیکوسیلاسیون، آسیلاسیون، متیلاسیون و همچنین pH واکوئلی، بوجود می‌آید (Stavenga et al., 2021).

۱-۵-شاخص رنگ گل

رنگ گل یکی از شاخص‌های مهم کیفی و ظاهری گل شاخه بریده در عمر پس از برداشت بوده و از عوامل مؤثر و مهم در زمینه بازاریابی گل‌های شاخه بریده و گیاهان زینتی به حساب می‌آید. شاخص رنگ یکی از عوامل مهمی از دیدگاه اصلاحگران می‌باشدکه سبب تمایز رقم‌ها از یکدیگر می‌شود (Gi et al., 2015). با این وجود، به منظور ایجاد رنگ در گل شاخه بریده از طریق روش‌های مختلف اصلاحی نیاز به هزینه‌ی بالا، تکنولوژی‌های خاص و صرف زمان زیادی می‌باشد. افزایش تقاضا برای تولید گیاهان زینتی نشان دهنده ضرورت بکارگیری روش‌های جایگزین به‌منظور افزایش تنوع و بهبود عملکرد این گیاهان است. رنگ گل یکی از ویژگی‌های مهم در صنعت گل و گیاهان زینتی است (رجبی ،۱۳۹۷). همچنین یکی از صفات مهم مورد توجه مصرف کنندگان گل‌های شاخه بریده نیز به شمار می‌آید. ایجاد تنوع در رنگ گل‌های شاخه بریده از طریق دورگ گیری و جهش انجام شده است (Su et al., 2021).

۲.مواد و روش ها

۲-۱-انواع رنگزاهای مورد استفاده در رنگ‌پذیری گل‌های شاخه بریده

۲-۱-۱-رنگ‌های طبیعی

رنگ‌های طبیعی از اندام‌های هوایی (برگ، ساقه، پوست ساقه، گل و میوه) و زمینی (ریزوم، ریشه، پوست ریزوم و ریشه، پیاز و ...) گیاهان در مراحل فنولوژی و شرایط اقلیمی متفاوت به دست می‌آیند. گیاهانی همچون کلم، خانواده مرکبات، اسفناج، گل رز، چغندر خاصیت رنگ‌دهی دارند(Jaffer et al., 2019). رنگزاهای طبیعی که از محصولات مختلف استخراج می‌شوند شامل کارتنوئیدها،

بتالائین‌ها، فلاونول‌ها، چالکون‌ها، آئرون‌ها و آنتوسیانین‌ها می‌باشند (Chen, 2009). ساخت رنگ‌های خوراکی مصنوعی، باعث کاهش استفاده از رنگ‌های طبیعی گردیده است. زیرا رنگ‌های طبیعی فاقد توانایی لازم جهت ایجاد طیف‌های مختلف از رنگ هستند و از طرفی اکثرا فاقد مقاومت در برابر حرارت و نور می‌باشند. رنگ‌های طبیعی نسبت به رنگ‌های مصنوعی، از قدرت رنگ‌کنندگی کمتری برخوردار هستند و به تغییرات pH، نیز حساس هستند(Chávez et al., 2019) و همین امر باعث شده کاربرد آنها مشکل‌تر از رنگ‌های مصنوعی باشد. همچنین علت دیگر این است که می‌توانند با موادغذایی یا با یکدیگر واکنش دهند(Hamdy et al., 2021) . رنگ‌های زرد، نارنجی یا قرمز از کاروتنوئیدها ساخته می‌شوند. آنتوسیانین‌ها و ترکیبات وابسته به فلاونوئیدها سازنده رنگ‌های بنفش، قرمز و آبی هستند. ترکیبات آنتوسیانین به pH حساس هستند به طوری که در pH قلیایی به رنگ آبی و در pH اسیدی به رنگ قرمز در می‌آیند (Iwashina et al., 2015). در رژیم غذایی روزانه‌ی انسان‌ها از مقدار زیادی رنگ‌های طبیعی خوراکی استفاده می‌شود. مانند لوتئین و کلروفیل در سبزی‌ها و آنتوسیانین‌ها در بسیاری از میوه‌های قرمز موجود می‌باشند (Dhaduk et al., 2003).

۲-۱-۲-رنگ‌های مصنوعی

رنگ‌های مصنوعی از نظر قدرت رنگ آمیزی دارای استاندارد می‌باشند همچنین خلوص شیمیایی بسیار بالایی دارند. این رنگ‌ها در آب محلول می‌باشند و در برخی ترکیبات که مقادیر زیاد هیدروژن دارند، مانند پروپیلن گلیکول نیز حل می‌گردند. ارتباط مستقیم بین مقدار رنگ شیمیایی موجود در آنها و قدرت رنگ آمیزی آنها برقرار است. این رنگ‌ها به شکل‌های پودری، ژله ای ،خمیری، دانه ای و محلول به بازار عرضه می‌شوند(Sigurdson et al., 2017). ترکیبات آزو در دسته آروماتیک ها و آلوفاتیک ها قرار می گیرند و اکثر ترکیبات آزو رنگی می‌باشند و در تولید جوهرها و رنگ‌ها استفاده می‌شوند. این ترکیبات مشتق شده از دیازن هستند. از نظر شیمیایی این رنگ‌ها معروف به رنگ‌های کاتیونی می‌باشند که، به شکل نمک هستند و جزو اولین رنگ‌های مصنوعی می‌باشند (کامیاب، ۲۰۱۶). امروزه، در صنایع غذایی به طور گسترده از رنگ‌های محلول در آب جهت تولید مواد غذایی استفاده می‌گردد. به طور معمول رنگ‌های خوراکی در مخلوط‌ها با یکدیگر سازگار می‌باشند و ازجنبه اقتصادی، پایداری و سازگاری با محیط مناسب هستند(زاده باقری و نماینده ، ۱۳۸۹) و (سهی زاده ابیانه ، ۱۳۸۰).

۲-۱-۳-رنگ‌های خوراکی

رنگ‌های خوراکی به دو گروه رنگ‌های خوراکی طبیعی از جمله فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، کاروتنوئیدها و غیره و رنگ‌های خوراکی سنتزی تقسیم بندی می‌شوند. رنگ‌های خوراکی سنتزی توسط انسان تولید می‌گردند و در طبیعت موجود نمی‌باشند.کاربرد این دسته از رنگ‌ها در غذاها و داروها می‌باشد و جزو تنها رنگ‌های خوراکی طبیعی مجاز جهت استفاده در غذا می‌باشد(Stich ,2016). در سال ۱۹۶۰، رنگ‌های سنتزی از اتحادیه‌ی غذا و داروی ایالات متحده‌ی آمریکا مجوز استفاده به‌عنوان افزودنی مجاز را دریافت کرده است (Lim, 2012). در موادغذایی و نوشیدنی‌ها از رنگ‌های خوراکی استفاده می‌شود تا باعث بهبود رنگ و اشتها برانگیزتر شدن آنها گردند. علاوه بر اینکه این افزودنی‌ها باعث ایجاد رنگ جدید یا بهتر کردن رنگ طبیعی می‌گردند، می‌توانند از رنگ اصلی یک ماده ی غذایی و یا نوشیدنی در مقابل اثرات نور و دما محافظت کنند. به طور معمول تولید رنگ‌های خوراکی برپایه ی مواد شیمیایی می‌باشد (De Mejia et al., 2020).

۳.نتایج و بحث

۳-۱-رنگ‌پذیری گل‌های شاخه بریده

در سال‌های اخیر اقداماتی در جهت ایجاد رنگ‌های جدید در گل‌های زینتی توسط اصلاحگران از طریق کاربرد تکنیک‌های جدید اصلاحی صورت گرفته است (Sigurdson et al., 2017). از آنجایی که این روش‌ها نیاز به زمان طولانی و هزینه زیادی دارد بنابراین مستلزم کاربرد روشی کم هزینه و آسان است. به منظور ایجاد رنگ‌های جدید در گل‌های شاخه بریده به کارگیری رنگزاهای مختلف

خوراکی و صنعتی روشی کاربردی می‌باشد(باباربیع و همکاران، ۱۳۹۵). امروزه، ایجاد رنگ‌هایی که در حالت طبیعی در گل‌ها وجود ندارد دارای اهمیت تجاری خاصی می‌باشد (رجبی ،۱۳۹۷). بنابراین از آنجا که برخی از رنگ‌ها مانند آبی، سبز و... در گل شاخه بریده رز به طور طبیعی وجود ندارد، برخی از تولیدکنندگان گل و گل فروش‌ها، با روش‌هایی، گل‌ها را پس از برداشت، درون محلول‌های رنگی قرار می‌دهند. البته ایجاد رنگ آبی در گل رز توسط بهنژاد گران ژاپنی انجام گرفته است اما هنوز در ایران تولید گلی با این رنگ گزارش نشده است. استفاده از رنگ‌ها همچنین می‌تواند به‌منظور تشدید گل‌هایی با رنگ کم رنگ استفاده گردد. مانند گل میخک زرد کمرنگ، گل رز صورتی و غیره... در بعضی موارد می‌توان با استفاده از رنگ‌های مصنوعی، رنگ‌های طبیعی را نیز اصلاح کرد. در طرح‌های تزئینی که رنگ خاصی انتخاب می‌شود، می‌توان از این روش برای تولید گل‌ها استفاده کرد یا در بعضی موارد که تقاضا برای گل‌هایی با رنگ خاص باشد، می‌توان گل‌هایی با رنگ مصنوعی از گل‌های سفید را تولید نمود (باباربیع و همکاران، ۱۳۹۵). استفاده از رنگ‌های مصنوعی یا طبیعی به منظور رنگ آمیزی گل‌های سفید در بالا بردن ارزش این گل‌ها و کسب درآمد بیشتر تاثیرگذار است. همچنین برای افزایش جذابیت و زیبایی که در نتیجه تنوع بالای رنگی ایجاد می‌شود، اثرگذار است. داشتن گل‌هایی با عمر گلجایی بیشتر و با طیف متفاوت از رنگ‌های آبی، قرمز، زرد و یا سایر رنگ‌ها به جای گل‌های سفید برای مصرف کننده اهمیت زیادی دارد. تولیدکنندگان با دانستن تکنولوژی رنگ کردن مصنوعی گل می‌توانند نسبت به گل‌های سفید، محصولی با قیمت و کیفیت بالاتر به مصرف کننده، ارائه دهند(Su et al., 2021).

کاربرد عملی استفاده از رنگ‌ها به صورت مصنوعی در گل‌های شاخه بریده چندین سال است که رونق یافته است. با این حال، عوامل مختلف درونی و بیرونی (محیطی) در رنگ‌پذیری گل‌های شاخه بریده موثر هستند. از جمله این عوامل می‌توان نوع رنگ، غلظت رنگ، شرایط محلول رنگزا (دما، pH و غیره)،شرایط محیطی محل رنگ‌پذیری، گونه‌ی گیاهی، فیزیولوژی گل در زمان برداشت و غیره را نام برد. طبق بررسی‌های انجام شده، شدت رنگ در گل تحت تأثیر شرایط محیط و مدت زمان تیمار با رنگزا قرار میگیرد. شدت درجه رنگ در گل با توجه به مدت زمان قرارگیری در محلول و غلظت افزایش می‌یابد (Patil, and Patil, 2008). میزان تعرق یکی دیگر از عوامل موثر می باشد به این ترتیب که با کاهش عرض لوله‌های آوندی وافزایش میزان تعرق، سرعت رنگ‌پذیری افزایش پیدا می‌کند، زیرا سیستم آوندی فشرده (باریک و کوتاه) توانایی بیشتری در بازگردانی آوندهای مسدود به حالت اولیه نسبت به آوندهای عریض و بلند دارند. اندازه ذره‌ای محلول‌های رنگی نیز در رنگ‌پذیری در نظر گرفته می‌شود. محلول‌هایی که دارای ذرات ریز معلق هستند و ناهمگن می‌باشند باعث تغییر رنگ برگ‌ها و گلبرگ‌ها نمی‌شوند. رنگ‌های دارای مواد معلق را برای رنگ‌کردن گل‌ها نمی‌توان استفاده نمود به دلیل اینکه باعث انسداد آوند های چوبی شده و مانع انتقال رنگ به گلبرگ‌ها می‌گردد Hideg et). (al., 2013 میزان رنگ‌پذیری با زمان رنگ آمیزی و دما همبستگی دارد و افزایش دما و قرار گرفتن طولانی درون محلول رنگزا باعث افزایش شدت رنگ‌پذیری می‌شود. به طوریکه دمای بالا شدت رنگ‌پذیری را در گل افزایش می‌دهد(Lourdusamy et ، 2002) .alنگهداری گل‌ها در آب، قبل از رنگ‌آمیزی باعث کاهش سرعت رنگ‌آمیزی و مشاهده ی صعود رنگ در ساقه و گلبرگ‌ها می‌گردد نسبت به گل‌هایی که چندین ساعت تحت تنش آبی قرار داشته اند. در واقع گل‌هایی که تحت تنش آبی قرار می‌گیرند، صعود رنگ سریعتری خواهند داشت. جذب رنگ در ساقه‌های علفی مانند میخک با سرعت بیشتری نسبت به ساقه‌های چوبی مثل رز صورت می‌گیرد(مدرس ، ۱۳۸۷). آوند چوبی در عملیات رنگ آمیزی اهمیت زیادی دارد زیرا از طریق ساقه به هر بخشی گیاه مانند برگ و گل و سایر سلول‌ها منتشر می‌گردد، بنابراین محافظت از آن باید به خوبی صورت گیرد تا رنگ‌پذیری به بهترین شکل انجام شود. استفاده از آبگرم، راهکاری به منظور بهبود میزان جذب آب، می‌باشد. هنگام آماده کردن گل‌ها برای رنگ‌آمیزی، می توان به دو روش عمل کرد الف) قرار دادن برش انتهای ساقه داخل آبگرم ب) فرو بردن ساقه ها به مدت ۵ ثانیه داخل آب جوش. این عمل به منظور

جلوگیری از تشکیل و ورود حباب‌های هوا به درون ساقه و ایجاد اختلال در عملکرد هیدراسیون آوند چوب می‌باشد(Hideg et al., 2013) و (Van Doorn et al., 2000).

منابع

۱- باباربیع م.، زارع ح و خیشه ز، ۱۳۹۵. بررسی عمر ماندگاری گل شاخه بریده رز سفید در اثر رنگ کردن گل با استفاده از رنگ های طبیعی و شیمیایی، نشریه کارافن، ۳۹: ۶۲-۶۹.

۲- رجبی ا،۱۳۹۷. تغییر در رنگ گلبرگ گیاه زینتی بنفشه آفریقایی(*Saintpaulia ionantha*) از طریق دست ورزی ژنتیکی ژن های درگیر در مسیر بیوسنتزی رنگدانه، رساله دکتری، دانشگاه زابل.

۳- زاده باقری م و نماینده آ، ۱۳۸۹. تأثیر تیمار نبضی و پیوسته محلول های نگهدارنده شیمیایی بر افزایش کیفیت و عمر پس از برداشت گل شاخه بریده ی میخک. مجله ی دانش نوین کشاورزی، انتشارات دانشگاه شیراز.

۴- سهی زاده ابیانه م، ۱۳۸۰. تکمیل فراورده های نساجی و رنگرزی- الیاف پروتئینی، انتشارات آرون، تهران.

۵- عظیمی،م و نصیری،م. ۱۳۸۹. تولید تجاری رز شاخه بریده(سیستم خاکی و هیدروپونیک، انتشارات آموزش و ترویج کشاورزی.

۶- قاسمی قهساره،م و کافی،م. ۱۳۸۹ . گلکاری علمی و عملی مرکز نشر جهاد دانشگاهی، اصفهان.

۷- کامیاب ف، ۲۰۱۶. تأثیر پلی آمین های مختلف بر عمر گلجایی، تولید اتیلن و برخی خصوصیات فیزیولوژیکی گل میخک رقم"رد کورسا" مجله به زراعی کشاورزی، انتشارات دانشگاه تهران.

۸- مدرس ب، ۱۳۸۷. پایان نامه اثر ۱-متیل سیکلوپروپن بر افزایش عمر انبارمانی و قفسه ای میوه توت فرنگی.

Acquaah, G., 2002. “Horticulture, principles and practices”, Pearson education, Singapore, p. 787. 9-

10- Anderson, N.O., 2006. Flower breeding and genetics, Issues, challenges and opportunities for the 21 century, Netherlands, p.

11- Baron, F., Mendoza, R., Melo, S. E., Clavijo, J., and Castellanos, D. A., 2021. Evaluation and representation of ethylene effect on vase life and quality of rose (*Rosa hybrida*) cv. Vendela. Acta Physiologiae Plantarum, 43(12), 1-

12- Chávez, L. A. C., García-Barrientos, R., Ortega, L. E. G., Garcia, O. D., and Alvarado, M. I. E., 2019. Natural vs Synthetic Colors, In Flavonoids-A Coloring Model for Cheering up Life, IntechOpen.

13- Chen, Y. P., 2009. Response of antioxidant defense system to laser radiation apical meristem of Isati indigotica seedlings exposed to UV-B. Plant sig naling & behavior .4:57.573-1.

14- Damunupola, J.W.; Qian, T., Muusers, R., Joyce, D.C., Irving, D.E., and Van Meeteren, U., 2010. Effect of s-carvone on vase life parameters of selected cut flower and foliage species. Postharvest biology and technology, 55, 66-69.

15- De Mejia, E. G., Zhang, Q., Penta, K., Eroglu, A., and Lila, M. A., 2020. The colors of health: Chemistry, bioactivity, and market demand for colorful foods and natural food sources of colorants. Annual review of food science and technology, 11, 145-182.

16- Dhaduk, B. K., and Naik, D. K., 2003. Effect of different edible dyes on flower colouring of tuberose (*Poliantes tuberosa L.*) cvs. Single Local and Double Local. Symposium of Indian Floiculture in New millennium, Aug 10. Gujarat Agricultural Univercity. New Delhi. India. 341-343.

17- Esselink, .G., Smulders, .M., and Vosman, .B., 2003. Identification of cut rose (*Rosa hybrida*) and rootstock varieties using robust sequence tagged microsatellite site markers. Theor Appl *Genet* 106, 277–286.

18- Fang, H., Wang, C., Wang, S., and Liao, W., 2021. Hydrogen gas increases the vase life of cut rose ‘Movie star’by regulating bacterial community in the stem ends. Postharvest Biology and Technology, 181, 111685.

19- Fanourakis, D., Papadopoulou, E., Valla, A., Tzanakakis, V. A., and Nektarios, P. A., 2021. Partitioning of transpiration to cut flower organs and its mediating role on vase life response to dry handling: A case study in chrysanthemum. Postharvest Biology and Technology, 181, 111636.

20- Nguyen, T. K., Jung, Y. O., and Lim, J. H., 2020. Tools for Cut Flower for Export: Is It a Genuine Challenge from Growers to Customers. *28*(4), 241-249.

21- Fanourakis, D., Pieruschka, R., Savvides, A., Macnish, A. J., Sarlikioti, V., and Woltering, E. J., 2013. Sources of vase life variation in cut roses: a review. Postharvest Biology and Technology, 78, 1-15.
22- Gi, G. Y., Lee, J. S., Cho, K. C., Lee, Y. S., Yun, B. K., and Han, T. H., 2015. Breeding of A New Rose Cultivar 'Red Ball'with Light Red Color Flower and Resistance to Powdery Mildew. Trends in Agriculture & Life Sciences, 50, 15-20.
23- Hamdy, D. M., and Hassabo, A. G., 2021. Various Natural Dyes from Different Sources. Journal of Textiles, Coloration and Polymer Science, 18(2), 171-190.
24- Hasanzadeh-Naemi, M., Jari, S. K., Zarrinnia, V., and Fatehi, F., 2021. The effect of exogenous methyl jasmonate and brassinosteroid on physicochemical traits, vase life, and gray mold disease of cut rose (Rosa hybrida L.) flowers. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 20(7), 467-475.
25- Hideg, E., Jansen, M. A.,. and Strid, A., 2013. UV-B exposure, ROS, and stress: inserparable compainions or loosely linked associates. Trends Plant Sci. 18: 107-115.
26- Iwashina, T., 2015. Contribution to flower colors of flavonoids including anthocyanins: a review. Natural product communications, *10*(3), 1934578X1501000335.
27- Jaffer, M., Shaheen, S., Ashraf, H., and Hanif, U., 2019. Green vegetation: A promising source of color dyes. Green Processing and Synthesis, 8(1), 215-222.
28- Jahnke, N. J., Dole, J. M., Livingston III, D. P., and Bergmann, B. A., 2020. Impacts of carbohydrate pulses and short-term sub-zero temperatures on vase life and quality of cut Paeonia lactiflora Pall. hybrids. Postharvest Biology and Technology, 161, 111083.
29- LE, N., 2021. Antiaging and Antibacterial Efficiency of copper ion on cut rose vase life *(Rosa L. hybrida*). Authorea Preprints.
30- Li, L., Yin, Q., Zhang, T., Cheng, P., Xu, S., and Shen, W., 2021. Hydrogen nanobubble water delays petal senescence and prolongs the vase life of cut carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers. Plants, 10(8), 1662.
31- Lim, T. K., 2012. Edible medicinal and non-medicinal plants. Springer. Dordrecht.
32- Lourdusamy D. K.,, Vadivel, E., and Manavalan, R. S. A., 2002. Studies on dyeing of globe amaranth (*Gomphrena globosa*) for dry fiower decoration. South Indian Ho rt. 50:645-648.
33- Okitsu, N., Noda, N., Chandler, S., and Tanaka, Y., 2018. Flower color and its engineering by genetic modification. In Ornamental Crops (pp. 29-62). Springer, Cham.
34- Patil, S. D., and Patil, M. E., 2008. Value addition of candytuft (*Iberis umbellata* L.) cut flowers coloured with edible dyes. Asian Journal of Bio . Science. 3(1), pp.163-167.
35- Sigurdson, G. T., Tang, P., and Giusti, M. M., 2017. Natural colorants: Food colorants from natural sources. Annual review of food science and technology, 8, 261-280.
36- Stavenga, DG., Leertouwer, HL., Dudek, B., and van der Kooi, CJ., 2021. Coloration of Flowers by Flavonoids and Consequences of pH Dependent Absorption. Front. Plant Sci. 11:600124.
37- Stich, E., 2016. Food color and coloring food: quality, differentiation and regulatory requirements in the European Union and the United States. In Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages (pp. 3-Woodhead Publishing.
38- Su, M., Damaris, R. N., Hu, Z., Yang, P., and Deng, J., 2021. Metabolomic Analysis on the Petal of 'Chen Xi'Rose with Light-Induced Color Changes. Plants, 10(10), 2065.
39- Van Doorn, W. G., and Cruz, P., 2000. Evidence for a Wounding-induced Xylem Occlusion in Stems of Cut Chrysanthemum Flowers. Postharvest Biol, Tec, 19(1), pp.73-83.

Investigation of the effect of zinc on yield and yield components of soybean (Glycin max L.) under water stress

G. Sanchooli1,A. Nakhzari moghaddam[2], A. Biabani[3].H. Kouhkan[4]

1. Master student of Agroecology, Department of Agriculture, Faculty of Plant Production, Gonbad Kavous Universit[y1]

2,3- Assistant Professor and Associate Professor, Department of Agriculture, Faculty of Plant Production, Gonbad Kavous University, respectively

4. PhD student in Agrotechnology, Department of Agriculture, Faculty of Plant Production, Gonbad Kavous University

Email address :ghorbansanchooly@gmail.com

Abstract

This study was performed to investigate the effect of zinc element in low irrigation conditions on yield and yield components of soybeans. Done in 2021. The main factor is the number of irrigations in ۳levels including one-time irrigation (flowering stage), two-time irrigation (flowering and podding) and three irrigations (flowering, podding and seed filling) and the secondary factor of zinc at four levels including zinc seed at planting time. Zinc foliar application at flowering stage was the combined use of zinc seeds and zinc solution and no zinc consumption (control). To determine the yield and yield components, ۲square meters of each plot was harvested at full maturity. After transferring the samples to the plant, the plant height, number of pods per plant, number of seeds per plant, number of seeds per pod, ۱۰۰۰-seed weight, biological yield, harvest index and grain yield per unit area were determined. The results of analysis of variance of yield and grain yield components showed the simple effects of irrigation and zinc on the number of pods per plant, number of seeds per pod, number of seeds per plant, ۱۰۰۰-seed weight, biological yield, harvest index and grain yield at ۱٪probability level. Became meaningful. The results of grain yield showed that the highest average irrigation effect belonged to three irrigation treatments (۳۸۶۹/۲kg / ha) at the time of flowering, podding and grain filling and the lowest average (۲۲۵۶/۱kg / ha) related to one stage of irrigation at the time of flowering. Was. Simple effect of different methods of zinc application The highest average grain yield (۳۷۳۹/۴kg / ha) belonged to the combined use of seed and foliar application of zinc and the lowest average (۲۵۷۰/۹kg / ha) belonged to the non-use of zinc fertilizer (control) . Seed yield had the highest positive and significant correlation with the number of seeds per plant (۰/۹۸) at the level of one percent probability.

Keywords: Soybean, Irrigation deficiency, Zinc fertilizer, Grain yield, Yield components

بررسی اثر عنصر روی بر عملکرد و اجزای عملکرد سویا تحت اثر تنش کم‌آبی

قربان سنچولی*[۱]، علی نخزری مقدم[۲]، عباس بیابانی[۳]، حمید کوهکن[۴]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد اگرواکولوژی، گروه کشاورزی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه گنبد کاووس

۲و۳- به ترتیب استادیار و دانشیار، گروه کشاورزی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه گنبد کاووس

۴- دانشجوی دکتری اگروتکنولوژی، گروه کشاورزی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه گنبد کاووس

Email address: ghorbansanchooly@gmail.com

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی اثر عنصر روی در شرایط کم‌آبیاری بر عملکرد و اجزای عملکرد سویا، آزمایش به صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در روستای حکیم آباد از توابع شهرستان علی آباد کتول در سال زراعی ۱۳۹۹ انجام شد. عامل اصلی تعداد دفعات آبیاری در ۳ سطح شامل یک‌مرتبه آبیاری (مرحله گل‌دهی)، دومرتبه آبیاری (گل‌دهی و غلاف‌دهی) و سه مرتبه آبیاری (گل‌دهی، غلاف‌دهی و پرشدن دانه) و عامل فرعی عنصر روی در چهار سطح شامل بذر مال روی در زمان کاشت، محلول‌پاشی روی در مرحله گل‌دهی، استفاده توأم بذر مال و محلول روی و عدم مصرف روی (شاهد) بود. برای تعیین عملکرد و اجزای عملکرد سطحی معادل ۲ مترمربع از هر کرت در مرحله رسیدگی کامل برداشت شد. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه ارتفاع بوته، تعداد غلاف در بوته، تعداد دانه در بوته، تعداد دانه در غلاف، وزن هزار دانه و عملکرد دانه در واحد سطح مشخص گردید. نتیجه تجزیه واریانس عملکرد و اجزای عملکرد دانه نشان داد اثرات ساده کم‌آبیاری و عنصر روی در صفات تعداد غلاف در بوته، تعداد دانه در غلاف، تعداد دانه در بوته، وزن هزار دانه و عملکرد دانه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. نتایج عملکرد دانه نشان داد بیشترین میانگین اثر آبیاری متعلق به تیمار سه مرتبه آبیاری (۳۸۶۹/۲ کیلوگرم درهکتار) در زمان گل‌دهی، غلاف‌دهی و پر شدن دانه و کمترین میانگین (۲۲۵۶/۱ کیلوگرم در هکتار) مربوط به یک مرحله آبیاری در زمان گل‌دهی بود. اثر ساده روش‌های متفاوت مصرف عنصر روی بیشترین میانگین عملکرد دانه (۳۷۳۹/۴ کیلوگرم در هکتار) متعلق به استفاده توام بذر مال و محلول پاشی روی و کمترین میانگین (۲۵۷۰/۹ کیلوگرم در هکتار) متعلق به تیمار عدم استفاده عنصر روی (شاهد) بود.

کلمات کلیدی: سویا، کم‌آبیاری، کود روی، عملکرد دانه، اجزای عملکرد

۱.مقدمه

سویا با نام علمی (*Glycine max* L.) گیاهی از خانواده لگومینوز، روز کوتاه و گرما دوست است. سویا با ۳۵ درصد پروتئین، ۳۰ درصد کربوهیدرات، از مقادیر مطلوبی فیبر، ویتامین‌ها و مواد معدنی تشکیل شده است (مرادی و سیادت، ۱۳۹۱). ارقام اصلاح شده سویا دارای میزان کمی اسیدهای چرب اشباع می‌باشند. از طرفی میزان بالای اسید اولئیک و میزان کم اسید پالمتیک، اسید استئاریک این ارقام، روغن سویا را تبدیل به روغنی مطلوب و سالم و مناسب مصرف انسان کرده است (بیتر و همکاران، ۲۰۱۷). سهم جهانی سویا در تأمین روغن خوراکی حدود ۴۴ درصد است. با این وجود، تولید این گیاه زراعی در قاره‌های آسیا و آفریقا تنها ۵ درصد از کل تولید جهانی سویا است (فائو، ۲۰۱۶).

در ایران، پس از کلزا، نیشکر، چغندرقند و پنبه بیشترین سطح زیر کشت با ۷/۲ درصد از کل گیاهان صنعتی به سویا اختصاص دارد. سطح زیر کشت سویا در کشور در سال ۱۳۹۹ حدود ۳۹۵۳۷ هزار هکتار برآورد شده و فقط در ۵ استان کشت گردیده است. میزان تولید دانه سویای کشور حدود ۹۱۳۳۵ هزار تن برآورد شده است. سطح زیر کشت و میزان تولید اراضی آبی به ترتیب ۳۵۹۱۶ هکتار و ۸۶۰۲۰ تن بوده و در اراضی دیم نیز ۳۶۲۱ هکتار و ۵۳۱۵ تن برآورد شده است. استان گلستان به‌تنهایی حدود ۹۰ درصد سطح زیر کشت سویا را دارد و استان‌های اردبیل و مازندران نیز در رتبه‌های بعدی قرار دارند. کمترین سطح زیر کشت سویا در بین استان‌های تولیدکننده‌ی این محصول متعلق به استان لرستان بود (فرجی و همکاران، ۱۳۹۱). طی چند دهه اخیر عملکرد سویا در نتیجه تولید و اصلاح ارقام پرمحصول مدام در حال افزایش بوده است. برآوردها نشان می‌دهد که بعد از سال ۱۹۸۰ سهم اصلاح ژنتیکی در افزایش عملکرد سالانه سویا به طور متوسط ۳۰ کیلوگرم در هکتار بوده است (لیو و همکاران، ۱۹۹۹) در مدیریت‌های زراعی اغلب مناطق کشاورزی مراحل زایشی که در تعیین عملکرد دانه نقش بسزایی دارند عبارت‌اند از تشکیل گل، تشکیل غلاف و پرشدن دانه که همهٔ آن‌ها تحت شرایط تنش کم‌آبی قرار می‌گیرند. میزان نقصان عملکرد ناشی از تنش آب به ژنوتیپ، مرحله نمو گیاه و شدت کمبود آب بستگی دارد (کورت و همکاران.، ۱۹۸۳). نتایج کبری و شمسی (۲۰۱۳) در بررسی اثرات تنش کم‌آبی در مرحل زایشی سویا نشان دهنده اثر منفی تنش بر صفات مرتبط با عملکرد هم‌چون تعداد غلاف در بوته، تعداد دانه در غلاف و عملکرد دانه بود. یافته‌های دیگر نیز اثر منفی شدید کمبود آب در طی دوره گلدهی و پر شدن دانه و عملکرد سویا را تایید می‌نماید (قاسمی قلی‌زانی ی و همکاران، ۲۰۱۵).

نتایج شابان و همکاران (۲۰۱۲) نیز نشان داد که محلول پاشی روی در شرایط تنش خشکی، تعداد دانه در غلاف، تعداد غلاف در بوته، وزن صد دانه، عملکرد دانه، درصد پروتئین دانه و عملکرد پروتئین را در گیاه نخود افزایش داد. هدف از مطالعه حاضر مطالعه عنصر روی بر عملکرد و اجزای عملکرد سویا تحت تأثیر تنش کم‌آبیاری است.

۲.مواد و روش‌ها

آزمایش به صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار صورت گرفت. عامل اصلی تعداد دفعات آبیاری در ۳ سطح شامل یک‌مرتبه آبیاری (مرحله گل‌دهی)، دومرتبه آبیاری (گل‌دهی و غلاف‌دهی) و سه مرتبه آبیاری (گل‌دهی، غلاف‌دهی و پرشدن دانه) و عامل فرعی عنصر روی در چهار سطح شامل بذر مال روی (زمان کاشت)، محلول‌پاشی روی (مرحله گل‌دهی)، استفاده توأم بذر مال و محلول روی (در زمان کاشت و گل‌دهی) و عدم مصرف روی (شاهد) بود. زمان کاشت نیمه دوم خرداد و بعد از برداشت محصول گندم بود. قبل از کاشت آبیاری برای سبز شدن یکنواخت و تأمین آب برای رشد اولیه انجام شد. پس از گاورو شدن، مزرعه دو بار دیسک زده شد و کود لازم بر اساس آزمون خاک به مزرعه داده شد و سپس دیسک سوم برای مخلوط کردن خاک با کود زده شد. هر کرت آزمایش شامل پنج خط کاشت با فاصله ۵۰ سانتی‌متر و طول چهار متر بود. فاصله دو بوته از هم ۸ سانتی‌متر بود. برای به‌دست آوردن تراکم مطلوب، در هر کپه سه بذر کاشته شد که

در مرحله چهار برگییک بوته حفظ شد. بذر مال کردن بذور در تیمارهای بذر مال با استفاده از بذر مال روی شرکت آریا شیمی به نسبت یک در هزار صورت گرفت در این بررسی از ترکیب روی ۵۴ درصد استفاده شد. عملیات مبارزه با علف‌های هرز به‌صورت دستی انجام شد. مبارزه با آفات به‌طور یکنواخت در تمامی تیمارها انجام شد. برای تعیین عملکرد و اجزای عملکرد پس از حذف اثرات حاشیه‌ای (فهر و همکاران،۱۹۸۲) سطحی معادل ۲ مترمربع از هر کرت در مرحله رسیدگی کامل که ۹۵ درصد غلاف‌ها زرد و قهوه‌ای رنگ شده‌اند، به‌صورت یک‌جا برداشت شد. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه ارتفاع تک بوته، تعداد غلاف در بوته، تعداد دانه در غلاف، تعداد دانه در بوته، وزن هزار دانه (جهت توزین از ترازوی با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه گیری شد)، عملکرد بیولوژیک و عملکرد دانه در واحد سطح مشخص گردید. تجزیه اطلاعات به‌دست آمده در جداول تجزیه واریانس، مقایسه میانگین‌ها و رسم گراف‌هایی نمایش داده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (سلطانی، ۱۳۸۶) مورد تجزیه قرار گرفت و میانگین صفات مورد بررسی توسط آزمون کمترین تفاوت معنی‌دار محافظت شده LSD در سطح احتمال ۵ درصد، مقایسه‌ی میانگین گردید. در نهایت نمودارها با نرم‌افزار Excel ترسیم شدند

۳.نتایج و بحث

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول-۱) اثر دفعات آبیاری و اثر ساده عنصر روی در اکثر صفات مورد مطالعه از جمله ارتفاع بوته، تعداد غلاف در بوته، تعداد دانه در غلاف، تعداد دانه در بوته، وزن هزار دانه، عملکرد بیولوژیک و عملکرد دانه در بوته در سطح احتمال پنج و یک درصد معنی‌دار بود.

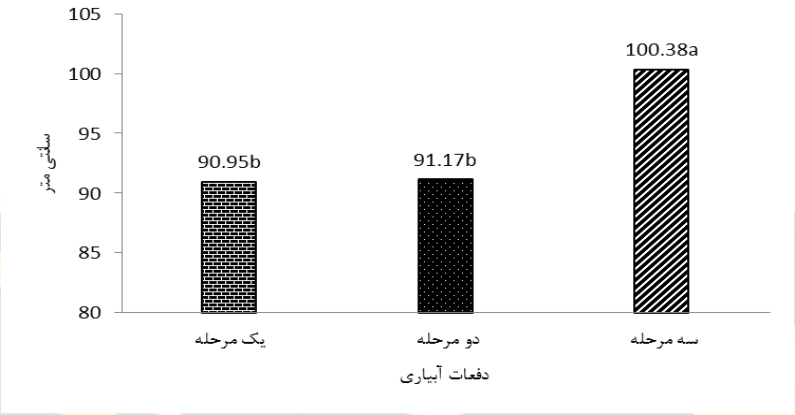
جدول ۱: تجزیه واریانس عملکرد و اجزای عملکرد سویا تحت تاثیر کم آبیاری و عنصر روی

به ترتیب عدم وجود تفاوت معنی دار و معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد بر اساس آزمون LSD.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS					
		ارتفاع بوته	تعداد غلاف در بوته	تعداد دانه در غلاف	تعداد دانه در بوته	وزن هزار دانه	عملکرد دانه
تکرار	2	۱۳/۱۰	۱۰/۹۹	۰/۰۲	۱۵۶/۴۹ n.s	۲/۴۵ n.s	۱۹۸۹۲۱/۶۹
آبیاری	2	۳۴۷/۹۶**	۳۲۳/۷۱ **	۰/۳۶**	۳۸۹۵/۷۵**	۲۷۹۳/۱۶**	۷۸۲۸۹۳۹/۶۹**
خطای اصلی	4	۵۴/۲۶	۲/۸۴	۰/۰۳	۴۱/۶۶	۵۱/۶۱	۹۸۵۰۴/۵۳
روی	3	۳۶/۵۷ n.s	۸۸/۰۵ **	۰/۲۷ **	۱۶۴۴/۶۳**	۵۰۵/۹۱**	۲۶۰۷۳۳۳/۳۶**
آبیاری × روی	6	۳/۱۹ n.s	۲/۴۱ n.s	۰/۰۲ n.s	۴۹/۷۳n.s	۱۱۰/۷۳ n.s	۱۱۴۶۹۴/۳۶
خطای فرعی	۱۸	۳۱/۰۳	۵/۱۵	۰/۰۱	۰/۱۵۰	۴۲/۳۶	۶۹۰۶۱/۳۶
ضریب تغییرات(٪)		۵/۹۲	۶/۷۷	۴/۱۷	۵/۴۷	۴/۰۷	۸/۵۱

۳-۱-ارتفاع بوته

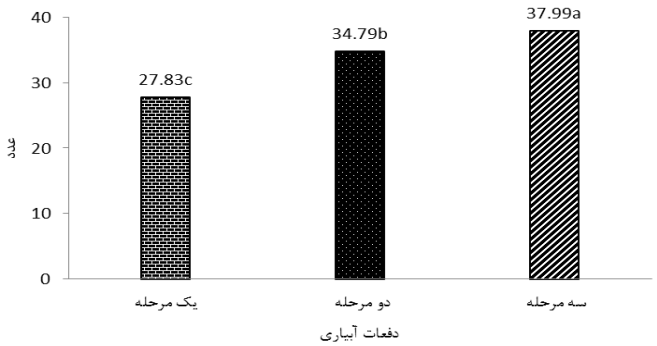
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها مندرج در (جدول -۱) نشان داد اثر دفعات آبیاری از لحاظ آماری در سطح احتمال یک درصد (p<۰/۰۱) معنی‌دار شد. نتایج مقایسه میانگین اثر تعداد دفعات آبیاری به روش حداقل اختلاف آماری (LSD) نشان داد بیشترین ارتفاع بوته (۱۰۰/۳۸ سانتی‌متر) مربوط به سه مرحله آبیاری (گل‌دهی، غلاف‌دهی و پرشدن دانه) و کمترین ارتفاع بوته (۹۰/۹۵ سانتی‌متر) متعلق به یک مرتبه آبیاری (گل‌دهی) بود (شکل -۱). تنش کم‌آبیاری در طی مرحله رشد رویشی ساقه و سلول‌های برگ را کاهش می‌دهد و در نتیجه ارتفاع گیاه کاهش می‌یابد. با توجه به اینکه رشد حاصل تقسیم و توسعه سلول می‌باشد و توسعه سلول نیز حاصل پتانسیل فشاری مطلوب است، لذا رشد بدلیل کم آبیاری بسیار حساس است، بنابر این تحت تنش کم‌آبیاری به دلیل کاهش فشار بر دیواره سلولی، آماس سلول‌ها کاهش یافته و رشد کند و متوقف می‌شود که در چنین شرایطی تنش کم‌آبیای باعث کاهش ارتفاع بوته در تحقیق حاضر مشاهده می‌شود.



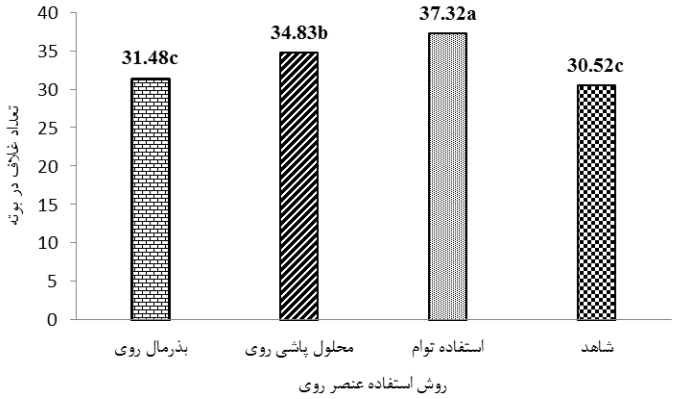
شکل ۱: اثر تعداد دفعات آبیاری بر ارتفاع بوته ($LSD_{0.01}$=۴/۷۸)

۳-۲-تعداد غلاف در بوته

با توجه به نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول۱) اثرات دفعات آبیاری و روش استفاده عنصر روی بر صفت تعداد غلاف در بوته از لحاظ آماری در سطح احتمال یک درصد (p<۰/۰۱) معنی‌دار بود. با توجه به مقایسه میانگین اثر دفعات آبیاری بیشترین تعداد غلاف در بوته (۳۷/۹۹) مربوط سه مرتبه آبیاری (گل‌دهی، غلاف‌دهی و پرشدن دانه) و کمترین (۲۷/۸۳) متعلق به یک مرتبه آبیاری (مرحله گل‌دهی) بود (شکل-۲). بیشترین و کمترین روش مصرف عنصر روی به‌ترتیب مربوط متعلق به تیمار استفاده توام روی (بذر مال و محلول پاشی روی) و عدم مصرف روی (شاهد) به ترتیب (۳۷/۳۲) و (۳۰/۵۲) غلاف در بوته بود (شکل -۳). علت کاهش تعداد غلاف در بوته تحت تنش کم‌آبیاری در این پژوهش ملاحظه گردید. همچنین ریزش شدید گل و غلاف در شرایط تنش آبی در اوایل رشد زایشی نیز از دلایل احتمالی کاهش تعداد غلاف در بوته بود. یکی از اجزاء مهم عملکرد گیاه که حساس به تنش کم‌آبی است، تعداد غلاف در بوته است. با توجه به اعمال تنش کم‌آبی تعداد گل‌ها ریزش یافته و غلاف‌های تولید شده ریزش می‌نمایند و عملکرد کاهش می‌یابد. تنش کم‌آبی در اوایل گل‌دهی سبب اندکی کاهش در تعداد غلاف در بوته می‌گردد. زیرا گل‌دهی در سویا با رشد نامحدود طی یک دوره طولانی انجام می‌شود و گیاه با تولید گل بیشتر در اواخر دوره گل‌دهی، خسارت کمبود آب را می‌تواند جبران کند، اما در این صورت با ادامه کمبود رطوبت عملکرد دانه کاهش شدید را نشان می‌دهد. تالوت و همکاران (۲۰۰۶) اعلام نمودند محلول پاشی روی در شرایط تنش آبی تاثیر مثبتی بر عملکرد واجزای عملکرد دارد.



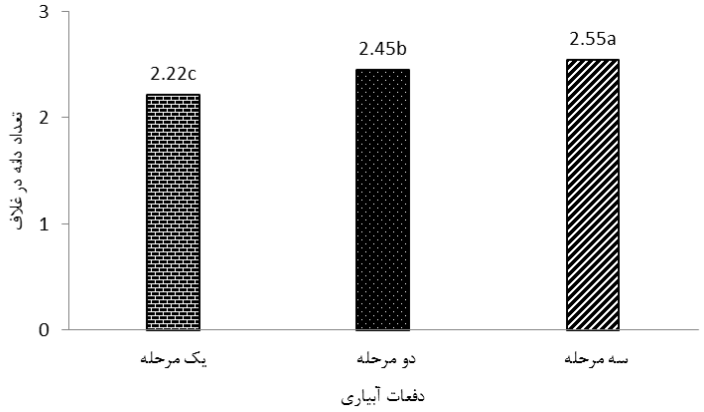
شکل ۲: اثر تعداد دفعات آبیاری بر تعداد غلاف در بوته ($LSD_{0.05}$=۱/۹۵)



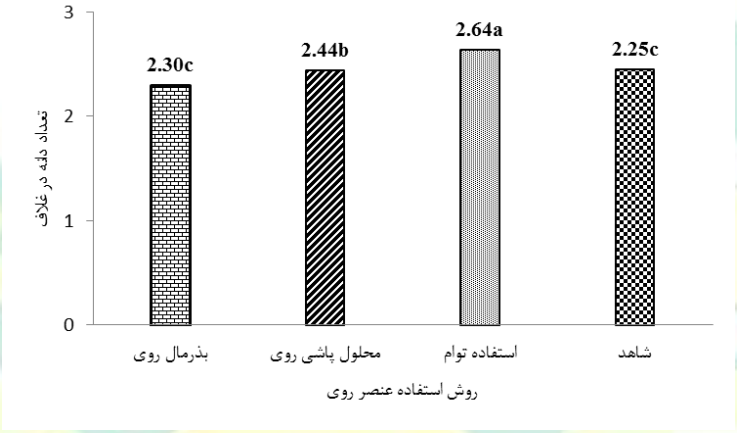
شکل ۳: اثر روش‌های مختلف استفاده کود روی بر تعداد غلاف در بوته ($LSD_{0.05}$=۲/۲۵)

۳-۳-تعداد دانه در غلاف

تعداد دانه در غلاف تحت تاثیر اثرات دفعات آبیاری و روش مصرف روی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار (p<۰/۰۱) بود (جدول ۱). مقایسه اثر تعداد دفعات آبیاری بیشترین تیمار با سه مرتبه (گل‌دهی، غلاف‌دهی و پر شدن دانه) آبیاری (۲/۵۵) و کمترین متعلق به تیمار یک مرتبه آبیاری (۲/۲۲) بود (شکل -۴) و اثر روش‌های مختلف مصرف کود روی نشان داد بیشترین و کمترین میانگین تعداد دانه در غلاف به ترتیب مربوط به استفاده توام روی (بذر مال و محلول پاشی روی) با میانگین (۲/۶) و عدم استفاده روی (شاهد) به مقدار ۲/۲۵ بود (شکل -۵). تعداد دانه عمدتاً تحت کنترل عوامل ژنوتیپ گیاه بوده و کمتر تحت تاثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرد.



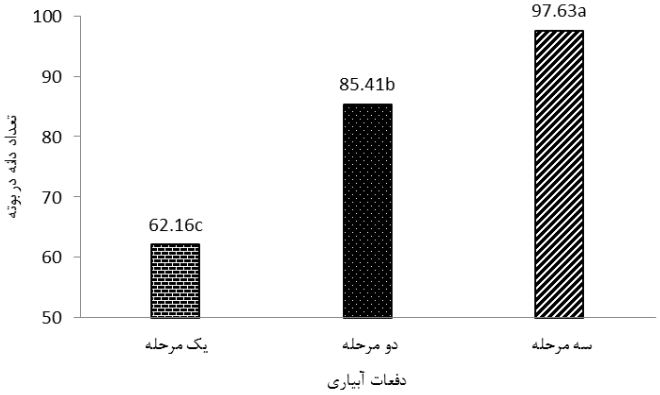
شکل ۴: اثر تعداد دفعات آبیاری بر تعداد دانه در غلاف ($LSD_{0.05}$=۰/۰۸)



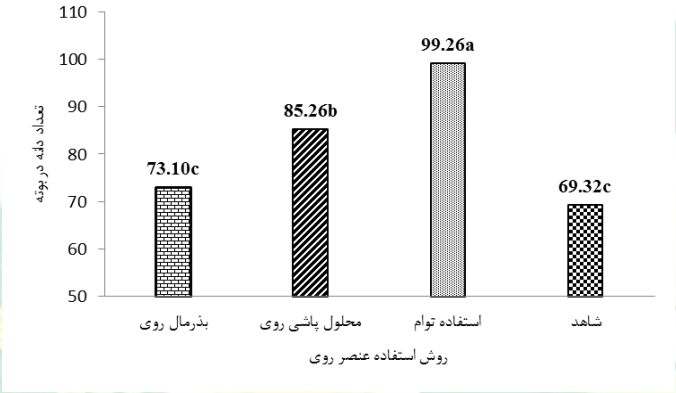
شکل ۵: اثر روش‌های مختلف استفاده کود روی بر تعداد دانه در غلاف ($LSD_{0.05}$=۰/۰۹)

۳-۴-تعداد دانه در بوته

طبق جدول (۱) تجزیه واریانس اثر دفعات آبیاری و روش استفاده عنصر روی تعداد دانه در بوته در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). بر اساس مقایسه میانگین حداقل اختلاف معنی‌دار بیشترین و کمترین میانگین اثر ساده تعداد دفعات آبیاری به ترتیب مربوط سه مرتبه آبیاری (گل‌دهی ، غلاف‌دهی و پرشدن دانه) با میانگین (۹۷/۶۳ دانه در بوته) و تیمار یک مرتبه آبیاری با میانگین (۶۲/۱۶ دانه در بوته) بود (شکل -۶). همچنین بیشترین میانگین اثر ساده استفاده کود روی در تعداد دانه در بوته مربوط به تیمار استفاده توام روی(بذرمال ومحلول پاشی) مقدار ۹۹/۲۶ دانه و کمترین میانیگن متعلق به تیمار عدم استفاده عنصر روی (شاهد) به مقدار (۶۹/۳۲ دانه در بوته) قرار داشت (شکل -۷). تعداد دانه در بوته یک صفت وراثتی بوده و کمتر تحت تاثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرد.



شکل ۶: اثر تعداد دفعات آبیاری بر تعداد دانه در بوته ($LSD_{0.05}$=۵/۵۶)



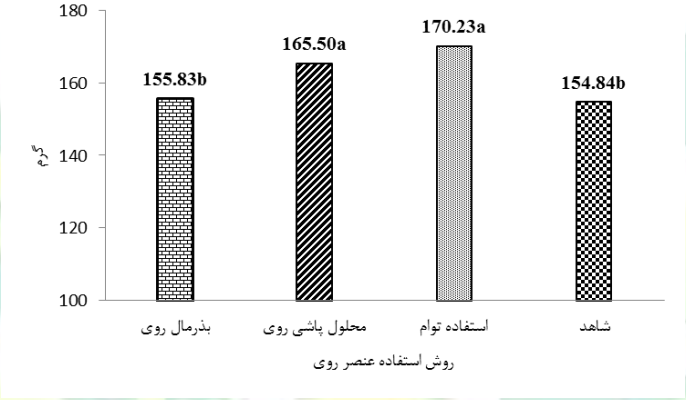
شکل ۷: اثر ساده روش‌های مختلف استفاده کود روی بر تعداد دانه در غلاف ($LSD_{0.05}$=۶/۴۲)

۳-۵-وزن هزار دانه

نتیجه تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد اثر ساده تعداد دفعات آبیاری و استفاده عنصر روی در سطح احتمال یک درصد ($p<۰/۰۱$) معنی‌دار شد. با توجه به نمودار مقایسه میانگین اثر دفعات دور آبیاری (شکل-۸) بیشترین وزن هزار دانه از تیمار سه مرحله آبیاری (۱۷۸/۴۷ گرم) و کمترین وزن هزار دانه متعلق به تیمار یک مرحله آبیاری (گل‌دهی) به مقدار (۱۴۸/۷۶ گرم) بود. همچنین به ترتیب بیشترین و کمترین میانگین اثر ساده استفاده کود روی به ترتیب مربوط تیمار استفاده توام روی (بذر مال و محلول پاشی روی) به مقدار (۱۷۸/۲۳گرم) و عدم استفاده از کود روی(شاهد) به مقدار (۱۵۴/۸۴گرم) بود (شکل-۹). با کاهش مقدار آب مورد نیاز جهت دسترس گیاه، مقدار سبزینه و شاخص سطح برگ گیاه کاهش می‌یابد و در نتیجه مقدار کل کربوهیدرات تولید شده در واحد زمان نیز کاهش خواهد یافت. در نتیجه توان ارسال مواد غذایی از منابع (اندام های سبز گیاه) به مخازن (دانه‌ها) کم شده و ما شاهد کاهش متوسط وزن دانه‌ها خواهیم بود. افزایش وزن دانه را میتوان به بهبود سیستم فتوسنتزی و انتقال مواد فتوسنتزی بیشتر به دانه در اثر کاهش عوارض تنش کمبود آب به وسیله عنصر روی نسبت داد. محلوپاشی در زمان رشد رویشی با افزایش سطح برگ باعث افزایش تشعشع دریافتی و در نتیجه تولید ماده خشک بیشتر گردیده و گیاه با پتانسیل بالقوه بیشتری وارد فاز زایشی می‌شود، بنابر این این گیاه پتانسیل بالاتری جهت تولید دانه از خود بروز می‌دهد (کومودینی و همکاران، ۲۰۰۱)



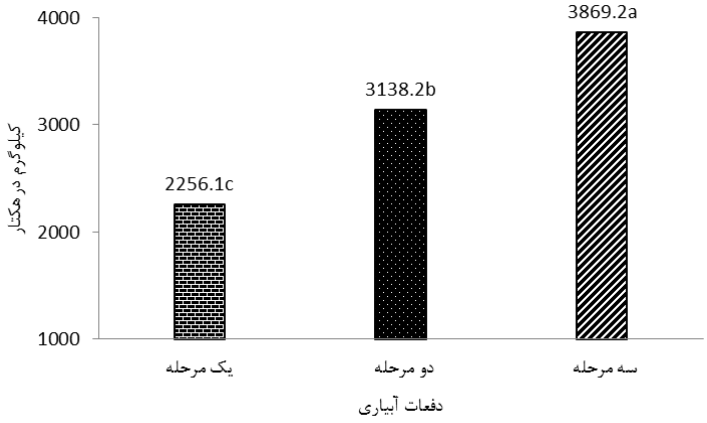
شکل ۸: اثر تعداد دفعات آبیاری بر وزن هزار دانه ($LSD_{0.05}$=۵/۵۸)



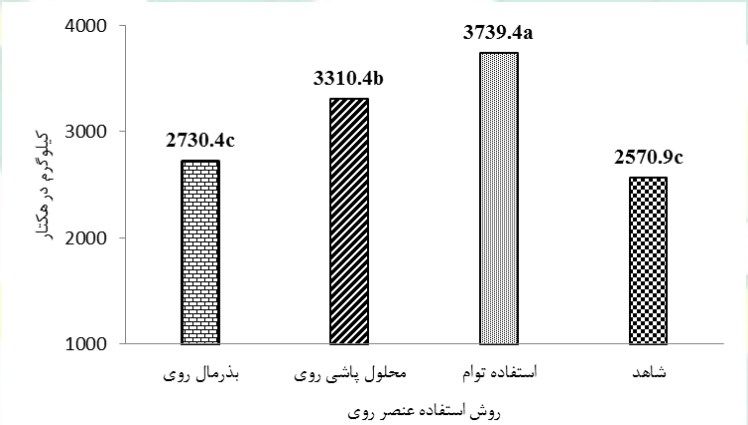
شکل ۹: اثر روش‌های مختلف استفاده عنصر روی بر وزن هزار دانه ($LSD_{0.05}$=۶/۴۵)

۳-۶-عملکرد دانه

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثرات ساده تعداد دفعات آبیاری و روش استفاده کود روی بر عملکرد دانه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. بیشترین میانگین اثر آبیاری به سه مرتبه آبیاری (گل‌دهی، غلاف‌دهی و پر کردن دانه) به مقدار (۳۸۶۹/۲ کیلوگرم در هکتار) و کمترین میانگین (۲۲۵۶/۱ کیلوگرم در هکتار) متعلق به یک مرتبه آبیاری (گل‌دهی) بود (شکل -۱۰). همچنین مقایسه میانگین حداقل اختلاف معنی‌دار اثر ساده روش‌های متفاوت کود روی بیشترین میانگین عملکرد دانه (۳۷۳۹/۴ کیلوگرم در هکتار) متعلق به استفاده توام روی (بذر مال و محلول پاشی روی) و کمترین میانگین (۲۵۷۰/۹ کیلوگرم در هکتار) مربوط به تیمار عدم استفاده کود روی (شاهد) بود (شکل -۱۱). کاهش عملکرد دانه عمدتاً به واسطه کاهش تعداد دانه در غلاف، تعداد غلاف در بوته، کاهش وزن هزار دانه می‌باشد. تشکیل تعداد کمتر غلاف و ریزش شدید آنها در شرایط کم‌آبیاری در مراحل زایشی از دلایل احتمالی کاهش تعداد غلاف در گیاه می‌باشد. تالوت و همکاران (۲۰۰۶) گزارش نمودند محلول پاشی روی در شرایط تنش آبی باعث افزایش عملکرد گیاه می‌شود. افزایش عملکرد ناشی از محلول پاشی کود روی می‌تواند به دلیل شرایط تغذیه‌ای گیاه و نقش مثبت این عناصر در فتوسنتز و عملکرد سیستم‌های نوری می‌باشد.



شکل ۱۰: اثر تعداد دفعات آبیاری بر عملکرد دانه ($LSD_{0.01}$=۲۲۵/۴)



شکل۱۱: اثر ساده روش‌های مختلف استفاده کود روی بر عملکرد دانه ($LSD_{0.01}$=۲۶۰/۲۷)

۴.نتیجه گیری

نتایج این آزمایش نشان داد تنش کم‌آبیاری سبب کاهش عملکرد دانه شد، بهترین شرایط عملکرد دانه در شرایط سه مرتبه آبیاری در مراحل مختلف گلدهی، غلاف‌دهی و پر شدن دانه در تمامی صفات مورد مطالعه حاصل شد. اما استفاده توام بذر مال و محلول پاشی باعث افزایش عملکرد دانه شد. به نظر کاربرد عنصر روی در مراحل اولیه رشد باعث بهبود رشد ریشه، اندام هوایی و در نتیجه جذب بیشتر عناصر مورد نیاز گیاه از خاک می‌شود و در نتیجه گیاه با ذخایر فتوسنتزی وارد شرایط تنش کم‌آبیاری شده است. بنابر گیاهانی که با بذر مال و محلول پاشی روی آب بیشتری از عمق‌هایی پایین خاک دریافت کرده تا حدودی خسارت ناشی از تنش کم‌آبی را کاهش می‌دهند. از این رو می‌توان بیان نمود در شرایط سه مرحله آبیاری و استفاده از بذر مال و محلول پاشی روی در افزایش عملکرد تاثیر بسزایی دارد.

منابع

۱- مرادی ، م.ر. و سیادات، ا. ۱۳۹۱. مقدمه‌ای بر تولید محصولات دانه‌های روغنی. انتشارات آموزش و ترویج کشاورزی. ص ۳۷۳.

۲- فرجی، ا.، رئیسی، س. و هزارجریبی، ا. ۱۳۹۱. گیاهان روغنی (ترجمه). نشر نوروزی. صفحه ۵۴۲.

3- Bihter, O. N. A. T., Bakal, H., Gulluoglu, L., & Arioglu, H. (2017). The effects of high temperature at the growing period on yield and yield components of soybean [*Glycine max (L.) Merr*] varieties. Turkish Journal of Field Crops, 22(2), 178-186.

4- Cumudini S, Hume DJ and Chu G, 2001. Genetic improvement in short season soybean: I. Dry

5- matter accumulation, Partitoning, and Leaf area duration. Crop Sci. 41: 391-398.

6- FAO. 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations. AQUASTAT website. http://www.fao.org/ website (accessed on May 3, 2016).

7- Ghasemi-Golezani, K., Bakhshi, J. and Dalil, B. (2015) Rate and duration of seed filling and yield of soybean affected by water and radiation deficits. Acta Agriculturae Slovenica 105: 225-232.

8- Liu KS. 1999. Chemistry and nutritional value of soybean components. In Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization. Aspen Publ. Inc.: Gaithersburg, Maryland, USA. P. 25-113.

9- Kobraee, S. and Shamsi, K. (2013) Impact of micronutrients foliar application on soybean yield and its components under water deficit condition. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences 3: 39-45.

10- Korte, L.L., J.E. Specht, J.H. Williams, and R.C. Sorensen. 1983. Irrigation of soybean genotypes during reproductive ontogeny II. yield component responses. Crop Science. 23(3): 528–533.

11- Shaban, M., Lak, M. and Hamidvand, Y. (2012) Response of chickpea (Cicer arietinum L.) cultivars to integrated application of zinc nutrient with water stress. International Journal of Agricultural Crop Science 4: 1074-1082.

12- Thalooth, A.T., M.M. Tawfik and M. Magda. 2006. A comparative study on the effect of foliar application of zinc, potassium, boron and magnesium on growth, yield and some chemical constituents of mung bean plants grown under water stress conditions. Department of field crops research, national research center. 2(1): 37-46.

Effect of Zinc Fertilizer on Qualitative Traits of Soybean under Low Water Stress in Moderate Conditions (Case study: Aliabad Katol County)

G. Sanchooli1,A. Nakhzari moghaddam[2], A. Biabani[3].H. Kouhkan[4], A. Khumri dehsoghte

1. Master student of Agroecology, Department of Agriculture, Faculty of Plant Production, Gonbad Kavous Universit[y1]

2,3- Assistant Professor and Associate Professor, Department of Agriculture, Faculty of Plant Production, Gonbad Kavous University, respectively

4. PhD student in Agrotechnology, Department of Agriculture, Faculty of Plant Production, Gonbad Kavous University

5. Former student of entomology, Department of Agriculture, Faculty of Plant Production, Gorgan University

Email address :ghorbansanchooly@gmail.com

Abstract

This study was conducted to investigate the effect of zinc element in low irrigation conditions on soybean quality traits in the form of split plots in a randomized complete block design with three replications in Hakimabad village of Aliabad Katoul city in 2021. The main factor is the number of irrigations in 3 levels including one-time irrigation (flowering stage), two-time irrigation (flowering and podding) and three irrigations (flowering, podding and seed filling) and the secondary factor of zinc at four levels including zinc seed at planting time. Zinc foliar application at flowering stage was the combined use of zinc seeds and zinc solution and no zinc consumption (control). Grain quality traits such as protein percentage were measured using Kjeldahl apparatus, oil percentage using Soxhlet apparatus and oil and protein yield were measured. The results of qualitative traits showed that the simple effects of frequency of irrigation and zinc on oil and protein percentage, oil and protein yield at 1% probability level were significant. Comparison of the mean minimum difference of the highest percentage of oil (17.94%) was related to the three irrigation treatments (flowering, podding and grain filling) and the lowest average (17.03%) belonged to the one-stage irrigation (flowering) treatment. The mean simple effect of different methods of zinc fertilizer application showed that the highest mean was related to the combined use of zinc (seedling and foliar application of zinc) with the mean (18.99%) and the lowest mean (17.41%) belonged to the no zinc treatment.

Keywords: Soybean, Low irrigation, Oil percentage, Protein percentage, Harvest index

تأثیر کود روی بر صفات کیفی گیاه سویا تحت تنش کم‌آبی در شرایط معتدله

(مطالعه موردی: شهرستان علی‌آباد کتول)

قربان سنچولی*[۱]، علی نخزری مقدم[۲]، عباس بیابانی[۳]، حمید کوهکن[۴]، علی خمبری ده سوخته[۵]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد اگرواکولوژی، گروه کشاورزی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه گنبد کاووس
۲و۳- به ترتیب استادیار و دانشیار، گروه کشاورزی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه گنبد کاووس

۴- دانشجوی دکتری اگروتکنولوژی، گروه کشاورزی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه گنبد کاووس

۵- دانشجوی سابق حشره شناسی، گروه کشاورزی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه گرگان

Email address :ghorbansanchooly@gmail.com

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی اثر عنصر روی در شرایط کم‌آبیاری بر صفات کیفی سویا، به صورت طرح کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در روستای حکیم آباد از توابع شهرستان علی آباد کتول در سال زراعی ۱۳۹۹ انجام شد. عامل اصلی تعداد دفعات آبیاری در ۳ سطح شامل یک‌مرتبه آبیاری (مرحله گل‌دهی)، دومرتبه آبیاری (گل‌دهی و غلاف‌دهی) و سه مرتبه آبیاری (گل‌دهی، غلاف‌دهی و پرشدن دانه) و عامل فرعی عنصر روی در چهار سطح شامل بذر مال روی در زمان کاشت، محلول‌پاشی روی در مرحله گل‌دهی، استفاده توأم بذر مال و محلول روی و عدم مصرف روی (شاهد) بود. صفات کیفی دانه هم‌چون درصد پروتئین با استفاده از دستگاه کجلدال ، درصد روغن با استفاده از دستگاه سوکسله و عملکرد روغن و پروتئین اندازه گیری شدند. نتایج صفات کیفی نشان داد اثرات ساده تعداد دفعات آبیاری و عنصر روی بر صفات درصد روغن و پروتئین، عملکرد روغن و پروتئین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. مقایسه میانگین حداقل اختلاف معنی دار بیشترین درصد روغن (۱۷/۹۴ درصد) مربوط به تیمار سه مرتبه آبیاری (گل‌دهی، غلاف‌دهی و پرشدن دانه) و کمترین میانگین (۱۷/۰۳ درصد) متعلق به تیمار یک مرحله آبیاری (گل‌دهی) بود همچنین مقایسه میانگین اثر ساده روش‌های مختلف استفاده کود روی نشان داد بیشترین میانگین مربوط به تیمار استفاده توام روی (بذرمال و محلول پاشی روی) با میانگین (۱۸/۹۹ درصد) و کمترین میانگین (۱۷/۴۱ درصد) متعلق به تیمار عدم استفاده روی بود.

کلمات کلیدی: سویا، کم‌آبیاری، درصد روغن، درصد پروتئین، شاخص برداشت

۱.مقدمه

سویا با نام علمی (Glycine max L.) گیاهی از خانواده لگومینوز، روز کوتاه و گرما دوست است. سویا با ۳۵ درصد پروتئین، ۳۰ درصد کربوهیدرات، از مقادیر مطلوبی فیبر، ویتامین‌ها و مواد معدنی تشکیل شده است (مرادی و سیادت، ۱۳۹۱). ارقام اصلاح شده سویا دارای میزان کمی اسیدهای چرب اشباع می‌باشند. از طرفی میزان بالای اسید اولئیک و میزان کم اسید پالمتیک، اسید استئاریک این ارقام، روغن سویا را تبدیل به روغنی مطلوب و سالم و مناسب مصرف انسان کرده است (بیتر و همکاران، ۲۰۱۷). سهم جهانی سویا در تأمین روغن خوراکی حدود ۴۴ درصد است. با این وجود، تولید این گیاه زراعی در قاره‌های آسیا و آفریقا تنها ۵ درصد از کل تولید جهانی سویا است (فائو، ۲۰۱۶). سویا به دلیل ارزش غذایی بالا و استفاده‌های فراوان دارویی و صنعتی دارای بیشترین سطح زیر کشت بین دانه‌های روغنی دنیا (بالغ بر ۱۱۷/۵ میلیون هکتار) می‌باشد که از این سطح معادل ۳۰۶/۵ میلیون تن دانه به دست می‌آید، به طوری که سویا یک چهارم از روغن و دو سوم از پروتئین خوراکی جهان را فراهم می‌کند (فائو، ۲۰۱۶). استان گلستان به‌تنهایی حدود ۹۰ درصد سطح زیر کشت سویا را دارد و استان‌های اردبیل و مازندران نیز در رتبه‌های بعدی قرار دارند. کمترین سطح زیر کشت سویا در بین استان‌های تولیدکننده‌ی این محصول متعلق به استان لرستان بود (فرجی و همکاران، ۱۳۹۱). مسئله اقتصاد صنعت سویا بسیار پیچیده است. اصولاً سه بازار عمده یعنی برای دانه، روغن و کنجاله موجود است. با توجه به میزان بالای پروتئین و روغن موجود در دانه سویا و همچنین عملکرد مناسب آن در واحد سطح که بخش عمده‌ای از تولید روغن‌های خوراکی مورد مصرف انسان و دام را تشکیل می‌دهد و همچنین کاربردهای متنوع آن اهمیت این گیاه مهم روشن‌تر می‌گردد (فرجی و همکاران، ۱۳۹۱). توسعه، بهبود و عملکرد سویا بر توانایی وراثتی یک رقم و سازگاری آن با طبیعت استوار است. در شرایط مزرعه‌ای، طبیعت بخش حقیقی تأثیر بوم‌شناسی بر پیشرفت و عملکرد سویا را ارائه می‌کند به‌طوری‌که می‌توان آن را با اعمال شیوه‌های مدیریتی نشان داد (فاتیما، ۲۰۱۷). افزایش سریع دما باعث افزایش مواجهه محصولات با تنش ناشی از خشک‌سالی شده است (نعیم، ۲۰۱۸). شدت تنش غیرقابل‌پیش‌بینی است زیرا به عوامل زیادی ازجمله توزیع و میزان بارندگی، تبخیر و تعرق و ظرفیت رطوبت خاک بستگی دارد (سود و همکاران، ۲۰۱۶) روی نیز جز لاینفک چندین مولکول زیستی مانند چربی‌ها، پروتئین‌ها و عوامل مشترک اکسین‌ها است و بنابراین نقش مهمی در متابولیسم اسید نوکلئیک ایفا می‌کند (چاتها و همکاران.، ۲۰۱۷) کاربرد روی در بهبود عملکرد و کیفیت محصول مفید بوده درحالی‌که کمبود آن باعث کاهش عملکرد و تخریب کیفیت محصول می‌شود (حسن و همکاران، ۲۰۱۹) علاوه بر این، محتوای بالای روی دارای اثرات سمی بر روی گیاهان بوده و منجر به جلوگیری از تقسیم و طویل‌شدن سلول می‌شود (تسونوو، ۲۰۱۲). هدف تحقیق مطالعه تأثیرات ساده تنش کم‌آبی و عنصر روی بر صفات کیفی سویا تحت شرایط اقلیم معتدل شهرستان علی آباد کتول بود.

۲.مواد و روش‌ها

آزمایش در سال زراعی ۱۳۹۹ در روستای حکیم آباد از توابع شهرستان علی آباد کتول که دارای اقلیم معتدل با میزان بارندگی سالیانه ۵۰۰ تا ۶۰۰ میلی‌متر با عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۹۶ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۴ درجه و ۹۱ درجه شرقی به اجرا شد. ارتفاع از سطح دریا ۸۰ متر و بر اساس تقسیم بندی آب و هوایی کوپن، منطقه دارای اقلیم مدیترانه ای گرم و مرطوب است قبل از اجرای آزمایش، نمونه گیری از خاک مزرعه از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متر انجام شد که برخی از ویژیگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن از جمله بافت خاک، نیتروژن خاک، درصد کربنی آلی، فسفر قابل جذب، پتاسیم قابل جذب، اسیدیته و هدایت الکتریکی و درصد اشباع در (جدول ۱)آورده شده است.

جدول۱: خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه

ردیف	درصد اشباع%sp	هدایت الکتریکی(ds/m)	اسیدیته کل اشباع	درصد مواد خنثی شونده	آهنppm	منگنزppm	رویppm	مسppm	درصد کربن آلی % oc	درصد ازت کل	فسفر قابل جذبppm	پتاسیم قابل جذبppm	درصد رس	درصد لای	درصد ماسه	کلاس بافت خاک
۱	۴۲/۸۰	۱/۰۴	۷/۶	۱۰/۸	۲/۸	۱۶	۰/۶	۱/۶	۱/۱۸	۰/۱۱	۱۳/۵	۳۰۳	۲۰	۶۶	۱۴	Si - L

زمین انتخاب شده در سال قبل از اجرای طرح، تحت کشت گندم بود. مراحل آماده سازی زمین شامل شخم اولیه ، دیسک زنی و رتیواتور بود که توسط تراکتور انجام شد. آزمایش به صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار صورت گرفت. عامل اصلی تعداد دفعات آبیاری در ۳ سطح شامل یک‌مرتبه آبیاری (مرحله گل‌دهی)، دومرتبه آبیاری (گل‌دهی و غلاف‌دهی) و سه مرتبه آبیاری (گل‌دهی، غلاف‌دهی و پرشدن دانه) و عامل فرعی عنصر روی در چهار سطح شامل بذر مال روی (زمان کاشت)، محلول‌پاشی روی (مرحله گل‌دهی)، استفاده توأم بذر مال و محلول روی (در زمان کاشت و گل‌دهی) و عدم مصرف روی (شاهد) بود. زمان کاشت نیمه دوم خرداد و بعد از برداشت محصول گندم بود. قبل از کاشت آبیاری برای سبز شدن یکنواخت و تأمین آب برای رشد اولیه انجام شد. پس از گاورو شدن، مزرعه دو بار دیسک زده شد و کود لازم بر اساس آزمون خاک به مزرعه داده شد و سپس دیسک سوم برای مخلوط کردن خاک با کود زده شد. هر کرت آزمایش شامل پنج خط کاشت با فاصله ۵۰ سانتی‌متر و طول چهار متر بود. فاصله دو بوته از هم ۸ سانتی‌متر بود. برای به‌دست آوردن تراکم مطلوب، در هر کپه سه بذر کاشته شد که در مرحله چهار برگی یک بوته حفظ شد. بذر مال کردن بذور در تیمارهای بذر مال با استفاده از بذر مال روی شرکت آریا شیمی به نسبت یک در هزار صورت گرفت. در این بررسی از ترکیب روی ۵۴ درصد استفاده شد. عملیات مبارزه با علف‌های هرز به‌صورت دستی انجام شد. مبارزه با آفات به‌طور یکنواخت در تمامی تیمارها انجام شد. صفات کیفی دانه هم‌چون میزان پروتئین (روش کجلدال) و روغن (روش سوکسله) اندازه گیری شدند. بررسی منابع و جمع آوری اطلاعات از طریق جستجو در بانک‌های اطلاعاتی و اینترنتی و مراکز اطلاعاتی و مدارک علمی ایران، کتابخانه‌های مراکز آموزشی، دانشگاه‌ها و مراکز تحقیقات انجام شد و داده‌ها نیز براساس اصول علمی از آزمایش‌های مزرعه‌ای به‌دست آمد. تجزیه اطلاعات به‌دست آمده در جداول تجزیه واریانس، مقایسه میانگین‌ها و رسم گراف‌هایی نمایش داده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (سلطانی، ۱۳۸۶) مورد تجزیه قرار گرفت و میانگین صفات مورد بررسی توسط آزمون کمترین تفاوت معنی‌دار محافظت شده LSD در سطح احتمال ۵ درصد، مقایسه‌ی میانگین گردید. در نهایت نمودارها با نرم‌افزار Excel ترسیم شدند.

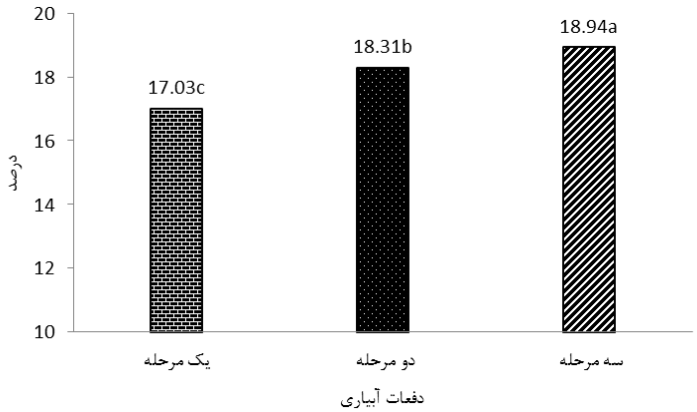
۳.نتایج و بحث

۳-۱-درصد روغن

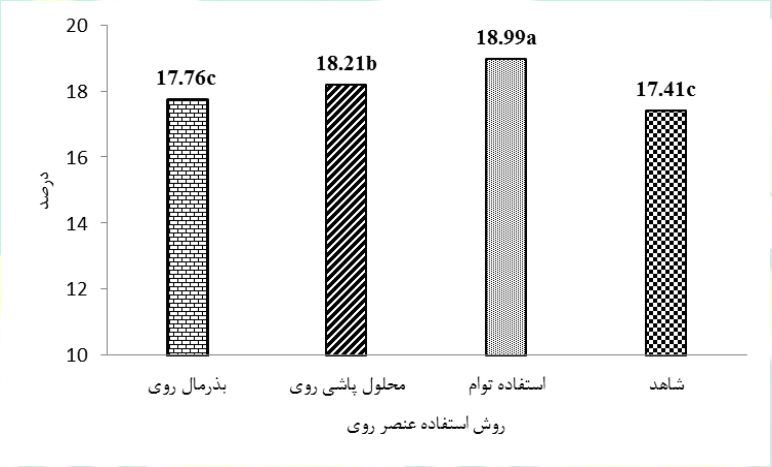
با توجه به نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول -۲) اثرات ساده تعداد دفعات آبیاری و روش‌های استفاده عنصر روی در سطح احتمال یک درصد شد. مقایسه میانگین حداقل اختلاف معنی دار بیشترین درصد روغن (۱۷/۹۴ درصد) مربوط به تیمار سه مرتبه آبیاری (گل‌دهی، غلاف‌دهی و پرشدن دانه) و کمترین میانگین (۱۷/۰۳ درصد) متعلق به تیمار یک مرحله آبیاری (گل‌دهی) بود (شکل -۱). همچنین مقایسه میانگین اثر ساده روش‌های مختلف استفاده کود روی نشان داد بیشترین میانگین مربوط به تیمار استفاده توام روی (بذرمال و محلول پاشی روی) با میانگین (۱۸/۹۹ درصد) و کمترین میانگین (۱۷/۴۱ درصد) متعلق به تیمار عدم استفاده روی بود (شکل -۲). نتایج نشان می‌دهد حداکثر درصد روغن در تیمار سه مرحله آبیاری و استفاده توام بدست آمد. مرشدی و همکاران (۱۳۷۹) نیز با محلول پاشی روی در گیاه کلزا به نتایج مشابهی دست یافتند. اصولاً تنش کم‌آبی تعادل بین پروتئین و روغن و حتی هیدرات‌کربن را تغییر می‌دهد. معمولاً تنش کم‌آبی درصد روغن کاهش و میزان پروتئین افزایش می‌دهد. در شرایط تنش کم‌آبیاری تشکیل مولکول‌های ساده‌تر خود به خود افزایش می‌یابد، بدین صورت تبدیل مواد فتوسنتزی حداکثر به سوی ساخت پروتئین پیش می‌رود (روتاندو و وستگیت، ۲۰۰۹).

جدول ۲: تجزیه واریانس صفات کیفی سویا تحت تاثیر کم آبیاری و عنصر روی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)			
		درصد روغن	عملکرد روغن	درصد پروتئین	عملکرد پروتئین
تکرار	2	۰/۲۸ $^{n.s}$	۵۷۹۷۴*	۲/۸۷ $^{n.s}$	۳۵۶۱۳*
آبیاری	2	۱۱/۴۴**	۴۱۵۴۱۳/۵۵**	۱۱۵/۲۸**	۳۴۹۴۶۳**
خطای اصلی	4	۱/۲۷	۱۳۴۹۰/۹۸	۰/۳۱	۱۱۹۱۲/۴۳
روی	3	۴/۱۹**	۴۶۶۱۰۳/۲۴**	۲۱/۰۵**	۴۳۲۹۱۸**
آبیاری × روی	6	۰/۱۶$^{n.s}$	۹۵۳۸/۵۴$^{n.s}$	۰/۲۳$^{n.s}$	۱۱۶۵۳/۸۸$^{n.s}$
خطای فرعی	۱۸	۰/۱۸	۱۱۲۸۴/۴۸	۱/۸۲	۸۳۵۸/۷۲
ضریب تغییرات(٪)		۲/۳۳	۱۰/۸۷	۴/۱۸	۹/۲۷



شکل ۱: اثر تعداد دفعات آبیاری بر درصد روغن ($LSD_{0.05}$=۰/۳۶)

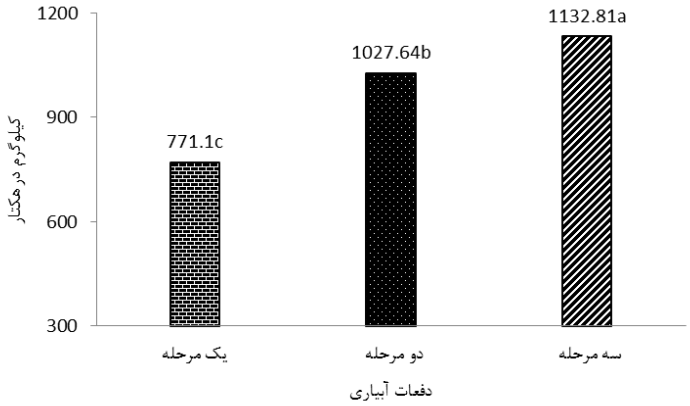


شکل ۲: اثر روش‌های مختلف استفاده کود روی بر درصد روغن ($LSD_{0.05}$= ۰/۴۲)

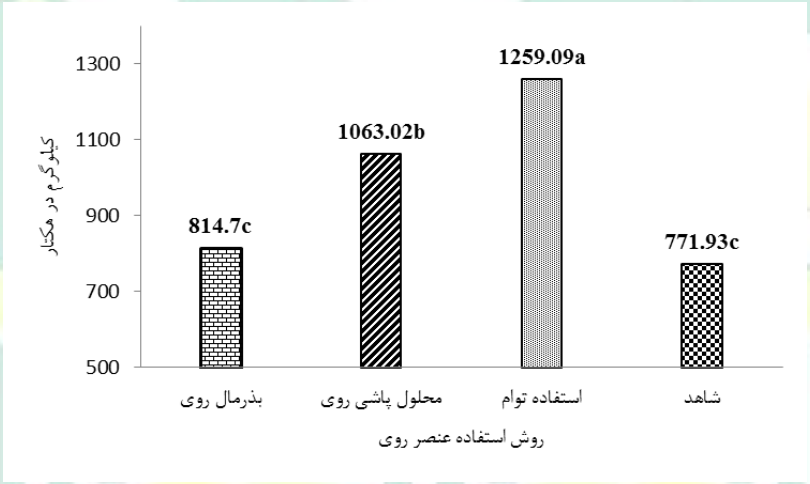
۳-۲-عملکرد روغن

نتایج تجزیه واریانس (جدول -۲) نشان داد اثرات ساده تعداد دفعات آبیاری و اثر روش مختلف مصرف عنصر روی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. بر اساس مقایسه میانگین بیشترین عملکرد پروتئین (۱۱۳۲/۸۱ کیلوگرم در هکتار) مربوط به تیمار سه مرحله آبیاری (گل‌دهی،غلاف‌دهی و پر شدن دانه) و کمترین میانیگن (۷۷۱/۱۰ کیلوگرم در هکتار) متعلق به تیمار یک مرحله آبیاری (گل‌دهی) بود (شکل -۳). همچنین نتایج مقایسه میانگین بیشترین و کمترین عملکرد روغن به ترتیب با میانگین ۱۲۵۹/۰۹ و ۷۷۱/۹۳ کیلوگرم در هکتار متعلق به تیمار استفاده توام روی و عدم استفاده روی بود (شکل-۴). نتایج این تحقیق نشان داد عنصر

روی نقش مثبتی در عملکرد و کیفیت پروتئین و روغن سویا به ویژه در شرایط تنش کمبود آب دارند.



شکل ۳- اثر تعداد دفعات آبیاری بر عملکرد روغن ($LSD_{0.05}$=۹۱/۱۱)

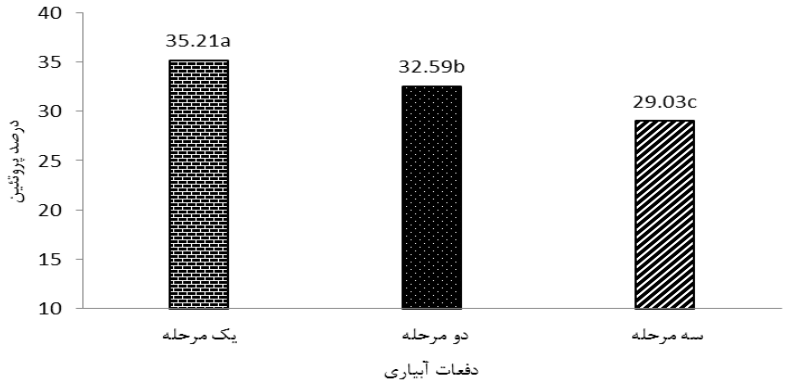


شکل ۴: اثر روش استفاده عنصر روی بر عملکرد روغن ($LSD_{0.05}$=۱۰۵/۲۱)

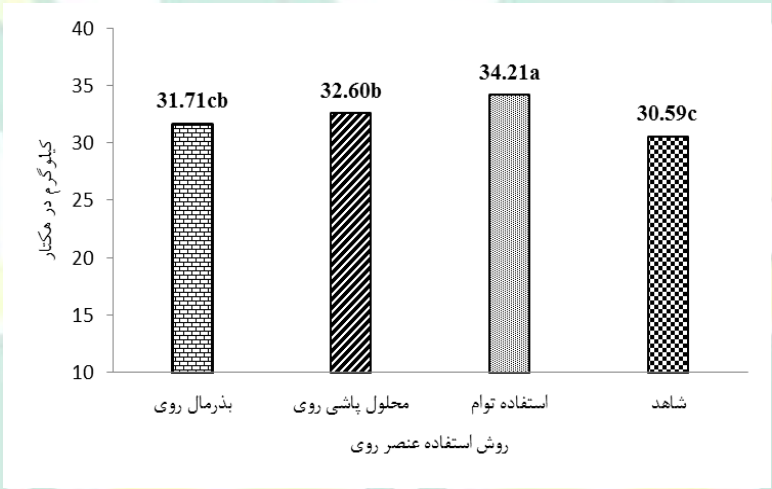
۳-۳-درصد پروتئین

نتایج تجزیه واریانس (جدول -۲) نشان داد اثرات ساده تعداد دفعات آبیاری و روش مختلف مصرف کود روی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود . بر اساس مقایسه میانگین اثر آبیاری بر درصد پروتئین بیشترین درصد پروتئین (۳۵/۲۱ درصد) مربوط به یک مرحله آبیاری(گل‌دهی) و کمترین میزان مقایسه میانگین(۲۹/۳۳ درصد) متعلق به تیمار سه مرحله (گل‌دهی، غلاف‌دهی و پر شدن دانه) بود (شکل۵). نتایج مقایسه میانگین حداقل اختلاف معنی‌دار اثر استفاده عنصر روی بر درصد پروتئین نشان داد بیشترین میانگین مربوط به تیمار استفاده توام روی (۳۲/۲۱ درصد) و کمترین میانگین مربوط به تیمار عدم استفاده روی با

میانگین (۳۰/۵۹ درصد) بود (شکل۶). نتایج این تحقیق نشان داد عنصر روی نقش مثبتی در عملکرد و کیفیت پروتئین و روغن سویا به ویژه در شرایط تنش کمبود آب دارند.



شکل ۵: اثر دفعات آبیاری بر درصد پروتئین ($LSD_{0.05}$=۱/۱۶)



شکل ۶: اثر اسفاده عنصر روی بر درصد پروتئین ($LSD_{0.05}$=۷۸/۴۲)

۳-۴-عملکرد پروتئین

نتایج تجزیه واریانس (جدول-۲) نشان داد اثرات ساده تعداد دفعات آبیاری و روش مختلف مصرف کود روی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. بر اساس مقایسه میانگین اثر آبیاری بیشترین عملکرد پروتئین (۱۱۳۲/۸۱ کیلوگرم در هکتار) مربوط به سه مرتبه آبیاری(گل‌دهی، غلاف‌دهی و پر شدن دانه) و کمترین عملکرد پروتئین (۷۷۱/۰۳ کیلوگرم در هکتار) متعلق به تیمار یک مرحله (گل‌دهی) بود (شکل۷). نتایج مقایسه میانگین حداقل اختلاف معنی‌دار اثر استفاده عنصر روی بر پروتئین دانه سویا نشان داد بیشترین میانگین مربوط به تیمار استفاده توام روی (۱۲۵۹/۰۹ کیلوگرم در هکتار) و کمترین میانگین مربوط به تیمار عدم

استفاده روی با میانگین (۷۷۱/۹۳ کیلوگرم در هکتار) بود (شکل۸). نتایج این تحقیق نشان داد عنصر روی نقش مثبتی در عملکرد و کیفیت پروتئین و روغن سویا به ویژه در شرایط تنش کمبود آب دارند.

۴.نتیجه‌گیری

نتایج این آزمایش نشان داد تنش کم‌آبیاری سبب کاهش درصد روغن و افزایش درصد پروتئین شد، بهترین شرایط عملکرد روغن در شرایط سه مرتبه آبیاری(مراحل گل‌دهی، غلاف‌دهی و پر شدن دانه) این درحالیست بهترین عملکرد پروتئین در یک مرحله آبیاری (گل‌دهی) حاصل شد.

منابع

۱- سلطانی، ا. ۱۳۸۶.کاربرد نرم افزار SAS در تجزیه‌های آماری. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ص ۱۸۴.
۲- فرجی، ا.، رئیسی، س. و هزارجریبی، ا. ۱۳۹۱. گیاهان روغنی (ترجمه). نشر نوروزی. صفحه ۵۴۲.
۳- مرادی ، م.ر. و سیادات، ا. ۱۳۹۱. مقدمه‌ای بر تولید محصولات دانه‌های روغنی. انتشارات آموزش و ترویج کشاورزی. ص ۳۷۳.
۴- مرشدی، ا.، ملکوتی، م. ج.، نقیبی، ح. ۱۳۷۹. تاثیر محلول پاشی آهن و روی بر عملکرد، خواص کیفی و غنی سازی دانه های کلزا در بردسیر کرمان. مجله خاک و آب ویژه نامه کلزا. ویژه نامه کلزا، ۱۲: ۵۶-۶۸

5- Bihter, O. N. A. T., Bakal, H., Gulluoglu, L., & Arioglu, H. (2017). The effects of high temperature at the growing period on yield and yield components of soybean [*Glycine max (L.) Merr*] varieties. Turkish Journal of Field Crops, 22(2), 178-186.
6- Chattha., M.U., M.U. Hassan, I. Khan, M.B. Chattha, A. Mahmood, M.U. Chattha, M. Nawaz, M.N. Subhani, M. Kharal and S. Khan. 2017. Bio fortification of wheat cultivars to combat zinc deficiency. Frontiers in Plant Science 8(2): 281-292.
7- FAO. 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations. AQUASTAT website. http://www.fao.org/ website (accessed on May 3, 2016).
8- Fatima, C.C. 2017. Physiological quality of soybean seed cultivars (*Glycine max* (L.) Merr) with different maturity groups. Research Journal of Seed Science 10(2): 59–72.
9- Hassan, M.U., M.U. Chattha, A. Ullah, I. Khan, A. Qadeer, M. Aamer, A.U Khan and F. Nadeem and T.A. Khan. 2019. Agronomic bio fortification to improve productivity and grain Zn concentration of bread wheat.International Journal Agriculture Biological. 21(2): 615–620.
10- Naeem, M., S.N. Muhammad, A. Rashid, Z.I. Muhammad, Y.A. Muhammad, H. Yasir and S. Fahad. 2018. Foliar calcium spray confers drought stress tolerance in maize via modulation of plant growth, water relations, proline content and hydrogen peroxide activity. Arch. Agronomy Soil Scientific. 64(3): 116–131.
11- Saud, S. Fahad, S. Hussain, L. Na, Y. Chen, L. Xin and S. Alhussien.2016. Silicate application increases photosynthesis and its associated metabolic activities in Kentucky bluegrass under drought stress and post-drought recovery. Environ. Scientific Pollution Research. 23(2): 17647–17655.
12- Tsonev, T. and F.J.C. Lidon. 2012. Zinc in plants—An overview. Emir. Journal Food Agriculture. 24: 322–333.
13- Rotundo, J.L., and Westgate, M.E. 2009. Meta- analysis of environmental effects on soybean seed composition. Field Crops Research, 110: 147- 156.

Study on the effect of zinc fertilizer on phenological traits of soybeans under dehydration under temperate conditions

G. Sanchooli1,A. Nakhzari moghaddam[2], A. Biabani[3].H. Kouhkan[4],

1. Master student of Agroecology, Department of Agriculture, Faculty of Plant Production, Gonbad Kavous Universit[y1]

2,3- Assistant Professor and Associate Professor, Department of Agriculture, Faculty of Plant Production, Gonbad Kavous University, respectively

4. PhD student in Agrotechnology, Department of Agriculture, Faculty of Plant Production, Gonbad Kavous University

Email address :ghorbansanchooly@gmail.com

Abstract

This study was performed to investigate the effect of zinc fertilizer under low irrigation conditions on phenological traits of soybeans by testing split plots in a randomized complete block design with three replications in Hakimabad village of Aliabad Katoul city in 2021 .The main factor is the number of irrigations in ۳levels including one-time irrigation (flowering stage), two-time irrigation (flowering and podding) and three irrigations (flowering, podding and seed filling) and the secondary factor of zinc at four levels including zinc seed at planting time. Zinc foliar application at flowering stage was the combined use of zinc seeds and zinc solution and no zinc consumption (control). Phenological stages including days from sowing to emergence, sowing to flowering, sowing to the beginning of podding, sowing to the end of podding, sowing to seed filling and sowing to physiological maturity were recorded. The results of analysis of variance showed that the simple effect of irrigation frequency and zinc fertilizer application on phenological traits of number of days from sowing to flowering, sowing to the beginning of podding, sowing to the end of podding and sowing to seed filling was significant at five and one percent probability levels. The highest and lowest mean effects of irrigation on the day to physiological maturity were ۱۰۷/۵۷and ۱۰۴/۸days, respectively, belonging to three and one irrigation treatments. Also, the effect of zinc fertilizer on the day until physiological maturity, the highest average of ۱۱۱days was related to combined use (seed and zinc monitoring solution) and the lowest belonged to ۱۰۲/۴ days.

Keywords: Soybean, Irrigation deficiency, Zinc fertilizer, Combined use, Phenological traits

مطالعه اثر کود روی بر صفات فنولوژیکی سویا تحت تنش کم‌آبی در شرایط معتدله

قربان سنچولی*[۱]، علی نخزری مقدم[۲]، عباس بیابانی[۳]، حمید کوهکن[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد اگرواکولوژی، گروه کشاورزی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه گنبد کاووس
۲و۳- به ترتیب استادیار و دانشیار، گروه کشاورزی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه گنبد کاووس

۴- دانشجوی دکتری اگروتکنولوژی، گروه کشاورزی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه گنبد کاووس

Email address :ghorbansanchooly@gmail.com

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی اثر کود روی در شرایط کم‌آبیاری بر صفات فنولوژیکی سویا ، به صورت آزمایش کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در روستای حکیم آباد از توابع شهرستان علی آباد کتول در سال زراعی ۱۳۹۹ انجام شد. عامل اصلی تعداد دفعات آبیاری در ۳ سطح شامل یک‌مرتبه آبیاری (مرحله گل‌دهی)، دومرتبه آبیاری (گل‌دهی و غلاف‌دهی) و سه مرتبه آبیاری (گل‌دهی، غلاف‌دهی و پرشدن دانه) و عامل فرعی عنصر روی در چهار سطح شامل بذر مال روی در زمان کاشت، محلول‌پاشی روی در مرحله گل‌دهی، استفاده توأم بذر مال و محلول روی و عدم مصرف روی (شاهد) بود. مراحل فنولوژیکی شامل روز از کاشت تا سبز شدن، کاشت تا گل‌دهی، کاشت تا شروع غلاف‌دهی، کاشت تا پایان غلاف‌دهی، کاشت تا پر شدن دانه و کاشت تا رسیدگی فیزیولوژیک ثبت شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثرات ساده دفعات آبیاری و استفاده کود روی در صفات فنولوژیکی تعداد روز از کاشت تا گل‌دهی، کاشت تا شروع غلاف‌دهی، کاشت تا پایان غلاف‌دهی و کاشت تا پر شدن دانه در سطح احتمال پنج و یک درصد معنی‌دار شد. بیشترین و کمترین میانگین اثر آبیاری بر روز تا رسیدگی فیزیولوژیک به ترتیب ۱۰۷/۵ و ۱۰۴/۸ روز متعلق به تیمارهای سه و یک مرتبه آبیاری بود. همچنین اثر کود روی بر روز تا رسیدگی فیزیولوژیک بیشترین میانگین۱۱۱ روز مربوط به استفاده توام (بذر مال و محلول پایش روی) و کمترین متعلق به۱۰۲/۴ روز بود.

کلمات کلیدی: سویا، کم‌آبیاری، کود روی، استفاده توام، صفات فنولوژیکی

۱.مقدمه

سویا با نام علمی (*Glycine max L.*) گیاهی از خانواده لگومینوز، روز کوتاه و گرما دوست است. سویا با ۳۵ درصد پروتئین، ۳۰ درصد کربوهیدرات، از مقادیر مطلوبی فیبر، ویتامین‌ها و مواد معدنی تشکیل شده است (مرادی و سیادت، ۱۳۹۱). ارقام اصلاح شده سویا دارای میزان کمی اسیدهای چرب اشباع می‌باشند. از طرفی میزان بالای اسید اولئیک و میزان کم اسید پالمتیک، اسید استئاریک

این ارقام، روغن سویا را تبدیل به روغنی مطلوب و سالم و مناسب مصرف انسان کرده است (بیتر و همکاران، ۲۰۱۷). سهم جهانی سویا در تأمین روغن خوراکی حدود ۴۴ درصد است. با این وجود، تولید این گیاه زراعی در قاره‌های آسیا و آفریقا تنها ۵ درصد از کل تولید جهانی سویا است (فائو، ۲۰۱۶). سویا به دلیل ارزش غذایی بالا و استفاده‌های فراوان دارویی و صنعتی دارای بیشترین سطح زیر کشت بین دانه‌های روغنی دنیا (بالغ بر ۱۱۷/۵ میلیون هکتار) می‌باشد که از این سطح معادل ۳۰۶/۵ میلیون تن دانه به دست می‌آید، به طوری که سویا یک چهارم از روغن و دو سوم از پروتئین خوراکی جهان را فراهم می‌کند (فائو، ۲۰۱۶). استان گلستان به‌تنهایی حدود ۹۰ درصد سطح زیر کشت سویا را دارد و استان‌های اردبیل و مازندران نیز در رتبه‌های بعدی قرار دارند. کمترین سطح زیر کشت سویا در بین استان‌های تولیدکننده‌ی این محصول متعلق به استان لرستان بود (فرجی و همکاران، ۱۳۹۱). مسئله اقتصاد صنعت سویا بسیار پیچیده است. اصولاً سه بازار عمده یعنی برای دانه، روغن و کنجاله موجود است. با توجه به میزان بالای پروتئین و روغن موجود در دانه سویا و همچنین عملکرد مناسب آن در واحد سطح که بخش عمده‌ای از تولید روغن‌های خوراکی مورد مصرف انسان و دام را تشکیل می‌دهد و همچنین کاربردهای متنوع آن اهمیت این گیاه مهم روشن‌تر می‌گردد (فرجی و همکاران، ۱۳۹۱). توسعه، بهبود و عملکرد سویا بر توانایی وراثتی یک رقم و سازگاری آن با طبیعت استوار است. در شرایط مزرعه‌ای، طبیعت بخش حقیقی تأثیر بوم‌شناسی بر پیشرفت و عملکرد سویا را ارائه می‌کند به‌طوری‌که می‌توان آن را با اعمال شیوه‌های مدیریتی نشان داد (فاتیما، ۲۰۱۷). افزایش سریع دما باعث افزایش مواجهه محصولات با تنش ناشی از خشک‌سالی شده است (نعیم، ۲۰۱۸). شدت تنش غیرقابل‌پیش‌بینی است زیرا به عوامل زیادی ازجمله توزیع و میزان بارندگی، تبخیر و تعرق و ظرفیت رطوبت خاک بستگی دارد (سود و همکاران، ۲۰۱۶) روی نیز جز لاینفک چندین مولکول زیستی مانند چربی‌ها، پروتئین‌ها و عوامل مشترک اکسین‌ها است و بنابراین نقش مهمی در متابولیسم اسید نوکلئیک ایفا می‌کند (چاتها و همکاران.، ۲۰۱۷) کاربرد روی در بهبود عملکرد و کیفیت محصول مفید بوده درحالی‌که کمبود آن باعث کاهش عملکرد و تخریب کیفیت محصول می‌شود (حسن و همکاران، ۲۰۱۹) علاوه بر این، محتوای بالای روی دارای اثرات سمی بر روی گیاهان بوده و منجر به جلوگیری از تقسیم و طویل‌شدن سلول می‌شود (تسونو، ۲۰۱۲). هدف تحقیق مطالعه تأثیرات ساده تنش کم‌آبی و عنصر روی بر صفات فنولوژیکی سویا تحت شرایط اقلیم معتدل شهرستان علی آباد کتول بود.

۲.مواد و روش‌ها

آزمایش در سال زراعی ۱۳۹۹ در روستای حکیم آباد از توابع شهرستان علی آباد کتول که دارای اقلیم معتدل با میزان بارندگی سالیانه ۵۰۰ تا ۶۰۰ میلی‌متر با عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۹۶ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۴ درجه و ۹۱ درجه شرقی به اجرا شد. ارتفاع از سطح دریا ۸۰ متر و بر اساس تقسیم بندی آب و هوایی کوپن، منطقه دارای اقلیم مدیترانه ای گرم و مرطوب است قبل از اجرای آزمایش، نمونه گیری از خاک مزرعه از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متر انجام شد که برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن از جمله بافت خاک، نیتروژن خاک، درصد کربنی آلی، فسفر قابل جذب، پتاسیم قابل جذب، اسیدیته و هدایت الکتریکی و درصد اشباع در (جدول ۱)آورده شده است.

جدول۱: خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه

ردیف	درصد اشباع%sp	هدایت الکتریکی(ds/m)	اسیدیته کل اشباع	درصد مواد خنثی شونده	آهنppm	منگنزppm	رویppm	مسppm	درصد کربن آلی % oc	درصد ازت کل	فسفر قابل جذبppm	پتاسیم قابل جذبppm	درصد رس	درصد لای	درصد ماسه	کلاس بافت خاک
۱	۴۲/۸۰	۱/۰۴	۷/۶	۱۰/۸	۲/۸	۱۶	۰/۶	۱/۶	۱/۱۸	۰/۱۱	۱۳/۵	۳۰۳	۲۰	۶۶	۱۴	Si - L

زمین انتخاب شده در سال قبل از اجرای طرح، تحت کشت گندم بود. مراحل آماده سازی زمین شامل شخم اولیه ، دیسک زنی و رتیواتور بود که توسط تراکتور انجام شد. آزمایش به صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار صورت گرفت. عامل اصلی تعداد دفعات آبیاری در ۳ سطح شامل یک‌مرتبه آبیاری (مرحله گل‌دهی)، دومرتبه آبیاری (گل‌دهی و غلاف‌دهی) و سه مرتبه آبیاری (گل‌دهی، غلاف‌دهی و پرشدن دانه) و عامل فرعی عنصر روی در چهار سطح شامل بذر مال روی (زمان کاشت)، محلول‌پاشی روی (مرحله گل‌دهی)، استفاده توأم بذر مال و محلول روی (در زمان کاشت و گل‌دهی) و عدم مصرف روی (شاهد) بود. زمان کاشت نیمه دوم خرداد و بعد از برداشت محصول گندم بود. قبل از کاشت آبیاری برای سبز شدن یکنواخت و تأمین آب برای رشد اولیه انجام شد. پس از گاورو شدن، مزرعه دو بار دیسک زده شد و کود لازم بر اساس آزمون خاک به مزرعه داده شد و سپس دیسک سوم برای مخلوط کردن خاک با کود زده شد. هر کرت آزمایش شامل پنج خط کاشت با فاصله ۵۰ سانتی‌متر و طول چهار متر بود. فاصله دو بوته از هم ۸ سانتی‌متر بود. برای به‌دست آوردن تراکم مطلوب، در هر کپه سه بذر کاشته شد که در مرحله چهار برگی یک بوته حفظ شد. بذر مال کردن بذور در تیمارهای بذر مال با استفاده از بذر مال روی شرکت آریا شیمی به نسبت یک در هزار صورت گرفت. در این بررسی از ترکیب روی ۵۴ درصد استفاده شد. عملیات مبارزه با علف‌های هرز به‌صورت دستی انجام شد. مبارزه با آفات به‌طور یکنواخت در تمامی تیمارها انجام شد. صفات فنولوژی شامل روز از کاشت تا سبز شدن، کاشت تا گل‌دهی، کاشت تا شروع غلاف‌دهی، کاشت تا پایان غلاف‌دهی، کاشت تا پر شدن دانه و کاشت تا رسیدگی فیزیولوژیک ثبت شد. بررسی منابع و جمع آوری اطلاعات از طریق جستجو در بانک‌های اطلاعاتی و اینترنتی و مراکز اطلاعاتی و مدارک علمی ایران، کتابخانه‌های مراکز آموزشی، دانشگاه‌ها و مراکز تحقیقات انجام شد و داده‌ها نیز براساس اصول علمی از آزمایش‌های مزرعه‌ای به‌دست آمد. تجزیه اطلاعات به‌دست آمده در جداول تجزیه واریانس، مقایسه میانگین‌ها و رسم گراف‌هایی نمایش داده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (سلطانی، ۱۳۸۶) مورد تجزیه قرار گرفت و میانگین صفات مورد بررسی توسط آزمون کمترین تفاوت معنی‌دار محافظت شده LSD در سطح احتمال ۵ درصد، مقایسه‌ی میانگین گردید. در نهایت نمودارها با نرم‌افزار Excel ترسیم شدند.

۳.نتایج و بحث

۳-۱-مراحل فنولوژیکی

بر اساس نتایج تجزیه واریانس اثر میانگین دفعات آبیاری و استفاده کود روی بر صفات فنولوژیکی بجز تعداد روز از کاشت تا سبز شدن در سایر صفات کاشت تا گل‌دهی، کاشت تا شروع غلاف‌دهی، کاشت تا پایان غلاف‌دهی، کاشت تا پر شدن دانه و روز تارسیدگی فیزیولوژیکی اختلاف معنی‌داری داشتند. این درحالیست که اثر متقابل آنها در هیچ یک از صفات فنولوژیکی مورد مطالعه اثر معنی‌داری نداشتند. (جدول ۱).

۳-۲- کاشت تا گل‌دهی

بر اساس نتایج حاصل تجزیه واریانس (جدول ۱) اثر کود روی بر صفت کاشت تا گل‌دهی در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد. بیشترین میانگین اثر روی بر صفت کاشت تا گلدهی (۴۷/۳۳ روز) متعلق به اثر استفاده توام (بذر مال و محلول پاشی) بود (جدول۲). و کمترین میانگین (۴۵/۱۱ روز) مربوط به عدم استفاده روی (شاهد) بدست آمد (جدول۳). نتایج حاصل نشان می‌دهد استفاده عنصر روی در مرحله گل‌دهی بصورت بذرمال و توام (بذرمال و محلول پاشی) روند افزایشی برخوردار بود.

۳-۳- کاشت تا شروع غلاف‌دهی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر آبیاری در سطح احتمال پنج درصد و اثر کود روی در سطح احتمال یک درصد در صفت تعداد روز از کاشت تا شروع غلاف‌دهی معنی‌دار بود (جدول ۱). بیشترین میانگین اثر آبیاری (۵۸/۰۸ روز) به صفت کاشت تا شروع غلاف‌دهی مربوط تیمار سه مرحله آبیاری (گل‌دهی، غلاف‌دهی و پر شدن دانه) و کمترین میانگین (۵۷ روز) متعلق به تیمار یک مرتبه آبیاری (گل‌دهی) بود (جدول۲). همچنین مقایسه میانگین اثر استفاده عنصر روی نشان داد به ترتیب بیشترین (۵۹/۵۶ روز) و کمترین (۵۵/۱۱ روز) متعلق به استفاده توام (بذرمال روی در زمان کاشت، محلول پاشی روی در زمان گل‌دهی) و عدم استفاده عنصر روی (شاهد) بود (جدول۳).

۳-۴- کاشت تا پایان غلاف‌دهی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر آبیاری در سطح پنج درصد و اثر کود روی در سطح یک درصد بر تعداد روز از کاشت تا پایان غلاف‌دهی معنی‌دار بوده است (جدول ۱). بیشترین میانگین اثر آبیاری (۶۷/۹۲ روز) مربوط به تیمار سه مرتبه آبیاری (گل‌دهی، غلاف‌دهی و پر شدن دانه) و کمترین (۶۶/۷۵ روز) متعلق به تیمار یک مرتبه آبیاری (گل‌دهی) بود (جدول۲). همچنین میانگین اثر عنصر روی، کاشت تا پایان غلاف‌دهی نشان داد بیشترین میانگین (۶۹/۸۹ روز) مربوط به تیمار استفاده توام (بذرمال روی، محلول پاشی روی) و کمترین میانگین (۶۴/۶۷ روز) متعلق به تیمار عدم استفاده روی (شاهد) بود (جدول ۳).

۳-۵- کاشت تا پر شدن دانه

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر آبیاری در سطح پنج درصد و اثر کود روی در سطح یک درصد بر تعداد روز از کاشت تا پر شدن دانه معنی‌دار بوده است (جدول۲). بیشترین میانگین اثر آبیاری (۷۸/۵۸ روز) مربوط به تیمار سه مرتبه آبیاری (گل‌دهی، غلاف‌دهی و پر شدن دانه) و کمترین (۷۷ روز) متعلق به تیمار یک مرتبه آبیاری (گل‌دهی) بود (جدول۴-۳). همچنین میانگین اثر عنصر روی، کاشت تا پایان غلاف‌دهی نشان داد بیشترین میانگین (۸۱/۱۱ روز) مربوط به تیمار استفاده توام (بذرمال، محلول پاشی روی) و کمترین میانگین (۷۱/۷۸ روز) متعلق به تیمار عدم استفاده روی (شاهد) بود (جدول ۳).

۳-۶- کاشت تا رسیدگی فیزیولوژیک

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات آبیاری و کود روی در سطح احتمال یک درصد بر تعداد روز از کاشت تا رسیدگی فیزیولوژیک معنی‌دار بوده است (جدول ۱). بیشترین میانگین اثر آبیاری (۱۰۷/۵روز) مربوط به تیمار سه مرتبه آبیاری (گل‌دهی، غلاف‌دهی و پر شدن دانه) و کمترین (۱۰۴/۸ روز) متعلق به تیمار یک مرتبه آبیاری (گل‌دهی) بود (جدول۲). همچنین میانگین اثر عنصر روی، کاشت تا پایان غلاف‌دهی نشان داد بیشترین میانگین (۱۱۱ روز) مربوط به تیمار استفاده توام (بذرمال روی ، محلول پاشی روی) و کمترین میانگین (۱۰۲/۴ روز) متعلق به تیمار عدم استفاده روی (شاهد) بود (جدول ۳). بر این اساس می‌توان اظهار داشت با کاهش تعداد دفعات آبیاری باعث کاهش تعداد روز تا پر شدن دانه شده و گیاه زودتر وارد فاز زایشی می‌شود.

جدول ۱: تجزیه واریانس مراحل فنولوژیکی سویا تحت تاثیر کم‌آبیاری و کود روی

		میانگین مربعات (MS)					
منابع تغییرات	درجه آزادی	کاشت تا سبزشدن	کاشت تا گل‌دهی	کاشت تا شروع غلاف دهی	کاشت تا پایان غلاف دهی	کاشت تا پرشدن دانه	کاشت تا رسیدن فیزیولوژیک
تکرار	۲	۰/۱۹ n.s	۰/۵۲ n.s	۰/۱۱	۰/۳۶	۰/۳۶ n.s	۱/۳۳ n.s
آبیاری	۲	۰/۱۱ n.s	۰/۷۸ n.s	۳/۶۹ *	۴/۱۱ *	۷/۸۶ *	۲۱/۵۸ **
خطای اصلی	۴	۰/۷۸ n.s	۰/۶۱ n.s	۱/۲۸ n.s	۱/۲۸ n.s	۰/۷۸ n.s	۲/۷۹ n.s
روی	۳	۰/۶۹ n.s	۱۱/۳۷ **	۳۸/۰۳ **	۵۵/۵۱ **	۰/۷۸ **	۱۲۴/۹۹ **
آبیاری × روی	۶	۰/۲۲ n.s	۰/۳۷ n.s	۰/۳۶ n.s	۰/۲۶ n.s	۰/۰۸ n.s	۰/۷۷ n.s
خطای فرعی	۱۸	۰/۳۲ n.s	۰/۶۲ n.s	۰/۷۸ n.s	۱/۱۲ n.s	۱/۵۳ n.s	۱/۳۴ n.s
ضریب تغییرات (٪)		۸/۸	۱/۷	۱/۵۳	۱/۵۷	۱	۱/۰۹

ns، * و ** : به ترتیب عدم وجود تفاوت معنی‌دار و معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد بر اساس آزمون LSD.

جدول۲: مقایسه میانگین اثر آبیاری بر صفات فنولوژیکی سویا

تیمار	میانگین مربعات			
	کاشت تا شروع غلاف‌دهی	کاشت تا پایان غلاف‌دهی	کاشت تا شروع پر شدن دانه	کاشت تا رسیدگ فیزیولوژیک
یک‌مرتبه آبیاری (مرحله گل‌دهی)	۵۷ ^{b}	۶۶/۷۵^{b}	۷۷^{b}	۱۰۴/۸^{c}
دومرتبه آبیاری (گل‌دهی + غلاف‌دهی)	۵۷/۳۳^{ab}	۶۷/۴۲^{ab}	۷۸/۰۸^{a}	۱۰۶/۴^{b}
سه مرتبه آبیاری (گل‌دهی + غلاف‌دهی+ پرشدن دانه)	۵۸/۰۸^{a}	۶۷/۹۲^{a}	۷۸/۵۸^{a}	۱۰۷/۵^{a}
$LSD_{0.05}$	۰/۷۶	۰/۹۱	۱/۰۶	۰/۹۹

جدول ۳: مقایسه میانگین اثر عنصر روی بر صفات فنولوژیکی سویا

تیمار	میانگین مربعات				
	کاشت تا شروع گلدهی	کاشت تا شروع غلاف‌دهی	کاشت تا پایان غلاف‌دهی	کاشت تا شروع پر شدن دانه	کاشت تا رسیدگی فیزیولوژیک
بذرمال روی	۴۷/۳۳^{a}	۵۸/۷۸ ^{a}	۶۹^{a}	۷۹/۵۶^{b}	۱۰۷/۲^{b}
محلول پاشی روی	۴۵/۷۸ ^{b}	۵۶/۴۴^{b}	۶۵/۸۸^{b}	۷۶/۱۱^{c}	۱۰۴/۳^{c}
استفاده توام	۴۷/۳۳ ^{a}	۵۹/۵۶ ^{a}	۶۹/۸۹^{a}	۸۱/۱۱^{a}	۱۱۱^{a}
شاهد	۴۵/۱۱ ^{b}	۵۵/۱۱ ^{c}	۶۴/۶۷^{c}	۷۴/۷۸^{d}	۱۰۲/۴^{d}
LDS0.05	۰/۷۸	۰/۸۷	۱/۰۴	۱/۲۲	۱/۱۵

در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.LSDدرهرستون، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک بر اساس آزمون

۴.نتیجه گیری

نتایج این آزمایش نشان داد اثر تعداد دفعات آبیاری صفات فنولوژی بیشترین میانگین حداقل اختلاف معنی‌دار در سه مرتبه آبیاری و کمترین متعلق به تیمار یک مرحله آبیاری حاصل شد همچنین اثر روشهای مختلف استفاده کود روی بیشترین اثر فنولوژیکی در استفاده توام بذر مال و محلول پاشی روی بدست آمد و کمترین میانگین فنولوژیکی مربوط به عدم استفاده از کود روی بود.

منابع

۱- سلطانی، ا. ۱۳۸۶.کاربرد نرم افزار SAS در تجزیه‌های آماری. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ص ۱۸۴.

۲- فرجی، ا.، رئیسی، س. و هزارجریبی، ا. ۱۳۹۱. گیاهان روغنی (ترجمه). نشر نوروزی. صفحه ۵۴۲.

۳- مرادی ، م.ر. و سیادات، ا. ۱۳۹۱. مقدمه‌ای بر تولید محصولات دانه‌های روغنی. انتشارات آموزش و ترویج کشاورزی. ص ۳۷۳.

۴- مرشدی، ا.، ملکوتی، م. ج.، نقیبی، ح. ۱۳۷۹. تاثیر محلول پاشی آهن و روی بر عملکرد، خواص کیفی و غنی سازی دانه های کلزا در بردسیرکرمان. مجله خاک و آب ویژه نامه کلزا. ویژه نامه کلزا، ۱۲: ۵۶-۶۸

5- Bihter, O. N. A. T., Bakal, H., Gulluoglu, L., & Arioglu, H. (2017). The effects of high temperature at the growing period on yield and yield components of soybean [*Glycine max (L.) Merr*] varieties. Turkish Journal of Field Crops, 22(2), 178-186.

6- Chattha., M.U., M.U. Hassan, I. Khan, M.B. Chattha, A. Mahmood, M.U. Chattha, M. Nawaz, M.N. Subhani, M. Kharal and S. Khan. 2017. Bio fortification of wheat cultivars to combat zinc deficiency. Frontiers in Plant Science 8(2): 281-292.

7- FAO. 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations. AQUASTAT website. http://www.fao.org/ website (accessed on May 3, 2016).

8- Fatima, C.C. 2017. Physiological quality of soybean seed cultivars (*Glycine max* (L.) Merr) with different maturity groups. Research Journal of Seed Science 10(2): 59–72.

9- Hassan, M.U., M.U. Chattha, A. Ullah, I. Khan, A. Qadeer, M. Aamer, A.U Khan and F. Nadeem and T.A. Khan. 2019. Agronomic bio fortification to improve productivity and grain Zn concentration of bread wheat.International Journal Agriculture Biological. 21(2): 615–620.

10- Naeem, M., S.N. Muhammad, A. Rashid, Z.I. Muhammad, Y.A. Muhammad, H. Yasir and S. Fahad. 2018. Foliar calcium spray confers drought stress tolerance in maize via modulation of plant growth, water relations, proline content and hydrogen peroxide activity. Arch. Agronomy Soil Scientific. 64(3): 116–131.

11- Saud, S. Fahad, S. Hussain, L. Na, Y. Chen, L. Xin and S. Alhussien.2016. Silicate application increases photosynthesis and its associated metabolic activities in Kentucky bluegrass under drought stress and post-drought recovery. Environ. Scientific Pollution Research. 23(2): 17647–17655.

12- Tsonev, T. and F.J.C. Lidon. 2012. Zinc in plants—An overview. Emir. Journal Food Agriculture. 24: 322–333.

13- Rotundo, J.L., and Westgate, M.E. 2009. Meta- analysis of environmental effects on soybean seed composition. Field Crops Research, 110: 147- 156.

Tissue culture optimization of Camelina Sativa L. under in vitro conditions

Tarinejad AliReza[1]*; Baghi Hamideh[2]

1-Associate professor, Biotechnology department, Faculty of agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
2-PhD student, Biotechnology department, Faculty of agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

*Corresponding Author Email address: atarinejad@yahoo.com

Abstract
Camellina oilseed is known for its high omega-3 content (18: 3), short growing season, low input, and easy gene manipulation. Camelina mainly contains unsaturated fatty acids, however, its fatty acid composition needs to be optimized depending on the end use, such as reducing unsaturated fatty acids for use as biodiesels, or increasing the amount of omega-3 fatty acids used as food. Gene transfer to Camelina requires micropropagation optimization and in vitro culture. In this study, the effect of different growth regulators on micropropagation of Camelina sativa L. was investigated using hypocotyl and cotyledon culture. The results showed that the best treatment for Camelina micropropagation was Gamborg B5 Medium containing 1.5 mg / l BAP and 0.5 mg / l NAA.

Keywords: Micropropagation, somatic embryogenesis, in vitro, medium

بهینه‌سازی کشت بافت گیاه کاملینا (*Camelina Sativa* L.) تحت شرایط درون شیشه‌ای

علیرضا تاری نژاد[1]*؛ حمیده باغی سفیدان[2]

۱-دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

۲-دانشجوی دوره دکتری گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

* ایمیل نویسنده مسئول مکاتبات: *atarinejad@yahoo.com*

چکیده

محصول دانه روغنی کاملینا به خاطر مقدار بالای امگا ۳ (۱۸: ۳)، فصل رشد کوتاه، نیاز به نهاده کم و دست‌کاری ژنی آسان شناخته‌شده است. کاملینا عمدتاً حاوی اسیدهای چرب اشباع‌نشده است، بااین‌حال ترکیب اسیدهای چرب آن بسته به کاربرد نهایی نیاز به بهینه‌سازی دارد، به‌عنوان‌مثال کاهش اسیدهای چرب اشباع‌نشده برای استفاده به‌عنوان بیودیزل‌ها، یا افزایش مقدار اسیدهای چرب امگا ۳ که به‌عنوان مکمل‌های غذایی استفاده می‌شود. انتقال ژن به کاملینا، مستلزم بهینه سازی ریزازدیادی وکشت درون شیشه ای آن هست. در این تحقیق، اثر تنظیم کننده های رشد مختلف بر روی ریزازدیادی کاملینا ساتیوا با استفاده از کشت هیپوکوتیل و کوتیلدون بررسی گردید. نتایج نشان داد که بهترین تیمار برای ریزازدیادی Camelina Sativa، محیط کشت گامبورگ حاوی ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA است.

واژگان کلیدی: ریزازدیای، جنین‌زایی سوماتیکی، درون شیشه‌ای، محیط کشت

۱.مقدمه

حدود ۸۵ درصد از انرژی مورد نیاز ما توسط سوخت های فسیلی مبتنی بر نفت مانند نفت، زغال سنگ و گاز طبیعی تامین می شود. استفاده مداوم از این سوخت‌های تجدید ناپذیر به دلیل کاهش منابع، افزایش قیمت‌ها و سهم این سوخت‌ها در آلودگی اتمسفر ناپایدار است (Mittal et al., 2018). چنین نگرانی‌های زیست‌محیطی و اقتصادی باعث علاقه به انرژی زیستی تجدیدپذیر شده است که می‌تواند به عنوان جایگزینی برای سوخت‌های فسیلی و کاهش انتشار گازهای گلخانه‌ای عمل کند. از میان منابع مختلف سوخت زیستی، دانه های روغنی اخیراً به عنوان منابع امیدوارکننده ای برای تولید بیودیزل کارآمد ظاهر شده اند. یکی از این محصولات، *Camelina sativa* L.، عضوی از خانواده Brassicaceae است که ویژگی‌های منحصربه‌فرد آن باعث رشد آن به عنوان یک ماده اولیه سوخت زیستی مهم شده است (Chen et al., 2015). دانه‌ها، روغنی غنی از اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه تولید می‌کنند و در نتیجه آن را به یک محصول انرژی تجدیدپذیر ارزشمند برای صنعت سوخت‌های زیستی در حال ظهور تبدیل

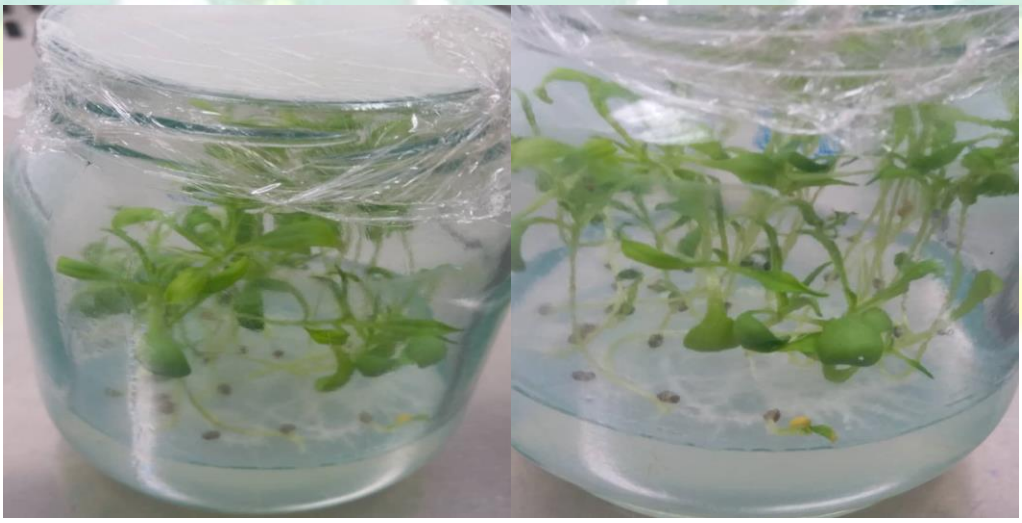
می‌کنند (Sitther et al., 2018). کشت اندام و سلول در شرایط آزمایشگاهی فرصتی عالی برای غلبه بر عوامل محدود کننده متعدد در تولید گیاه فراهم می‌کند. هدف این تحقیق بهینه‌سازی کشت درون شیشه ای کاملینا ساتیوا با تنظیم کننده‌های رشد مختلف است، توسعه هیبریداسیون سوماتیکی در شرایط آزمایشگاهی و باززایی گیاه از ریزنمونه های برگ منجر به یک سیستم تغییر ژنتیکی با واسطه Agrobacterium در C. sativa خواهد شد.

۲.مواد و روش‌ها

بذرکاملینا ساتیوا (*Camelina sativa* L.) به‌دست‌آمده از پروژه دابل هاپلوئیدی که توسط دکتر دانیال کهریزی از دانشگاه رازی کرمانشاه در کشور معرفی‌شده است و محیط کشت‌های MS پایه و گامبورگ به همراه تنظیم کننده‌های رشد BAP، KIN، PIC ، 2,4-D،NAA در این آزمایش بکار گرفته شدند.

۲-۱-آماده سازی و کشت بذرها

در ابتدا به منظور ضدعفونی نمودن سطحی، بذور به مدت ۶۰ ثانیه در الکل ۹۶ ٪غوطه ور گردیده، پس از سه بار شستشو با آب مقطراستریل، به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰٪ قرار گرفتند. در مرحله بعد بذرها سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. برای جوانه زنی، بذرها در یک ارلن حاوی۵۰ میلی لیترمحیط پایه MS (Murashige & Skoog, 1962) وگامبورگ (Gamborg et al., 1968) استریل کشت داده شده و در اتاقک رشد تحت فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۲۴۰۰ لوکس و دمای ۲۴ C° به مدت یک هفته نگهداری شدند (شکل۱).



شکل۱:گیاهچه های ۷ روزه جهت تهیه ریزنمونه های کوتیلدون و هیپوکوتیل

۲-۲-کشت هیپوکوتیل و کوتیلدون

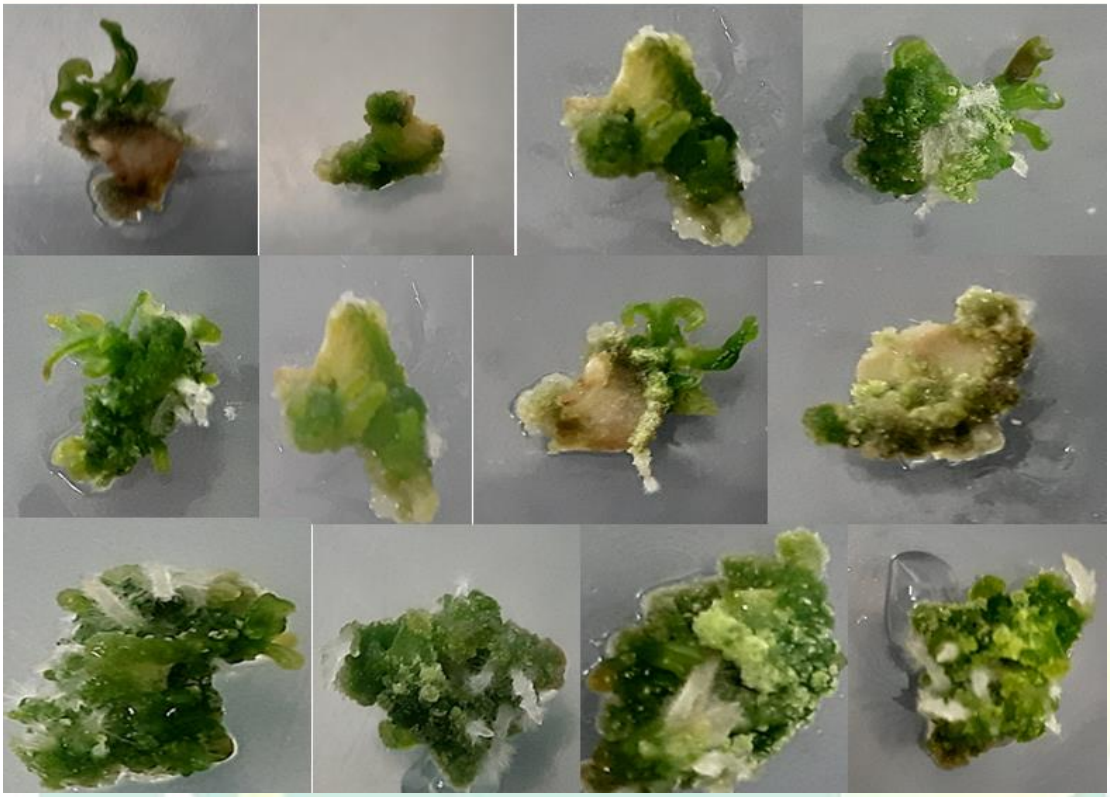
ظروف حاوی گیاهچه های یک هفته ای حاصل از کشت بذرها در شرایط استریل از ارلن خارج شدند. در مرحله بعد، هیپوکوتیل و کوتیلدون آنها به اندازه های مناسب برش داده شد . سپس ریزنمونه ها به صورت عمودی در پتری دیش حاوی ۵۰ میلی لیتراز محیط گامبورگ حاوی غلظتهای متفاوت از تنظیم کننده های مختلف رشد گیاهی کشت شدند. این تنظیم کننده های رشد شامل نسبتهای مختلف سیتوکینین های BAP، Kin و اکسین‌های NAA، 2,4-D و پیکلورام (بر حسب میلی گرم بر لیتر) بودند (جدول ۱) .

جدول ۱: تنظیم کننده های رشدگیاهی مورد استفاده در این آزمایش

محیط کشت پایه	KIN	BAP	NAA	PIC	2,4-D
MS	–	۴	۰	–	–
MS	–	۴	۰.۱	–	–
گامبورگ	–	۱.۵	۰.۵	–	–
گامبورگ	–	۴	۰.۲	–	–
گامبورگ	۲	–	–	–	۰.۵
گامبورگ	۴	–	–	–	۰.۵
گامبورگ	۲	–	۰.۱	–	–
گامبورگ	۲	–	–	۰.۵	–
گامبورگ	۳	–	–	۱	–
گامبورگ	–	۲	–	۰.۵	–
گامبورگ	–	۳	–	۱	–

۳.نتایج و بحث

در این مطالعه، اثر غلظت‌های مختلف هورمون‌های سیتوکینین (BAP،Kin) به تنهایی، یا درترکیب با هورمون‌های اکسین (PIC، NAA و 2,4-D) به محیط پایه MS و گامبورگ در رشد ریزنمونه های کاملینا ساتیوا حاصل از کوتیلدون و هیپوکوتیل بررسی گردید. در تیمارهای هورمونی 0/1NAA+4BAP و 0NAA+4BAP اصلا رشدی مشاهده نشد. در بین هورمونها و محیط های استفاده شده نسبت هورمونی ۰.۵ میلی گرم NAA و ۱.۵ میلی گرم BAP برای کوتیلدونها در محیط گامبورگ ۳ هفته بعد کشت کالوس های جنین زا (شکل۲) و در بقیه نسبتهای هورمونی کالوس های غیرجنین زا و شیشه ای مشاهده گردید.



شکل ۲: تولید کالوس جنین زا در ریزنمونه کوتیلدون کاملینا ساتیوا ۳هفته پس از کشت در محیط گامبورگ با ترکیبات هورمونی BAP و NAA

۴.نتیجه‌گیری

گیاه کاملینا به مقدار ۴۰ درصد امگا ۳ و ۲۰ درصد امگا ۶ در روغن خود دارد. همچنین ۹۵ درصد اسیدهای چرب اشباع مفید در روغن آن نیز موجود است. کنجاله این گیاه می‌تواند به‌عنوان غذایی مناسب برای دام، طیور و آبزیان استفاده شود. گیاه کاملینا در برابر سرما، گرما، خشکی، شوری زمین، آفات و امراض و... بسیار مقاوم است از همه مهم‌تر اینکه خاصیت ضد سرطانی آن هم به اثبات رسیده است. با وجوداین، روغن استحصالی به علت دارا بودن اسیدهای چرب زنجیره بلند بیشتر جنبه صنعتی دارد. لذا نیاز است از طریق رهیافت انتقال ژن و دستکاری ژنتیکی مقدار اسیدهای چرب زنجیره بلند را کاهش داد. لازمه این امر، بهینه‌سازی کشت بافت مناسب این گیاه می‌باشد.

منابع

14- Chen, C., Bekkerman, A., Afshar, R. K., & Neill, K. (2015). Intensification of dryland cropping systems for bio-feedstock production: Evaluation of agronomic and economic benefits of Camelina sativa. Industrial Crops and Products, 71, 114-121 .

15- Gamborg, O .L. c., Miller, R. A., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental cell research, 50(1), 151-158 .
16- Mittal, S., Ahmed, W., & Koli, C. (2018). Renewable Energy in India: Current Status and Future Potentials. Invertis Journal of Renewable Energy, 8(2), 96-108 .
17- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum, 15(3), 473-497 .
18- Sitther, V., Tabatabai, B., Enitan, O & ,.Dhekney, S. (2018). Agrobacterium-mediated transformation of Camelina sativa for production of transgenic plants. Journal of biological methods, 5(1).

Methods for isolation and identification of bioactive compounds in weeds

Ebrahim Gholamalipour Alamdari [1,*] and Karim Dozini[2]

[1]Assistance professor of Plant Production Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University
[2] Weed Science student, Plant Production Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University

Corresponding author: e- mail: eg.alamdari@gonbad.ac.ir

Abstract
Weeds compete with neighboring plants through competition and secretion of bioactive compounds. Bioactive compounds are primarily related to secondary compounds that are involved in the immune system in plants. These compounds are extracted through various methods such as maceration, ultrasonic, microwave waves, supercritical fluid, ultrasound waves, etc. depending on the type of compounds.

Keywords: Bioactive compounds, Extraction, Microwave, Ultrasound waves

روش‌های جداسازی و شناسایی ترکیبات زیست فعال در علف‌های هرز

ابراهیم غلامعلی‌پور علمداری[۱،*]، کریم دزینی[۲]

[۱]استادیار گروه تولیدات گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس

۲ دانشجوی علوم علف‌های هرز گروه تولیدات گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس

نویسنده مسئول مکاتبات: *E- mail: eg.alamdari@gonbad.ac.ir*

چکیده

علف‌های هرز از طریق رقابت و ترشحات ترکیبات زیست فعال با گیاهان مجاور خویش رقابت می‌نمایند. اصولاً ترکیبات زیست فعال به ترکیبات ثانویه که در سیستم دفاعی در گیاهان دخالت دارند، مربوط می‌شود. این ترکیبات از طریق روش‌های مختلفی نظیر ماسراسیون، اولتراسونیک، امواج مایکروویو، سیال فوق بحرانی، امواج فراصوت و غیره بسته به نوع ترکیبات استخراج می‌گردند.

کلمات کلیدی: استخراج، امواج فراصوت، ترکیبات زیست فعال، مایکروویو

۱.مقدمه

علف‌هرز گیاهی ناخواسته و مضر که به دلیل آثار مخرب ناشی از رقابت بر عملکرد محصولات زراعی از دیر باز به‌عنوان جزئی نامطلوب از بوم نظام‌های کشاورزی شناخته شده و یکی از مهم‌ترین عوامل کاهش دهنده میزان محصول به‌شمارمی‌روند (Delafuente et al., 2006). از دلایل موفقیت و بقای این گیاهان، تولید بذر فراوان، سازگاری با شرایط اقلیمی منطقه و عدم وجود علف‌کش مناسب جهت کنترل آن‌ها می‌باشد (Sohrabi et al., 2013; Savarinejad et al., 2010). شرایط مزرعه و بدون شک تداخل آللوپاتیک یکی از فاکتورهای مهم در مشخص نمودن توزیع و فراوانی برخی از گونه‌های علف هرز در داخل اجتماعات گیاهی است. لذا کاهش در عملکرد گیاهان زراعی توسط علف‌های هرز می‌تواند به نوعی نتیجه مستقیم رقابت و آللوپاتی و یا فعالیت توأم آن دو با هم باشد (Kadiolu and Yanar, 2004).

متابولیت‌های ثانویه مشتق از ترکیبات فرعی حاصل از گیاهان مانند ترکیبات فنلی و فلاونوئید تام دارای پتانسیل قوی برای پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد می‌باشند که در تمام قسمت های مختلف گیاهی مانند برگ، میوه، دانه، ریشه و پوست وجود دارند (Sottero *et al.*, 2019). ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها دارای خواص بیولوژیکی متعددی مانند خاصیت آنتی‌اکسیدانی، به دام انداختن رادیکال‌های آزاد و خاصیت ضدالتهاب می‌باشند (فاضلی‌نسب و همکاران، ۱۳۹۶). از سوی دیگر غلظت بالای ترکیبات فنلی سبب مهار جوانه‌زنی بذر، ممانعت از رویش گیاهان و جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها می‌شود.

کمیت و کیفیت متابولیت‌ها در گیاهان به عوامل متعددی از جمله اندام، سن گیاه، مرحله فنولوژیکی و عوامل محیطی وابسته است. استخراج این ترکیبات نیز وابسته به روش استخراج و حلال مورد نظر است. متابولیت‌های گیاهی رنج وسیعی از ترکیبات غیر قطبی تا قطبی هستند بنابراین جهت جداسازی و استخراج آن‌ها می‌بایست از حلال‌های مختلف با قطبیت‌های مختلف استفاده نمود.

به عنوان مثال جهت استخراج و خالص سازی ترکیبات غیر قطبی ترپنوئیدها می‌توان از حلال‌های غیر قطبی مانند هگزان و یا اتر دوپترول استفاده نمود (Farimani et al., 2016).

روش‌های عصاره‌گیری

معمولاً چندین روش برای تهیه عصاره گیاهی وجود دارد و هر روش در مقایسه با دیگر روش‌ها از محدودیت‌ها و مزایای منحصر به‌فرد برخوردار می‌باشند. در سال‌های اخیر توجه فراوانی به ارائه روش‌های جدید استخراج شده است، به گونه‌ای که بیشترین ساختار از مواد موثره، در کوتاه‌ترین زمان ممکن با کمترین قیمت به‌دست آید.

روش‌های عصاره‌گیری به دو نوع با کمک حرارت و بدون دخالت حرارت می‌باشد. در صورتی‌که اجسام موجود در گیاهان به حرارت حساس باشند، بهتر است از روش دوم استفاده شود. عصاره‌گیری با دخالت حرارت با وسیله‌ای به نام سوکسله و عصاره‌گیری بدون دخالت حرارت با وسیله‌ای به نام پرکولاتور صورت می‌گیرد. عصاره‌گیری با حرارت سریع‌تر و ارزان‌تر تمام می‌شود، در حالی‌که در روش دوم عصاره‌گیری نیازمند زمان بوده و میزان حلال مصرفی بیشتر و گران‌تر تمام می‌شود. مزیت عصاره‌گیری بدون دخالت حرارت سالم ماندن اجسام در عصاره است، در این‌صورت اثر عصاره شبیه گیاه مربوطه می‌باشد.

عصاره‌گیری بدون دخالت حرارت با دستگاه پرکولاتور

پرکولاتور وسیله‌ای است که با ریختن پودر گیاه در آن و عبور دادن جریان حلال از روی پودر بدون دخالت حرارت عصاره‌گیری انجام می‌شود. پرکولاتور آزمایشگاهی از جنس شیشه و به‌شکل مخروط ناقص می‌باشد که قسمت عمده آن به طرف بالا بوده و در قسمت پایین آن شیری جهت کنترل خروج حلال آن تعبیه شده است. پرکولاتورهای آزمایشگاهی دارای حجم‌های متفاوت بوده و می‌توان تا چند کیلوگرم پودر را عصاره‌گیری کرد. پرکولاتورهای صنعتی از جنس استیل بوده و حجم آن در حد چندین تن در پودر گیاه است.

عصاره‌گیری با کمک حرارت با دستگاه سوکسله

روش سوکسله یک روش استانداردی است که به‌عنوان مرجع اصلی ارزیابی دیگر روش‌ها به‌کار می‌رود. این روش، عمومی بوده که به‌طور عمده برای استخراج ترکیبات با فراریت کم یا متوسط که درمقابل حرارت پایدار باشند بهکار می‌رود (Luque de Castro and Garcia-Ayuso, 1998). در این روش و سایر روش‌های عصاره‌گیری انتخاب حلال اهمیت بسیار زیادی دارد، به‌طوری‌که انتخاب حلال‌های مختلف موجب ایجاد عصاره‌های متفاوت و ترکیبات متنوع در آن عصاره خواهد شد (Zarnowski and Suzuki, 2004).

در این روش هگزان، حلالی است که مورد استفاده قرار می‌گیردT زیرا دمای جوش بین ۶۳ تا ۶۹ درجه سانتی‌گراد داشته، حلالیت مواد روغنی در آن خوب است و می‌توان پس از استفاده آن را بازیافت کرد، اما این حلال آلاینده محیط زیست بوده و به‌همین دلیل گاهی از حلال‌های کم خطری مانند اتانول، ایزوپروپانول، هیدروکربنه و غیره در این روش استفاده می‌شود (Mamidipally and Liu, 2004).

اندازه ذره‌ای از موارد دیگری است که در این روش و هر روش عصاره‌گیری دیگری اهمیت داشته و با کاهش آن میزان نفوذ حلال به داخل ماده گیاهی افزایش یافته و بازده افزایش می‌یابد، به‌طوری‌که در استخراج روغن‌ها از دانه‌های روغنی برای دست‌یابی به بازه ۹۹ درصد با اندازه ذره‌ای ۰/۴ میلی‌متر حدود ۲ ساعت و با اندازه ذره ۲ میلی‌متر ۱۲ ساعت زمان لازم است (Luque-Carcia and Luque de Gastro, 2004).

به‌هر حال از مزایای عصاره‌گیری به روش سوکسله می‌توان به ساده و آسان بودن روش، در تماس بودن مداوم حلال تازه با پودر گیاهی، عدم فیلتراسیون و استفاده از دمای بالا که منجر به افزایش حدلیت ترکیبات محلول در دمای پایین می‌شود، اشاره کرد. اما علی‌رغم مزایای اشاره شده، این روش دارای معایبی می‌باشد که از جمله آن می‌توان به زمان‌بر بودن فرآیند و آسیب‌رساندن به ترکیبات حساس به حرارت اشاره کرد (De Castro and Garcıa-Ayuso, 1998).

عصاره‌گیری به روش ماسراسیون

فرآیند استخراج مایعات که شامل حفظ تماس بین گیاه و یک مایع (حلال) برای یک دوره زمانی است، ماسراسیون نامیده می‌شود. ماسراسیون یک روش استخراج است که در دمای اتاق انجام می‌شود. این روش شامل غوطه‌وری گیاه در مایع (آب، روغن، الکل و غیره) درون یک ظرف ضدهوای برای مدت زمان متغیر بر اساس مواد گیاهی و مایع (حلال) مورد استفاده است. در روش ماسراسیون، عصاره‌گیری بایستی در مکانی دور از نور مستقیم خورشید انجام گیرد و درب ظرف جهت جلوگیری از تبخیر به‌طور محکم بسته گردد. عمل عصاره‌گیری را ضمن تکان دادن و یا همزدن مکرر در حرارت اتاق ادامه داده و بعد از این زمان که تعادل غلظت مواد موجود در حلال و بافت گیاهی برقرار گردیده است، عمل عصاره‌گیری را خاتمه داده و سپس عصاره حاصل را صاف می‌نمایند. در خاتمه عصاره‌ها را با هم مخلوط و در حرارت کمتر از ۱۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری نموده و سپس با احتیاط از تبخیر شدن حلال آن را مجدداً صاف و در صورت لزوم غلظت‌های مختلف را تنظیم می‌نمایند.

از مزایای روش ماسراسیون می‌توان به ساده و آسان بودن روش (بدون به‌کارگیری دستگاهی) و امکان استخراج ترکیبات حساس نسبت به دما اشاره نمود. از سوی دیگر نیاز به فیلتراسیون و زمان‌بر بودن روش، از معایب این روش قلمداد می‌شوند. به‌کار بردن حلال‌های یکنواخت می‌توان به‌کمک این روش عصاره‌هایی با میزان مواد موثره یکنواخت به‌دست آورد. هم‌چنین در مطالعاتی که هدف تحقیقات بیولوژیکی بوده (استفاده از عصاره به‌عنوان دارو) و کیفیت و درصد مواد موثره مهم می‌باشد، این روش پیشنهاد می‌شود. در مقایسه با روش‌های دیگر، این روش بیشتر طول می‌کشد. از انواع حلال‌های آبی، الکی و هیدروالکلی در این روش می توان استفاده کرد.

عصاره‌گیری به روش اولتراسونیک

روش‌های استخراج جدید مانند استخراج به‌کمک اولتراسونیک و مایکروویو، روش‌های سریع و مؤثری برای استخراج ترکیب‌های موثره از بافت‌های گیاهی می‌باشد. امواج اولتراسوند، امواج صوتی با فرکانسهای بالاتر از ۲۰ کیلوهرتز می‌باشند که نوسان‌های مکانیکی در یک ماده جامد، مایع و گاز ایجاد می‌کنند. برخلاف امواج الکترومغناطیسی، امواج صوتی باید در یک ماده پخش شوند و دارای چرخه‌های انبساط و انقباض در طی پخش در محیط باشند. انبساط سبب افزایش فاصله مولکولی شده و انقباض آن‌ها را با هم تحت فشار قرار می‌دهد. در حالت انبساط، حباب‌هایی در یک مایع ایجاد و فشار منفی تولید می‌کند. حباب‌های تشکیل شده، رشد و در نهایت متلاشی می‌شوند (پدیده کاویتاسیون[1]). تاثیرات مکانیکی اولتراسوند، باعث نفوذ حلال بیشتر به درون مواد سلولی شده و انتقال جرم را بهبود می‌دهد. هم‌چنین اولتراسوند می‌تواند در طی استخراج دیواره‌های سلولی را تخریب و موجب تسهیل آزادسازی محتوای آن شود. در کل استخراج به‌کمک اولتراسوند یک روش ساده بوده و جایگزین مناسبی برای روش‌های سنتی استخراج است. فواید اصلی استفاده از اولتراسوند در استخراج جامد-مایع شامل افزایش بازده استخراج و سرعت استخراج است. اولتراسوند می‌تواند دمای عملیاتی را کاهش دهد و امکان استخراج ترکیبات حساس به حرارت را فراهم سازد. در مقایسه با تکنیک‌های استخراج جدید دیگر هم‌چون استخراج با مایکروویو، دستگاه اولتراسوند ارزان‌تر و اجرای آن راحت‌تر می‌باشد. استخراج به‌کمک اولتراسوند مشابه استخراج با سوکسله می‌تواند با هر حلالی برای استخراج دامنه وسیعی از ترکیبات طبیعی آن استفاده شود.در این روش محتوای رطوبت ماده گیاهی اهمیت فراوانی دارد، زیرا حداکثر قدرت امواج در مجاورت منبع تولید موج بوده و با افزایش فاصله از منبع، قدرت امواج کاهش می‌یابد. به‌علاوه هرچه ماده موجود در مسیر تابش جامد و متراکم‌تر باشد، میزان کاهش امواج بیشتر خواهد بود، بنابراین با به‌کار بردن ماده گیاهی مرطوب از کاهش قدرت امواج جلوگیری می‌شود (Romdhane et al., 1995). کاهش اندازه ذره‌ای در این روش هم موجب افزایش بازده می‌گردد. فرکانس امواج می‌تواند در بازده تاثیرگذار باشد، به‌طوری‌که درمطالعه‌ای، استخراج پیرترین‌ها از پیرتروم افزایش کوچکی در فرکانس منجر به افزایش ۲۲ درصد در بازده شده است، اما در عصاره‌گیری از گیاه، افزایش فرکانس تأثیر قابل توجهی بر بازده نداشته است. دمای عصاره‌گیری در این روش بایستی مدنظر قرار گرفته شود و از افزایش بیهوده دما جلوگیری گردد. طول مدت عصاره‌گیری هم در این روش اهمیت خاصی داشته و افزایش بیش از حد آن موجب تغییر در کیفیت عصاره حاصله خواهد شد. در این روش دمای کمتری برای عصاره‌گیری لازم است، در نتیجه به ترکیبات حساس به حرارت، کمتر آسیب می‌رسد. در مقایسه این روش با سایر روش‌های جدید عصاره‌گیری، این روش آسانتر و ارزان تر بوده، با هر نوع حلالی نیز قابل انجام می‌باشد. از معایب روش حاضر می‌توان نیاز به فیلتراسیون و انتخاب‌گری پایین روش را برشمرد، اگرچه می‌توان با به‌کار بردن حلاهای اختصاصی تا حدودی روش را انتخابی

[1] Cavitation

کرد، اما به‌هرحال چون در این روش گاهی سلول پاره شده و کلیه محتویات سلولی در تماس با حلال قرار می‌گیرند، این روش به‌طورکلی غیر انتخابی تلقی می‌شود (Luque-Garcia and De Castro, 2003).

روش عصاره‌گیری همراه با امواج مایکروویو

امواج مایکروویو، امواج الکترومغناطیسی با فرکانس ۰/۳ تا ۳۰۰ گیگا هرتز هستند. این امواج به داخل بافت گیاهی نفوذ کرده و با مولکول‌های قطبی مانند آب واکنش داده و گرما ایجاد می‌کنند. در واقع مولکول‌های قطبی مثل آب این امواج را جذب کرده، موجب ایجاد گرمای زیاد داخلی در ماده گیاهی و در نتیجه تخریب سلول‌ها می‌گردند.

دما و اندازه ذره در این روش هم‌مانند روش‌های قبلی ذکر شده اهمیت زیادی دارد. به‌علاوه در این روش، محتوای رطوبت ماده گیاهی نیز بسیار مهم است. زیرا همان‌طورکه ذکر شده است که حلال‌های قطبی و به‌ویژه آب توانایی جذب امواج را خواهند داشت. بنابراین هرچه محتوای رطوبت ماده بیشتر باشد، میزان جذب امواج بیشتر و گرمای بیشتری ایجاد می‌شود و در نتیجه، تخریب سلول‌ها هم افزایش می‌یابد. انتخاب حلال مناسب در این روش هم به قدرت حلالیت و هم به ثابت دی الکتریک حلال بستگی دارد، به‌طوری‌که در استخراج پیگمان‌های رنگی پاپریکا از ۳۰ حلال مختلف استفاده کرده‌اند و دریافتند که اگر از حلال‌های قطبی مثل اتانول، متانول و آب استفاده شود به‌علت داشتن ثابت دی‌الکتریک بالا مطلوب بوده، اما قادر به حل پیگمان‌های رنگی نیستند و عکس این موضوع را در مورد حلال‌های غیر قطبی مثل هگزان و تولوئن خواهیم داشت (Csiktusnadi Kiss et al., 2000). به‌همین دلیل معمولاً از مخلوط حلال‌ها برای افزایش قدرت حلالیت و قطبیت همراه با هم استفاده می‌شود. به‌علاوه به‌منظور افزایش قطبیت، حلال‌هایی مانند هگزان، گزیلن و تولوئن به آن‌ها آب اضافه می‌شود (Spar Eskilsson and Bjorklund, 2000). کاهش طول زمان عصاره‌گیری از مهمترین محاسن این روش است، به‌طوری‌کهدر مطالعه‌ای در استخراج ساپونین‌ها از جین سینگ با استفاده از این روش زمان عصاره گیری از ۱۲ ساعت به چند دقیقه کاهش یافته است. این روش بازده عصاره‌گیری را افزایش می‌دهد. در آزمایشی، استخراج آرتمیزینین از آرتمیزیا با استفاده از این روش نسبت به روش سوکسله نه‌تنها زمان عصاره‌گیری را از چند ساعت به ۱۲ ثانیه کاهش داده است، بلکه بازده را از ۶۰ درصد به ۹۲/۱ درصد افزایش داده است. به‌علاوه ۴ تا ۵ دقیقه عصاره یری با روش مایکروویو بازده بالاتری را نسبت به ۲۰ تا ۲۴ ساعت دمای اتاق ایجاد می‌نماید . کاهش میزان حلال مصرفی از محاسن دیگر این روش است و گاهی با استفاده از این روش میزان حلال مورد نیاز تا ۲۰ برابر کاهش می‌یابد. سادگی و هزینه نسبتاً پایین هم از دیگر محاسن این روش می‌باشد.در این روش گرمای ایجاد شده می‌تواند به ترکیبات حساس به حرارت آسیب رساند. به‌علاوه این روش برای استخراج ترکیبات با قطبیت پایین مناسب نیست و فیلتراسیون انتهایی مورد نیاز بعد از استفاده از این روش از ددگر معایب آن محسوب می‌شود

روش استخراج با سیال فوق بحرانی[1]

امروزه به‌طور گسترده، حلال هگزان در فرآوری دانه‌های روغنی مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما به‌دلایلی نظیر آتش‌زا بودن، سمیت بالا، کمیاب بودن، قیمت زیاد و افت قابل توجه آن در طول فرآیند و نیز تجزیه ترکیبات حساس به حرارت در مرحله حلال‌زدایی و هزینه بالای این مرحله، نیاز به روش‌های ایمن و جدید مانند استخراج با سیال فوق بحرانی الزامی است. دی‌اکسیدکربن فوق بحرانی به‌دلیل مزایایی مانند غیرسمی و غیراشتعال‌زا بودن، قیمت پایین، دسترسی آسان، پایداری شیمیایی بالا، عدم واکنش با نمونه و جداسازی آسان از نمونه، مورد توجه قرار گرفته است. دی‌اکسیدکربن به‌دلیل غیرقطبی بودن، ترکیبات غیرقطبی مانند روغن‌ها را به‌خوبی در خود حل می‌کند. عدم انحلال ترکیبات قطبی مانند فسفولیپیدها در دی‌اکسیدکربن، سبب حذف مراحل بعدی صمغ گیری[2] و تصفیه[3] می‌شود. حالت فوق بحرانی برای یک سیال زمانی به‌دست می آید که دما و فشار آن بیشتر از نقطه بحرانی سیال[4] بوده و سیال به‌واسطه افزایش فشار و دما به مایع و گاز تبدیل

[1] Supercritical Fluid Extraction (SFE)
[2] Degumming
[3] Refining
[4] Critical point

نشود. در شرایط پایین‌تر از نقطه بحرانی، تعادلات مایع- بخار به‌گونه‌ای است که بخار در سطح جداکننده دو فاز و مایع در سطح پایین آن قرار[1] می‌گیرد. با افزایش دما و فشار به تدریج چگالی مایع کاهش و جرم حجمی آن افزایش می‌یابد.

در نقطه بحرانی، چگالی دو حالت مایع و گاز با هم برابر می‌شود و تشخیص سطح جداکننده دو فاز امکانپذیر نیست. نقطه بحرانی بالاترین دما و فشاری است که سیال می‌تواند در یک زمان در دو فاز مایع و گاز وجود داشته باشد و در بالاتر از این نقطه، سیال به‌شکل گاز یا مایع وجود ندارد. این فاز از نظر قدرت حلالیت و چگالی مشابه مایعات و از نظر خصوصیات انتقالی شبیه گازها است، به‌طوری‌که گرانروی پایین سیال فوق بحرانی و قدرت نفوذ بالای[2] آن، سبب بروز خصوصیات انتقال جرم بهتر این سیال در مقایسه با حلال های رایج می‌شود. در نتیجه، سرعت استخراج و جداسازی به‌طور قابل ملاحظه‌ای سریع‌تر از حالتی است که فرآیند استخراج به‌طور معمول صورت می‌گیرد (Mukhopadhyay, 2000). انتخاب حلال مهم ترین موضوع در طراحی یک فرآیند استخراج فوق بحرانی است. حلال‌هایی که به‌عنوان سیال فوق بحرانی به‌کار می روند باید دارای ویژگی‌هایی نظیر حلالیت خوب، بی اثر بودن بر فرآورده‌ها، جداسازی آسان از نمونه، ارزان بودن و فشار بحرانی پایین باشند. علاوه بر شرایط یاد شده، سازگاری با محیط‌زیست از نکات مورد توجه در انتخاب یک سیال فوق بحرانی به‌شمار می‌آید که در این میان دی‌اکسیدکربن بسیار مورد توجه است، زیرا این ماده دارای نقطه بحرانی پایین (دمای ۳۱/۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۷۳/۸ بار)، ارزان قیمت، پایدار، غیرقابل اشتعال بوده و از نظر زیست‌محیطی نیز قابل پذیرش است و می‌تواند به آسانی به سیستم برگردانده شود.برای استخراج ترکیبات غیرقطبی و قطبی به‌ترتیب می‌توان از دی‌اکسیدکربن و حلال‌های کمکی مانند متانول استفاده کرد .تحقیقات نشان می‌دهند نقش اصلی حلال کمکی در فرآیند استخراج فوق بحرانی، افزایش قطبیت سیال فوق بحرانی نظیر دی‌اکسیدکربن است و معمولاً هنگامی که جزء حل شونده قطبی باشد و قدرت انحلال سیال فوق بحرانی غیرقطبی با تغییر دما و فشار افزایش پیدا نکند مورد استفاده قرار می‌گیرد.

نانــوتکنولوژی ترکیبات شیمیایی گیاهان و بهره‌وری از آن جهت نیل به پایداری در اکوسیستم

لغت نانو واژه‌ای است یونانی که برای تعیین یک میلیاردم یا 10^{-9} یک کمیت استفاده می‌شود. (خیام نکویی و همکاران، ۱۳۸۹). در سال‌های اخیر به‌دلیل پتانسیل‌های موجود در زمینه نانوتکنولوژی محققین تلاش‌های گسترده‌ای در توسعه آن داشته‌اند. فناوری نانو شناخت و کنترل مواد در ابعاد بین یک تا صد نانومتر است . نانوتکنولوژی به‌علت تولید نانوذرات در اندازه، شکل، ترکیب شیمیایی و پراکنش متفاوت و کاربردهای بسیار آن‌ها برای بشر، حوزه تحقیقاتی جذابی به حساب می‌آید. ساخت، دستکاری و استفاده از نانوذرات فلزی به‌علت کاهش ابعاد و در نتیجه داشتن ویژگی‌های حرارتی، نوری و الکترونیکی منحصر بفرد اهمیت زیادی دارند.

روش‌های تولید زیستی نانوذرات نسبت به روش‌های فیزیکی و شیمیایی به‌دلیل کاهش هزینه انرژی و زمان اولویت دارد. این روش نیازمند استفاده از حلال‌های سمی و ماده خطرناک برای محیط زیست نیست. تولید سبز نانوذرات روشی دوست‌دار طبیعت است که در آن از حلال‌های طبیعی استفاده می‌شود. فناوری نانو باعث ایجاد تحول در حوزه های مواد، فناوری اطلاعات و ارتباطات پزشکی و ژنتیک شده است. امروزه محصولات جدید مبتنی بر فناوری نانو بیش از پیش وارد بازار شده‌اند و نتایج تحقیقات در این زمینه به‌سرعت در حال تجاری شدن است. این فناوری موجب بهبود محصولات و فرآیندهای تولید با مشخصات و کارکردهای جدید می‌شود. انتظار می‌رود که در سال‌های آینده، کاربردهای وابسته به فناوری نانو، تقریباً تمامی بخش‌های صنعتی را پوشش داده و به‌طور گسترده وارد بازار محصولات مصرفی شود. بنابراین با توجه به آینده درخشان این صنعت، کشورهای مختلف سرمایه‌گذاری‌های بزرگی در این زمینه انجام می‌دهند.

[1] Density
[2] Viscosity

همان‌طوری‌که می‌دانیم استفاده از امولسیون‌های روغنی در ساخت واکسن‌ها می‌تواند عوارض جانبی شدیدی به‌همراه داشته باشد. استفاده از حامل‌های نانو ذرات مثل کیتوسان و پلی‌لاکتیت‌کوگلیکولید اسید (PLGA) منجر به ایجاد سطح بالایی از ایمنی نه فقط در برابر بیماری‌های باکتریایی بلکه در برابر بیماری‌های ویروسی می‌شود. واکسینه کردن موجودات می‌تواند با استفاده از نانوکپسول‌های حاوی نانوذرات انجام شود. مزیت این روش آن است که مواد با این روش تجزیه نمی‌شوند و نانوکپسول‌ها که حاوی رشته‌های کوتاهی از DNA هستند، بعد از ورود به آب، می‌توانند وارد سلول‌های جانوران شوند.

در رابطه با اثر شرایط مختلف برداشت، نتایج جرجانی و همکاران (۱۳۹۷) نشان داد که ریشه مامیران در مراحل مختلف فنولوژیکی از میزان آلکالوئیدها و فنل کل بیشتری در مقایسه با اندام‌های هوایی در مراحل مشابه برخوردار بود. هم‌چنین بیشترین میزان آلکالوئیدها و فنل کل ریشه به‌ترتیب به مرحله رویشی و گل‌دهی اختصاص داشت. میزان آنتوسیانین‌ها با افزایش مرحله نموی گیاه مامیران در اندام‌های ریشه و هوایی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. در تحقیقی دیگر توسط غلامعلی‌پور علمداری (۲۰۱۱) متابولیت‌های ثانویه مثل تانن‌ها، ساپونین‌ها و آنتراکوئینون‌ها در عصاره آبی و ترپنوئیدها، استروئیدها و گلیکوزوئیدها در عصاره الکلی در اندام‌های مختلف ریشه، ساقه و برگ علف‌های هرز اویارسلام، سوروف، بندواش و تیرکمان آبی شناسایی و مورد تایید قرار گرفت. در آزمایشی مکاری و همکاران (۱۳۹۵) گزارش نمودند که مقدار ترکیبات فنلی در اندام‌های مختلف گیاه ریواس یکسان نیست. بیش‌ترین میزان فنل کل مربوط به دو اندام گل‌آذین و مخلوطی از سه اندام‌ها بود. در مطالعه‌ای بر روی کاهوی‌وحشی نیز گزارش شد که بیشترین میزان فنل کل و آنتوسیانین‌ها به برگ اختصاص داشت و در حالی‌که سایر اندام‌ها به‌ویژه ریشه از کمترین این مقادیر متابولیت‌های ثانویه برخوردار بودند (غلامعلی‌پور علمداری و همکاران، ۱۳۹۶).

۲.نتیجه‌گیری

گیاهان به‌ویژه هرز به‌دلیل زندگی در شرایط تنش سرشار از متابولیت‌های ثانویه می‌باشند. روش‌های مختلفی جهت عصاره‌گیری از گیاهان وجود دارد که مهمترین آن‌ها استفاده از دستگاه‌های پیشرفته کروماتوگرافی است. روش‌هایی شامل سیال فوق بحرانی، امواج مافوق صوت ،اولتراسونیک، مایکرویو و غیره از مهمترین روش‌ها می‌باشند.

منابع

۱- جرجانی آ.، نیاکان م. و غلامعلی‌پور علمداری ا. ۱۳۹۷. بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، سنجش محتوای متابولیت‌های ثانویه و اسمولیت‌های اندام‌های هوایی و زیرزمینی گیاه دارویی مامیران (*Chelidonium majus* L.) در مراحل مختلف فنولوژیکی. فیزیولوژی محیطی گیاهی، ۱۳(۵۱): ۵۱-۶۶.

۲- خیام نکویی م.، بی‌آزار ا. و صالحی جوزای غ. ۱۳۸۹. فناوری نانو در علوم کشاورزی. انتشارات پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی. ۲۴۱ صفحه.

۳- غلامعلی‌پور علمداری ا.، ایری م.، اورسجی ز. و بیات کوهسار ج. ۱۳۹۶. بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی علف‌هرز کاهوی وحشی *Lactuca serriola* L. (مطالعه موردی مزارع روستای وامنان شهرستان آزادشهر)، نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، ۱۲(۴۸): ۷۷-۶۵.

۴- فاضلی‌نسب، ب.، رهنما، م. و مزارعی، ا. ۱۳۹۶. ارزیابی ارتباط بین خواص آنتی اکسیدانی و خاصیت ضد میکروبی عصاره های ۹ گیاه دارویی. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ۲۷(۱۴۹): ۷۸-۶۳.

۵- مکاری ف.، غلامعلی‌پور علمداری، ا. و بیات کوهسار ج. ۱۳۹۵. تجزیه فیتوشیمیایی اندام‌های مختلف گیاه خودرو ریواس (*Rheum ribes*) در مرحله گل‌دهی (مطالعه موردی: ارتفاعات روستای کاریزک از توابع شهرستان کاشمر). نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، ۱۱(۴۲): ۳۶-۲۵.

6- Csiktusnadi Kiss G.A., Forgacs E.F., Cserhati T., Mota T., Morais H. and Ramos A. 2000. Optimization of the microwave-assisted extraction of pigments from paprika (*Capsicum annuum* L.) powders. Journal of Chromatography A, 889: 41–49.

7- De Castro M.L. and Garcıa-Ayuso L.E. 1998. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. Analytica Chimica Acta, 369(1): 1-10.
8- Delafuente E.B. Suarez S.A. and Ghersa C.M. 2006. Soybean weeds community composition and richness between 1995 and 2003 in the Rolling Pampas (Argentina). Agriculture Ecosystem and Environment, 115: 229-236.
9- Farimani M.M., Taleghani A., Aliabadi A., Aliahmadi A., Esmaeili M.A., Sarvestani N.N., Khavasi H.R., Smieško M., Hamburger M. and Ebrahimi S.N. 2016. Labdane diterpenoids from Salvia leriifolia: *Absolute configuration*, antimicrobial and cytotoxic activities. Planta medica, 82(14): 1279-1285.
10- Gholamalipour Alamdari E. 2011. Preliminary phytoconstituts screening of some weeds and their potential toxicity on rice variety–Tarom via decomposition bioassay. International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology, Vol. 16 (2011) c (2011) IACSIT Press, Singapore.
11- Kadiolu I. and Yanar Y. 2004. Alelopathic effect of plant extracts against seed germination of some weeds. Asian Journal of Plant Sciences, 3(4):472-475.
12- Luque de Castro M.D. and Garcia-Ayuso L.E. 1998. Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. Analytical Chemical Acta, 369: 1-10.
13- Luque-Garcıa J.L. and De Castro M.L. 2003. Ultrasound: a powerful tool for leaching. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 22(1): 41-47.
14- Mamidipally P.K. and Liu S.X. 2004. First approach on rice bran oil extraction using limonene. European Journal of Lipid Science and Technology, 106: 122– 125.
15- Mukhopadhyay M. 2000. Natural extracts using supercritical carbon dioxide.First ed. Boca Raton: CRS Press. Pp. 198-205.
16- Romdhane M., Gourdon, C. and Casamatta G. 1995. Local investigation of some ultrasonic devices by means of a thermal sensor. Ultrasonics, 33: 221-227.
17-Savarinejad A.R., Habibian L. and Yunes-Abadi M. 2010. The introduction of new invasive weed of wild melon, morning glory and two spurge species in soybean fields in Golestan Province. The First National Conference on Advances in the Production of plant oils, 26-27 May 2010. Bojnourd, Iran.
18-Sohrabi S., Ghanbari M., Rashedmohasel M.H., Nasiri mahalati M. and Gherekhloo J. 2013. Effect of salinity and Temperecure on germination charactersics, seedling growth, water and sodium contain of cucumis melo L. Journal of Plant Protection, 27(4):452-458.
19- Sottero B., Leonarduzzi G., Testa G., Gargiulo S., Poli G. and Biasi F. 2019. Lipid oxidation derived aldehydes and oxysterols between health and disease. European Journal of Lipid Science and Technology, 121(1): 1700047.
20- Spar Eskilsson S. and Bjorklund E. 2000. Analyticalscale microwave-assisted extraction. Journal of Chromatography A, 902: 227–250.
21- Zarnowski R. and Suzuki, Y. 2004. Expedient soxhlet extraction ofresorcinolic lipids from wheat grains. Journal of Food Composition and Analysis, 17: 649- 664.

گیاهان دارویی زیر اشکوب رویشگاه ارس منطقه گوی‌نیک جرگلان (استان خراسان شمالی)

زیور ظفرنجف زاده[۱]، ابوالفضل دانشور[۲*]، علی ستاریان[۳]، سیده مینو میرعرب رضی[۴]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس
۲-استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس
۳-دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس
۴- دانش آموخته دکتری بیوتکنولوژی گروه زیست شناسی، دانشگاه گیلان

*Abolfazl.Daneshvar@gmail.com **

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی مقدماتی فلور گیاهان دارویی رویشگاه ارس منطقه گوی‌نیک جرگلان واقع در استان خراسان شمالی انجام شد. این مطالعه، از ابتدای فصل رویش در منطقه جرگلان شروع شد و به مدت یک سال تداوم داشت. جهت جمع آوری نمونه گیاهان دارویی، هر دو هفته یکبار از منطقه مورد مطالعه بازدید و اطلاعات مربوطه جمع آوری شد. در بررسی مقدماتی فلور گیاهان دارویی رویشگاه ارس منطقه گوی‌نیک جرگلان (استان خراسان شمالی)، ۵۷ گونه گیاهی از ۵۰ جنس متعلق به ۲۱ تیره شناسایی گردید. بزرگ‌ترین تیره‌های گیاهی منطقه به ترتیب با اولویت بیشترین تعداد گونه عبارتند از: تیره Asteraceae با ۹ گونه، تیره Lamiaceae با ۸ گونه، تیره Fabaceae با ۷ گونه، تیره Rosaceae با ۵ گونه، تیره Apiaceae با ۴ گونه، تیره Poaceae با ۳ گونه، تیره Brassicaceae با ۳ گونه ، تیره Boraginaceae با ۲ گونه، تیره Berberidaceae با ۲ گونه، تیره Malvaceae با ۲ گونه، تیره Ephedraceaeبا ۲ گونه و تیره Scrophulariaceae، تیره Resedaceae، تیره Sapindaceae، تیره Amaryllidaceae، تیره Asparagaceae، تیره Simaroubaceae، تیره Zygophyllaceae، تیره Convolvulaceae، تیره Euphorbiaceae و تیره Hypericaceae، هر کدام با یک گونه شناسایی شدند. از مجموع ۵۷ گونه گیاهی منطقه، ۲۱ گونه به شکل زیستی همی‌کریپتوفیت، ۱۶ گونه به شکل تروفیت، ۳ گونه به شکل ژئوفیت، ۸ گونه به شکل فانروفیت و ۹ گونه به شکل کامفیت بودند. همچنین بررسی‌های اولیه نشان می‌دهد تعداد ۲۴ گونه از فلور گیاهی کف رویشگاه ارس گوی‌نیک جزو گیاهان دارویی بسیار مهم هستند. لذا به نظر می‌رسد منطقه مورد بررسی از نظر تنوع گونه‌ای گیاهان دارویی، مطلوبیت خوبی نداشته باشند که ضرورت دارد با اعمال مدیریت مستقیم، نسبت به افزایش تنوع گونه‌ای آن اقدام نمود. یافته‌های این پژوهش می‌تواند به‌منظور مکان‌یابی رویشگاه‌های گیاهان دارویی برای حفاظت، بهره‌برداری، بذرگیری و تأمین بخشی از درآمد دامداران مورد استفاده قرار گیرد. از آنجائی که مطالعه حاضر در منطقه ذخیره گاه رویشگاه ارس گوی‌نیک استان خراسان در حال انجام است، تکرار مطالعه در منطقه خارج ذخیره گاه در رویشگاه یادشده می‌تواند نتایج قابل ملاحظه‌ای را در اختیار محققین و کارشناسان و عوامل اجرایی قرار دهد.

واژگان کلیدی: طب سنتی، رویشگاه ارس خراسان، گیاهان دارویی، تنوع زیستی

۱.مقدمه

وجود اقلیم‌های متفاوت در ایران، شرایط مساعدی را به لحاظ بهره مندی از یک اکولوژی منحصر به فرد فراهم کرده است. این شرایط، زمینه رشد و نمو گیاهان دارویی را در کشور فراهم نموده و کشور را در زمره مستعدترین کشورهای جهان از نظر گیاهان دارویی قرار داده است. از نظر تاریخی گیاهان اهمیت فراوانی در توسعه جوامع مختلف داشته‌اند. در همین راستا استفاده از بعضی گیاهان دارویی به صورت سنتی مرسوم بوده و هنوز هم رواج دارد به همین دلیل همیشه تحقیقات وسیعی جهت یافتن فراورده‌ها و مواد طبیعی دارویی گیاهان در حال انجام می‌باشد.

امروزه اهمیت گیاهان دارویی و شناساندن نقش حیاتی آن‌ها در پیشبرد اهداف ملی، منطقه‌ای و جهانی برای تحقق سلامت، خودکفایی دارویی، ایجاد اشتغال و توسعه اقتصادی بر کسی پوشیده نیست. گیاهان دارویی به عنوان ذخایر و گنجینه‌های ژنتیکی کیانی می‌تواند بزرگ‌ترین ثروت ملی برای هر کشوری به عنوان یکی از تولیدات مهم در بخش کشاورزی محسوب شود. گیاهان دارویی از ارزش خاصی در علوم زیستی، پزشکی و دام پزشکی به لحاظ پیشگیری و درمان بیماری برخوردار است، در سال‌های اخیر استفاده از گیاهان دارویی به دلیل اثبات اثرات مفید آن، ارزان بودن، نداشتن اثرات جانبی و همچنین سازگار بودن با محیط زیست روزبه روز در حال افزایش است (Semnani et al., 2007) . شناخت گیاهان دارویی، اندازه‌گیری ویژگی‌های ساختاری و شاخص‌های تنوع گونه‌ای آنها یکی از ملزومات اساسی به‌منظور تعیین شایستگی مراتع برای بهره‌برداری از گیاهان دارویی است. مطالعات فلوریستیک پایه مطالعات مختلفی نظیر بوم‌شناسی، جنگل‌داری، کشاورزی، گیاهان دارویی و ... هستند. شناسایی و معرفی رستنی‌های هر منطقه اهمیت ویژه‌ای دارد که از جمله می‌توان امکان دسترسی به گونه گیاهی خاص در مکان و زمان معین، تعیین قابلیت‌های رویشی منطقه، امکان افزایش تراکم گونه‌های منطقه، شناسایی گونه‌های مقاوم، مهاجم و در حال انقراض، کمک به تعیین پوشش گیاهی کشور، امکان دست‌یابی به گونه یا گونه‌های جدید گیاهی و شناسایی عوامل مخرب رستنی‌های منطقه را نام برد (Ejtehadi et al., 2009). در پژوهشی که درباره تنوع زیستی حاشیه دریاچه انجام شده است، ۲۵۷ گونه گیاهی متعلق به ۵۳ تیره و ۱۸۳ جنس معرفی شده‌اند و تیره‌های Asteraceae با ۳۵ گونه و Poaceae با ۲۹ گونه بیشترین تعداد گونه را به خود اختصاص داده‌اند (Khorasani et al, 2014). همچنین (Tabad and Jalilian, 2015) در بررسی اتنوبوتانی این منطقه، ۵۶ گونه دارویی را شناسایی و معرفی کردند که تیره Lamiaceae با ۱۲ گونه و تیره Asteraceae با ۱۱ گونه بیشترین غنای گونه‌ای را داشتند.

۲.مواد و روش‌ها

ابتدا برای تعیین حوضه مطالعه از نقشه‌های توپوگرافی ۱:۶۵۰۰۰ سازمان جغرافیایی نیروهای مسلح و تصاویر سه‌بعدی نرم‌افزار Google Earth استفاده شد و با اطلاعات افراد بومی، مسیرهای عبور و مرور منطقه شناسایی شدند. پس از تعیین حوضه مطالعه و بررسی‌های اولیه، طی سال‌های ۱۳۹۸ تا ۱۳۹۹ به منطقه مراجعه و کل عرصه در فواصل زمانی مشخص (میانگین ۱۵ روز) به روش پیمایش زمینی، یکی از روش‌های مرسوم مطالعات تاکسونومیک، بررسی شد. با توجه به وضعیت آب و هوایی منطقه و پوشش گیاهی درختی و درختچه‌ای آن، بیشتر عملیات صحرایی در ماه‌های اسفند تا تیر انجام شدند.

نمونه‌ها براساس روش‌های رایج و کلیدهای شناسایی از جمله فلورا ایرانیکا (Rechinger, 1965-1998)، فلور ترکیه (Davis, 1965-1985)، فلور عراق (Townsend and Guest, 1966-1985)، فلور ایران (Assadi et al., 1988-2013)، رستنی‌های ایران (Mobayen, 1975-1996)، رده‌بندی گیاهی (Mozaffarian, 2005)، گون‌های ایران (Maassoumi,1986-2005) شناسایی و اسامی مؤلفان تاکسون‌ها با نمایه بین‌المللی نام‌های گیاهی (IPNI, 2016) یکسان‌سازی شد. نامگذاری فارسی گیاهان نیز براساس فرهنگ نام‌های گیاهان ایران (Mozaffarian, 1998) به‌دقت انجام شد. همچنین براساس کتاب Red date book of Iran (Jalili and Jamzad., 1999) گونه‌های آسیب‌پذیر و در معرض خطر تعیین شدند. نمونه‌ها در هرباریوم دانشگاه گنبدکاووس نگهداری می‌شوند. تیره‌ها و جنس‌های فلور منطقه موردبررسی با سیستم رده‌بندی APG IV (APG, 2016) تطبیق داده شدند.

شکل زیستی گیاهان براساس سیستم Raunkiaer (1934) تعیین و سپس طیف زیستی ترسیم شد. پراکنش جغرافیایی گونه‌های گیاهی شناسایی‌شده منطقه با توجه به اطلاعات فلورهای یاد شده استخراج شد. مناطق جغرافیای گیاهی هر گونه بر اساس دیدگاه‌های Takhtajan (1986) و Zohary (1973) تعیین و با استفاده از منابع معتبر، گیاهان دارویی نیز مشخص شدند (Zargari, 1997؛ Mir-Heidar, 2002).

جدول ۱: اسامی گیاهان جمع آوری شده در بررسی مقدماتی فلور منطقه گوی‌نیک

ردیف	تیره	تیره/ نام علمی	نام فارسی	اندام دارویی	کاربرد متداول

۱	Amaryllidaceae	*Allium scabriscapum* Boiss	سیرک چاک پیاز	ریزوم	اسهال
۲	Apiaceae	*Ferula ovina* (Boiss.) Boiss.	کما	ریشه	چربی خون بالا
۳	Apiaceae	*Torilis heterophylla* Guss.	ماستونک	-	ضد تومور
۴	Apiaceae	*Eryngium bungei Boiss*	زول خراسانی	ریشه ، برگ	درمان ورم ها ، دمل ها
۵	Apiaceae	*Caucalis platycarpos L.*	جعفری هویج	برگ	درمان آسم، کم خونی، لاغری
6	Asparagaceae	*Polygonatum sewerzowii* Regel	مهرسلیمان دانه قرمز	-	التیام‌بخشی زخم
7	Asteraceae	*Anthemis odontostephana* Boiss	بابونه تاج دندانی	گل	ضد التهاب
8	Asteraceae	*Achillea biebersteinii*	بومادران زرد	اندام‌های هوایی	درمان زخم ها
9	Asteraceae	*Centaurea virgata* sbsps quarrosa	گل گندم زبر	ریشه	آنتی اکسیدان
10	Asteraceae	*Lactuca serriola L.*	کاهوی خاردار	برگ	آرامبخش
۱۱	Asteraceae	*Onopordon heteracanthum* C. A. Mey.	خار پنبه	گل	بیماری‌های معده و کبد
12	Asteraceae	*Centaurea virgata* Lam.	گل گندم	ریشه	علیه سمیت سلولی
13	Asteraceae	*Artemisia husskenchtii*	درمنه	برگ،گرد غنچه	درمنه
14	Asteraceae	*Acroptilon repense (l.)Dc*	تلخه	برگ	تلخه
15	Asteraceae	*Tragopogon officinalis*	شنگ	ریشه-برگ-ساقه	شنگ
16	Berberidaceae	*Berberis integerrima* Bunge	زرشک وحشی	ریشه-پوست درخت-میوه	ضد میکروبی و ضد قارچ

17	Berberidaceae	*Berberis orthobtrys*	زرشک	میوه	کاهش چربی خون و لاغری
18	Boraginaceae	*Lappula sinaica*	خارلنگر سینایی	-	عفونت ادراری
19	Boraginaceae	*Lappula microcarpa* (Ledeb.) Gurke	لاپولا	-	ضد میکروبی
20	Brassicaceae	*Capsella bursa-pastoris (L.)* Medik.	کیسه کشیش	گل گیاه	خونریزی شدید بینی
۲۱	Brassicaceae	*Thlaspi perfoliatum*	کیسه‌چوپان	دانه	بهبود بینایی
۲۲	Brassicaceae	*Alyssum lanceolatum Dc.*	قدومه	دانه	ضد سرفه ، ملین ، رفع درد گلو
۲۳	Convolvulaceae	*Convolvulus commutatus* Boiss.	پیچک سرسان	-	مسهل و صفرا بر
۲۴	Ephedraceae	*Ephedra intermedia* Schrenk&C.A.Mey.	ارمک میانه	میوه	بیماری‌های تنفسی
۲۵	Ephedraceae	*Ephedra major Host*	ارمک رنگارنگ	میوه ، ساقه ، ریشه	موثر در لرزش- تشنج
۲۶	Euphorbiaceae	*Euphorbia boissieriana* (Woron.) Prokh	فرفیون	برگ، دانه و ریشه	ضد میکروبی
۲۷	Fabaceae	*Glycyrrhiza glabra* L.	شیرین‌بیان	ریشه و ساقه زیرزمینی	نارسایی کبد
۲۸	Fabaceae	*Vicia hirsuta* (L.) Gray	ماشک	جوانه	ضددرد
۲۹	Fabaceae	*Vicia villosa* L.	ماشک زمستانی	-	تسکین درد
۳۰	Fabaceae	*Alhagi cameloruml*	خارشتر	میوه،گل،ریشه	مدر و مسهل ، تقویت سیستم دفاعی بدن
۳۱	Fabaceae	*Onobrychis micrantha schren*	اسپرس گل ریز	گل	رفع نفخ معده ، کم خونی

۳۲	Fabaceae	*Trigonella monantha C.A Mey*	شنبلیله وحشی	دانه-برگ	دیابت ، آرتروز ، آسم
۳۳	Fabaceae	*Astragalus gossipinus Fisch*	گون سفید	صمغ-ریشه	تقویت سیستم گوارش ، ضد سرماخوردگی
۳۴	Hypericaceae	*Hypericum scabrum* L.	گل راعی دیهیمی	سرشاخه‌های گل‌دار	آرام‌بخشی
۳۵	Lamiaceae	*Phlomis cancellata* Bunge	گوش بره سفید	قسمت رویشی	ضد باکتریال
۳۶	Lamiaceae	*Ziziphora clinopodioides* Lam.	کاکوتی	اندام‌های هوایی	ضدمیکروبی
۳۷	Lamiaceae	*Ziziphora tenuior* L	آنخ	اندام‌های هوایی	ضد درد
۳۸	Lamiaceae	*Hymenocerater elegnas Bunge*	اروانه زیبا	گل-برگ	آرام‌بخش
۳۹	Lamiaceae	*Plantago lanceolata*	بارهنگ کاردی	تخم	قابض و محرک ، تصفیه خون
۴۰	Lamiaceae	*Thymus transcaspicus klokov*	آویشن کوهی	گل-گیاه	نفخ معده ، بوی بد دهان ، رماتیسم
۴۱	Lamiaceae	*Mentha longifolia (L.)*	نعنا پونه	برگ	تقویت‌کننده دستگاه گوارش ، ضد آسم
۴۲	Lamiaceae	*Perovskia abrotanoides karel*	برازمبل	-	ضد باکتریایی، مقوی ، رفع التهاب
۴۳	Malvaceae	*Alcea gorganica* (Rech.f.Aell.&Esfand.)	ختمی گرگانی	برگ ، ریشه و گل	ضد سرفه
۴۴	Malvaceae	*Malva neglecta*	پنیرک گل ریز	ریشه ، برگ و گل	ضد التهاب ، رفع عفونت

۴۵	Poaceae	*Bromus tectorum* Var. tectorum	جارو علفی بامی	بذر	کاهش درد
۴۶	Poaceae	*Aegilop stauschii* Cosson	گندم وحشی	-	ضد نارسائی قلبی
۴۷	Poaceae	*Phlem paniculatum* Hudson	دم‌گربه‌ای	ریشه	یرقان و امراض گلو
۴۸	Rosaceae	*Cerasus mahleb*	آلبالوی تلخ	میوه-برگ-هسته	آرامش اعصاب،ورم معده و روده
۴۹	Rosaceae	*Rosa beggeriana* Schrenk	نسترن وحشی	-	محافظت کننده کبد
۵۰	Rosaceae	*Rosa canina L*	نسترن کوهی	ریشه، شاخه، میوه	سرفه، سنگ کلیه ، آسم
۵۱	Rosaceae	*Cotoneaster nummularioides pojark*	شیرخشت	صمغ	زردی نوزادان، ملین های قندی
۵۲	Rosaceae	*Sanguisorba minor scop*	توت روباهی	ریشه-ریزوم-گل	ضد میکروبی ضد تشنج و ضدعفونی کننده
۵۳	Resedaceae	*Reseda luteola L.*	اسپرک یا ورث	میوه-ساقه	ضد باکتری
۵۴	Sapindaceae	*Acer monspessulanum* L.	کیکم	-	ضد اکسیدانی
۵۵	Scrophulariaceae	*Verbascum speciosum* Schrad.	گل ماهور تماشایی	گل	سرماخوردگی، آنژین
۵۶	Simaroubaceae	*Ailanthus altissima*	عرعر	برگ	سرفه، بواسیر،تب های مزمن
۵۷	Zygophyllaceae	*Peganum harmala L.*	اسپند	دانه	یبوست،کاهش وزن

۳. نتایج و بحث

با توجه به تعداد گونه‌های گیاهی ناحیه مطالعه‌شده و مقایسه آن با ۸۰۰۰ گونه فلور ایران (Abasi et al., 2015) و در نظرگرفتن مساحت منطقه گوی‌نیک نتایج نشان می‌دهند که این منطقه یکی از غنیترین ذخیره‌گاه‌های ژنتیکی در سطح کشور است. تنوع زیاد در سطح تاکسونومیک گونه، جنس، تیره و فرمهای رویشی ارزشهای گوناگون این منطقه را به‌ویژه از جنبه حفاظت ذخیره‌های ارزشمند ژنتیکی آشکار می‌کند. همچنین تنوع گونهای این منطقه در مقایسه با سایر پژوهشها نظیر شناسایی گونه‌های گیاهی در منطقه ۳۴۰۰۰ هکتاری نوژیان لرستان (Mehrnia and Ramak, 2014) ، شناسایی گونه‌های گیاهی در منطقه ۱۶۹۲۰۰ هکتاری خبر و روچون کرمان (Irannejad Parizi et al., 2001) ، شناسایی گونه‌های گیاهی در منطقه ۳۳ هزار هکتاری مانشت و قلارنگ ایلام (Darvishnia et al., 2012) و شناسایی گونه‌های گیاهی در منطقه ۳۰ هزار هکتاری دینارکوه (Rashidnahal, 2006) مناسب است. یکی از دلایل مهم تنوع و غنای گونه‌ای زیاد منطقه، کوهستانی بودن بخشی از آن و در دسترس‌نبودن برای چرای دام است و از دیگر دلایل می‌توان به وجود منابع رطوبتی همچون بارش سالانه زیاد، بهره‌مندی از جریان‌های مرطوب مدیترانه‌ای، وجود رودخانه‌های فصلی و چشمه‌سارهای فراوان در منطقه اشاره کرد.

تیره‌های Asteraceae، Plumbaginaceae، Rosaceae، Fabaceae، Poaceae، Boraginaceae، Lamiaceae، Apiaceae، Scrophulariaceae، Acanthaceae، Sapindaceae، Amaryllidaceae، Malvaceae، Asparagaceae و Berberidaceae مهم‌ترین تیره‌های گیاهی منطقه هستند که در مجموع ۸۴/۶۱ درصد کل گونه‌ها (۳۳ گونه از ۳۸ گونه) را شامل می‌شوند. این تیره‌ها در مطالعات (Ahmadi et al., 2013) در مناطق جنگلی غرب کردستان، (Hassani et al., 2014) در منطقه سرشیو مریوان، Sanandaji and (Mozaffariam., 2010) در منطقه سارال استان کردستان، و همکاران (Jalilian et al., 2014) در منطقه کوه بهارآب در رشته‌کوه زاگرس، et (Shirmardi al., 2014) در منطقه قیصری کوهرنگ در استان چهارمحال و بختیاری، (Dolatkhahi et al., 2014). در منطقه حفاظت‌شده ارژن‌پریشان در استان فارس و (Darvishnia et al., 2012) در منطقه مانشت و قلارنگ ایلام نیز مهم‌ترین تیره‌های گیاهی از نظر تعداد گونه معرفی شده‌اند. شاید بتوان مقاوم بودن گونه‌های مختلف تیره Asteraceae به شرایط محیطی مختلف و تخریب برخی از نقاط منطقه (به‌دلیل چرای دام) را دلیل فراوانی گونه‌های این تیره دانست. به عقیده (Agheli and Ghahremaninejad, 2009) هنگامی که درصد تخریب پوشش گیاهی ناحیه‌ای زیاد شود، برخی تیره‌های گیاهی نظیر تیره Asteraceae بیشتر در فلور منطقه حضور می‌یابند. گسترش گونه‌های مختلف تیره Plumbaginaceae را نیز می‌توان به‌دلیل خوش‌خوراک‌نبودن برخی از گونه‌ها برای دام دانست. همچنین فراوانی تیره Poaceae می‌تواند به‌علت وجود منبع رطوبتی در منطقه باشد؛ گیاهان تک‌لپه‌ای وابستگی خود را به محیط‌های مرطوب بیش از دولپه‌ای‌ها حفظ کرده‌اند و بنابراین درصد زیادی را در این مناطق به خود اختصاص می‌دهند (Asri and Moradi, 2004).

۴. نتیجه‌گیری

علیرغم غنای گونه‌ای زیاد و ارزش‌های زیست‌محیطی منطقه حفاظت شده گوی‌نیک جرگلان، مسئولان ذیربط تاکنون هیچ اقدام حفاظتی در این منطقه انجام نداده‌اند و بدیهی است که تا اقدامات حفاظتی شایسته و مؤثری برای حفظ این اکوسیستم ارزشمند انجام نشود، اقدام دیگری نتیجه‌بخش نخواهد بود. در این راستا تحقق هریک از پیشنهادات زیر می‌تواند تا حد زیادی به ادامه حیات و حفظ گونه‌های ارزشمند این منطقه کمک کند. شایسته است مسئولین و به‌ویژه سازمان حفاظت محیط‌زیست با تمرکز روی ویژگی‌های منحصربه‌فرد منطقه گوی‌نیک جرگلان، تمام تلاش خود را برای حفاظت هرچه بیشتر این منطقه به کار گیرند. همچنین با توجه به ارتباط نزدیک این منطقه با معیشت روستاهای حاشیه آن، اهمیت اکوتوریسمی و گونه‌های متنوع گیاهی و جانوری و با در نظر گرفتن سه نقش محوری ذخیره‌گاه‌های زیست‌کره (توسعه، پشتیبانی و حفاظت) مسلماً پیگیری برای انتخاب این منطقه با عنوان ذخیره‌گاه زیست‌کره از طریق سازمان حفاظت محیط‌زیست می‌تواند تا حد زیادی در حفظ و حمایت آن نقش داشته باشد.

منابع

1- Abasi, S., Zare, H., Hosseini, S. H. and Pilehvar, B. (2015) Study on flora, vegetation structure and chorology of plants in some parts of protected area of Oshtorankooh, Lorestan province. Journal of Environmental Science and Technology 17 (1): 125-134 (in Persian).
2- Ahmadi, F., Mansory, F., Maroofi, H. and Karimi, K. (2013) Study of flora, life form and chorotypes of the forest area of West Kurdistan (Iran). Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences 2 (9): 11-18.
3- APG IV. (2016) An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. Botanical Journal of the Linnean Society 181(1): 1-20.
4- Asri, Y. and Moradi, A. (2004) Floristic and phytosociological studies of Amirkelayeh Lagoon. Journal of Agricultural Science and Natural Resource 11: 171-179.
5- Assadi, M. (Ed.) (1988-2013) Flora of Iran. vols. 1-74. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran (in Persian).
6- Darvishnia, H., Dehghani Kazemi, M., Forghani, A. H. and Kavyani fard, A. A. (2012) Study and introducing of flora of protected of Manesht and Qalarang in Ilam province. Taxonomy and Biosystematics 4 (11): 47-59 (in Persian).
7- Davis, P. H. (Ed.) (1965-1985) Flora of Turkey. vols. 1-9. Edinburgh University Press, Edinburgh.
8- Dolatkhahi, M., Asri, Y. and Dolatkhahi, A. (2012) Floristic study of Arjan-Parishan protected area in Fars province. Taxonomy and Biosystematics 3 (9): 31-46 (in Persian).
9- Ejtehadi, H., Sepehri, A. and Akafi, H. (2009) Methods of measuring biodiversity. Ferdowsi Mashhad University, Mashhad (in Persian).
10- Ghahreman, A. and Attar, F. (1998) Biodiversity of plant species in Iran. vol. 1. Tehran University Press, Tehran (in Persian).
11- Ghahremaninejad, F. and Agheli, S. (2009) Floristic study of Kiasar National Park, Iran. Taxonomy and Biosystematics 1: 47-62 (in Persian).
12- Hassani, S. M., Yazdanshenas., H., Nazarpoorfard, K., Bassiri, R. and PurRezaee, J. (2014) Study of physiognomy and origin of plant species in Sarshiv area of Marivan, Iran. Journal of Rangeland Science 4: 270-276.
13- IPNI, The International Plant Names Index. Retrieved from http://www.ipni.org. On: 3 December 2016.
14- Irannejad Parizi, M. H., Sanei Shariat Panahi, M., Zobeiri, M. V. and Marvi Mohajer, M. R. (2001) A floristic and phytogeographical investigation of khabr national park and rouchun as wildlife refuge. Iranian Journal of Natural Resources 54 (2): 111-130.
15- Jalili, A. and Jamzad, Z. (1999) Red Data Book of Iran, Research Institute of Forests and Rangelands (RIFR) Publication, Tehran.
16- Jalilian, N., Sheikhi, A. and Dehshiri, M. M. (2014) A floristic study in Bahar-ab Kuh area in Zagros mountains (in the border of Kermanshah and Ilam provinces, Iran). Taxonomy and Biosystematics 6 (18): 65-76 (in Persian).

17- Khorasani, N., Riazi, B. and Aliehiaee, A. (2014) Investigating the diversity of plant species around Zarivar Lake in Marivan. Iranian Journal of Natural Resources 67 (1): 53-64 (in Persian).

18- Maassoumi, A. A. (1986-2005) The genus Astragalus in Iran. vols. 1-4. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran (in Persian).

19- Mehrnia, M. and Ramak, P. (2014) Floristic investigation of Noujian Watershed (Lorestan province). Iranian Journal of Plant Biology 6 (20):113-136.

20- Mir-Heidar, H. (2002) Plant Learning, Usage of plants in prevention and treatment of disease. Daftare-Nashre- Farhange-Islami, Tehran (in Persian).

21- Mobayen, S. (1975-1996) Flora of Iran: vascular plants. vols. 1-4. Tehran University Press, Tehran (in Persian).

22- Mozaffarian, V. (1998) A dictionary of Iranian plant names. Farhang Moaser Publication, Tehran (in Persian).

23- Mozaffarian, V. (2005) Plant classification. Vols. 1-2. Amir kabir Publications, Tehran (in Persian).

24- Rashidnahal, M. (2006) Study and introducing of flora and plant life form of the protected area of dinarkooh in Ilam. MSc thesis, Islamic Azad University of Borujerd, Borujerd, Iran (in Persian).

25- Raunkiaer, C. (1934) The life forms of plants and statistical plant geography. Larendon, Oxford.

26- Rechinger, K. H. (Ed.) (1965-1998) Flora Iranica. Vols. 1-178. Akademische Druck-U Verlagsanstalt, Graz.

27- Sanandaji, S. and Mozaffarian, V. (2010) Studies of flora in Saral area: Kurdistan, Iran. Taxonomy and Biosystematics 2 (4): 59-84 (in Persian).

28- Semnani, K., Saeedi, M., Mahdavi, M. and Rahim, F. (2007) Review and comparison of the antimicrobial effect of methanolic extracts of several plant species from Stachys and Phlomis. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 17(57): 57-66 (in Persian).

29- Shirmardi, H. A., Heydari, G., Gholami., Mozaffarian, V. and Tahmassebi, P. (2014) A study of flora in rangelands of Gheissari Koohrang region in Chaharmahal and Bakhtiari province. Taxonomy and Biosystematics 6(18): 87-106 (in Persian).

30- Tabad, M. A. and Jalilian, N. (2015) Ethnobotanical study of medicinal plants in Zarivar Region (Marivan), Iran. Journal of Medicinal Plants 2(54): 55-75 (in Persian).

31- Takhtajan, A. (1986) Floristic regions of the world. University of California Press, Berkley.

32- Townsend, C. C. and Guest, E. (Eds.) (1966-1985) Flora of Iraq. vols. 1-9. Ministry of Agriculture and Agrarian Reform, Baghdad.

33- Zargari, A. (1997) Medicinal plants. Tehran University Press. Tehran (in Persian).

34- Zohary, M. (1973) Geobotanical foundation of Middle-East. vols. 1-2. Department of Botany, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

شرکت داروگستر ساوا-شفاژن

تولید، صادرات و واردات مکمل‌های غذایی و دارویی انسانی (دانش‌بنیان)

این شرکت، مجموعه‌ای دانش‌بنیان و پیشرو در کشور است که به دنبال رمزگشایی اطلاعات ژنتیکی، با سریعترین، صحیح‌ترین و مطمئن‌ترین راه، به دنبال تامین سلامت، زیبایی و شادابی برای تمام هموطنان می باشد. همسو با کشورهای اروپایی و آمریکا، با نگرشی نو در زمینهٔ تامین سلامت افراد جامعه، ما مثلث سلامت را بنیان نهاده ایم. سه راس این مثلث سلامت شامل: یک کلینیک فوق تخصصی (تشخیص و انتخاب)، یک آزمایشگاه فوق تخصصی ژنتیک (آنالیز ژنوم و رمزگشایی ژنوم)، و شرکت داروگستر ساوا شفاژن با نقش کلیدی فرموله‌سیون و ساخت محصول و ارائه پروتوکل مصرف زیر نظر فوق تخصصین می باشد. لذا محصولات این شرکت بر پایه اختراعات ثبت شدهٔ بین‌المللی و دانش فنی روز دنیا و با تکیه بر نتایج بررسی اطلاعات ژنومی هر فرد یا خانواده، از مواد اولیهٔ کاملا طبیعی طراحی و تولید می گردد.

ترکیبات زیست‌فعال طبیعی، خصوصاً ترکیبات استخراج‌شده از منابع دریایی (موجودات جانوری و گیاهی قابل‌برداشت ازدریا) در کنار ترکیبات گیاهی دارویی، پایهٔ ساخت محصولات تولیدی این شرکت هستند.

شرکت داروگستر ساوا شفاژن افتخار دارد با ارائه محصولات پیش‌گیرنده، کمک درمان و درمان شامل بر کرم‌های آرایشی، مکمل‌های تقویت کنندهٔ بینایی، مکمل‌های تقویت‌کنندهٔ قوای جسمی و جنسی، مکمل‌های حمایت‌کننده از سیستم قلبی‌عروقی، مکمل‌های سم‌زدای کبد، مکمل‌های کنترل‌کنندهٔ قند خون و دیابت، مکمل‌های تقویت‌کنندهٔ سیستم عصبی، سوپر آنتی‌اکسیدان‌ها، مکمل‌های کمک‌درمان آرتروز و همچنین سوپر دایت‌ها به صورت اختصاصی و عمومی، ضامن سلامت، زیبایی و شادابی شما و خانواده شما باشد.

اهداف تأسیس و پشتوانه فکری

به دنبال چندین دهه تحقیق و پژوهش در سطح ملی و بین المللی و ثبت اختراعات توسط موسس شرکت، وجود شرایط همکاری با فوق تخصصین حوزه سلامت و فوق تخصصین ژنتیک داخلی و خارجی و همچنین پتانسیل ایجاد ارتباط با تولید کنندگان بنام فرانسه و کانادا تاسیس شرکت انجام گرفت. در چند سال آینده غذاها، مکمل ها، کرم های آرایشی و حتی داروهای افراد، اختصاصی خود خواهد بود!! آیا می‌دانید رموز نهفته در ژن‌های من و شما تعیین می‌کند که خوردن چه نوع غذایی و به کدام یک از روش‌های پخت به حفظ سلامت زیبایی و شادابی ما کمک می‌کند؟ کدام مکمل ها و کدام داروها در صورت بروز بیماری بیشترین اثر درمانی را بر ما دارند؟ و کدام نوع از فعالیت ها مناسب شرایط فیزیکی ما هستند؟ کدام ترکیبات مورد استفادهٔ غذایی-دارویی یا بهداشتی-آرایشی با طبیعت ما سازگاری بیشتری دارند و از کدام باید پرهیز کرد؟











ضد عفونی کننده ساوا



مواد اولیه و شکل محصولات

دریا به‌عنوان منشأ حیات، با داشتن شگفتی‌های فراوان، مولکول‌ها و موجودات خاص، امروزه در رأس مطالعات زیستی و زیست فناوری جهانی قرارگرفته و با راه‌اندازی گرایش داروهای دریایی، اهمیت و توجه به تحقیقات بر موجودات آن بیشتر شده است. همچنین ترکیبات زیست فعال موجود در انواع گیاهان از هزاران سال پیش مورد توجه بشر بوده است. **شرکت دارو گستر ساوا شفاژن** محصولات خود را به شکل هارد کپسول، کپسول ژل، شربت و پودرهای خوراکی سوپر پروتئین و بر پایهٔ مواد با ارزش مانند رتینول یا ویتامین آ، فلاونوئیدها، گلوتاتیون، اسکوربیک اسید، آلفاتوکوفرول یا ویتامین ای، گلیکورآمینوگلیکان ها، کیتوزان، مایکوسپرین‌ها، انواع کاروتنوئیدها مثل لیکوپن و لوتئین، همراه با بهره‌گیری از ریزذرات مس، روی، منگنز، سلنیوم و ... و نیز پروتئین هیدرولیز شده، پپتیدها و آمینواسیدهای مهمی چون الاستین، کراتین، تورین، گلوتامین، گلایسین، لایزین و پرولین و ... که ترکیباتی کاملا طبیعی و بسیار با ارزش بوده و قابل‌استخراج از انواع جانوران و گیاهان دریایی و خشکی هستند، تحت لیسانس سه شرکت معروف فرانسوی و کانادایی تولید و عرضه می‌کند.

آدرس دفتر تهران: خیابان کارگر شمالی، کوچه شهریور، جنب اورژانس مرکز قلب، پلاک ۲۷ طبقه پنجم. دفتر مرکزی شرکت: استان آذربایجان غربی، جاده نقده به مهاباد، ناحیه صنعتی راهدانه شماره تماس: ۰۹۱۴۴۴۷۲۰۳۳-۰۹۱۴۳۴۷۷۳۲۸ شماره فکس: ۰۴۴-۳۵۶۳۳۹۹۸ کد پستی: ۵۷۶۱۸۱۴۷۵۷

کلینیک فوق تخصصی



SAVA SHAFAGENE

NUTRIPHARMA SUPPLEMENTS COMPANY

www.ssnsco.com