بررسی فیزیولوژی بردباری گیاه نی (*Phragmites australis*) نسبت به آرسنیک در منطقه آلوده چلپو ـ کاشمر

حدیث یوسف زاده[۱]، *مه‌لقا قربانلی[۲]، فرشته قاسم‌زاده[۳]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور تهران

۲. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد گرگان

۳. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

این مطالعه بردباری گیاه نی *Phragmites australis* L. را در برابر آرسنیک بررسی می‌کند. بدین منظور گیاهان از پنج ایستگاه در منطقه آلوده چلپو- کاشمر در شمال شرقی ایران جمع‌آوری شدند. اندازه‌گیری عناصر روی، منیزیم، آهن، کلسیم و آرسنیک در نمونه‌های جمع‌آوری شده پس از آماده‌سازی، با دستگاه اسپکترومتری جذب اتمی انجام شد. تمام قسمتهای گیاه نی قادر به حذف آرسنیک از خاک‌های آلوده هستند. بیشترین میزان انباشت آرسنیک در اندام‌های هوایی و ریشه‌ها به ترتیب ۶/۸۲ و ۲۳/۵۶ میلی‌گرم در کیلوگرم می‌باشد. آرسنیک عمدتاً در ریشه انباشت می‌شود و مقادیر بسیار کم آن به اندام‌های هوایی انتقال داده می‌شود. الگوی تجمع آرسنیک در گیاه نی پس از ریشه‌های مویی به ترتیب در ریزوم، ساقه و برگ دارای بیشترین میزان خود می‌باشد. در این مطالعه همگام با جذب آرسنیک در گیاه نی جذب پتاسیم و آهن افزایش می‌یابد. در حالی که کلسیم و منیزیم در مقایسه با گیاهان کنترل تغییر قابل ملاحظه‌ای را نشان نمی‌دهند. همانندی الگوی انباشت آرسنیک و آهن در ریشه‌ها و افزایش ۴ و ۱۳/۵ برابری جذب آهن به ترتیب در ریشه‌ها و ساقه‌های گیاهان جمع‌آوری شده از منطقه آلوده چلپو نسبت به گیاهان شاهد پیشنهاد می‌کند که درگیاه نی، آهن نقش اساسی را در سم‌زدایی ایفا می‌کند. این گیاه می‌تواند به عنوان یک گونه بردبار به آرسنیک معرفی شود و کشت آن در مقیاس گسترده باعث جذب میزان بالایی از آرسنیک در نواحی آلوده و به دنبال آن پاکسازی محیط از آرسنیک شود.

کلمات کلیدی: نی، آرسنیک، بیش انباشت، بردباری، چلپو

مقدمه

در بین همه آلاینده‌های فلزی، آرسنیک به عنوان یکی از فلزات سنگین سرطان زا به صورت یک خطر جدی قلمداد می‌شود. با وجود حضوراین عنصر به صورت طبیعی در پوسته زمین، سطوح آرسنیک بوسیله محدوده وسیعی از فعالیت‌های انسانی افزایش پیدا کرده است. استنشاق و بلع آب آلوده به

*e.mail: Ghorbanli@yahoo.com

آرسنیک میزان بروز سرطان کبد، کلیه، مثانه، پوست و شش را افزایش می‌دهد (Eisler, 2002).

تکنولوژی‌های اخیر برای حذف آرسنیک از خاک و آبهای آشامیدنی علاوه بر گران بودن وقت گیر نیز هستند و با تولید ضایعات ثانویه سلامت کارگران را به خطر می‌اندازند (Lombi et al., 2000). در چند دهه اخیر محققان به موضوع گیاه پالایی به مفهوم استفاده از گیاهان برای حذف آلاینده‌ها از طبیعت توجه زیادی شده است. مهمترین دلیل استفاده از این روش علاوه بر صرفه اقتصادی و عدم تولید ضایعات ثانویه، برخورداری از محیطی سبز می‌باشد (Suresh & Ravishanker, 2004). گونه‌های بردبار گیاهی تحمل زیادی نسبت به جذب فلزات دارند و اغلب به استثنای غلظت‌های بالای فلزات سنگین در بافتهای خود، توانایی انباشت فلزات را دارند. از بین تمامی گونه‌های گیاهی، گیاهان آبزی به دلیل برخورداری از مرفولوژی خاص، توانایی بالایی در بردباری به فلزات سنگین دارند (Wu, 1990). در این مطالعه گیاه نی با نام علمی *Phragmites australis* متعلق به خانواده گندمیان و طایفه آرویندینه به عنوان یک بیش انباشته کننده انتخاب شد. این گیاه علاوه بربرخورداری از سیستم ریشه‌ای توسعه یافته و ریزوم‌های منشعب، دارای بیشترین توزیع جغرافیایی نسبت به هر گیاه گلدار دیگر می‌باشد (قهرمان، ۱۳۷۳). اخیراً به گیاه نی برای پالایش فلزات سنگین از جمله کادمیوم (Ederli et al, 2004)، مس (Ali et al., 2002)، آلاینده‌های آلی پایدار مثل د.د.ت و پلی‌کلرو فلوئوروکربن‌ها (Chu et al., 2006) و حذف نیکل و نیترات مس از آب‌های آشامیدنی شهری (Lee and Scholz, 2007) توجه زیادی شده است. منطقه چلپو ـ کلاته چوبک در ۵۶ کیلومتری شمال کاشمر (بخش کوهسرخ) در استان خراسان رضوی با طول جغرافیایی ´۲۸، °۳۵ و عرض ´۲۸، °۵۸ واقع است (مظلومی، ۱۳۸۲). در این منطقه آرسنیک به دنبال فرآیندهای ناشی از هوازدگی و فرسایش سنگها وارد آب‌های زیرزمینی و سطحی شده و در نتیجه باعث آلودگی با منشاء طبیعی در این منطقه شده است (Ghassemzadeh et al., 2006). غلظت آرسنیک در خاک ناحیه مورد مطالعه نسبت به نواحی غیرآلوده بسیار زیاد، به مقدار ۲۱۰ppm تا ۲۶×۱۰^{۴} است. برای مقایسه تاثیر آرسنیک روی جذب سایر عناصر در گیاه نی، گیاهان کنترل از منطقه‌ای غیرآلوده به آرسنیک جمع‌آوری شدند. آرسنیک با تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر، استرس اکسایشی را تولید می‌کند. گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر بسیار فعال هستند و با آسیب به لیپیدهای غشا، پروتئین‌ها، رنگدانه‌ها واسیدهای نوکلئیک باعث مرگ گیاه می‌شوند (Foyer et al., 1994). گیاهان بردبار به آرسنیک مکانیسم‌های متفاوتی، از جمله افزایش در میزان آنزیم‌های آنتی اکسیدان و تغییرا ت متابولیکی شامل تغییر در میزان جذب بعضی از عناصر مغذی را به کار می‌گیرند. اهداف ما از این مطالعه بررسی رابطه بین جذب عناصر روی، منیزیم، آهن، کلسیم، فسفر و پتاسیم با بیش انباشت آرسنیک دراندام‌های مختلف گیاه نی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری از خاک و گیاه

پنج ایستگاه در منطقه آلوده به آرسنیک چلپو واقع در استان خراسان رضوی برای این مطالعه انتخاب گردید. نمونه‌برداری دستی از گیاه مناطق آلوده انجام گرفت. نمونه‌ها جهت آماده سازی‌های به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از آن در آزمایشگاه نمونه‌ها به صورت ساقه، برگ، ریزوم و ریشه تفکیک شدند و بافتهای جداسازی شده به مدت ۲۴ ساعت در آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

اندازه‌گیری شیمیایی

مقدار ۰/۲گرم بافت خشک ریشه، ریزوم، ساقه و برگ را به داخل ارلن ۲۵ میلی لیتری ریخته و سپس ۵ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ بدان اضافه گردید. سر ارلن‌ها با شیشه ساعت

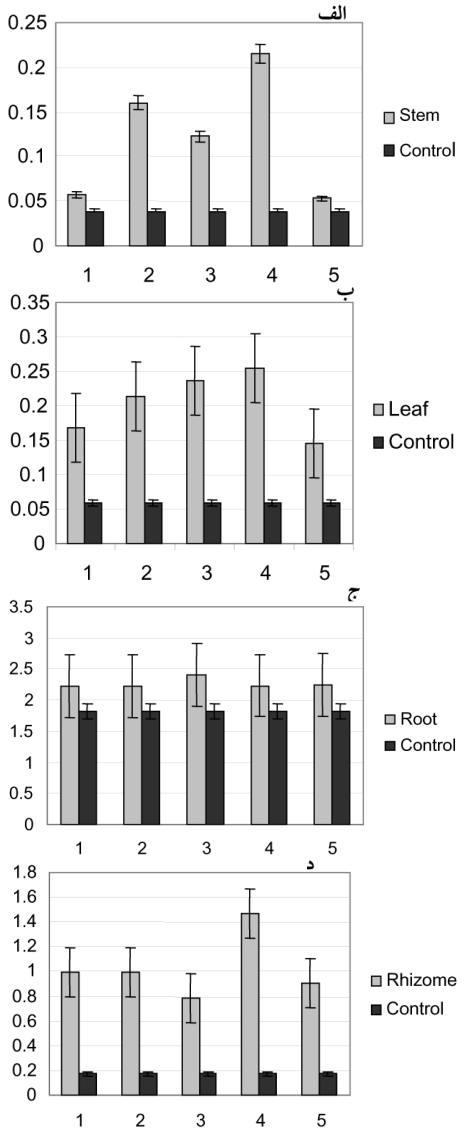
بسته و بعد از ۴۸ تا ۷۲ ساعت برای تکمیل هضم بافت گیاهی، محلول را به آرامی حرارت داده تا در نهایت شفاف و بی رنگ شود و اسید موجود در آن تبخیر گردد. در این مرحله کلیه مواد معدنی گیاه به صورت محلول در اسید باقی می‌ماند. سپس حجم محلول را در بالن ژوژه با آب مقطر به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. از این محلول برای سنجش میزان عناصر در بافت گیاهی استفاده گردید (Wallis, 1999). آنالیز تعیین روی، منیزیم، آهن، کلسیم و آرسنیک، با کمک دستگاه اسپکترومتری جذب اتمی مدل SHIMADZU, Japan A-A-670G، میزان پتاسیم با کمک نورسنج شعله‌ای مدل (Corning Jenway. PFP7) انجام شد. اندازه‌گیری فسفر بر اساس روش رنگ سنجی صورت گرفت (Wallis, 1999).

تحلیل‌های آماری

تحلیل‌های آماری با استفاده از آزمونهای ANOVA در سه سطح آماری P≤۰,۰۵ ، P≤۰,۰۱ و P≤۰,۰۰۱ انجام شد. آزمون توکی از آزمون‌های چند دامنه‌ای برای مقایسه تغییرات متابولیکی بین ایستگاه‌های مختلف استفاده شد. تمام نتایج به صورت میانگین±انحراف معیار حاصل از ۳ تکرار ارائه شده است.

نتایج

این مطالعه نشان داد که ریشه، ریزوم، ساقه و برگ گیاه نی همگی قادر به بیش انباشت آرسنیک می‌باشند (جدول ۱). بیش انباشت آرسنیک در ریشه‌ها تفاوت معنی‌داری با آرسنیک جمع‌آوری شده در اندام‌های هوایی دارد (P≤۰,۰۱). بیشترین میزان انباشت آرسنیک در گیاه نی پس از ریشه‌های مویی به ترتیب در ریزوم، ساقه و برگ می‌باشد. آرسنیک بیش انباشت شده در ریشه‌های مویی تفاوت بارزی با ریزوم ندارد، ولی آرسنیک جمع‌آوری شده در ساقه‌ها به صورت معنی‌داری بیشتر از برگ‌ها می‌باشد (P≤۰,۰۱) در گیاه نی در افزایش بیش انباشت آرسنیک تاثیر معنی‌داری روی غلظت‌های کلسیم و منیزیم نداشت (P≤۰,۰۵)، در حالی که غلظت آهن در ساقه‌ها و ریشه‌ها و پتاسیم فقط در ساقه‌ها در پاسخ به آرسنیک افزایش معنی‌داری را نشان دادند(P≤۰,۰۱). غلظت آهن در برگ، ساقه، ریشه و ریزوم در مقایسه با گیاهان کنترل افزایش معنی‌داری داشت (شکل ۱). غلظت فسفر و روی در ساقه‌ها و ریشه‌ها کاهش یافت (P≤۰,۰۱) (جدول۲و۳).



شکل ۱: غلظت آهن در ساقه (الف)، برگ (ب)، ریشه (ج) و ریزوم (د) گیاهان آلوده به آرسنیک در مقایسه با گیاهان کنترل

جدول ۱: میزان آرسنیک در قسمتهای مختلف گیاه نی (میلی‌گرم در کیلوگرم)

ایستگاه	برگ	ساقه	ریزوم	ریشه
1	0.05±0.01	1.38±2.30	5.10±5.69	9.73 ± 3.90
2	0.039±0.19	1.78±1.72	4.32±8.66	11.63± 8.66
3	0.05± 0.01	1.45± 2.42	7.75 ±3.27	9.08 ±10.68
4	1.34± 1.77	1.53± 2.57	6.26 ±5.39	7.95 ± 4.82
5	0.76±0.72	0.97± 0.85	6.05± 5.46	6.05 ± 5.46

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار حاصل ۳ تکرار ارائه شده است.

جدول۲: میزان عناصر Zn, Mg, K, P, Fe و Ca در ریشه‌های *P. australis*.

	Zn (μg mg^{-1})	Mg (μg mg^{-1})	K (μg mg^{-1})	P (μg mg^{-1})	Fe (μg mg^{-1})	Ca (μg mg^{-1})
کنترل	0.145 ± 0.05	4.33 ± 2.41	7.87 ± 2.48	0.44 ± 0.07	0.95 ± 0.09	17.8 ± 14.6
ایستگاه ۱	0.115 ± 0.31	3.72 ± 2.43	9.44 ± 2.12	6.00 ± 3.64	1.61 ± 1.04	5.58 ± 3.22
ایستگاه ۲	0.089 ± 0.02	3.21 ± 2.96	8.82 ± 1.35	6.63 ± 4.65	1.59 ± 1.11	5.23 ± 3.14
ایستگاه ۳	0.103 ± 0.03	3.35 ± 2.72	4.61 ± 2.19	7.04 ± 2.83	1.52 ± 1.51	4.51 ± 3.73
ایستگاه ۴	0.075 ± 0.02	3.79 ± 2.59	9.64 ± 2.48	5.77 ± 2.56	1.35 ± 1.02	7.73 ± 7.16
ایستگاه ۵	0.292 ± 0.43	3.98 ± 2.61	14.49± 3.61	5.58 ± 0.58	1.57 ± 0.82	12.4 ± 11.61
P value	0.0073	0.446	0.0 28	0.025	0.002	0.120

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است.

جدول۳: میزان عناصر Zn, Mg, K, P, Fe و Ca در ساقه‌های *P. australis*.

	Zn (μg mg^{-1})	Mg (μg mg^{-1})	K (μg mg^{-1})	P (μg mg^{-1})	Fe (μg mg^{-1})	Ca (μg mg^{-1})
کنترل	0.215 ± 0.03	2.93 ± 1.63	7.19 ± 3.64	0.68 ± 0.12	0.049 ± 0.032	9.74 ± 5.60
ایستگاه ۱	0.089 ± 0.04	2.39 ± 1.63	5.83 ± 3.98	1.66 ± 0.58	0.113 ± 0.069	11.85 ± 6.68
ایستگاه ۲	0.058 ± 0.03	2.52 ± 1.00	4.17 ± 2.90	2.45 ± 1.23	0.186 ± 0.095	11.73 ± 8.39
ایستگاه ۳	0.067 ± 0.01	2.42 ± 1.32	5.70 ± 4.01	1.75 ± 0.47	0.180 ± 0.073	11.67 ± 6.62
ایستگاه ۴	0.092 ± 0.07	1.94 ± 0.63	3.00 ± 1.41	3.29 ± 1.60	0.234 ± 0.102	16.18 ± 5.80
ایستگاه ۵	0.142 ± 0.15	2.69 ± 1.57	5.95 ± 3.79	1.33 ± 0.25	0.099 ± 0.055	10.94 ± 5.87
P value	0.0073	0.415	0.0445	0.044	0.0091	0.0648

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است.

بحث

مطالعه روی جذب آرسنیک در گیاه نی نشان داد که جذب آرسنیک در این گیاه بواسطه دو سیستم ریشه جذبی و ریشه تخریبی انجام می‌شود و این گیاه علاوه بر بیش انباشت آرسنیک می‌تواند به عنوان یک گونه بردبار به آرسنیک هم معرفی شود (Ghassemzadeh et el., 2007). غلظت‌های آرسنیک به صورت طبیعی در گیاهان به ندرت از ۱ mgKg^{-1} تجاوز می‌کند (Porter & Peterson, 1975).

غلظت آرسنیک در ریشه‌های نی در ایستگاه‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ به ترتیب ۱۲,۴۶، ۱۵,۷۲، ۱۵,۵۱، ۱۱,۷۸ و ۱۱,۹۶mgKg^{-1} بود، در حالی که در غلظت آرسنیک بیش انباشت شده در ساقه‌های ایستگاه‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ به ترتیب ۱۵,۸ mgKg^{-1}، ۱۱، ۱۴، ۳۸ و ۱۱,۸ بود.

Visoottiviseth & Aksorn در سال ۲۰۰۴ طی مطالعه‌ای بیان کردند که در *Typha* spp مدل بیش انباشت آرسنیک به صورت ریشه>ریزوم> برگ و در *Persica* spp. به صورت ریشه>برگ>ساقه است. اندازه‌گیری میزان آرسنیک در اندام‌های هوایی (ساقه و برگ) و در ریشه‌ها (ریشه مویی و ریزوم) نشان داد که در تمام ایستگاه‌ها بیش انباشت آرسنیک در گیاه نی به صورت ریشه>ریزوم> ساقه>برگ است (جدول۱). ویژگی‌های مورفو فیزیولوژیکی سیستم‌های ریشه‌ای گیاهان در جذب فلزات از خاک مهم می‌باشد. بعضی از این ویژگی‌ها شامل طول، قطر و بیومس ریشه و ریخت‌شناسی ریشه می‌باشند (Taize & Zeiger, 1998). ریشه‌های گیاه نی به دلیل برخورداری از از بیومس بالا و قطر ضخیم توانایی بیش انباشت فلزات سنگین از جمله آرسنیک را دارا هستند. استراتژی به کار گرفته شده توسط گیاهان حاشیه ای آبزی در بردباری به فلزات سنگین عمدتاً شامل جلوگیری و یا محدود کردن انتقال آرسنیک به اندام‌های هوایی است و در نتیجه بیشترین میزان بیش انباشت فلزات سنگین در گیاهان بردبار در ریشه‌ها اتفاق می‌افتد (Meharg & Witaker, 2002). افزایش تجمع آرسنیک در ریشه‌های نی به نسبت ساقه‌های آن موید این مطلب است که بردباری به آرسنیک در گیاه نی به صورت محدود کردن انتقال آرسنیک به اندام‌های هوایی صورت می‌گیرد.

مشخص شده است که فلزات سنگین در جذب عناصر مغذی ضروری اختلال ایجاد می‌کنند. برای مثال تغییرات در جذب عناصر پس از بیش انباشت آرسنیک در سرخس چینی *Pteris vittata* (Singh et al., 2006) و در گیاه آبزی *Spartina alternifolia* در پاسخ به آرسنیک (Carbonell et al., 1998) مشاهده شده است.

افزایش ۴ و ۱۳/۵ برابری جذب آهن به ترتیب در ریشه‌ها و ساقه‌های گیاهان جمع‌آوری شده از منطقه آلوده چلپو نسبت به گیاهان شاهد بواسطه بیش انباشت آرسنیک نشان دهنده بردباری گیاه نی به آرسنیک می‌باشد. معمولاً ساختارهایی معروف به پلاکهای آهن در اطراف ریشه‌های گیاهان آبزی مشاهده می‌شود که نقش سم‌زدایی آلاینده‌ها و تصفیه آب را به آنها نسبت می‌دهند. این ساختارها به طور اختصاصی در گیاه نی مطالعه شده‌اند و نشان داده شده است که آنها نقش حفاظتی ریشه‌ها را در برابر سم‌زدایی فلزات سنگین بوسیله هم رسوبی یا هم جذبی آهن با فلز سنگین را برعهده دارند (Wang & Peverly, 1996). گرچه در این مطالعه پلاکهای آهن آنالیز نشده‌اند، ولی همانندی الگوی جذب آهن با آرسنیک، افزایش غلظت‌های آهن و آرسنیک در ریشه‌ها نسبت به ساقه‌ها در طی این مطالعه، می‌تواند موید نقش حفاظتی آهن در برابر آرسنیک در گیاه نی باشد (جدول۲ و ۳). علاوه بر این غلظت آهن در تمامی اندام‌های مورد مطالعه (ساقه، برگ، ریشه و ریزوم) در گیاهان آلوده به آرسنیک در مقایسه با گیاهان کنترل افزایش معنی‌داری دارد (شکل۱). از این مطلب هم می‌توان نتیجه‌گیری کرد که به تناسب افزایش بیش انباشت آرسنیک در تمامی بافتهای گیاه نی، گیاه با افزایش جذب آهن در تمامی قسمتهای خود مکانیسم‌های بردباری را تکامل داده است. یون‌های فسفات به دلیل شباهت فیزیکوشیمیایی خود با آرسنات، نقش اساسی را در برهم‌کنش با آنیون‌های آرسنیک ایفا می‌کنند (Adriano, 2001). به نظر می‌رسد آرسنات بواسطه سیستم جذبی فسفات توسط گیاه جذب می‌شود. در طی این مطالعه میزان فسفر حدود ۳/۲ تا ۲/۶۶ برابر نسبت به گیاهان کنترل کاهش پیدا می‌کند. شبیه به الگوی جذب آهن و آرسنیک، جذب فسفر هم در ریشه‌ها بیشتر از ساقه‌ها است. مطالعات سیستم‌های

آبکشت روی گیاهان بردبار به آرسنیک نشان می‌دهد این گیاهان برای جلوگیری از ورود آرسنات به داخل گیاه سیستم جذبی فسفات آرسنات سرکوب شده‌ای دارند و در نتیجه در بیشتر گیاهان بیش انباشت کننده و بردبار به آرسنیک، همگام با افزایش جلوگیری از ورود آرسنات به داخل سلول گیاهی، جذب فسفر کاهش می‌یابد (Meharg & Macnair, 1990).

پتاسیم علاوه بر فعال‌سازی ۸۰ آنزیم مختلف در متابولیسم گیاهان، به فتوسنتز نیز کمک نموده و به صورت املاح مختلف در تحریک تنفس شرکت می‌کند (ابراهیم‌زاده، ۱۳۷۳). در مطالعه حاضر در گیاه نی، میزان جذب پتاسیم در ساقه‌ها به نسبت گیاهان شاهد افزایش یافته است. در حالیکه Carbonell و همکاران در سال ۱۹۹۸ طی مطالعه خود روی دو گونه غیربردبار به آرسنیک، گیاه آبزی *Spartina alternifolia* و گیاه برنج بیان کردند که جذب آرسنیک باعث کاهش میزان پتاسیم در ساقه‌ها و ریشه‌های آنها می‌شود.

افزایش پتاسیم در بافت‌های هوایی، افزایش آهن در قسمت‌های مختلف گیاه نی همگام با جذب آرسنیک و عدم تغییر بارز در میزان جذب کلسیم و منیزیم نسبت گیاهان شاهد می‌تواند موید فیزیولوژی بردباری منحصر به فرد گیاه نی در برابر آرسنیک باشد. بنابراین می‌توان پیشنهاد کرد که این گیاه بتواند به عنوان یک گونه بردبار به آرسنیک معرفی شود و کشت آن در مقیاس گسترده باعث جذب میزان بالایی از آرسنیک در نواحی آلوده و به دنبال آن پاکسازی محیط از آرسنیک شود.

نتیجه‌گیری نهایی

در این پژوهش برای اولین بار نشان داده شدکه گیاه نی توانایی انباشته کردن ارسنیک دارد.توان انباشته شدن بترتیب به صورت ریشه> ریزوم>ساقه>برگ است.ونظر به اینکه این انباشته شدن در منطقه مورد مطالعه قابل توجه بوده است میتوان نتیجه گرفت که در پالش الودگی محیط از ارسنیک موثر باشد. با توجه به اینکه میزان اهن به مقدار قابل توجهی در اندام‌های دارای ارسنیک بیش از کیاهان شاهد است می‌توان نتیجه گرفت که آهن در سم زدایی ارسنیک دخالت نموده است.

منابع

ابراهیم‌زاده، ح. (۱۳۷۳). فیزیولوژی گیاهی ۱، انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، ۵۷۶ صفحه.

قهرمان، ا. (۱۳۷۳). کروموفیت‌های ایران(سیستماتیک گیاهی)، جلد چهارم، چاپ اول،مرکز نشر دانشگاهی تهران.

مظلومی بجستانی، ع. (۱۳۸۲). مطالعه زمین شناسی و ژئوشیمی نواحی طلا دار علی آباد گردنه کوهسرخ در شمال کاشمر (استان خراسان رضوی)، پایان نامه دوره کارشناسی ارشد دانشگاه شهید بهشتی.

Adriano, D.C., (2001). Trace Elements in the Terrestrial Environment. Springer, New York.

Aksorn, E. and Visoottiviseth, P. (2004). Selection of suitable emergent plants for removal of arsenic from arsenic contaminated water, Science Asia.30,105-113.

Ali, N.A., Bernal, M.P., Ater, M., (2002). Tolerance and bioaccumulation of copper in *Phragmites australis* roots, physiological plantarum. 121, 66-74.

Carbonell, A.A., Aarabi, M.A., Gambrell, R.P., Patrick, W.H. J.R., (1998). Arsenic in wetland vegetation: Availability, phytotoxicity, uptake and effects on plant growth and nutrition. Sci. Total environment. 217, 189- 199.

Chu, W.K., Wong, M.H., Zhang. J., (2006). Accumulation, distribution and transformation DDT. PCBs by *Phragmites australis* and *Oryza sativum*. Environmental geochemistry. 28, 159-168.

Eisler, R. et al. (2002). Hand book of chemical risk assessment, CRC press, 274pp, Journal of applied sciences, 6(13):2705-2714.

Ederli, L., Reale, L., Ferranti, F., Pasaqualini, S., (2004). Responses induced by high concentration of cadmium in *Phragmites australis* roots. Physiological plantarum. 121, 66-74.

Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, K.J., (1994). Photooxidativew stress in plants. Physiol Plant, 92, 697- 717.

Ghassemzadeh, F., Arbab-Zavar, M.H., McLennan, G., (2006). Arsenic and Antimony in drinking water in Kohsorkh area, Northeast Iran, possible risks for public health", Journal of applied sciences, 6(13):2705-2714.

Ghassemzadeh, G., Yousefzadeh, H., Arbabzavar, M.H., (2007). Arsenic phytoremediation by *Phragmites australis*: green technology International journal of Environmental studies, submit.

Lee, B.H., Scolz, M., (2007. What is the role of *Phragmites australis* in experimental constructed wetland filters treating urban run off, Ecological engineering. 29, 87-95.

Lombi, E., Zhao, F.J. Dunham, S.J. and McGrath. S.P. (2002). Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*. New Phytol.145, 11-20.

Meharg, A.A., Bailey, J., Breadmore, K., Macnair, M.R., (1994). Biomass allocation, phosphorous nutrition and vesiculararbuscular mycorrhiza infection in clones of Yorkshire Fog, *Holcus lanatus* L. (Poaceae) that differ in their phosphate uptake kinetics and tolerance to arsenate. Plant Soil.160, 11-20.

Meharg, A.A., and Hartley–Whitaker, J. (2002). Arsenic uptake and metabolisms in arsenic resistant and non resistant plant species, New Phytologist, Tansley review no.133 (154):29-43.

Porter, E.K. and Peterson, P.J. (1975). Arsenic accumulation by plants on mine waste. Sci.Total Env.4:365-371.

Singh, N., Ma, L.Q., Srivastava, M., Rathinasabapathi, B., (2006). Metabolic adaptation to arsenic- induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris ensiformis* L. Plant Science. 170, 274-282.

Suresh, B. Ravishanker, G.A. (2004). Phytoremediation a Novel and promising approach for environmental clean up.critical reviews in Biotechnol.24 (2-3):97-124.

Wallis, C. (1999). Practical biology (A laboratory manual). Heinmann medical.

Wang, T., Peverly, J.H., (1996). Oxidation states and fractionation of plaque iron on roots of common reeds. Soil Sci. Soc.Am.J.60, 323-329.

Wu, L., (1990). Colonization and establishment of plants in contaminated sites. In: Shaw AJ (ed) Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary Aspect. CRC Press, Boca Raton, FL, 296-284.

Tolerance physiological study of common reed (*Phragmites australis*) to arsenic in Chelpo contaminated area-Kashmar

Yousefzadeh, H[1]., Ghorbanli, MH[2]., Ghassemzadeh, F[3]

1. Biology Department, Faculty of Sciences, Payam-Noor University, Tehran, Iran.
2. Biology department, Azad University of Gorgan, Iran.
3. Biology Department, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

Abstract

This study was examined arsenic tolerance in *Phragmites australis* L, common reed. We collected plants from five contaminated stations in Chelpo-Kashmar, northeast Iran. Determination of As, Fe, Ca, Mg and Zn was done by atomic absorption spectrometry on the prepared samples. All parts of common reed had efficiencies for removal As from contaminated soils. Maximum accumulation in shoot and roots of common reed was 6.82 and 23.56 mg Kg^{-1} respectively. Arsenic accumulated mainly in roots of common reed and only minor amount of As translocated to shoot. In *P. australis* accumulation model followed as this order Root>Rhizome>Stem>leave. In this study following As increment, uptake of K and Fe increased while Ca and Mg didn't significantly different in contrast to control plants among stations. Root accumulation model similarity between Fe and As and increment 4 and 13.5 times of Fe in root and shoots of contaminated plants in contrast to control plants suggested that Fe play a key role in As detoxification in this plant. Common reed has a good potential to be used for removing As from polluted environment.

Key words: Arsenic, Chelpo, Common reed, Hyperaccumulation, Tolerance

مطالعه رستنی‌های (فلورستیکی) منطقه عین الکش کرمانشاه

*مهتاب شهرکی[۱]، منیژه پاکروان[۱]، یونس عصری[۲]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا، تهران

۲. موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران

چکیده

منطقه عین الکش با مساحت حدود ۲۵۰۰ هکتار در جنوب غربی کرمانشاه واقع شده است. حداقل ارتفاع منطقه ۱۵۵۰ متر و حداکثر ارتفاع ۱۸۵۰متر از سطح دریا می‌باشد. میانگین بارندگی سالانه منطقه ۴۳۰/۷ میلیمتر و متوسط دمای سالانه آن ۱۵/۱ درجه سانتیگراد است. هدف اصلی این پژوهش شناسایی گونه‌های گیاهی و معرفی فلور منطقه، تعیین شکلهای زیستی گیاهان و پراکنش جغرافیایی آنها می باشد. به این منظور نمونه‌های گیاهی از زیستگاه‌های مختلف منطقه طی دوره رویشی سال ۱۳۸۵ جمع آوری و با استفاده از فلورهای مختلف شناسایی شدند. شکل‌های زیستی گونه‌های شناسایی شده تعیین گردید و طیف زیستی منطقه ترسیم شد. بر اساس اطلاعات به دست آمده از پراکنش جغرافیایی گونه ها و منابع موجود، جایگاه منطقه از نظر جغرافیای گیاهی ایران مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۱۵۶ گونه و تقسیمات تحت گونه ای شناسایی شده از منطقه به ۲۷ تیره و ۱۱۸ جنس تعلق دارند. بیشترین غنای گونه‌ای در تیره‌های Asteraceae (۳۲ گونه)، Fabaceae (۲۷ گونه) و Poaceae (۱۴ گونه) دیده می‌شود. در بین گیاهان منطقه تروفیت‌ها با ۹۱ گونه (۵۸/۳ درصد) فراوان ترین شکل زیستی منطقه هستند. پراکنش ۸۶ گونه (۵۵/۱ درصد) به ناحیه ایران ـ تورانی منحصر می‌گردد که از این تعداد ۱۲ گونه اندمیک ایران هستند.

کلمات کلیدی: استان کرمانشاه، شکل زیستی، فلور، کوروتیپ، گونه‌های اندمیک، منطقه عین الکش

مقدمه

کشور ایران با مساحت ۱۶۴۸۰۰۰ کیلومتر مربع دارای اختلاف ارتفاعی از ۲۸ متر پایین تر از سطح دریا در ساحل دریای خزر تا ارتفاع ۵۷۷۰ متر بالاتر از سطح دریا در کوه دماوند می‌باشد. شرایط اقلیمی متنوع از جمله آب وهوای مرطوب در حاشیه جنگل‌های دریای خزر، آب وهوای خشک در بیابان‌های دشت لوت وتنوع دمای کمتر از ۳۵ درجه سانتیگراد در شمال غربی و تابستان‌های بیش از ۵۰ درجه سانتیگراد در خلیج فارس از دیگر ویژگی‌های این پهنه در جهان است. به دلیل تنوع زیاد شرایط توپوگرافیکی، زمین‌شناسی و اقلیمی، کشور ایران یکی از مناطق مهم تنوع گونه‌ای و همچنین گونه‌زایی گیاهان می‌باشد (صفی‌خانی، ۱۳۸۰).

اهمیت مطالعه تنوع گونه‌های گیاهی کشور به عنوان بستری لازم برای مطالعات مختلف اکولوژیکی، زیست محیطی، مرتعداری، جنگلداری، آبخیزداری، کشاورزی و...

*e.mail: mahtab.shahraki_284@yahoo.com

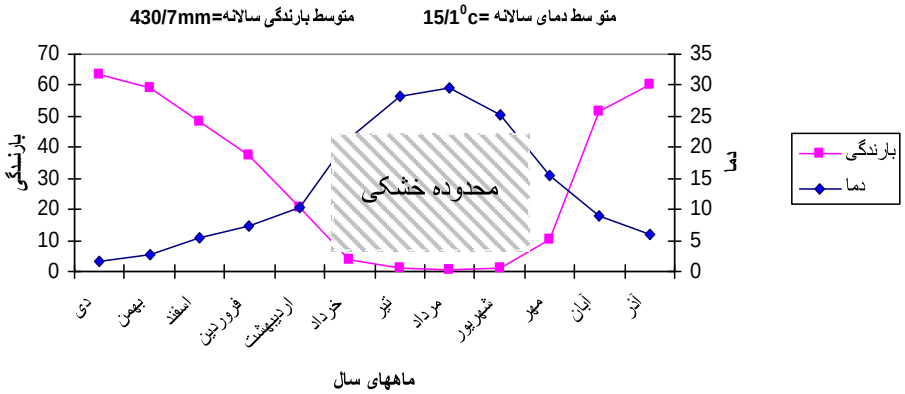
غیرقابل انکار می‌باشد. از طرفی با توجه به اثرات عوامل مخرب در انقراض برخی از گونه‌های حائز اهمیت، شناسایی هرچه سریعتر چنین گونه‌هایی در عرصه‌های مختلف و برنامه‌ریزی جهت حفظ آنها ضرورت می‌یابد. به همین منظور فلور منطقه عین الکش در استان کرمانشاه مورد بررسی قرار گرفت و گونه‌های گیاهی موجود در این منطقه شناسایی و نامگذاری گردید. نتایج حاصل از این مطالعه به تعیین هر چه دقیق‌تر تنوع گونه ای در استان و کشور کمک خواهد کرد. به علاوه پتانسیلهای گیاهی قابل بهره برداری منطقه را از لحاظ دارویی، مرتعی، جنگلی، صنعتی و... مشخص خواهد کرد.

در چند دهه اخیر پژوهش‌هایی در زمینه مطالعات فلورستیکی مناطق مختلف کشور صورت گرفته است که از جمله می‌توان به عصری و همکاران (۱۳۷۹)، آریاوند و فتح پور (۱۳۸۰)، عصری و مهرنیا (۱۳۸۱)، بتولی (۱۳۸۲)، عصری (۱۳۸۲)، یوسفی (۱۳۸۲)، اشرفی و همکاران (۱۳۸۳)، کاشی پزها و همکاران (۱۳۸۳)، کاظمیان و همکاران (۱۳۸۳)، توکلی و مظفریان (۱۳۸۴)، دهشیری و گودرزی (۱۳۸۴)، نجفی تیره شبانکاره و همکاران (۱۳۸۴)، رشید نهال و همکاران (۱۳۸۵) و مریدی و همکاران (۱۳۸۶) اشاره کرد. در این پژوهش تنوع گیاهی منطقه عین الکش کرمانشاه در راستای تکمیل مطالعات فلور ایران مورد مطالعه قرار گرفت.

منطقه مورد مطالعه

منطقه عین الکش به مساحت حدود ۲۵۰۰ هکتار در ۴۷°۳َ–۴۶°۵۶َ طول شرقی و ۳۴°۱۹َ–۳۴°۱۵َ عرض شمالی واقع شده است. این منطقه در ۱۰ کیلومتری جنوب غربی کرمانشاه و ۱۴ کیلومتری شهرستان ماهیدشت در ارتفاع بین ۱۸۵۰–۱۵۵۰ متر از سطح دریا و در شیبهای جنوبی قرار گرفته است. تشکیلات زمین شناسی منطقه شامل آهک‌های مارنی به رنگ کرم نسبتاً روشن است که لایه بندی منظم وکم ضخامتی را نشان می‌دهند. وجود گونه‌های مختلفی از میکروفسیل‌های گلوپرتوونکلانا وسن سومائین رسوبات دوره کرتاسه را برای آن پیشنهاد می‌کند. آهکهای موصوف ریز دانه را به ندرت می‌توان در لایه‌های مارنی و سیلیسی مشاهده کرد. منطقه عین الکش به صورت دشتهای دامنه ای وتپه‌های کم ارتفاع است.

بر اساس آمار ۱۵ ساله (۱۳۸۲–۱۳۶۸) نزدیکترین ایستگاه هواشناسی منطقه یعنی ایستگاه کرمانشاه میانگین بارندگی سالانه ۴۳۰/۷ میلیمتر و میانگین دمای سالانه ۱۵/۱ درجه سانتیگراد است. حداقل و حداکثر دمای مطلق منطقه به ترتیب ۲۴- و ۴۴/۱ درجه سانتیگراد است. منحنی آمبروترمیک منطقه بر اساس مقادیر میانگین دما و بارندگی ماهانه ترسیم گردید (شکل ۱). همان طور که مشاهده می‌شود دوره خشک منطقه نسبتاً طولانی است و از اواسط اردیبهشت ماه تا اواسط مهر ادامه می‌یابد. طبق این منحنی وبا کمک روش ضریب آمبرژه روش دومارتن، اقلیم منطقه، نیمه خشک معتدل می‌باشد. بارش از اواسط شهریور آغاز می‌شود و تا اواسط خرداد ادامه دارد. ماههای خرداد تا شهریور بارش بسیار ناچیزی می‌باشد و منطقه تقریباً یک دوره ۳ ماهه را با خشکی زیاد می‌گذراند (عصری، ۱۳۸۴).



شکل ۱: منحنی آمبروترمیک منطقه با استفاده از اطلاعات اقلیمی ایستگاه هواشناسی کرمانشاه

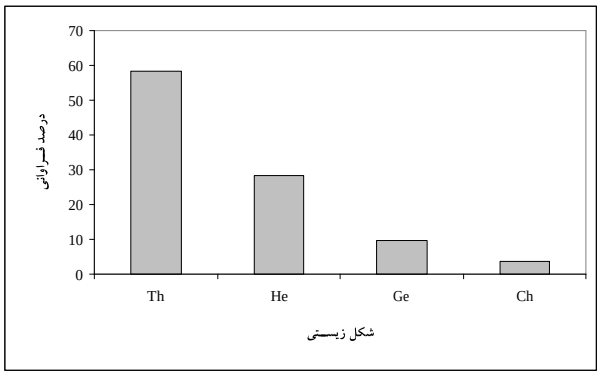
مواد و روشها

در این پژوهش کلیه نمونه های گیاهی از مناطق مختلف عین الکش در دو فصل رویشی سال ۸۶-۱۳۸۵ جمع آوری شدند و پس از انتقال به هرباریوم‌های مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه و دانشگاه الزهرا با استفاده از فلورهای ایرانیکا (Rechinger, 1963-2005)، ترکیه (Davis, 1965-1988)، عراق (Townsend et al., 1966-1988) و ایران (اسدی و همکاران، ۱۳۸۵-۱۳۶۷) و دیگر منابع موجود نظیر فلور رنگی ایران (قهرمان، ۱۳۸۵-۱۳۵۷)، گون‌های ایران (معصومی، ۱۳۸۴-۱۳۶۵) و کورموفیت‌های ایران (قهرمان، ۱۳۷۳-۱۳۶۹) مورد شناسایی قرار گرفتند. نمونه ها در هرباریوم دانشگاه الزهرا نگهداری می‌شوند. مناطق انتشار گونه های گیاهی نیز بر اساس فلورهای فوق مشخص شد. سپس کوروتیپ گونه ها با توجه به مناطق انتشار آنها و بر اساس تلفیقی از تقسیم بندیهای جغرافیایی رویش‌های ایران توسط Zohary (۱۹۷۳)، Takhtajan (۱۹۸۶) و Leonard (۱۹۸۸) تعیین شد. شکل زیستی گیاهان بر اساس سیستم Raunkiaer تعیین گردید و سپس طیف زیستی منطقه ترسیم شد (Archibold, 1996).

نتایج

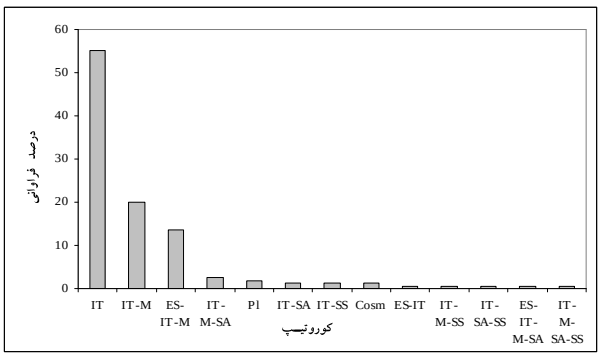
بر اساس جمع آوری گیاهان از رویشگاههای مختلف منطقه در مجموع ۱۵۶ گونه و تقسیمات تحت گونه ای تشخیص داده شد که به ۲۷ تیره و ۱۱۸ جنس تعلق دارند (جدول ۱). بیشترین غنای گونه‌ای در تیره‌های Asteraceae (۳۲ گونه)، Fabaceae (۲۷ گونه)، Poaceae (۱۴ گونه)، Brassicaceae (۱۱ گونه)، Caryophyllaceae و Lamiaceae (هر یک با ۱۰ گونه) دیده می‌شود. در بین گیاهان منطقه تروفیت‌ها با ۹۱ گونه (۵۸/۳ درصد) فراوان‌ترین شکل زیستی هستند، ضمن اینکه شکل زیستی فانروفیت یافت نشد (شکل ۲). پراکنش ۸۶ گونه (۵۵/۱ درصد) به ناحیه ایران – تورانی منحصر می‌گردد که از این تعداد ۱۲ گونه اندمیک ایران هستند. پس از این گروه گونه هایی با کوروتیپ ایران – تورانی و مدیترانه‌ای، و ایران – تورانی، مدیترانه ای و اروپا – سیبری به ترتیب با ۳۱ گونه (۱۹/۹ درصد) و ۲۱ گونه (۱۳/۵ درصد) بیشترین فراوانی را دارند (شکل ۳). گونه های اندمیک ایران عبارتند از:

Acantholimon blakelockii, Astragalus ecbatanus, Astragalus verus, Cousinia keredjensis, Crepis quercifolia, Echinops parviflorus, Echinops robustus, Onobrychis scrobiculata, Scabiosa flavida, Scorzonera mucida, Tragopogon rezaiyensis, Trigonella persica



شکل ۲: طیف زیستی گیاهان منطقه

Ch= کامفیت، Ge= ژئوفیت، He= همی کریپتوفیت، Th= تروفیت



شکل ۳: هیستوگرام فراوانی نواحی رویشی گیاهان منطقه

Cosm: جهان گستر، ES: اروپا- سیبری، IT: ایران- تورانی، M: مدیترانه‌ای، Pl: چند ناحیه‌ای SS: صحارا- سندی، SA: صحارا ـ عربی

جدول ۱: فهرست، شکل‌های زیستی و کوروتیپ‌های گیاهان منطقه عین الکش

تاکزون	شکل زیستی	کوروتیپ
Dicotyledones		
Apiaceae		
Bunium paucifolium DC.	Ge	IT
Bupleurum kurdicum Boiss.	Th	IT
Eryngium thyrosoideum Boiss.	He	IT
Torilis leptophylla (L.) Reichenb.	Th	ES, IT, M
Turgenia latifolia (L.) Hoffm.	Th	ES, IT, M
Asteraceae		
Achillea wilhelmsii C. Koch	Th	IT
Anthemis haussknechtiii Boiss. & Reut.	Th	IT
Carduus pycnocephalus L. subsp. albidus (M. B.) Kazmi	Th	IT
Carthamus oxyacantha M. B.	Th	IT
Centaurea aggregata Fisch & C. A. Mey. ex DC.	He	IT
Centaurea solstitialis L.	He	IT
Centaurea virgata Lam. subsp. squarrosa (Willd.) Gugler	He	IT
Chardinia orientalis (L.) Gaerth	Th	IT
Cirsium rhizocephalum C. A. Mey.	Ge	IT
Cousinia keredjensis Bornm. & Gauba	He	IT
Crepis micrantha Czer.	Th	IT
Crepis quercifolia Bornm. & Gauba	Th	IT
Crupina crupinastrum (Moris) Vis.	Th	IT, M
Echinops parviflorus Boiss. & Buhse	He	IT
Echinops robustus Bge.	He	IT
Filago arvensis L.	Th	ES, IT, M
Garhadiolus angulosus Jaub. & Spach	Th	IT
Gundelia tournefortii L.	He	IT
Lactuca serriola L.	Th	ES, IT, M
Lasiopogon muscoides (Desf.) DC.	Th	IT
Picnomon acarna (L.) Cass.	Th	IT, M
Picris strigosa M. B.	He	IT
Rhagadiolus stellatus (L.) Gaertn.	Th	IT, M
Scorzonera mucida Rech. f., Aell. & Esfand.	Ge	IT
Scorzonera phaeopappa (Boiss.) Boiss.	Ge	IT
Senecio vernalis Waldst & Kit.	Th	ES, IT,M
Siebera nana (DC.) Bornm.	Th	IT
Taraxacum syriacum Boiss.	He	IT
Tragapagon buphthalmoides (DC.) Boiss.	He	IT
Tragapogon longirostris Bisch.	He	IT ,M
Tragapogon rezaiyensis Rech. f.	He	IT
Zoegea crinita Boiss.	Th	IT
Boraginaceae		
Anchusa italica Retz.	He	ES, IT, M
Heliotropium noeanum Boiss.	Th	IT, SS
Myosotis refracta Boiss.	Th	IT
Onosma sericeum Willd.	He	IT
Rochelia disperma (L. f.) C. Koch	Th	IT
Trichodesma incanum (Bge.).DC.	He	IT

Brassicaceae		
Aethionema carneum (Banks & Soland.) B. Fedtsch.	Th	IT, M
Alyssum marginatum Steud. ex Boiss.	Th	IT
Arabis caucasica Willd.	He	IT, M
Capsella bursa-pastoris (L.) Medicus	Th	Cosm
*Cardaria draba (*L.) Desv.	He	IT, M
Clypeola jonthlaspi L.	Th	IT, M
Conringia perfoliata (C. A. Mey.) Busch	Th	IT
Erysimum crassipes Fisch. & C. A. Mey.	Th	IT, M
Matthiola longipetala (Vent.) DC.	Th	IT,M,SA,SS
Parlatoria cakiloidea Boiss.	Th	IT
Thlaspi perfoliatum L.	Th	ES, IT, M
Caryophyllaceae		
Acanthophyllum caespitosum Boiss.	Ch	IT
Arenaria serpyllifolia L.	He	IT
Cerastium inflatum Link ex Desf.	Th	IT
Dianthus orientalis Adams subsp. *orientalis*	He	IT
Holosteum umbellatum L.	Th	ES, IT, M
Minuartia anatolica (Boiss.) Woron.	He	IT
Minuartia hybrida (Vill.) Schischk. subsp. *hybrida*	Th	ES, IT, M
Minuartia meyeri (Boiss.) Bornm.	Th	IT
Silene coniflora Nees ex Otth.	Th	IT, M
Velezia rigida L.	Th	ES, IT, M
Cistaceae		
Helianthemum ledifolium (L.) Miller	Th	IT, M, SA
Helianthemum salicifolium (L.) Miller	Th	IT, M, SA
Convolvulaceae		
Convolvulus arvensis L.	He	Cosm
Convolvulus commutatus Boiss.	Ch	IT
Crassulaceae		
Rosularia sempervivum (M. B.) Berger var. *sempervivum*	He	IT
Dipsacaceae		
Cephalaria syriaca (L.) Schrad.	Th	IT, M
Pterocephalus plumosus (L.) Coult.	Th	IT, M
Scabiosa flavida Boiss. & Hausskn.	Th	IT
Euphorbiaceae		
Andrachne telephioides L.	Th	IT, M, SS
Euphorbia cheiradenia Boiss. & Hohen.	Th	IT
Euphorbia inderiensis Less. ex Kar. & Kir.	Th	IT
Euphorbia myrsinites L.	He	IT
Fabaceae		
Astragalus aduncus Willd.	He	IT
Astragalus chrysostachys Boiss. subsp. *chrysostachys*	Ch	IT
Astragalus curvirostris Boiss.	He	IT
Astragalus ecbatanus Bunge	He	IT
Astragalus hamosus L.	Th	IT
Astragalus supervisus (Kuntze) Sheld.	He	IT
Astragalus tricholobus DC.	Ch	IT
Astragalus verus Olivier	Ch	IT

Glycyrrhiza glabra L.	He	IT, M
Lathyrus cicera L.	Th	IT, M
Lens cyanea (Boiss. & Hohen.) Alef.	Th	IT
Lens orientalis (Boiss.) Hand. – Mzt.	Th	IT, M
Medicago radiata L.	Th	IT, M
Medicago rigidula (L.) All.	Th	IT
Melilotus officinalis (L.) Desr.	He	ES, IT, M
Onobrychis scrobiculata Boiss.	He	IT
Pisum sativum L.	Th	IT, M
Sophora alopecuroides L.	Ge	IT
Trifolium hirtum All.	Th	IT, M
Trifolium scabrum L.	Th	ES, IT, M
Trifolium stellatum L.	Th	ES, IT
Trigonella monantha C. A. Mey.	Th	IT
Trigonella persica Boiss.	Th	IT
Vicia assyriaca Boiss.	Th	IT
Vicia ervilia (L.) Willd.	Th	IT, M
Vicia narbonensis L.	Th	ES, IT, M
Vicia peregrina L.	Th	IT, M
Geraniaceae		
Erodium cicutarium (L.) L'Herit ex Aiton	Th	ES, IT, M
Geranium tuberosum L.	Ge	IT
Hypericaceae		
Hypericum asperulum Jaub. & Spach	He	IT
Lamiaceae		
Acinus graveolens (M. B.) Link	Th	IT, M
Lamium amplexicaule L.	Th	ES, IT, M
Marrubium anisodon C. Koch	He	IT
Phlomis lanceolata Boiss. Hohen.	He	IT
Phlomis olivieri Benth.	He	IT
Salvia multicaulis Vahl	He	IT, M
Salvia spinosa L.	Ge	IT, SA, SS
Scutellaria pinnatifida A. Hamilt.	He	IT
Stachys inflata Benth.	He	IT
Ziziphora capitata L.	Th	IT, M
Linaceae		
Linum mucronatum Bertol.	He	IT
Malvaceae		
Alcea kurdica (Schlecht.) Aleff	He	IT
Papaveraceae		
Glaucium corniculatum (L.) Rudolph	Th	IT, M
Hypecoum pendulum L.	Th	IT, M
Papaver bornmülleri Fedde	Th	IT
Papaver dubium L.	Th	Pl
Roemeria hybrida (L.) DC.	Th	IT, M, SA
Roemeria refracta DC.	Th	IT
Plumbaginaceae		
Acantholimon blakelockii Mobayen	Ch	IT

Primulaceae		
Anagallis arvensis L.	Th	ES, IT, M
Androsace maxima L.	Th	ES, IT, M
Ranunculaceae		
Adonis dentata Delile	Th	IT, M, SA
Ceratocephalus falcata (L.) Pers.	Th	ES, IT, M
Consolida orientalis (Gay) Schrod.	Th	IT
Ficaria kochii (Ledeb.) Iranshahr & Rech. f.	Ge	IT
Nigella oxypetala Boiss.	Th	IT
Ranunculus arvensis L.	Th	ES, IT, M
Ranunculus scleratus L.	Th	Pl
Rubiaceae		
Callipeltis cucullaria (L.) Stev.	Th	IT, SA
Scrophulariaceae		
Scrophularia atropatana Grossh.	He	IT
Scrophularia striata Boiss.	He	IT
Valerianaceae		
Valerianella vesicaria (L.) Moench	Th	IT, M
Violaceae		
Viola modesta Fenzl.	Th	IT, M
Monocotyledones		
Iridaceae		
Crocus haussknechtii Boiss.	Ge	IT
Gladiolus atroviolaceus Boiss.	Ge	IT
Liliaceae		
Gagea reticulata (Pall.) Schultes & Schultes fil.	Ge	IT, SA
Poaceae		
Aegilops umbellulata Zhuk.	Th	IT,SS
Agropyron intermedium (Host) P. Beauv.	Ge	IT, M
Agropyron podperae Nab.	Ge	IT
Avena barbata Pott ex Link	Th	ES, IT, M
Boissiera squarrosa (Banks & Soland.) Nevski	Th	IT
Bromus danthoniae Trin.	Th	IT
Bromus sterilis L.	Th	IT, M
Bromus tectorum L.	Th	ES,IT,M,SA
Echinaria capitata (L.) Desf.	Th	IT
Festuca ovina L.	He	Pl
Hordeum bulbosum C. Koch	Ge	IT, M
Hordeum spontaneum C. Koch	Th	IT, M
Poa bulbosa L.	Ge	ES, IT,M
Stipa barbata Desf.	He	IT

شکل‌های زیستی:Ch: کامفیت، Ge: ژئوفیت، He: همی‌کریپتوفیت، Th: تروفیت؛ کوروتیپها: Cosm: جهان گستر، ES: اروپا – سیبری، IT: ایران – تورانی، M: مدیترانه‌ای، Pl: چند ناحیه‌ای، SA: صحارا - عربی، SS: صحارا – سندی

بحث

در ایـن پـژوهش فلـور منطقـه عـین الکـش در اسـتان کرمانشاه مـورد بررسـی قـرار گرفـت. ۱۲۲ گونـه گیـاهی در مساحتی حدود ۲۵۰۰ هکتار شناسایی شد که نسبت بـه دامنـه ارتفاعی کم منطقـه و یکنـواختی شـرایط توپـوگرافیکی آن از تنوع گونه‌ای به نسبت خوبی بهره‌مند است. با توجه به حضور ۸ گونه اندمیک در منطقه نگهداری و حفاظت از آن بـه ویـژه عرصه‌هایی به عنوان قرق در نقاطی که گونه‌های اندمیک نـادر وجود دارند, امری ضروری است، زیرا این گونه‌هـا از ذخـایر ژنتیکی کشور محسوب می‌شوند که با از بین رفتن آنهـا تنـوع ژنتیکی نیز کاهش می‌یابد. لازم به ذکر اسـت مهمتـرین عامـل پایداری هـر اکوسیـستمی تنـوع ژنتیکـی و بـه تبـع آن تنـوع گونه‌ای آن است.

در اقلیم‌های خشک و نیمه خـشک، تروفیتهـا بـه دلیـل سازگاری مطلوبتر با شرایط محیطی به ویژه بارشهای مناسـب در ابتدای فصل رویش و خشکی شدید در دوره بیـشتر سـال، فراوانی زیادتری نسبت به سایر شکلهای زیـستی دارنـد. ایـن وضعیت در اکثر مطالعات فلورستیکی انجـام شـده در منـاطق مشابه از جمله بتـولی (۱۳۸۲)، اشـرفی و همکـاران (۱۳۸۳)، کاشی پزها و همکاران (۱۳۸۳)، کاظمیان و همکاران (۱۳۸۳)، تـوکلی و مظفریـان (۱۳۸۴)، دهـشیری و گـودرزی (۱۳۸۴)، نجفـی تیـره شـبانکاره و همکـاران (۱۳۸۴) و رشـید نهـال و همکاران (۱۳۸۵) مورد اشاره و تایید قـرار گرفتـه اسـت. امـا مقایسه فراوانی تروفیتها در منطقه عین الکش با منـاطق مـورد اشاره نشان از حاکمیت بیشتر این شکل زیستی در منطقه مورد مطالعه دارد. با وجود اینکه ۴۱/۷ درصد گونـه‌هـای منطقـه را گیاهـان چندسـاله (همـی کریپتوفیتهـا، ژئوفیتهـا و کامفیتهـا) تشکیل داده‌اند, اما حضور فراوان تروفیتها در این مناطق حتـی بیشتر از مناطق کویری از جملـه ذخیـره گـاه بیوسـفر تـوران (عـصری و همکـاران، ۱۳۷۹) و ذخیـره گـاه بیوسـفر کـویر (عصری، ۱۳۸۲) است. علت وفـور بیـشتر تروفیتهـا در عـین الکش را می‌توان به تخریـب شـدید منطقـه از جملـه چـرای مفرط دام, عملیات جاده سازی و جمع آوری گیاهـان توسـط اهالی نـسبت داد. تعـداد فـراوان بعـضی از گیاهـان از جملـه گونه‌های تیره Asteraceae در منطقه موید این موضوع است.

در منطقه مورد مطالعه ۳۳/۴ درصـد گونـه هـا، عناصـر رویشی ایـران – تـورانی و مدیترانـه ای, و ایـران – تـورانی, مدیترانه ای و اروپـا – سـیبری هـستند. حـضور فـراوان ایـن گونه‌ها در منطقه نشان دهنـده تأثیرپـذیری زیـاد آن از ناحیـه رویشی مدیترانه ای است. این موضوع با مطالعات انجام شـده در مناطق مشابه نظیر عصری و مهرنیا (۱۳۸۱)، رشـید نهـال و همکاران (۱۳۸۵) و مریدی و همکاران (۱۳۸۶) که بر حـضور فراوان عناصر مدیترانه ای در رشـته کوههـای زاگـرس اشـاره نموده اند، مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج کلی۱۵۶ گونه گیاهی مورد بررسی در منطقه عـین الکش در استان کرمانـشاه نـشان مـی‌دهـد گیاهـان تیـره‌هـای Lamiaceae, Poaceae, Asteraceae, Fabaceae, Brassicaceae نسبت به سایر تیره‌ها، سـهم بیـشتری از فلـور منطقه را به خود اختصاص داده اند. از آنجایی که منطقـه روز به روز در حال تخریب است. فراوانی گونه‌های گیاهی مربوط به تیره Asteraceae به دلیل عـواملی از جملـه چـرای دام‌هـا، جاده‌سازی، جمع‌آوری گیاهان منطقه توسط اهالی و یا عوامل دیگری در حال افـزایش اسـت، ولـی همچنـان ایـن تخریـب وسعت منطقه را کاهش می‌دهد.

همچنـین حـضور جـنس هـای *Boissiera, Silene, Phlomis, Echinops, Anthemis, Acantophyllum, Astragalus, Centaurea* کـه عناصـر آنهـا بیـشتر در ناحیـه رویشی ایران ـ تـورانی تجمـع یافتـه‌انـد، نـشان از حاکمیـت رویش‌های ایران ـ تورانی در منطقه است. از آنجایی که اقلـیم منطقه نیمه خشک است، درصد بـالای تروفیـت‌هـا، دلیـل بـر سازگاری بیشتر این گیاهان در منطقه اسـت کـه بـه وفـور در مناطق خشک و نیمه خشک دیده شده است.

سپاسگزاری

از اعضای هیات علمی و کارشناسان محترم مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه به خاطر مساعدت‌های ارزنده‌شان تشکر می‌شود. از زحمات آقای مهندس منصور حیدری در مراحل اجرای این پژوهش سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

آریاوند، ا.، و فتح‌پور، ح. (۱۳۸۰). بررسی مقدماتی گیاهان آوندی و جانوران مهره‌دار پناهگاه حیات وحش موته در استان اصفهان. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان ۵(۲)، صفحات ۲۳۹-۲۲۵.

اسدی، م.، معصومی، ع.، خاتم ساز.، م و مظفریان، و. (ویراستاران). (۱۳۸۵-۱۳۶۷). فلور ایران. شماره‌های ۵۲-۱، انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران.

اشرفی، ک.، اسدی، م.، و نجاحی، ر. (۱۳۸۳). معرفی فلور، شکل زیستی و پراکنش جغرافیایی گیاهان منطقه ورامین. فصلنامه پژوهش و سازندگی ۱۷(۱)، صفحات ۶۳-۵۱.

بتولی، ح. (۱۳۸۲). تنوع زیستی و غنای گونه ای عناصر گیاهی ذخیره گاه قزاآن کاشان. فصلنامه پژوهش و سازندگی ۱۶(۴)، صفحات ۱۰۳-۸۵.

توکلی، ز.، و مظفریان، و. (۱۳۸۴). بررسی فلور آبخیز سد کبار قم. فصلنامه پژوهش و سازندگی ۱۷(۱)، صفحات ۶۷-۵۷.

دهشیری، م.، و گودرزی، م. (۱۳۸۴). بررسی فلورستیک شهرستان بروجرد. مجله علوم پایه (دانشگاه آزاد اسلامی) ۱۵، صفحات ۴۷۶-۴۵۹.

رشید نهال، م.، عصری، ی.، زارع مبارکه، ش.، احمدی، ش.، و مریدی، م. (۱۳۸۵). فلور، شکلهای زیستی و کوروتیپهای گیاهان دینار کوه. فصلنامه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، جلد ۱(۳)، صفحات ۳۰-۲۱.

کاشی‌پزها، ا.، عصری، ی.، و مرادی، ح. (۱۳۸۳). معرفی فلور، شکل زیستی و پراکنش جغرافیایی گیاهان منطقه باغ شاد. فصلنامه پژوهش و سازندگی ۱۷(۲)، صفحات ۱۰۳-۹۵.

کاظمیان، آ.، ثقفی خادم، ف.، اسدی، م.، و قربانلی، م. (۱۳۸۳). مطالعه فلورستیک بند گلستان و تعیین شکل‌های زیستی و پراکنش جغرافیایی گیاهان منطقه. فصلنامه پژوهش و سازندگی ۱۷(۳)، صفحات ۶۲-۴۸.

عصری، ی. (۱۳۸۲). فلور، شکل‌های زیستی و کوروتیپ‌های گیاهان ذخیره‌گاه بیوسفر کویر. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان ۴، صفحات ۲۵۹-۲۴۷.

عصری، ی.، جلیلی، ع.، اسدی، م.، و دیانت‌نژاد، ح. (۱۳۷۹). نگرشی بر فلور ذخیره‌گاه بیوسفر توران. فصلنامه پژوهش و سازندگی ۱۳(۲)، صفحات ۱۹-۴.

عصری، ی.، و مهرنیا، م. (۱۳۸۱). معرفی فلور بخش مرکزی منطقه حفاظت شده سفیدکوه. مجله منابع طبیعی ایران، ۵۵(۳)، صفحات ۳۷۶-۳۶۳.

قهرمان، ا. (۱۳۸۵-۱۳۵۷). فلور رنگی ایران. جلدهای ۲۰-۱،انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران.

قهرمان، ا. (۱۳۷۳-۱۳۶۹). کورموفیت‌های ایران (سیستماتیک گیاهی). جلدهای ۴-۱، انتشارات مرکز نشر دانشگاهی، تهران.

مریدی، م.، عصری، ی.، زارع مبارکه، ش.، احمدی، ش.، و رشـید نهـال، م. (۱۳۸۶). فلـور، شـکل‌هـای زیـستی و کوروتیپ‌های گیاهان کبیر کوه. فـصلنامه زیـست‌شناسـی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار (زیر چاپ).

معصومی، ع. (۱۳۸۴-۱۳۶۵). گون‌های ایران. جلدهای ۵-۱، انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران.

نجفی تیره شبانکاره، ک.، جلیلی، ع.، خراسانی، ن.، جم‌زاد، ز.، و عـصری، ی. (۱۳۸۴). فلـور، شـکلهای زیـستی و کوروتیپهای گیاهان منطقه حفاظـت شـده گنـو. فـصلنامه پژوهش و سازندگی ۱۸(۴)، صفحات ۶۲-۵۰.

یوسفی، م. (۱۳۸۲). بررسی گیاهـان پناهگـاه حیـات وحـش قمیشلو. مجله زیست شناسی ایران ۱۶(۴)، صفحات ۸۷-۷۲.

Archibold, O.W. (1996). Ecology of world vegetation. Chapman & Hall, Inc., London, 509 P.

Davis, P.H. (ed.) (1965-1988). Flora of Turkey and the east Aegean Islands, vols. 1-10. Edinburgh University Press, Edinburgh.

Léonard, J. (1988). Contribution à l'étude de la flore et de la végétation des desert d'Iran, Fascicule 8: Etude des aires de distribution–Les phytochories–Les chorotypes. Bulletin of the Jardin Botanique National de Belgique, Meise, 190 p.

Rechinger, K.H. (1963-2005). Flora Iranica, nos. 1-175. Akademische Druk-u Verlagasanstalt, Graz.

Takhtajan, A. (1986). Floristic Regions of the World. University of California Press, California.

Townsend, C.C., Guest, E. and Al-Ravi, A. (1966-1988). Flora of Iraq, vols. 1-9. Ministry of the Republic of Iraq.

Zohary, M. (1973). Geobotanical foundations of the Middle East, 2 vols. Stuttgart.

Floristic study of Einolkosh area in Kermanshah

Shahraki, M[1]., Pakravan, P[1]., Asri, Y[2]

1. Dep. of Biology, Alzahra University, University Faculty of Science, Tehran, Iran
2. Research Institute of Forests & Rangelans, Tehran, Iran

Abstract

Einolkosh region covers an area of 2000 hectares situated in the southwest of Kermanshah. Minimum and maximum altitudes of study area are 1550 and 1850 m, respectively. Mean annual precipitation of the area is 430.7mm and mean annual temperature is 15.1˚C. The aim of this research was to identify the plant species, introducing the flora, determination of life forms and geographical distribution of species in the area. For this purpose, plant samples were collected from different habitats of the area during growing seasons in 1385. The biological spectrum of the area was plotted by means of life forms results. The position of the area within Iran's phytogeography classification was studied based on geographical distribution data. In this study, 156 species are collected and identified. These species belong to 27 families and 118 genera. The following families had the highest number of species: Asteraceae (32 species), Fabaceae (27 species) and Poaceae (14species). Therophytes with 91 species (58.3%) are the most frequent life form. Investigation on geographical distribution of species showed 86 species (55.1 %) belong to Irano–Turanian region. Of these, 12 species are endemics of Iran.

Keywords: Chorotype, Einolkosh area, Endemic species, Flora, Iran, Kermanshah province, Life form

بررسی مقایسه‌ای ترکیب‌های اسانسی برگ و ساقه گیاه مورخوش در مرحله رویشی (*Zhumeria majdae* Rech. f. & Wendelbo)

علی اصغر مجروحی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرری، تهران

چکیده

گونه ایرانی منوتیپیک *Zhumeria majdae* Rech. f. که با نام محلی ُمورخوش شناخته می‌شود، اخیراً بـه عنـوان یک گونه متعلق به یک جنس جدید بنام زومریا (*Zhumeria*) از تیره نعناع معرفی شده است. این گیاه از نظر پـراکنش محدود به جنوب ایران و استان هرمزگان است. برگ‌های گیاه ُمورخوش سالیان متمادی است که به عنوان یک داروی شفابخش برای درد معده و یک ضدعفونی کننده قوی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این تحقیق نوع و مقدار ترکیبات موجود در اسانس برگ و ساقه گیاه ُمورخوش در مرحله رویشی که از منطقه کوه گنو واقـع در۳۰ کیلـومتری شـمال بندرعباس جمع آوری شده بود، از طریق تکنیک‌های GC و GC/MS مورد بررسی قـرار گرفـت. در اسـانس بـرگ و ساقه به ترتیب تعداد ۲۲ و ۱۹ ترکیب شیمیایی شناسایی شدند. بازده تولید اسانس برگ و ساقه به ترتیـب ۷/۵ و ۰/۳ درصد بود. دو ترکیب لینالول و کامفور جزو گروه ترکیبات اصلی تشکیل دهنده اسانس هستند، در حالی که ترکیبـات آلفا پینن، کامفن، لیمونن، آلفا ترپینئول، کاریوفیلن اکسید و میرسن جزء گروه ترکیبات با مقادیر کم محسوب می‌شوند و در گروه دوم قرار می‌گیرند.

کلمات کلیدی: اسانس، اندمیک، کامفور، لینالول، مورخوش، *Zhumeria majdae*

مقدمه

کشور ایران اگرچـه بـه دلیـل قـرار گـرفتن در کمربنـد خـشکی جـزء کـشورهای خـشک و بـا پوشـش گیـاهی کـم محسوب می‌شود، اما وجود رشته کوه‌های مختلف و پراکنـده در سطح کشور به خصوص البرز و زاگرس در شمال و غرب ایران و در نتیجه متاثر شدن از جریان‌هـا و تـوده‌هـای هـوایی مختلف، اقلیم‌های متفاوتی را به وجود آورده که تنوع اقلیمی، تنوع گونه‌های گیاهی و جانوری و در نهایت افزایش در تنوع زیستی را به دنبال خواهد داشت. با توجه به شـرایط مـذکور، ایران از جمله کشورهای مهم از نظر تنوع گونـه‌هـای گیـاهی بوده و پدیده گونه‌زایی گیاهان و سایر موجودات از امتیـازات منحصر به فرد زیستی در این سرزمین است (عصاره، ۱۳۸۴).

با نظری کوتاه بر اقلیم‌های موجود در ایران، این جملـه گویا و زیبا در ذهن نقش می‌بندد که ایـران جهـانی اسـت در

*e.mail: A_Majrouhi@yahoo.com

یک مرز. به دلیل وجود اختلافات اکولوژیکی، زمین شناختی و اقلیمی، ایران از نظر تنوع گونه ای غنی است. این کشور دارای حدود ۸۰۰۰ گونه گیاهی است و یکی از مراکز اصلی گون زایی در این بخش از جهان محسوب می‌شود (مظفریان، ۱۳۸۴). از این تعداد گونه، حدود ۲۰ درصد انحصاری ایران هستند که به ۸۵ تیره تعلق دارند. به طورکلی ۱۷۲۷ گونه گیاهی بومی و اندمیک در کشور وجود دارد. ناحیه رویشی ایرانو – تورانی با ۱۴۵۲ گونه انحصاری، تقریباً با ۸۵ درصد گونه‌های انحصاری ایران در فلور کشور حالت غالب دارد. حوزه هیرکانین (خزری) و ناحیه صحرائی – سندی (سواحل جنوب کشور) به ترتیب دارای ۱۱۵ و ۵۲ گونه انحصاری هستند.

تعداد ۲۰ جنس تک گونه‌ای (منوتیپیک) انحصاری در فلور ایران وجود دارد که همه این جنس‌ها به جز جنس *Zhumeria* که در ناحیه خلیج– عمانی حضور دارد، متعلق به ناحیه ایرانو– تورانی هستند. جنس زومِریا دارای یک گونه به نام محلی مُورخوش و نام علمی *Zhumeria majdae* است (Rechinger, 1982). گیاه مُورخوش انحصاری ایران و اندمیک استان هرمزگان است و تاکنون از هیچ نقطه دیگر کشور و جهان گزارش نشده است. از نظر پراکنش و تعداد رویشگاه‌ها بسیار محدود می‌باشد و در مناطق قطب آباد، تنگ زاغ، کوه گنو و آب گرم گنو گزارش شده است (مجروحی، ۱۳۸۰). رویشگاه‌های این گونه بسترهای لخت و شیبدار صخره ای با خاک کم عمق است. ارزش این گیاه از نظر تاکسونومیکی، به دلیل منفرد بودن در ارتباط فیلوژنتیکی با سایر جنس‌های تیره نعناع و همچنین به دلیل خاصیت دارویی بسیار زیاد است. اگرچه مردم بومی استان هرمزگان از زمان‌های دور با گیاه مُورخوش آشنا بوده اند، ولی تا سال ۱۹۶۷ این گونه برای مجامع علمی گیاه شناسی ناشناخته باقی مانده بود، تا اینکه خانم *Majda Zhumer* محقق نروژی، نمونه هرباریومی این گیاه را برای اولین بار، از منطقه قطب آباد استان هرمزگان جمع آوری نمود و با خود به اُسلو، مرکز نروژ برد. آقایان رشینگر و وندلبو، این گیاه را به عنوان جنس و گونه جدید قلمداد کرده و به افتخار نام جمع‌آوری کننده‌اش، به این اسم نامگذاری نمودند

Rechinger & Wendelbo (۱۹۸۲) این جنس با هیچ یک از جنس‌های تیره نعناع خویشاوندی ندارد ویک جنس کاملاً جدا افتاده باستانی و باقیمانده از دوران‌های گذشته به شمار می‌رود (زهزاد، ۱۳۷۶). وجه تسمیه نام بومی آن، خواص درمانی و بوی خوش آن می‌باشد. مورخوش گیاهی پایا و بوته‌ای، بسیار معطر با رایحه لیمو، به رنگ سبز متمایل به سفید یا خاکستری، با گلهای بنفش یا بنفش متمایل به آبی می‌باشد (قهرمان، ۱۳۷۳). این گیاه در ارتفاع ۳۰۰ الی ۱۴۰۰ متر از سطح دریا در مناطق کوهستانی و دامنه‌های لخت شیب دار و سنگلاخی می‌روید (مجروحی، ۱۳۸۰). ارتفاع این گیاه حداکثر به ۵۰ سانتیمتر می‌رسد و شاخه‌های متعدد و چوبی دارد. برگ‌ها اغلب در انتهای شاخه‌ها و به صورت متراکم در کنار هم قرار دارند (شکل ۱). گل‌ها کم و به صورت منفرد در انتهای شاخه‌ها قرار می‌گیرند. بوی تند و نافذ آن به دلیل داشتن غده‌های ترشحی روی سطح برگ و ساقه است. گیاه مُورخوش در طب سنتی یکی از گیاهان دارویی پرمصرف بوده و خواص درمانی آن از دیر باز مورد توجه بوده است. برگ‌های این گیاه جهت درمان بیماری‌های گوارشی، اسهال، دل درد، نفخ، رفع سوزش معده، سرماخوردگی، بهبود حال زنان تازه زایمان کرده، سردرد و التیام زخم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (زرگری، ۱۳۷۲).

صدری (۱۳۷۵) تعداد ۲۴ ترکیب شیمیایی را در اسانس قسمت‌های هوایی مورخوش شناسایی نمود که دو ترکیب کامفور با ۳۹/۷ درصد و لینالول با ۴۱/۵ درصد، حدود ۸۱ درصد حجم اسانس را به خود اختصاص می‌دهند. عازمی و همکاران (۱۳۷۹) در بررسی ترکیبات اسانس برگ مُورخوش به روش آنالیز جرمی، ترکیباتی مانند کامفن، سابینن میرسن،

لیمونن، ترانس بتا اسیمن و آلفا پینن را از دسته مونوترپن‌ها و نرولیدول را از گروه سزکویی ترپن‌ها بـه عنـوان مـواد اصـلی تشکیل دهنده اسانس شناسایی کردند. حسین زاده و همکاران (۱۳۸۴) با بررسی اثـر عـصاره و اجـزای اسانـسی انـدام‌هـای هوایی مُورخوش بر تحمل به اثر ضددردی مـرفین در مـوش، نتیجه گرفت که عصاره حاصل قادر است تحمل نسبت به اثـر ضددردی مرفین را مهار نموده و از ایجاد تحمل نسبت به اثـر ضددردی آن جلوگیری کنند.

Nickavar & Mojab (۲۰۰۵) اسانس بخش‌های هوایی گونه *Salvia hypoleuca* را مورد آنالیز قراردادند و ۳۹ ترکیب شیمیایی شناسایی نمودند. ترکیبات اصـلی شـامل بـی‌سـیکلو ژرمـاکرن (۱۵/۳درصـد)، بتـا کـاریوفیلن (۱۴/۶درصـد)، وریدیفلورال (۱۳/۳درصد)، اسـپاتولنول (۱۲/۵درصـد)، گامـا اُلمـن (۷/۷درصـد)، بتـا پیـنن (۷/۲درصـد) و آلفـا پیـنن(۵/۹ درصد) است. در این گیاه ترکیب لینالول به میزان ۰/۹ درصـد گـزارش شـده اسـت، امـا کـامفور وجـود نـدارد. جایمنـد و همکـاران در اسـانس بومـادران تعـداد ۳۱ ترکیـب شناسـایی نمودند که عمده‌تـرین آنهـا لیمـونن، برنئـول، آلفـا کـادینول، کاریوفیلن اکسید و ترپینن-۴-اُل هستند.

با عنایت به اسـتفاده از بـرگ‌هـای گیـاه مورخـوش در ۱۲۰۰۰۰۰۰۰۰ طب سنتی، تاکنون چنـدین پـژوهش در زمینـه استخراج اسانس برگ مورخوش و شناسایی ترکیبات متـشکله آن صورت گرفته است، امـا بـا توجـه بـه وجـود کـرک‌هـای ترشحی بر روی ساقه این گیاه، در مورد اسـتخراج اسـانس از ساقه و مقایسه آن با ترکیب‌های اسانسی حاصل از برگ هـیچ تحقیقی انجـام نـشده اسـت. هـدف از انجـام ایـن پـژوهش، استخراج اسانس از برگ و ساقه، تعیین بازده تولید اسانس در هر دو اندام، شناسایی ترکیبات تشکیل دهنـده و مقایـسه ایـن ترکیبات در اسانس برگ و ساقه می‌باشد.

شکل ۱: سر شاخه‌های گیاه مورخوش بـا بـرگ‌هـای متـراکم و بـه شدت مواج در حاشیه با جام گل بنفش رنگ

مواد و روش‌ها

الف) جمع آوری نمونه‌های گیاهی و اسانس‌گیری

به منظور اسانس گیری، برگ و ساقه گیاه مُورخوش در اوایل فصل رویشی (اسفندماه ۱۳۸۴) از رویشگاه اصلی آن در کوه گنو جمع‌آوری شد. این کوه در۳۰ کیلومتری شمال غربی شهر بندرعباس واقع است. گیاه مُورخوش در منطقه کوه گنو در ارتفاع ۷۸۱ متر از سطح دریا بر روی صخره‌های پرشـیب، برهنه و سنگلاخی با مختصات جغرافیایی،″۱۰،′۲۲،°۲۷ عرض شمالی و ″۵۵،′۰۹،°۵۶ طول شرقی می‌روید.

برگ‌ها و ساقه‌های جمع آوری شده در محیط خشک و سایه به دور از نور خورشید به مدت یک هفته قرار گرفتند تـا خشک شوند. اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب و با اسـتفاده از دستگاه کلونجر (*Clevenger*) صورت گرفـت. مقـدار ۱۰۰ گرم از برگ و ساقه به طور جداگانه توزین گردید و در بـالن شیشه ای دستگاه تقطیر قرار داده شدند. سپس۱۰۰۰ میلی‌لیتـر آب مقطر به آن اضافه نموده و بالن بعد از آماده شدن بر روی گرم‌کن برقی قرار گرفت. دمای اولیه گـرم‌کـن روی عـدد ۳۰ درجه سانتیگراد تنظیم شد و بعد از گذشت نیم ساعت بـه ۶۰ درجـه سـانتیگراد افـزایش یافـت. بـا گـرم شـدن دسـتگاه و جوشیدن آب درون بـالن، اسـانس موجـود در بـرگ و سـاقه همراه با بخار آب، تبخیر شده و به لوله سرد کننده مـی‌رسـد. در اثر سرد شدن با آب جاری در مُبرد، بخار آب و اسانس به حالت مایع در مـی‌آینـد و چـون آب دارای دانـسیته بیـشتری است دوباره وارد بالن می‌شود، اما اسانس بـه علـت سـبک و نامحلول بودن، در بالای لوله می‌ماند. مدت زمان اسانس‌گیری

سه ساعت در نظر گرفته شد. اسانس‌های حاصل پس از جداسازی از سطح آب توسط سدیم سولفات بدون آب، رطوبت زدایی شدند و پس از توزین و محاسبه بازده تولید اسانس، در ظروف شیشه ای درب دار تیره و دمای یخچال نگهداری گردیدند.

ب) روش شناسایی ترکیب‌ها

۱- روش کروماتوگرافی گازی (GC)

از روش کروماتوگرافی گازی برای جدا نمودن ترکیب‌های شیمیایی موجود در اسانس گیاهان استفاده به عمل می‌آید (Proestos et al., 2006). برای آنالیز GC اسانس مُورخوش از دستگاه کروماتوگراف گازی Hewlett Packard مدل HP-6890 مجهز به ستون از نوع HP-5 MS به ضخامت ۰/۲۵ میکرومتر و طول۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر استفاده شد. دمای ستون روی ۶۰ تا ۲۲۰ درجه سانتیگراد برنامه ریزی شد. دما به مدت ۳ دقیقه در ۶۰ درجه سانتیگراد نگه داشته شد و سپس تا ۲۲۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۶ درجه سانتیگراد در دقیقه افزایش یافت و به مدت۳ دقیقه نیز در دمای ۲۲۰ درجه سانتیگراد نگه داشته شد. از گاز حامل هلیوم با سرعت یک میلی لیتر در دقیقه استفاده به عمل آمد.

۲- روش کروماتوگرافی گازی و طیف سنج جرمی (GC/MS)

برای شناسایی ترکیب‌های موجود در اسانس برگ و ساقه گیاه مورخوش از دستگاه GC/MS یا دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف سنج جرمی Hewlett Packard مدل HP-5973 استفاده به عمل آمد. ستون و برنامه دمایی آن مشابه شرایط به کار رفته در GC بود و انرژی یونیزاسیون برابر ۷۰ الکترون ولت (ev) تنظیم گردید. شناسایی ترکیب‌ها با مقایسه شاخص‌های بازداری کواتس به دست آمده با طیف‌های جرمی آنها و نیز مقایسه با طیف‌های موجود در کتابخانه رایانه (HP Cam) و طیف‌های منتشرشده انجام گرفت (Adams, 2004).

نتایج و بحث

با اندازه گیری راندمان تولید اسانس برگ و ساقه مشخص گردید که بازده اسانس برگ و ساقه گیاه مورخوش در مرحله رویشی به ترتیب ۷/۵ و ۰/۳ درصد است. این اعداد بیانگر آن می‌باشد که برگ این گونه در مقایسه با ساقه آن از یک راندمان و بازده تولید اسانس بسیار بالایی برخوردار است. حتی در میان سایر گونه‌های متعلق به تیره نعناع، به ندرت تولید اسانس در این حجم زیاد مشاهده می‌گردد و این یکی از ویژگی‌های شاخص گیاه مورخوش است. نتایج بررسی کروماتوگرام GC اسانس برگ نشان دهنده وجود دو پیک عمده مربوط به حضور دو ترکیب شیمیایی با مقادیر بسیار زیاد است (شکل ۲). در اسانس حاصل از برگ، تعداد ۲۲ ترکیب شیمیایی مورد شناسایی قرار گرفت. دو ترکیب، لینالول با ۳۵/۶ درصد و کامفور با ۴۲/۱ درصد و جمعاً ۷۷/۷ درصد حجم اسانس برگ را به خود اختصاص می‌دهند و این دو ترکیب در گروه اول ترکیبات شاخص اسانس برگ قرار می‌گیرند. گروه دوم از ترکیبات تشکیل دهنده اسانس برگ، ترکیباتی مانند آلفا پینن، کامفن، میرسن، لیمونن و آلفا ترپینئول هستند که در مقادیر بیش از یک درصد یافت می‌شوند. پانزده ترکیب شیمیایی باقی مانده را می‌توان در گروه سوم قرار داد که مقادیری کمتر از یک درصد را در حجم اسانس برگ دارند. ترکیباتی مانند آلفا فلاندرن، پارا سایمن، ترانس اسیمن و غیره در گروه سوم قرار می‌گیرند.

با شناسایی ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس ساقه گیاه مورخوش، مشخص گردید که تعداد ۲۰ ترکیب در این اسانس قابل شناسایی است. وجود دو پیک عمده و اصلی در کروماتوگرام GC اسانس ساقه، دلیل حضور دو ترکیب شاخص لینالول و کامفور می‌باشد (شکل ۳). این بیانگر آن است که در اسانس استخراج شده از ساقه گیاه مورخوش نیز، این دو ترکیب به مقدار بسیار زیادی وجود دارند و در گروه اول قرار می‌گیرند. ترکیبات هپتادکان، اکتادکان، کامفن، میرسن، لیمونن، آلفا ترپینئول، کاریوفیلن اکسید و سلین-۱۱-ان-۴- آلفا- ال دارای مقادیر بیش از یک درصد در حجم کلی اسانس ساقه بوده و گروه دوم را شامل می‌شوند. بقیه ترکیبات

که در مقادیر کمتر از یک درصد وجود دارند، در گروه سوم قرار می‌گیرند.

ترکیبات تشکیل دهنده اسانس‌ها به همراه شاخص‌های بازداری (کواتس) و درصد آنها در جدول ۱ آورده شده است. با مقایسه مقدار و نوع ترکیبات موجود در اسانس حاصل از برگ وساقه گیاه مورخوش ملاحظه می‌شود که تعداد ترکیبات از ۲۲ عدد در اسانس برگ به ۱۹ عدد در اسانس ساقه کاهش یافته است. لینالول و کامفور به عنوان دو ترکیب اصلی و شاخص در هر دو اندام حضور دارند. اما در اسانس برگ از بیشترین مقدار برخوردار هستند طوری که مقدار لینالول در برگ از ۳۵/۶ درصد به ۳۴/۱ درصد در ساقه کاهش می‌یابد. که این کاهش مقدار در حد ۱/۵ درصد برای لینالول است. در حالی که کامفور با یک کاهش قابل توجهی از ۴۲/۱ درصد در برگ به مقدار ۳۲/۱ درصد در ساقه می‌رسد و نشان دهنده مقدار کاهشی به میزان ۱۰ درصد می‌باشد.

با بررسی ترکیبات اسانسی هر دو اندام، مشخص می‌گردد که ۱۵ ترکیب در هر دو اسانس مشترک هستند. این ترکیبات شامل آلفا پینن، کامفن، میرسن، لیمونن، سیس اسیمن، ترانس اسیمن، گاما ترپینن، ترانس لینالول اکسید، لینالول، کامفور، ترپینن -۴ -اُل، آلفا ترپینئول، نرول، بتا کاریوفیلن و کاریوفیلن اکسید، است. نتایج حاصل از بررسی جدول شماره ۱ نشان می‌دهد که از پانزده ترکیب شیمیایی مشترک بین دو اسانس، مقدار چهارده ترکیب در اسانس ساقه کاهش یافته است. تنها مقدار ترکیب کاریوفیلن اکسید از ۰/۳۱ درصد در اسانس برگ به ۱/۹ درصد در اسانس ساقه افزایش نشان می‌دهد.

ترکیبات ۳-اکتانن، آلفا فلاندرن، آلفا ترپینن، پارا سایمن، ترپینولن،سیس لینالول اکسید و نرال در اسانس ساقه شناسایی نگردیدند. همچنین ترکیبات اسپاتولنول، سلین-۱۱-ان-۴- آلفا-اُل، هپتادکان و اکتادکان نیز در اسانس حاصل از برگ مشاهده نشدند. نکته قابل توجه در بررسی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس ساقه این است که در حدود ۱۵ درصد از حجم کلی اسانس را سه ترکیب هپتادکان، اکتادکان و سلین- ۱۱- ان-۴-آلفا-اُل به خود اختصاص می‌دهند در حالی که این ترکیب‌ها در اسانس برگ شناسایی نشدند.

مطالعات انجام شده قبلی، مربوط به نمونه‌های جمع آوری شده در مرحله گلدهی است. به طوری که صدری بازده اسانس برگ و گل گیاه مُورخوش را، ۲/۴ درصد گزارش نموده است که با نتایج حاصل از این تحقیق(۷/۵ درصد) مطابقت ندارد. صدری تعداد ۲۴ ترکیب را شناسایی نموده است که ۱۴ ترکیب با نتایج بررسی حاضر یکسان است. ایشان ترکیباتی مانند ۳- اکتانن، آلفا فلاندرن، ترانس اسیمن، ترانس لینالول اکسید، سیس لینالول اکسید، نرول، نرال و کاریوفیلن اکسید را گزارش نکرده است ولی به ترکیبات دیگری مانند بتا فلاندرن، اکتان-۳- اُن، دی متیل اکتا دی اندیول، سیترال، برونئول، ژرانیال و ایزوپیپریتنون اشاره نموده است و این در حالی است که این ترکیبات در اسانس برگ و ساقه شناسایی نشدند. نتایج نشان می‌دهد که دو ترکیب لینالول و کامفور بخش عمده ای از حجم اسانس برگ و ساقه را به خود اختصاص می‌دهند و ترکیبات دیگر در مقایسه با این دو ترکیب بسیار ناچیز هستند.

ترکیبات موجود در اسانس برگ و ساقه گیاه مُورخوش را می‌توان به دو گروه اصلی مونوترپن‌ها و سزکویی ترپن‌ها تقسیم نمود. مونوترپن‌ها بیش از ۹۸ درصد حجم اسانس را تشکیل می‌دهند. در حالی که مقدار سزکویی ترپن‌ها در حجم کلی اسانس بسیار ناچیز است و بیش از ۰/۵ درصد حجم اسانس را شامل نمی شوند. این مطلب موید آن است که اسانس برگ و ساقه مُورخوش غنی از ترکیبات مونوترپنی است و میزان سزکویی ترپن‌ها در مقایسه با مونوترپن‌ها بسیار کم می‌باشد.

اگرچه رشد، نمو، کمیت و کیفیت مواد موثر گیاهان دارویی اساساً با هدایت ژنتیکی صورت می‌گیرد ولی عوامل محیطی نیز نقش عمده ای در این میان بازی می‌کنند. لازم به ذکراست که میزان اسانس در گیاه رابطه مستقیمی با بیوسنتز، متابولیسم و فعالیت زیستی گیاه دارد که اینها تابع شرایط اقلیمی محیط زیست می‌باشد. عوامل مختلفی نظیر زمان برداشت، نحوه جمع‌آوری، طریقه خشک کردن و نگهداری در

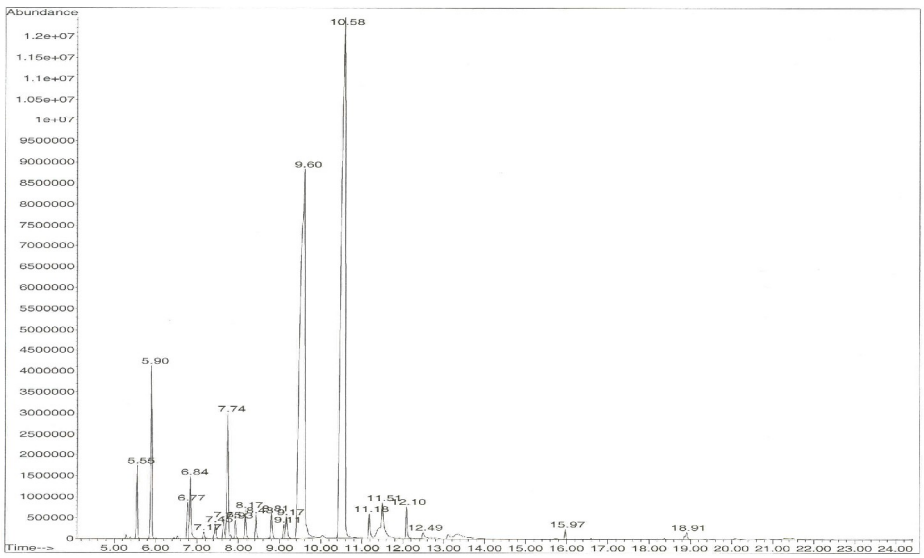
کمیت و کیفیت اسانس‌ها موثرند. عوامل محیطی از جمله دما، نور (شدت و تناوب)، ارتفاع محل رشد، شیب منطقه و میزان آب تغذیه روی عملکرد اسانس گیاهان معطر موثرند ولی چگونگی و میزان اثر آنها در گونه‌های مختلف متفاوت است (Baser, 1993).

با بررسی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس گونه‌های گیاهی مختلف، مشخص می‌گردد که نوع و مقدار این ترکیبات از گونه‌ای به گونه و از اندامی به اندام دیگر متفاوت است. لذا نوع و مقدار ترکیبات موجود در اسانس برگ و ساقه گیاه مُورخوش نیز، متفاوت می‌باشد. شاید دلیل استفاده از برگ‌های گیاه مورخوش در طب سنتی نیز به خاطر حضور ترکیبات شیمیایی فراوان و با مقادیر بسیار زیاد است. همان طور که قبلاً ذکر شد در اسانس برگ و ساقه این گونه، دو مونوترپن لینالول و کامفور بیش از ۷۵ درصد حجم اسانس را تشکیل می‌دهند که این وضعیت در هیچ کدام از گیاهان تیره نعناع که مورد بررسی قرار گرفتند، مشاهده نگردید.

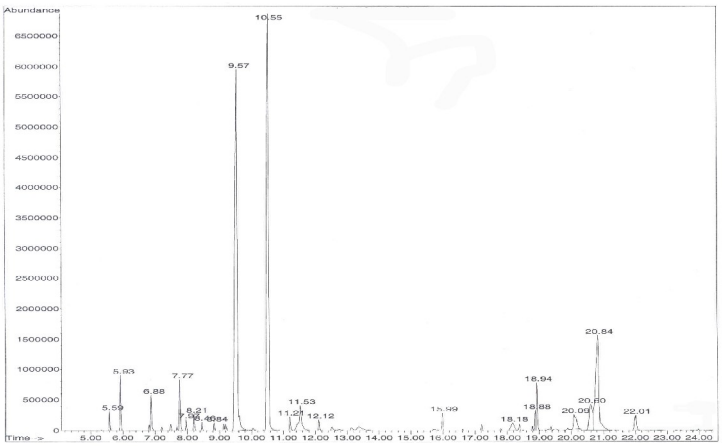
نتیجه‌گیری نهایی

بنابر اطلاعات حاصله، می‌توان چنین نتیجه گرفت که برگ گیاه مورخوش به دارا بودن کرک‌های ترشحی فراوان در سطح خود، از تنوع قابل توجهی در نوع و مقدار ترکیبات تشکیل دهنده اسانس برخوردار است. در حالی که، ساقه به علت وجود تراکم کم از کرک‌های ترشحی، تعداد کمی ترکیب اسانسی در مقایسه با برگ دارد و حتی مقدار این ترکیبات نیز در قیاس با برگ، کاهش قابل ملاحظه ای نشان می‌دهد.

بوی خوش و تند گیاه مُورخوش احتمالاً مرتبط با حضور موادی مانند لیمونن، کامفور و لینالول است. همچنین دلیل خاصیت ضد نفخی آن نیز به علت وجود لینالول می‌باشد و کامفور ترکیبی آنتی سپتیک و مقوی قلب است (زرگری، ۱۳۷۲). با توجه به اینکه پراکنش جغرافیایی گیاه مُورخوش بسیار محدود می‌باشد و به منطقه کوچکی در جنوب ایران منحصر شده است، لذا باید از برداشت و جمع آوری بی رویه آن جلوگیری به عمل آید. همچنین با توجه به بازده بسیار بالای اسانس و وجود ترکیبات مهمی مانند لینالول، کامفور، کامفن، لیمونن با درصد بالا ونیز استفاده از برگ‌های این گیاه در طب سنتی، لازم است اثرات ضدمیکروبی و ضدسرطانی به دقت مورد مطالعه گیرد.



شکل ۲: کروماتوگرام GC مربوط به اسانس برگ گیاه مُورخوش



شکل ۳: کروماتوگرام GC مربوط به اسانس ساقه گیاه مُورخوش

جدول ۱: فهرست مقایسه‌ای ترکیبات اسانسی برگ و ساقه گیاه مورخوش به ترتیب شاخص بازداری(RI)

ردیف	ترکیب	شاخص بازداری (RI)	درصد در روغن اسانسی برگ	درصد در روغن اسانسی ساقه
۱	α - Pinene	۹۳۱	۱/۶	۰/۶
۲	Camphene	۹۴۷	۴/۱	۱/۸
۳	3- Octanone	۹۸۵	۰/۹	---
۴	Myrcene	۹۸۸	۱/۷	۱/۳
۵	α - Phellandrene	۱۰۰۲	۰/۱	---
۶	α - Terpinene	۱۰۱۴	۰/۴	---
۷	ρ - Cymene	۱۰۲۳	۰/۵	---
۸	Limonene	۱۰۲۷	۳/۴	۱/۹
۹	cis - Ocimene	۱۰۳۵	۰/۵	۰/۴
۱۰	trans - Ocimene	۱۰۴۶	۰/۷	۰/۶
۱۱	γ - Terpinene	۱۰۵۷	۰/۶	۰/۳
۱۲	trans - Linalool oxide	۱۰۷۳	۰/۸	۰/۲
۱۳	Terpinolene	۱۰۸۷	۰/۳	---
۱۴	cis - Linalool oxide	۱۰۸۹	۰/۸	---
۱۵	Linalool	۱۱۰۸	۳۵/۶	۳۴/۱
۱۶	Camphor	۱۱۵۲	۴۲/۱	۳۲/۱
۱۷	Terpinene - 4 - ol	۱۱۷۹	۰/۷	۰/۵
۱۸	α - Terpineol	۱۱۹۴	۲/۸	۲/۵
۱۹	Nerol	۱۲۲۴	۰/۹	۰/۴
۲۰	Neral	۱۲۴۴	۰/۳	---
۲۱	β - Caryophyllene	۱۴۲۲	۰/۳	۰/۶
۲۲	Spathulenol	۱۵۸۲	---	۰/۷
۲۳	Caryophyllene oxide	۱۵۹۳	۰/۳	۱/۹
۲۴	Selin - 11-en-4-alpha-ol	۱۶۶۳	---	۱/۶
۲۵	Heptadecane	۱۷۰۶	---	۱۲/۱
۲۶	Octadecane	۱۷۹۵	---	۱/۱

منابع

جایمند، ک.، و رضایی، م. (**۱۳۷۹**). بررسی ترکیب‌های شیمیایی اسانس بابونه گاوی، مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۴۸، صفحات ۱۷-۱۵.

حسین‌زاده، ح. (**۱۳۸۴**). بررسی اثر عصاره و اندام‌های هوایی گیاه مُورخوش بر روی تحمل نسبت به اثر ضد دردی مرفین در موش، مجله علوم پایه پزشکی ایران، جلد ۸ ، شماره ۲، صفحات ۹۸-۹۳.

زرگری، ع. (**۱۳۷۲**). گیاهان دارویی، جلد چهارم، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه ۱۳۶.

زهزاد، ب.، و مجنونیان، ه. (**۱۳۷۶**). شناسنامه منطقه حفاظت شده گنو، انتشارات اداره محیط زیست هرمزگان، صفحه ۳۹.

صدری، ح. (**۱۳۷۵**). ترکیب‌های شیمیایی موجود در روغن اسانسی گونه مُورخوش، مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۳۱، صفحه ۶۱-۵۹.

عازمی، م. (**۱۳۷۹**). بررسی ترکیبات اسانس *Zhumeria majdae* به روش آنالیز جرمی، اولین همایش بین المللی طب سنتی و مفردات پزشکی، تهران.

عصاره، م. (**۱۳۸۴**). تنوع گیاهی ایران، انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، ص ۱۳۵.

قهرمان، ا. (**۱۳۷۳**). کورموفیت‌های ایران، جلد سوم، انتشارات مرکز نشر دانشگاهی، صفحه ۲۹۵.

مجروحی، ع. و مجد، ا. (**۱۳۸۰**). بررسی‌های ریخت شناسی، تشریحی و تکوینی گونه اندمیک مورخوش، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت معلم تهران.

مظفریان، و. (**۱۳۸۴**). شناخت گیاهان دارویی و مسائل آن، مجموعه مقالات همایش ملی توسعه پایدار گیاهان دارویی، مشهد، صفحات ۱۴-۱۳.

Adams, R.P. (2004) Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Carol Stream, Allured Publishing Corporation.

Baser, K.H.C. (1993) Essential oils of Anatolian labiatae, Acta Hort. No. 333: 217-239.

Nickavar, B., Mojab, F. (2005) Volatile composition of the essential oil of *Salvia hypoleuca, Benth*. Aromatherapy, No. 15, pp. 51-53.

Proestos, C., Sereli, D. (2006) Determination of essential oils in aromatic plants by HPLC and GC-MS Food Chemistry, 95: 44-52.

Rechinger, K.H. (1982) Flora Iranica, No.150, pp. 479-480.

Comparative study of the essential oils in leaf and stem of *Zhumeria majdae* at vegetative stage

Majrouhi, A.A.

Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Shahr-e-Rey branch, Iran

Abstract

The monotypic Iranian *Zhumeria majdae* (Lamiaceae), known locally by the name of Mohrekhosh, was recently described as the first member of a new genus (*Zhumeria*). It has a limited geographical rang in southern Iran at Hormozgan province. The leaves have been used for many years as a curative for stomachaches and an antiseptic. In this research, the constituents of essential oils of *Zhumeria majdae* leaves and stem in Geno mountain of Hormozgan province were analyzed via GC and GC/MS and compared together. The oil yield of the dried leaves and stem by hydrodistillation were 7.5 and 0.3 %, respectively (v/w). 22 and 19 compounds were identified. The major constituents were Linalool and Camphor, which they belong to first group. Wheras, compounds, like alpha-Pinene, Camphene, Limonene, Alpha-terpineol, Caryophyllene oxide and Myrcene belong to second group.

Key words: Camphor, Endemic, Essential oil, Linalool, Mourekhosh, *Zhumeria majdae*.

تاثیر هیدروکربن‌های نفتی بر میزان بقاء و رنگیزه‌های سیانوباکتری‌های جدا شده از مناطق آلوده به نفت آبادان

*ندا سلطانی[۱]، لادن بافته‌چی[۱]، شادمان شکروی[۲]

۱. گروه میکروبیولوژی نفت، پژوهشکده نفت جهاد دانشگاهی، تهران
۲. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

چکیده

پاکسازی محیط‌های آبی و خاکی از پساب‌های هیدروکربنی ناشی از آلودگی‌های نفتی از توجه و اهمیت بسیاری برخوردار است. یکی از راه‌های رفع آلودگی، استفاده از ریزجلبک‌ها و از جمله سیانوباکتری‌ها می‌باشد. در این تحقیق اثر یک نوع پسماند کارخانه گل روغنی (شامل ۷۰٪ گازوئیل) بر روی بقاء و رنگیزه‌های سه سیانوباکتری (*Oscillatoria* + *Calothrix*، *Nostoc* و *Calothrix*) به شکل خالص و مخلوط بررسی گردید. این سیانوباکتری‌ها از خاک ساحل اروندرود در شهر آبادان جدا گشتند. نتایج حاکی از آن است که میزان بیومس در نمونه اول حدود سه برابر نمونه‌های دیگر است. روند رشد در این نمونه افزایشی و در دو نمونه دیگر ابتدا روند کاهشی داشته و سپس بعد از حدود یک هفته به فاز ساکن رسیده است. هر سه نمونه بقای خود را در تیمارهای اعمال شده حفظ نموده و ترکیب نفتی برای هیچکدام از نمونه‌ها سمیت مرگ‌آوری تولید نکرده است. میزان کلروفیل در نمونه‌ها با میزان بیومس تطابق داشته و در نمونه اول حدود سه برابر نمونه‌های دوم و سوم می‌باشد. بطورکلی نتایج حاصل از این آزمایش حاکی از مقاومت این سه نمونه در مقابل اعمال تیمار ترکیب نفتی بوده و پتانسیل این سیانوباکتری‌ها را برای استفاده از آن‌ها برای تجزیه آلودگی ناشی از ترکیبات نفتی را نشان می‌دهد. ضمن اینکه نتایج برای اولین بار برای ریزجلبک‌های بومی ایران گزارش می‌گردند.

کلمات کلیدی: آلودگی، بقاء، ترکیبات نفتی، رشد، رنگیزه، سیانوباکتری

مقدمه

آلودگی‌های نفتی یکی از معضلات زیست‌محیطی است که می‌تواند در اثر تصادفات نفتکش‌ها، فعالیت‌های اکتشاف و حفاری، پساب‌های صنایع نفتی و نشت لوله‌های انتقال نفت در محیط‌های آبی و خاکی پراکنده شوند.از آنجا که مهم‌ترین اجزای سازنده نفت را هیدروکربن‌ها تشکیل می‌دهند، پاکسازی محیط (آب و خاک) آلوده به پساب‌های هیدروکربنی از بیشترین توجه و اهمیت برخوردار است. یکی از راه‌های رفع آلودگی، استفاده از ریزجلبک‌ها و از جمله سیانوباکتری‌ها می‌باشد. مطالعات اولیه نشان می‌دهد که این موجودات قادرند، اجزای آروماتیک و آلیفاتیک نفت را اکسید کنند (Garcia de Oteyza et al., 2004; Al-Hasan et al.,

*e.mail:soltani6@yahoo.com

2001; Raghukumar et al., 2001). علاوه بر این در پشته‌هایی که سیانوباکتری‌ها در آن‌ها غالب هستند، قارچها و باکتری‌های تخمیر کننده نفت در لایه‌های پلی‌ساکاریدی این سیانوباکتری‌ها به طور طبیعی زندگی می‌کنند. فعالیت توام سیانوباکتری‌ها و ارگانوتروف‌های وابسته به آن در اصلاح و بهبودی این چنین محیط‌های آلوده موثر هستند.

سیانوباکتری‌ها اساساً موجودات فتوسنتز کننده اکسیژنی هستند، ولی تعدادی از آن‌ها قادرند از ترکیبات آلی اضافی از طریق هتروتروفی یا فتوهتروتروفی استفاده کنند. گزارش‌ها در این خصوص متعددند. در اغلب موارد هتروتروفی فقط با استفاده از تعداد محدودی گهرمایه‌های[1] آلی مانند گلوکز، فروکتوز، ریبوز، سوکروز و نیز گلیسرول، قند نامیده می‌شوند، آزمایش شده است.

Ellis (۱۹۷۷) اولین مطالعات را بر روی توان میکروارگانیسم‌های فتوسنتزی (شامل سیانوباکتری‌ها) در اکسیداسیون هیدروکربن آروماتیک انجام داد. این محقق توان تجزیه فنل و کتکول را در ریزجلبک‌های *Chlamydomonas ulvaensis*، *Chlorella pyenoidosa*، *Scenedesmus brasiliensis*، فیتوفلاژلای *Euglena gracilis* و سیانوباکتری‌های *Anabaena cylindrica* و *Phormidium foveolarum* بررسی کرده است. از این میان ۴ عدد از فتوتروف‌ها فنل را تجزیه کرده درحالی که تمام ۶ میکروارگانیسم کتکول را تجزیه می‌کنند. همچنین بر روی تجزیه زیستی نفتالن توسط باکتری‌ها، قارچها و جانوران عالی مطالعات زیادی صورت گرفته است (مانند Cerniglia & Gibson, 1977). مطالعات بر روی اکسیداسیون نفتالن توسط سیانوباکتری‌ها با مطالعات *Oscillatoria* sp. و *Agmenellum quadruplicatum* آغاز گردید. همچنین تاثیر نفت خام و آلکان‌های منفرد بر سوش‌های غیرخالص *Microcoleus chthonoplastes* و *Phormidium corium* که از رسوبات غنی از نفت جدا شده اند، بررسی شده است (Al-Hasan et al., 1994). مطالعات حاکی از آن است که میکروارگانیسم‌هایی که آلکان‌ها را مورد استفاده قرار می‌دهند، ابتدا آن‌ها را به اسیدهای چرب اکسید می‌کنند. بنابراین طرح اسید چرب لیپیدهای سلولی بازتابی از آلکان مورد استفاده آن‌ها است.

هدف از این تحقیق مطالعه بررسی اثر ترکیبات نفتی بر روی رشد و ترکیبات رنگیزه‌ای سیانوباکتری‌های جدا شده از خاک‌های آلوده به نفت بوده است. نظر به اهمیت و جایگاه استراتژیک استان خوزستان از نظر دارا بودن چاه‌ها و لوله‌های انتقالی نفت در ایران، این سیانوباکتری‌ها از منطقه آبادان جدا شده‌اند.

مواد و روش‌ها

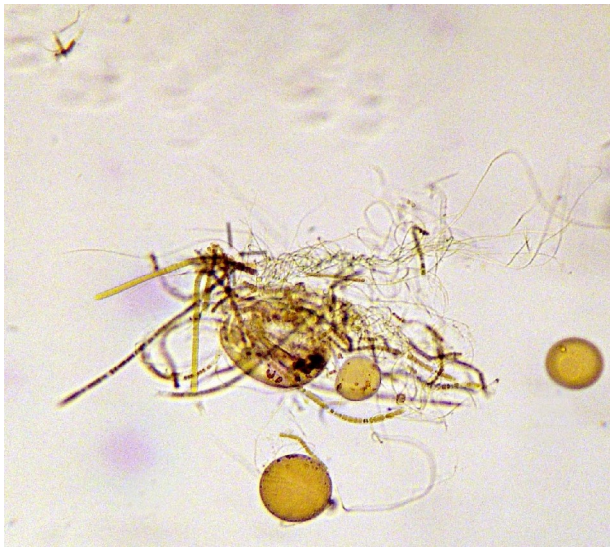
نمونه‌های خاک از کنار اروندرود از سواحل شهر آبادان جمع‌آوری گشتند. این نمونه‌ها به منظور جدا سازی سیانوباکتری‌های موجود در پلیت کشت گردیدند. کشت خاک مطابق روشی که سلطانی و همکاران (۱۳۸۴) قبلاً انجام داده بودند، صورت گرفت. پس حصول کلنی‌های سیانوباکتری‌ها بر روی خاک، این کلنی‌ها به پلیت آگار منتقل گردیدند. کشت‌های متوالی از سیانوباکتری‌های رشد یافته بر روی پلیت آگار صورت گرفت تا این که سیانوباکتری‌های خالص حاصل شد. برای انجام مرحله بعد دو سوش سیانوباکتری به صورت منفرد (نمونه دوم و سوم) و دو سوش سیانوباکتری به شکل مخلوط (نمونه اول) برای تیماردهی انتخاب گردیدند. شناسایی مقدماتی و شناسایی در حد گونه با استفاده از John و همکاران (۲۰۰۳) و Desikachary (۱۹۵۹) انجام شد. به منظور اعمال تیمار نفتی ابتدا جلبک‌ها وارد کشت مایع گردیدند. کشت در محیط $BG11_0$ صورت پذیرفت. نوردهی با نور سفید (۳۰۰۰ لوکس) و با استفاده از دو لامپ

[1] Substrates

فلورسانت به شکل مداوم انجام گرفت. دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و pH ۷/۲ انتقال داده شد (Soltani et al., 2005). بررسی‌ها در ارلن‌های با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر محتوی ۱۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون انجام شد. کشت‌ها به مدت ۱ ساعت هم زده شده و سپس به اتاق کشت منتقل گردیدند. پیش از تلقیح، نمونه به مدت ۴۸ ساعت جهت ایجاد سازگاری به محیط مایع وارد گردید. نمونه‌های ۱ و ۲ و ۳ تحت تیمار یک ترکیب نفتی (پسماند کارخانه گل روغنی شامل ۷۰٪ گازوئیل و مقادیر جزئی ورساکوت و ورساوت، باریت، کربنات سدیم، آهک) قرار گرفتند. این تیمارها عبارت بودند از ۰، ۱، ۲، ۳ و ۴٪ از ترکیب نفتی که به طور جداگانه بر روی نمونه‌ها اعمال گردید. سنجش‌های فیزیولوژیک شامل بقا، رشد و رنگیزه‌ها در هنگامی که نمونه‌ها وارد فاز لگاریتمی شدند، صورت پذیرفت (روز هفتم پس از رشد). رشد بر اساس کدورت سنجی، با استفاده از اسپکتروفتومتر (OD_{750}) انجام شد. سنجش کلروفیل پس از استخراج با متانول با روش Jensen (۱۹۷۸) اندازه‌گیری گردیدند. آنالیزهای آماری بوسیله نرم‌افزار های SPSS Ver 11 و Excel 2003 انجام شد.

نتایج

سوش‌های جدا شده تحت عنوان نمونه‌های ۱، ۲ و ۳ عبارت بودند از؛ نمونه ۱: *Oscillatoria + Calothrix*، نمونه ۲: *Nostoc* و نمونه ۳: *Calothrix*. نمونه‌ها پس از تلقیح در فاز مایع ابتدا در محیط کشت غوطه‌ور بودند، ولی پس وارد شدن در فاز لگاریتمی ریسه‌های سیانوباکتریایی به سطح محیط کشت (محل قرارگیری ترکیب نفتی) کشیده شدند. این حالت حکایت از تمایل سوش‌ها به استفاده از هیدروکربن‌های نفتی دارد. شکل ۱ نمونه *Oscillatoria* را در اطراف قطرات ترکیبات نفتی نشان می‌دهد.



شکل ۱: سیانوباکتری‌ها در اطراف قطره نفت

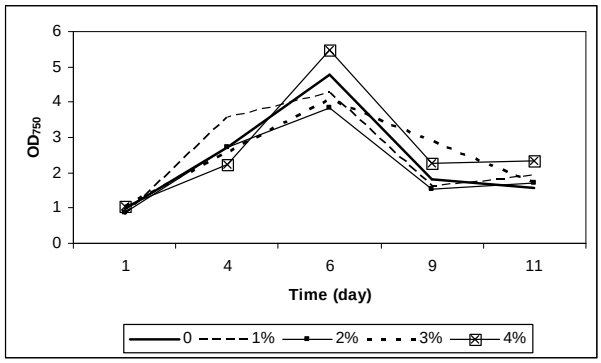
جدول ۱ نرخ رشد را در سه نمونه تیمار شده در آزمایش نشان می‌دهد. همانطور که ملاحظه می‌گردد، نرخ رشد بر خلاف نمونه‌های دوم و سوم، فقط در نمونه اول مثبت می‌باشد. در نمونه اول که مخلوطی از دو سیانوباکتری *Oscillatoria* و *Calothrix* افزودن ترکیب نفت مانع از رشد نشده است.

جدول ۱: مقدار نرخ رشد (μ) و زمان مضاعف شدن (G) نمونه‌های سیانوباکتری ۱، ۲ و ۳، تحت تیمارهای مختلف ترکیب نفتی

نمونه		نوع تیمار				
		فاقدترکیب‌نفتی	٪۱	٪۲	٪۳	٪۴
Oscollatoria+ Calothrix	G	۱/۵۶	۵/۰۶	۲/۵۶	۱/۸۹	۰/۹۷
	μ	۰/۴۱	۰/۱۲	۰/۲۷	۰/۳۳	۰/۶۵
Nostoc	G	−۱/۲۱	−۰/۹۶	−۵/۸۲	−۱/۷۹	−۴/۰۰
	μ	−۰/۵۲	−۰/۶۵	−۰/۱۱	−۰/۳۵	−۰/۱۶
Calothrix	G	−۰/۶۸	−۰/۵۷	−۰/۸۵	−۰/۹۱	−۲/۲۳
	μ	−۰/۹۳	−۱/۱۰	−۰/۷۵	−۰/۷۰	−۰/۲۸

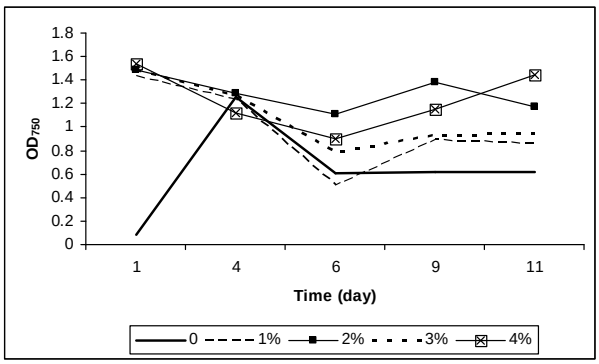
این نتایج در خصوص زمان دو برابر شدن نیز مشابه می‌باشد. نمونه‌های دوم و سوم مقادیر منفی را در مورد نرخ رشد و زمان دو برابر شدن نشان می‌دهند که حاکی از کاهش بیومس و رشد منفی این نمونه‌ها است. در نمونه اول بیشترین نرخ رشد مربوط به تیمار ۱٪ است (۵/۰۶). در تیمارهای دیگر با افزایش غلظت ترکیب نفتی میزان نرخ رشد کاهش یافته است. بر خلاف این، صرف نظر از تیمار ۴٪، میزان زمان دو برابر شدن در شاهد بیشتر است.

اشکال ۲-۴ حکایت از منحنی رشد سه نمونه تحت تیمار دارد. همانطور که در این اشکال قابل ملاحظه می‌باشد، فاز لگاریتمی نمونه اول روند افزایشی را نشان می‌دهند. این روند در کلیه تیمارها در این نمونه ملاحظه می‌گردد. بعد از روز ششم نمونه‌ها تا روز نهم کاهشی در رشد نشان داده و وارد فاز ساکن می‌گردند. ضمن اینکه میزان جذب در این منحنی بطور قابل ملاحظه‌ای از دو نمونه دیگر بیشتر می‌باشد. بیشترین میزان جذب در روز ششم مشاهده گردیده است. بنابراین نتایج حاکی از بقای این نمونه در کلیه تیمارهای نفتی است.

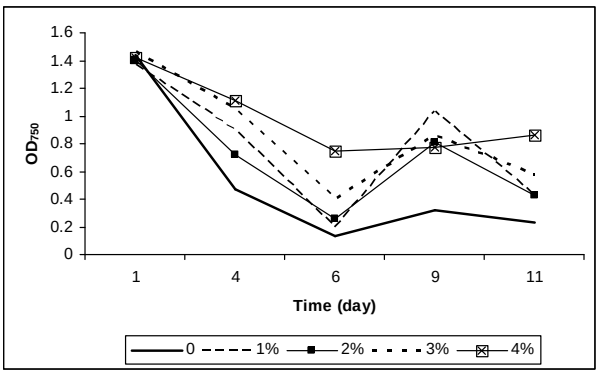


شکل ۲: منحنی رشد نمونه ا در تیمارهای مختلف ترکیب نفتی

شکل ۳ نیز بقای نمونه دوم را در تیمارهای نفتی حکایت می‌کند. با این تفاوت که این نمونه قادر به افزایش بیومس در تیمارها نبوده و فقط خود را از مرگ حفظ می‌کند. همانطور که نشان داده شده است، در نمونه شاهد ابتدا رشد روند افزایشی داشته و بعد از یک افت دو روزه میزان بیومس به مقدار ثابتی رسیده و در همین میزان باقی می‌ماند. در تیمارهای نفتی نمونه دوم اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای ۱٪-۴٪ ملاحظه نمی‌گردد. کلیه تیمارها ابتدا با یک افت رشد مواجه بوده و سپس به فاز ساکن می‌رسند. بطور کلی این نمونه نیز در هنگامی که با ترکیب نفتی روبرو می‌شود، قدرت بهره‌وری زیادی از این منبع هیدروکربوری نداشته، ولی با سمیتی نیز از طرف آن مواجه نمی‌شود. ولی این افت در تیمار ۲٪ بسیار کمتر نمایان شده است.

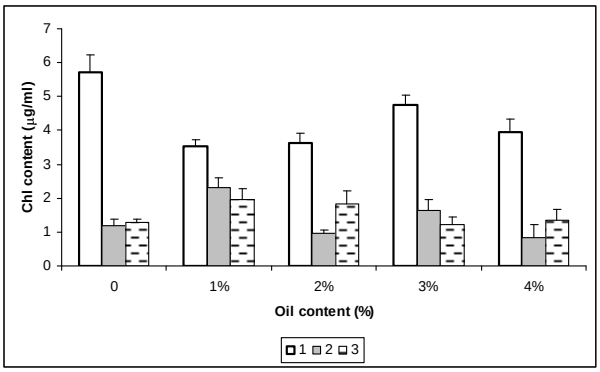


شکل ۳: منحنی رشد نمونه۲ در تیمارهای مختلف ترکیب نفتی



شکل ۴: منحنی رشد نمونه۳ در تیمارهای مختلف ترکیب نفتی

نمونه سه که سوشی از *Calothrix* است، افت شدیدی را در رشد در کلیه تیمارها و همچنین شاهد از خود نشان می‌دهد. از آنجا که این افت در شاهد نیز مشاهده شده است، می‌تواند حکایت از عدم تطابق نمونه با محیط جمع‌آوری شده و شرایط آزمایشگاهی داشته باشد. حساس بودن خود نمونه *Calothrix* نیز دلیلی دیگر برای این کاهش بیومس است. ولی باید اشاره کرد که این حساسیت به میزانی نیست، که کلاً موجب نابودی نمونه گردد، بلکه این سوش حتی در تیمار ۴٪ توانسته است بقای خود را حفظ کند.



شکل ۵: مقایسه میزان کلروفیل در سه نمونه سیانوباکتریایی در غلظت‌های مختلف ترکیب نفتی

میزان کلروفیل سه نمونه در تیمارهای مختلف در شکل ۵ آمده است. همانطور که ملاحظه می‌گردد، این میزان در نمونه اول تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های دوم و سوم دارد. بیشینه میزان کلروفیل در نمونه اول در شاهد به مقدار ۵/۷۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. این میزان در تیمار ۴٪ به ۳/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر افت کرده است. در مابقی تیمارها تفاوت معنی‌داری ملاحظه نمی‌گردد (ANOVA, P<0.05). در نمونه‌های دوم و سوم، بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. ولی میانگین میزان کلروفیل در این نمونه‌ها به طور محسوسی نسبت به نمونه اول کاهش یافته است. به طوری که میانگین میزان کلروفیل در نمونه دوم و سوم (شاهد) به ترتیب ۱/۳۹ و ۱/۵۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر است که در نمونه اول به میزان ۴/۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایش یافته است. این افزایش حدود سه برابری در نمونه اول با میزان بیومس نشان داده شده در منحنی رشد نیز تطابق دارد.

بحث

محل قرارگیری ریسه‌های جلبکی در کنار قطرات نفت می باشد. احتمالاً این حالت به منظور استفاده از این قطرات نفتی به عنوان منابع هیدروکربنی برای انجام متابولیسم سلولی است. زیرا همانطور که محققان نشان داده‌اند، برخی از سیانوباکتری‌ها قادرند از ترکیبات آلی اضافی از طریق هتروتروفی یا فتوهتروتروفی استفاده کنند (Pearce & Carr, 1966). اگرچه می‌دانیم که چنین ترکیباتی به شکل مولکول‌های کامل به سلول‌ها می‌روند، مکانیسم(های) جذب هیدروکربن‌ها بوسیله میکروارگانیسم‌ها هنوز به درستی روشن نشده است. اولین تماس بین سلول‌ها و چنین ترکیبات غیرمحلول در آب بوسیله ماهیت هیدروفوبیک غشاهای سلولی گسترش می‌یابد (Ramsay et al., 1988). فرض بر آن است که میکروارگانیسم‌ها بخش محلول هیدروکربن را جذب می‌کنند. این حالت فقط برای ترکیباتی با وزن مولکولی پایین صدق می‌کند. حلالیت درون آب، با افزایش وزن مولکولی هیدروکربن بشدت کاهش می‌یابد. بسیاری از باکتری‌ها و مخمرها با غشاهای هیدروفوبیک تمایلی نسبت به قطرات هیدروکربن در محیط‌های کشت آبی دارند. این امر یک فرآیند فیزیکی است و به شناخت ویژه مواد توسط سلول مربوط نمی‌شود. همچنین هیدروکربن‌ها ممکن است توسط امولسیفیکاسیون در دسترس میکروارگانیسم‌ها قرار گیرند (Singer & Finnerty, 1984). بقای سه نمونه تیمار شده در این تحقیق حاکی از پتانسیل استفاده از این ترکیبات هیدروکربوری توسط نمونه‌های سیانوباکتریایی دارد. همانطور که نتایج نشان می‌دهند هیچکدام از نمونه‌های این آزمایش به طور کلی از بین نرفته‌اند. بلکه در نمونه اول رشد حالت افزایشی داشته و در نمونه‌ها دوم و سوم با وجود اینکه نمونه‌ها در ابتدا روند کاهشی در رشد را نشان داده‌اند، ولی پس از حدود ۷ روز به فاز ساکن از منحنی رشد رسیده‌اند. احتمالاً این کاهش در رشد به دلیل زمان مورد نیاز برای سازش با شرایط جدید و تیمار اعمال شده دارد. بنابراین تاثیر ترکیب نفتی مرگ‌آور نبوده است. در صورتی که می‌دانیم نفت خام دارای اجزایی است که حتی در غلظت‌های پایین خاصیت بازدارندگی ویژه بر موجودات فتوسنتزی دارد. اساس بیوشیمیایی این سمیت هنوز ناشناخته است. البته این تاثیر هم با توجه به ساختار نفت و هم با توجه به نوع سوش مورد مطالعه متفاوت می‌باشد. در همین رابطه محققان از نمونه‌های محیطی، شامل جمعیت‌های مخلوط و کشت‌های خالص،

استفاده کرده‌اند. در مطالعه‌ای که بر روی موجودات فتوسنتزی شامل سیانوباکتری *Agmenellum quadruplicatum* صورت گرفته، نشان داده شده است که نفت سوخت بشدت رشد را باز می‌دارد، ولی نفت خام خاصیت سمی بسیار کمتری دارد. احتمالاً سمیت نفت سوخت، عمدتاً به دلیل میزان بیشتر ترکیبات آروماتیک آن است. Winters و همکارانش (۱۹۷۶) نشان دادند که بخش‌های محلول در آب ۴ ترکیب نفت سوختی مورد آزمایش، اثرات سمی متفاوتی را بر روی دو سیانوباکتری و ۴ ریزجلبک گذاشته است. بخش‌های محلول در آب دو نفت سوخت هر دوی سیانوباکتری‌های *Coccochloris elabens* و *A.quadruplicatum* را از بین می‌برد. از آنجا که تیمارهای اعمال شده در این آزمایش در شرایط وجود نور بوده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً بقای نمونه‌های دوم و سوم بدلیل انجام فتوسنتز و با استفاده از منابع کربن معدنی بوده است. همچنین ترکیب نفتی اضافه شده تاثیر سمیتی مرگ‌آوری بر روی این دو نمونه نداشته است، ولی نمونه اول احتمالاً قادر بوده است از این ترکیب نفتی به عنوان منبع کربنی استفاده کند. صحت این فرضیه با انجام آزمایش‌های بعدی و بررسی میزان تغییرات ترکیب نفتی قابل اثبات خواهد بود. زیرا این مورد بستگی بسیاری به نوع سوش یا سوش‌های مورد بررسی داشته و در موارد مختلف متفاوت می‌باشد. نتایج به دست آمده در این آزمایش با نتایج سایر محققین قابل مقایسه می‌باشد. Morales–Loo & Goutx (۱۹۹۰) دو سوش فیتوپلانکتونی را در معرض بخش قابل حل نفت خام مکزیک قرار داده و رشد آن‌ها را اندازه‌گیری کردند. رشد *Nitzschia closterium* (دیاتمه)، *Asterionella glacialis* (دیاتمه)، *Rhodomonas lens* (کریپتوفیسه) و *Dunaliella tertiolecta* (جلبک سبز) بازداشته شده، در حالی که *Skeletonema costatum* (دیاتمه) و *Agmenellum quadruplicatum* (سیانوباکتری) تحت تاثیر قرار نگرفته است. جالب است که رشد *Prorocentrum minimum* (دینوفیسه) افزایش یافته است.

میزان کلروفیل در سه نمونه نیز با روند رشد کاملاً تطابق داشته و در نمونه اول حدود سه برابر نمونه دوم و سوم می‌باشد.

با نگاهی به ترکیب سیانوباکتریایی نمونه‌های مختلف، می‌توان به تاثیر نوع سوش در مقاومت در برابر ترکیبات مختلف برد. حدود ۱۰۰۰ جلبک به عنوان اشکال مقاوم گزارش شده‌اند. یکی از این جلبک‌ها گونه‌های *Oscillatoria* می‌باشد (Leupold, 1978). بدون شک یکی از عوامل روند افزایشی رشد در نمونه اول و مقاومت این نمونه در مقابل افزودن ترکیب نفتی، حضور این سیانوباکتری در این نمونه می‌باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

به طور کلی این تحقیق برای اولین بار به گزارش سوش‌های سیانوباکتریایی از مناطق آلوده به نفت در ایران می‌پردازد. ضمن اینکه در همین راستا نشان‌ویژه‌سازی اولیه بر روی سیانوباکتری‌های جدا شده از این مناطق انجام شده است. بررسی میزان بقاء، رشد و نیز رنگیزه‌های سیانوباکتریای در این آزمایش حاکی از مقاومت این گونه‌ها در مقابل آلودگی‌های نفتی دارد. بقای کلیه نمونه‌های مورد آزمایش و نیز روند افزایشی رشد در نمونه اول، پتانسیل این نمونه‌ها را برای مقابله با آلودگی‌های نفتی در محیط‌ها نفت‌خیز، مناطق مسیر حرکت لوله‌های انتقال نفت و یا حرکت نفت‌کش‌ها، نشان می‌دهد. نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که *Nostoc*، *Calothrix* و خصوصاً سوش *Oscillatoria* قادر به استفاده از ترکیبات هیدروکربنی نفت برای متابولیسم خود هستند. میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در این سیانوباکتری‌ها و سه برابر بودن میزان آن در نمونه اول نسبت به سایر نمونه‌های مورد آزمایش، حکایت از فتوهتروتروفی در این نمونه‌ها است. بدیهی است میزان تغییرات هیدروکربنی نفت در محیط کشت، گام بعدی در اثبات توانایی این سیانوباکتری‌ها در تجزیه این ترکیبات در محیط می‌باشد که قدم بعدی در سلسله این آزمایشات می‌باشد.

سپاسگزاری

این پروژه با حمایت مالی پژوهشکده علوم پایه جهاد دانشگاهی صورت پذیرفته است. بدینوسیله از همکاری ریاست و معاونت محترم پژوهشی آن پژوهشکده کمال تشکر را می‌نماید.

منابع

سلطانی، ن.، خاوری‌نژاد، ر.، طباطبایی یزدی، م.، شکروی، ش.، و فرناندز والینته، ا. (۱۳۸۴) بررسی خواص آنتی‌میکروبیال و فیزیولوژی سیانوباکتری‌ها در محیط‌های افراطی، پایان نامه دکترای تخصصی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران.

شکروی، ش.، سلطانی، ن.، و بافته‌چی، ل. (۱۳۸۱) تدوین تکنولوژی استفاده از سیانوباکتری‌ها به عنوان کود بیولوژیک در شالیزارها، شورای عالی تحقیقات نهاد ریاست جمهوری.

Al-Hasan, R.H., Khanafer, M., Eliyas, M., Radwan, S.S. (2001) Hydrocarbon accumulation by picocyanobacteria from the Arabian Gulf. Journal of Applied Microbiology 91, 533-540.

Al-Hassan, R.H., Sorkhoh, N.A., Al-Bader, D., Radwan, S.S. (1994) Utilization of hydrocarbons by cyanobacteria from microbioal mats on oily coasts of the Gulf. Applied Microbiology and Biotechnology 41, 615-619.

Cernigilia, C.E. & Gibson, D.T. (1977) Metabolism of naphthalene by Cunninghamella elegans. Applied and Environmental Microbiology 34, 363-370.

Desikachary, T.V. (1959) Cyanophyta. Indian council of agricultural research, monographs on Algae New Delhi, India.

Ellis, B.E. (1977) Degradation of phenolic compounds by freshwater algae. Plant Scientific Lettres 8, 213- 216.

Garcia de Oteyza, T., Grimalt, J.O., Diestra, E., Sole, A. Esteve, I. (2004) Changes in the composition of polar and apolar crude oil fractions under the action of microcoleus consortia. Applied Microbiology and Biotechnology 66, 226-232.

Jensen, A. (1978) Chlorophylls and carotenoides. In: Handbook of Phycological Methods, Physiological and Biochemical Methods, ed. J.A. Hellebust, & Craigie, J.S., Cambridge University Press.

John, D.M., Whitton, B.W., Brook, A.J. (2002) The Freshwater Algal Flora of the British Isles - Cambridge University Press.

Leupold, M.A. (1978) Water quality assessment. In: Handbook of phycological methods, physiological and biochemical methods, ed. J.A. Hellebust, & Craigie, J.S., Cambridge University Press.

Morales-Loo, M.R. Goutx, M. (1996) Effects of water soluble fraction of the Mexican crude oil "Isthmus Cactus" on growth, cellular content of chlorophyll a and lipid composition of planktonic microalgae. Marine Biology 104, 503-509.

Pearce, J. & Carr, N.G. (1967) The metabolism of acetate by the blue-green alga *Anabaena varaibilis* and *Anacystis nidulans*. Journal of General Microbiology 49, 301-313.

Raghukumar, C., Vipparty, V., David, J.J. Chandramohan, D. (2001) Degradation of crude oil by marine cyanobacteria. Applied Microbiology and Biotechnology 57, 433-436.

Ramsay, B., McCarthy, I., Guerra-Santos, L., Kapelli, O. Fiechter, A. (1988) Biosurfactant production and diauxic growth of *Rhodococcus aurantiacus* when using n-alkanes as the carbon source. Canadanian Journal of Microbiology 34, 1209-1212.

Singer, M.E. & Finnerty, W.R. (1984) Microbial metabolism of straight chain and branched alkanes. In: Petroleum Microbiology, ed. R.M. Atlas, pp. 1-60, Macmillan Pub. Co, New York.

Soltani, N., Khavari-Nejad, R., Tabatabaie, M., Shokravi, SH., Valiente, E.F. (2005) Variation of Nitrogenase Activity, photosynthesis and pigmentation of cyanobacterium *Fischerella ambigua* strain FS18 under different irradiance and pH. World Journal of Microbiology and Biotechnology l22 (6), 571-576.

Winters, K., O'Donnel, R., Batterton, J.C. Van Baalen, C. (1976) Water-soluble components of four fuel oil: chemical characterization and effects on growth of microalgae. Marine biology 36, 269-276.

The effect of petroleum hydrocarbons on survival and pigments of cyanobacteria isolated from Abadan

Soltani, N[1]., Baftehchi, L[1]., Shokravi, Sh[2]

1. Dep of Petroleum Microbiology, ACECR, Research Institute of Petroleum, Tehran. Iran
2. Dep of Biology, Islamic Azad Univ., Branch Gorgan, Gorgan, Iran

Abstract

Remediation of petroleum polluted soil and water is very important. One of the pathways of oil remediation is usage of microalgae and cyanobacteria. In this research the effects of oiled based drilling mud waste (including 70% gasoline) on survival, growth and pigments of three cyanobacteria (*Oscillatoria+Calothrix*, *Nostoc*, *Calothrix*) in mix and unialgal forms were investigated. These cyanobacteria were isolated from soil of Arvand-rood in Abadan city. Results indicated that biomass of first sample was three fold of other samples. Growth rate in first sample was increasingly. In second and third samples, growths were decreased and reach to stationary phase after one week. All samples survived in treated experiments and oil compound did not have any toxic effects of them. Chlorophyll contents were similar to biomass and in first sample were three fold of others. Totally, results showed the resistance and potential of these species to degradation of oil pollution. Also these results are the first report from oil polluted fields of Iran.

Keywords: Cyanobacteria, Growth, Oil components, Pigment, Pollution, Survival

تجزیه ضرایب همبستگی عملکرد دانه با برخی از صفات مورفولوژیک در گلرنگ‌های بهاره

*محمدرضا داداشی[۱]، علیرضا احمدزاده[۲]، ابوالقاسم محمدی بندارخیلی[۱]، اسلام مجیدی[۳]، بهرام علیزاده[۳]

۱. گروه کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان
۲. گروه کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر
۳. موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کرج

چکیده

به منظور بررسی همبستگی عملکرد دانه با اجزاء آن و برخی از صفات مورفولوژیک در گلرنگ‌های بهاره، ۳۰ ژنوتیپ مختلف گلرنگ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر مورد آزمایش قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. صفات مورد اندازه‌گیری شامل ارتفاع بوته، تعداد دانه در طبق اصلی، وزن طبق اصلی، تعداد طبق یک بوته، وزن تک بوته، زمان گل‌دهی، زمان رسیدگی، عملکرد دانه، عملکرد بیولوژیک، شاخص برداشت، وزن هکتولیتر، وزن ۱۰۰ دانه، درصد روغن دانه و عملکرد روغن بود. نتایج بدست آمده نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در اکثر صفات وجود داشت. عملکرد دانه با صفات ارتفاع بوته، تعداد دانه در طبق، وزن هکتولیتر، عملکرد بیولوژیک و عملکرد روغن رابطه مثبت و معنی‌داری داشت. استفاده از سه روش رگرسیون گام به گام، صعودی و نزولی نشان داد، در هر سه روش بیشترین تغییرات عملکرد دانه توسط صفات ارتفاع بوته، تعداد دانه در طبق اصلی، وزن هکتولیتر و وزن۱۰۰ دانه ایجاد شده است. تجزیه ضرایب همبستگی عملکرد دانه با صفاتی که بیشترین تغییرات عملکرد دانه را ایجاد کردند به همراه چهار صفت زمان رسیدگی، تعداد طبق در بوته، وزن طبق اصلی و درصد روغن نشان داد، صفات ارتفاع بوته، تعداد طبق در بوته، تعداد دانه در طبق اصلی، وزن هکتولیتر و وزن ۱۰۰ دانه دارای اثرات مستقیم مثبت و صفات زمان رسیدگی و درصد روغن اثرات مستقیم منفی، روی عملکرد دانه داشته‌اند. بزرگترین اثر مربوط به وزن ۱۰۰ دانه (۰/۳۵۲) و کوچکترین آن مربوط به تعداد طبق در بوته (۰/۱۳۸) بود. بررسی رگرسیون صفت وزن ۱۰۰ دانه با برخی از صفات دیگر نشان داد که دو صفت وزن طبق اصلی و تعداد دانه در طبق اصلی، اصلی‌ترین صفات موثر بر صفت وزن ۱۰۰ دانه بودند.

کلمات کلیدی: اجزای عملکرد، تجزیه علیت، عملکرد دانه، گلرنگ، همبستگی

*e.mail:mdadashi730@yahoo.com

مقدمه

گلرنگ از خانواده Asteraceae و با نام علمی *Corthamus tinctorius* با تعداد کرموزوم‌های (۲n=۲۴) می‌باشد. از گل‌های این گیاه بعنوان ماده رنگی استفاده می‌کنند، ولی امروزه گلرنگ یک گیاه روغنی است که روغن از دانه آن بدست می‌آید. بسته به ژنوتیپ، گلرنگ دارای دو نوع روغن با کیفیت متفاوت است. روغن بعضی از ژنوتیپ‌ها دارای اسید لینولئیک زیاد بوده و به مصرف آشپزی، تهیه مارگارین نرم و یا مصارف صنعتی می‌رسد. روغن برخی از ژنوتیپها نیز دارای اسید اولئیک بسیار زیاد بوده و مشابه روغن زیتون می‌باشد و بنابراین از کیفیت خوراکی بسیار مطلوبی برخوردار است

Weiss (۲۰۰۰) در تحقیقات کشاورزی بعضی از صفات نقش تعیین کننده‌ای در عملکرد تولیدی دارند. مثلاً در گلرنگ عملکرد بوسیله صفاتی مثل تعداد طبق، وزن هزار دانه، تعداد دانه در طبق اصلی تعیین می‌گردد (امیدی تبریزی، ۱۳۷۷).

با مطالعه رابطه بین عملکرد و صفات مورفولوژیک و تجزیه ضرایب همبستگی بین آنها می‌توان صفت یا صفاتی را که بیشترین اثر مستقیم و یا غیرمستقیم بر روی عملکرد دانه را دارند، شناسایی کرده و در برنامه‌های اصلاحی برای گزینش ژنوتیپ‌های پرمحصول استفاده نمود. Ashri و همکاران (۱۹۷۵) با مطالعه بر روی ۹۰۳ واریته گلرنگ گزارش کردند که تعداد طبق در گیاه و تعداد دانه در طبق به ترتیب مهمترین اجزاء عملکرد بوده ولی وزن هزار دانه تاثیری بر روی عملکرد دانه نمی‌گذارد. Abel & Driscoll (۱۹۷۶) پیشنهاد کردند که اگر سه جزء عملکرد دانه یعنی تعداد طبق در بوته، تعداد دانه در طبق و وزن هزار دانه همزمان انتخاب شوند باید به ترتیب ضریب بیشتری به تعداد طبق در بوته، تعداد دانه در طبق و وزن هزار دانه داده شود زیرا در بررسی آنها ۹۷ درصد تغییرات در عملکرد دانه گلرنگ مربوط به سه جزء، فوق بود. Solanaki & Paliwal (۱۹۷۹) اعلام نمودند که همبستگی مثبت و معنی‌داری بین عملکرد گلرنگ با تعداد دانه در طبق، تعداد طبق در بوته و وزن هزار دانه وجود دارد. اهدائی و نورمحمدی (۱۳۶۳) به همبستگی مثبت و معنی‌داری بین عملکرد دانه از یک طرف و وزن هزار دانه، تعداد دانه در طبق، درصد روغن و ارتفاع بوته گلرنگ اشاره نموده‌اند. فیلی‌زاده (۱۳۷۰) بین عملکرد دانه با تعداد دانه در طبق، تعداد طبق در هر بوته، وزن هزار دانه و ارتفاع بوته همبستگی مثبت و معنی‌داری بدست آوردند. Gou Yahai & Lianlu (۱۹۹۲) گزارش کردند که تعداد دانه در طبق مهمترین صفتی است که بر عملکرد دانه تاثیر می‌گذارد. Yoguoy و همکاران (۱۹۹۳) عملکرد گلرنگ را تابعی از تعداد بوته در واحد سطح، تعداد طبق در بوته، تعداد دانه در طبق و وزن دانه ذکر کرده‌اند هدف از این مطالعه میزان اثر بخشی هر یک از اجزاء عملکرد در ارقام گلرنگ بهاره مورد آزمایش از بعد افزایش عملکرد دانه بود.

مواد و روشها

این آزمایش جهت مطالعه و ارزیابی عملکرد و اجزای عملکرد ژنوتیپهای مختلف گلرنگ بهاره در سال ۱۳۸۴ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر واقع در ۶۰ کیلومتری شمالغرب تبریز به طول جغرافیائی ۴۵ درجه و ۴۲ دقیقه و عرض جغرافیایی ۳۸ درجه و ۱۱ دقیقه و با ارتفاع ۱۴۶ متر از سطح دریا اجرا گردید. حداقل و حداکثر دمای سالانه منطقه به ترتیب ۱۲- و ۳۸ درجه سانتی‌گراد می‌باشد و بافت خاک از نوع شنی لومی بود. در این آزمایش ۳۰ ژنوتیپ تهیه شده از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی با سه تکرار مورد مطالعه قرار گرفتند. در پایان فصل زراعی ده بوته بطور تصادفی از ردیف دوم و سوم هر کرت انتخاب و صفاتی نظیر ارتفاع بوته، تعداد دانه در طبق اصلی، وزن طبق اصلی، تعداد طبق در بوته، وزن تک بوته، اندازه‌گیری گردید. تعداد روزها از زمان کاشت تا مرحله ظهور گل در ۵۰٪ بوته‌ها، به عنوان

«زمان گل‌دهی» تعیین شد. برای اندازه گیری عملکرد دانه، عملکرد بیولوژیک و شاخص برداشت (پس از حذف اثرات حاشیهای) ردیفهای کشت شده برداشت گردید. برای وزن ۱۰۰ دانه ۵ نمونه ۱۰۰ بذری توزین و میانگین آنها بعنوان وزن ۱۰۰ دانه منظور شد. برای وزن هکتولیتر ۵ نمونه از هر کرت در ظروفی به حجم ۱۰۰میلی لیتر توزین و میانگین آنها گرفته شد. همچنین درصد روغن دانه از روی نمونه‌های ۵۰ گرمی هر کرت به دست آمد. میانگین نمونه‌های بدست آمده از هر واحد آزمایشی برای کلیه صفات بعنوان نماینده کرت در محاسبات آماری مورد استفاده قرار گرفت. داده‌های حاصل بعد از تست نرمال بودن در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی تجزیه واریانس شده و مقایسه میانگین نیز با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت. همچنین ضرایب همبستگی بین صفات با یکدیگر محاسبه شده و با استفاده از سه روش رگرسیون گام به گام، صعودی و نزولی صفاتی که بیشترین اثر را روی عملکرد دانه دارند شناسائی و سپس با استفاده از روش تجزیه علیت، ضرایب همبستگی عملکرد دانه با برخی صفات به اثرات مستقیم و غیرمستقیم تجزیه گردید. کلیه محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS و SAS انجام گرفت.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از صفات مورد مطالعه نشان می‌دهد که بین ژنوتیپهای مورد مطالعه از نظر زمان گل دهی، زمان رسیدگی، تعداد دانه در طبق اصلی، وزن طبق اصلی، تعداد طبق در بوته، وزن هکتولیتر، وزن ۱۰۰ دانه، عملکرد دانه، عملکرد بیولوژیک و عملکرد روغن دانه در سطح احتمال ۱٪ و از نظرصفات وزن همه طبق‌های یک بوته و ارتفاع بوته در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری داشته است.بین ژنوتیپ ها از نظر صفات وزن تک بوته، درصد روغن دانه و شاخص برداشت اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱).

قدرتی، ۱۳۷۶؛ رفیعی، ۱۳۸۴؛ Ghorpade و همکاران، ۱۹۹۳ و Johnson، ۲۰۰۱، اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه خود از نظر اکثر صفات مورد مطالعه مشاهده کردند. دامنه ضریب تغییرات بین ۱/۸۰ و ۳۰/۴ می‌باشد. پایین بودن ضریب تغییرات در برخی صفات میتواند ناشی از کم بودن اثر محیط بر روی این صفات و بالا بودن ضریب تغییرات در برخی صفات می‌تواند ناشی از زیاد بودن اثر محیط بر روی این صفات باشد. مقایسه میانگین عملکرد دانه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد که ۱۳ ژنوتیپ اختلاف معنی‌داری با هم نداشته و بیشترین میزان عملکرد را دارند و میانگین عملکرد دانه آنها در حدود ۱۱۴۴/۷ کیلو گرم در هکتار می‌باشند. جدول شماره ۲ مقایسه میانگین عملکرد دانه ژنوتیپ‌ها را نشان می‌دهد.

ضرایب همبستگی بین صفات در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. عملکرد دانه با صفات ارتفاع بوته، تعداد دانه در طبق، وزن هکتولیتر، عملکرد بیولوژیک و عملکرد روغن رابطه مثبت و معنی‌داری داشت. همبستگی مثبت و معنی‌داری بین تعداد دانه در طبق، تعداد طبق در بوته و وزن هزار دانه با عملکرد دانه گلرنگ توسط Solanaki & Paliwal (۱۹۷۹) و فیلی‌زاده (۱۳۷۰) گزارش شده است.

برای شناسایی صفاتی که بیشترین تاثیر را بر روی عملکرد دانه در این بررسی داشته اند از سه روش رگرسیون گام به گام، صعودی و نزولی استفاده گردید، بطوریکه صفات ارتفاع بوته، زمان گل دهی، زمان رسیدگی، وزن کل بوته، تعداد طبق در بوته، وزن کل طبق‌های یک بوته، وزن طبق اصلی،تعداد دانه در طبق اصلی، وزن هکتولیتر، وزن ۱۰۰ دانه و درصد روغن بعنوان صفات مستقل و عملکرد دانه به عنوان صفت وابسته در یک مدل قرار گرفتند. نتایج هر سه رگرسیون نشان داد که بیشترین تغییرات عملکرد دانه در این مطالعه توسط صفات ارتفاع بوته، تعداد دانه در طبق اصلی، وزن هکتولیتر و وزن ۱۰۰دانه ایجاد شده که در نتیجه این صفات وارد مدل شدند.

جدول ۱: تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه ژنوتیپ‌های گلرنگ

منابع تغییر	درجه آزادی	ارتفاع بوته	زمان گل دهی	زمان رسیدن	وزن تک بوته	تعداد طبق	وزن همه طبق‌های یک بوته	وزن طبق اصلی	تعداد بذر در طبق
		میانگین مربعات							
تیمار	۲۹	۲۵۱/۵۵*	۵/۲۲**	۳۷/۶۶**	ns۲۷/۶۶	۵/۲۵**	۲۶/۱۴*	۰/۳۸۱**	۱۵۷/۰۵**
بلوک	۲	۱۰۴۳/۵۴**	۸/۰۴**	۱۶۲/۱۳**	۲۷۰/۰۳**	۳۳/۰۴**	۱۶۸/۴۳**	۰/۸۷۵*	ns۱۰/۴۳
خطا	۵۸	۱۳۱/۷۴	۰/۸۰۳	۵/۹۶	۲۰/۴۳	۲/۵۵	۱۳/۳۵	۰/۱۷۸	۲۸/۱۴
C.V (%)		۱۳/۷۲	۱/۰۸	۲/۱۹	۲۵/۳	۲۴/۰۲	۳۰/۴	۱۸/۴۴	۱۴/۳۳

ادامه جدول ۱: تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه ژنوتیپهای گلرنگ

منابع تغییر	درجه آزادی	وزن هکتومتر	وزن ۱۰۰ دانه	درصد روغن دانه	عملکرد دانه	عملکرد بیولوژیک	عملکرد روغن	شاخص برداشت
		میانگین مربعات						
تیمار	۲۹	۱۸۴/۹۷**	۰/۳۵۹**	ns۱۰/۴۲	۱۷۴۹۸۳/۸۸**	۱۶۱۸۴۱۷/۹۵**	۱۷۸۵۳/۰۵**	ns۱۲/۴
بلوک	۲	ns۳۲/۶۰	ns۰/۰۲۰۱	ns۲/۴۳	۸۷۱۸۴/۹۳**	۵۶۱۶۹۰/۸۵*	۱۲۴۷۱/۰۵**	ns۴/۲
خطا	۵۸	۲۵/۳۹	۰/۰۴۰۷	۹/۱۲	۱۱۸۷۷/۵۱	۱۶۱۶۵۶/۶۳	۲۳۵۲/۰۹	۷/۸
C.V(%)	_	۶/۵۲	۶/۱۷	۹/۶۹	۱۱/۸۹	۱۴/۵۰	۱۶/۹۶	۸/۴۱

به ترتیب معنی‌دار در سطح ۱٪ و ۵٪ و غیر معنی دار : **, * ,ns

جدول ۲: مقایسه میانگین عملکرد دانه در ژنوتیپ های مورد بررسی با استفاده از آزمون دانکن (P<%5)

شماره ژنوتیپ	نام ژنوتیپ	میانگین	کد
۷	محلی اصفهان ۱	۱۲۶۱/۱۱	a
۱۰	محلی رزقان	۱۲۴۱/۳۳	a
۹	رقم Ch.353	۱۲۳۹/۷۲	a
۱۴	محلی کردستان ۲	۱۲۲۹/۹۳	a
۲۴	ورامین LR.V.51.141	۱۱۶۱/۷۳	ab
۲۵	لاین k.h.34.779	۱۱۳۸/۷۹	ab
۱۷	رقم CART.9094	۱۱۲۰/۸۴	abc
۲۱	محلی اصفهان ۲	۱۱۱۷/۴۰	abc
۱۳	لاین k.h.2357	۱۰۹۱/۹۷	abcd
۴	محلی اراک	۱۰۸۴/۹۳	abcd
۳	محلی ارومیه	۱۰۷۶/۹۴	abcd
۲۳	رقم 1457	۱۰۶۸/۱۲	abcd
۱۲	محلی تبریز ۱	۱۰۴۸/۶۶	abcd
۶	فریو 3.76	۹۸۳/۰۶	bcde
۲۰	ورامین LR.V.51.233	۹۷۹/۰۹	bcde
۸	محلی کردستان ۱	۹۷۴/۳۳	bcde
۱۶	محلی تبریز۲	۹۱۹/۵۴	cdef
۲۹	اراک 2811.2	۸۹۳/۴۸	defg
۱۹	لاین k.h.15.44	۸۲۸/۴۵	efgh

۲۸	اراک 2811.1	۷۵۷/۶۵	fghi
۲۲	رقم N 2004	۷۵۳/۴۷	fghi
۱۱	لاین k.h.96450	۷۰۷/۰۲	ghij
۳۰	ورامین LR.V.51.24.60	۶۸۲/۷۱	hij
۱۸	لاین k.h.6.468	۶۷۴/۸۶	hij
۱۵	لاین k.h.100511	۶۴۸/۰۷	hij
۲	محلی ارومیه	۶۴۶/۳۹	hij
۵	لاین k.h.23/57	۵۷۷/۴۹	ij
۲۶	دیم کشور PI	۵۶۵/۴۲	ij
۲۷	لاین k.h.9.411	۵۱۳/۵۱	j
۱	لاین k.h.39/115	۵۰۰/۳۵	j

حروف مشترک در کد میانگین ها نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار بین آنهاست

جدول ۳: ضرایب همبستگی فنوتیپی بین صفات مورد مطالعه

صفات / صفات	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵
ارتفاع بوته	۱														
زمان گل دهی	ns +۰/۱۹۵	۱													
زمان رسیدگی	* +۰/۴۱۶	ns ۰/۲۲۰	۱												
وزن کل بوته	* ۰/۴۰۳	ns -۰/۱۷۸	ns ۰/۲۴۱	۱											
تعداد طبق یک بوته	ns ۰/۲۱۲	ns - ۰/۱۹۲	ns ۰/۲۲۱	** ۰/۶۶۹	۱										
وزن کل طبق ها	ns ۰/۲۷۲	ns - ۰/۲۸۵	ns ۰/۱۶۵	** ۰/۸۰۴	** ۰/۶۶۵	۱									
وزن طبق اصلی	ns ۰/۱۸۹	ns - ۰/۲۴۹	ns ۰/۰۵۸	* ۰/۴۱۸	ns ۰/۱۶۰	* ۰/۴۹۱	۱								
تعداد دانه طبق اصلی	ns ۰/۲۱۳	ns ۰/۰۹۲	ns ۰/۲۹۰	ns ۰/۲۹۲	ns ۰/۰۷۷	ns ۰/۲۸۳	** ۰/۵۲۳	۱							
وزن هکتومتر	* ۰/۳۱۸	* ۰/۳۵۶	ns ۰/۲۶۹	ns -۰/۰۴۸	ns -۰/۰۴۴	ns - ۰/۰۱۳	ns ۰/۰۸۳	ns ۰/۲۰۹	۱						
وزن ۱۰۰ دانه	ns - ۰/۱۳۸	ns ۰/۲۵۵	ns -۰/۰۵۹	ns -۰/۰۱۹	ns -۰/۰۵۹	ns ۰/۰۷۹	ns ۰/۲۵۷	ns -۰/۱۶۵	ns -۰/۰۵۸	۱					
درصد روغن	ns ۰/۱۲۰	ns ۰/۰۲۰۱	ns ۰/۰۲۷	ns -۰/۰۲۶	ns ۰/۰۵۷	ns -۰/۰۲۲	ns ۰/۱۶۷	ns ۰/۱۴۷	ns ۰/۰۹۹	ns ۰/۱۲۹	۱				
عملکرد دانه	* ۰/۳۹۸	ns ۰/۱۳۱	ns ۰/۲۵۳	ns ۰/۲۵۹	ns ۰/۱۶۰	ns ۰/۲۳۴	ns ۰/۲۸۶	* ۰/۳۸۰	* ۰/۴۴۴	ns ۰/۲۱۰	ns ۰/۰۲۵	۱			
عملکرد بیولوژیک	* ۰/۴۰۶	ns ۰/۲۰۷	ns ۰/۲۴۸	ns ۰/۲۴۳	ns ۰/۰۷۸	ns ۰/۰۳۵	ns ۰/۱۷۷	* ۰/۳۴۱	* ۰/۴۰۱	ns ۰/۱۴۹	ns ۰/۰۰۸۴	** ۰/۹۴۴	۱		
عملکرد روغن	* ۰/۴۱۰	ns ۰/۱۱۳	ns ۰/۲۵۰	ns ۰/۲۴۳	ns ۰/۱۷۶	ns ۰/۲۲۹	* ۰/۳۳۶	* ۰/۴۱۱	* ۰/۴۴۹	ns ۰/۱۵۶	* ۰/۳۴۲	** ۰/۹۴۴	** ۰/۸۸۰	۱	
شاخص برداشت	ns -۰/۰۵۷	ns -۰/۲۵۱	ns -۰/۰۱۹	ns ۰/۰۷۳	ns ۰/۲۷۸	** ۰/۶۱۹	ns ۰/۲۶۶	ns ۰/۰۸۳	ns ۰/۰۹۹	ns ۰/۱۷۰	ns ۰/۰۰۴	ns ۰/۱۰۶	ns -۰/۲۱۳	ns ۰/۱۲۲	۱

به ترتیب معنی‌دار در سطح ۱٪ و ۵٪ و غیرمعنیدار : **, * ,ns

تجزیه ضرایب همبستگی عملکرد دانه با صفاتی که بیشترین تغییرات عملکرد را ایجاد می‌کنند به همراه چهار صفت زمان رسیدگی، تعداد طبق در بوته، وزن طبق اصلی و درصد روغن به اثرات مستقیم و غیرمستقیم انجام گردید که نتایج در جدول شماره ۴ آمده است.

صفات ارتفاع بوته، تعداد طبق هر بوته، تعداد دانه در طبق اصلی، وزن هکتولیتر و وزن ۱۰۰ دانه دارای اثر مستقیم مثبت و صفات زمان رسیدگی، وزن طبق اصلی و درصد روغن اثر مستقیم منفی را روی عملکرد دانه داشتند. بزرگترین اثر مربوط به وزن ۱۰۰ دانه (۰/۳۵۲) و کوچکترین آن مربوط به تعداد طبق هر بوته (۰/۱۳۸) بود. بزرگترین اثر مستقیم منفی مربوط به وزن طبق اصلی (۰/۰۹۰۹-) و کمترین آن مربوط به درصد روغن (۰/۰۴۱۹-) می‌باشد، بطوریکه مشخص است اثرات مستقیم منفی بسیار جزئی می‌باشند. هر چند که، اثر مستقیم زمان رسیدگی منفی می‌باشد (۰/۰۶۵-) ولی غیرمستقیم از طریق وزن هکتولیتر (۰/۰۸۹۳) تا حدودی سبب افزایش عملکرد دانه می‌شود.

نظر به اینکه صفات ارتفاع بوته، تعداد طبق هر بوته، تعداد دانه درطبق اصلی، وزن هکتولیتر و وزن ۱۰۰ دانه اثر مستقیم بر روی عملکرد دانه دارند، بنابر این، گزینش برای هر کدام از این صفات سبب افزایش عملکرد دانه خواهد شد.

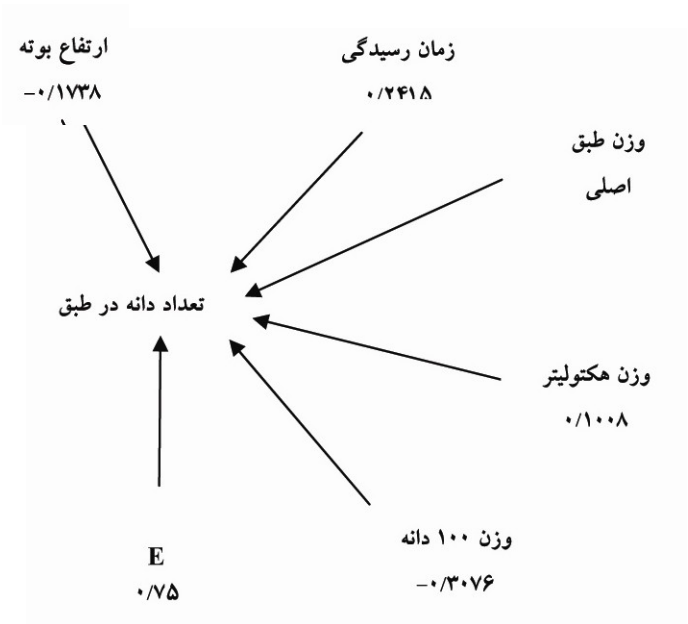
Kumar و همکاران (۱۹۸۲) اثر مستقیم ارتفاع بوته، اندازه طبق و تعداد دانه در طبق را بر روی عملکرد دانه و روغن مثبت و معنی‌دار گزارش کرده اند با وجود این، Paliwal & Solahki (۱۹۸۴) اثر مستقیم تعداد طبق در بوته و وزن هزار دانه را روی عملکرد دانه مثبت و معنی‌دار مشاهده کرد. Khidir (۱۹۷۴) و Abel & Driscoll (۱۹۷۶) اثر مستقیم و مثبت ارتفاع بوته و اندازه طبق بر روی عملکرد دانه را گزارش کردند در حالیکه اسکندری (۱۳۸۳) اثر مستقیم منفی ارتفاع بوته و تعداد دانه در طبق را روی عملکرد دانه مشاهده کرد. Tuncturk & Vahdettin (۲۰۰۴) در سال اول آزمایش اثر مستقیم وزن هزار دانه را روی عملکرد دانه منفی و در سال دوم آزمایش آن اثر را مثبت گزارش کردند. می‌توان اظهار داشت که رابطه برخی از صفات با عملکرد دانه بسته به شرایط آزمایش و ژنوتیپ‌های مورد کشت متغیر می‌باشد.

جدول ۴: تجزیه ضرایب همبستگی عملکرد با برخی صفات به اثرات مستقیم وغیر مستقیم

صفت	اثر مستقیم	اثر غیر مستقیم از طریق								ضریب همبستگی باعملکرد
		۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	
ارتفاع بوته	۰/۲۸۳	-	۰/۰۲۷۰۴-	۰/۰۲۹۲۶	۰/۰۱۷۰۳-	۰/۰۷۸۸۱	۰/۱۰۵۵۸	۰/۰۴۸۴-	۰/۰۰۵۰۴-	۰/۳۹۸*
زمان رسیدگی	۰/۰۶۵-	۰/۱۱۷۷۳	_	۰/۰۳۰۴۹۸	۰/۰۰۵۲۲-	۰/۱۰۷۳	۰/۰۸۹۳۱	۰/۰۲۰۷۷-	۰/۰۰۱۱۳۴-	ns ۰/۲۵۳
تعداد طبق یک بوته	۰/۱۳۸	۰/۰۵۹۹۹	۰/۰۱۴۳۶-	_	۰/۰۱۴۴۱۶-	۰/۰۲۸۴۹	۰/۰۱۴۶۰۸-	۰/۰۲۰۷۷-	۰/۰۰۲۳۹-	ns ۰/۱۶۰
وزن طبق اصلی	۰/۰۹۰۱-	۰/۰۵۳۴۸۷	۰/۰۰۳۷۷-	۰/۰۲۲۰۸	_	۰/۱۹۳۵۱	۰/۰۲۷۵۵۶	۰/۰۹۰۴۶۴	۰/۰۰۷۰۱۴-	ns ۰/۲۸۶
تعداد دانه طبق اصلی	۰/۳۷۰	۰/۰۶۰۲۷۹	۰/۰۱۸۸۵-	۰/۰۱۰۶۲۶	۰/۰۴۷۱۲۲-	_	۰/۰۶۹۳۸۸	۰/۰۵۸۰۸-	۰/۰۰۶۱۷۴-	۰/۳۸۰*
وزن هکتولیتر	۰/۳۳۲	۰/۰۸۹۹۹۴	۰/۰۱۷۴۸۵-	۰/۰۰۶۰۷۲-	۰/۰۰۷۴۷۸-	۰/۰۷۷۳۳	_	۰/۰۲۰۴۱۶-	۰/۰۰۴۱۶-	۰/۴۴۴*
وزن صد دانه	۰/۳۵۲	۰/۰۳۹۰۵-	۰/۰۰۳۸۳۵+	۰/۰۰۸۱۴۲-	۰/۰۲۳۱۵۶-	۰/۰۶۱۰۵-	۰/۰۱۹۲۵۶-	_	۰/۰۰۵۴۱۸+	ns ۰/۲۱۰
درصدروغن	۰/۰۴۲-	۰/۰۳۳۹۶	۰/۰۰۱۷۵۵-	۰/۰۰۷۷۲۸	۰/۰۱۵۰۴۷-	۰/۰۵۴۳۹	۰/۰۳۲۸۷	۰/۰۴۵۴۰۸-	_	ns ۰/۰۲۵

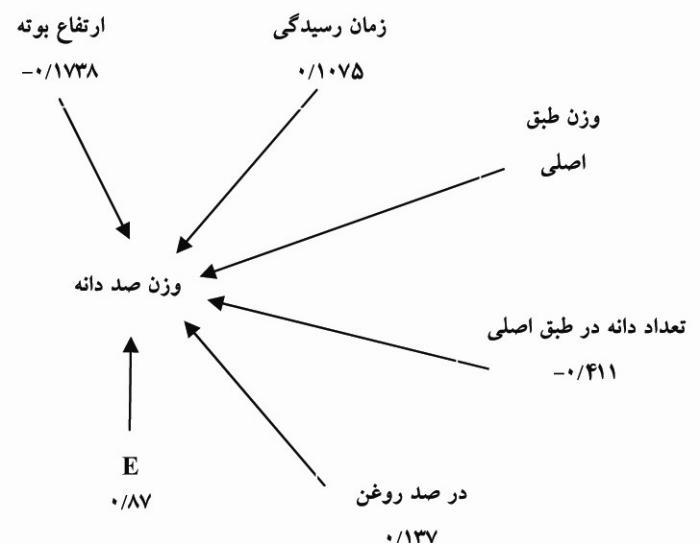
با توجه به اینکه در این آزمایش چهار صفت ارتفاع بوته، تعداد دانه در طبق اصلی، وزن هکتولیتر و وزن ۱۰۰ دانه در سه روش رگرسیون گام به گام، صعودی و نزولی وارد مدل رگرسیونی شدند. برای شناسایی عواملی که بر روی برخی از این صفات اثر گذاشته و بطور غیرمستقیم باعث افزایش عملکرد دانه می‌گردند، رگرسیون دو صفت تعداد دانه

در طبق اصلی و وزن ۱۰۰ دانه با برخی صفات دیگر بررسی شد، بطوری که در صفت تعداد دانه در طبق اصلی، رگرسیون این صفت بر روی صفات ارتفاع بوته، زمان رسیدگی، وزن کل بوته، وزن کل طبق‌های یک بوته، وزن طبق اصلی، وزن هکتولیتر، وزن ۱۰۰ دانه و درصد روغن بررسی گردید و نتایج هر سه رگرسیون گام به گام، صعودی و نزولی نشان داد که سه صفت وزن طبق اصلی، وزن ۱۰۰ دانه و زمان رسیدگی درمدل قرار گرفتند. بنابر این صفات فوق به همراه صفات ارتفاع بوته و وزن هکتولیتر در تجزیه علیت مورد استفاده قرار گرفت (شکل۱). اثر مستقیم وزن طبق اصلی (۰/۵۹۳۸)، زمان رسیدگی (۰/۲۴۱۵) و وزن هکتولیتر (۰/۱۰۰۸) مثبت و اثر مستقیم وزن ۱۰۰ دانه (۰/۳۰۷۶-) و ارتفاع بوته (۰/۰۷۵۲-) منفی بودند. تانجترک و همکاران (۲۰۰۴) بین تعداد دانه در طبق و ارتفاع بوته رابطه مثبت و معنی‌دار مشاهده کردند.



شکل ۱: تجزیه ضرایب همبستگی تعداد دانه در طبق اصلی با برخی از صفات

برای شناسایی صفاتی که بطور غیرمستقیم از طریق وزن ۱۰۰ دانه باعث افزایش عملکرد دانه می‌شوند، رگرسیون این صفت را با صفات وزن هکتولیتر، وزن کل طبق ها یک بوته، وزن کل بوته، زمان گل دهی، تعداد طبق‌های یک بوته، زمان رسیدگی، ارتفاع بوته، درصد روغن، وزن طبق اصلی و تعداد دانه در طبق اصلی بررسی گردید. سه روش رگرسیونی گام به گام، صعودی و نزولی دو صفت وزن طبق اصلی و تعداد دانه در طبق اصلی را اصلی ترین صفات موثر بر وزن ۱۰۰ دانه بر آورد کردند. برای اینکه اثرات مستقیم و غیرمستقیم برخی از صفات بر روی صفت وزن ۱۰۰ دانه مطالعه شود، ضرایب همبستگی وزن ۱۰۰ دانه با دو صفت وزن طبق اصلی و تعداد دانه در طبق و سه صفت ارتفاع بوته، زمان رسیدگی و درصد روغن با استفاده از تجزیه علیت به اثرات مستقیم و غیر مستقیم تجزیه گردید. نتایج تجزیه علیت (شکل ۲) نشان داد که دو صفت زمان رسیدگی و وزن طبق اصلی دارای اثرات مستقیم مثبت و دیگر صفات دارای اثرات مستقیم منفی بر روی وزن ۱۰۰ دانه دارند. بطوریکه بیشترین اثر مستقیم مثبت مربوط به وزن طبق اصلی (۰/۵۲۲۲) و بیشترین اثر مستقیم منفی مربوط به تعداد دانه طبق اصلی می‌باشد.



شکل ۲: تجزیه ضرایب همبستگی وزن صد دانه با برخی از صفات

نتایج تجزیه به مولفه‌های اصلی در جدول شماره ۵ آمده است، چنانچه مشاهده می‌شود بر اساس مقادیر ویژه بالاتر از یک, چهار مولفه قابل استخراج است این چهار مولفه، جمعاً حدود ۷۴/۸۲ درصد از تغییرات اولیه صفات مورد بررسی را توجیه کردند. با توجه به اینکه هر مولفه خصوصیات مختلفی از صفات را مورد بحث قرار می‌دهد چهار مولفه اول تجزیه وتحلیل و نامگذاری شدند. اولین مولفه اصلی ۳۲/۱۵ درصد از تغییرات اولیه را تبین کرد که در این مولفه صفاتی مانند ارتفاع بوته، تعداد دانه در طبق اصلی، وزن هکتولیتر، عملکرد دانه، عملکرد بیولوژیک و عملکرد روغن دارای ضرایب بالایی بودند، این مولفه به نام مولفه عملکرد دانه و اجزاء آن نامگذاری گردید. اکثر صفاتی که در این مولفه وارد شده است دارای همبستگی مثبت با هم بوده و بدین لحاظ از این صفات می‌توان در برنامه‌های اصلاحی جهت افزایش عملکرد دانه استفاده نمود.

مولفه اصلی دوم، ۲۲/۳۶ درصد از تغییرات داده‌های اولیه را توجیه نمود. در این مولفه صفاتی نظیر وزن کل بوته، تعداد طبق، وزن همه طبق‌های موثر، وزن طبق اصلی و شاخص برداشت ضرایب بیشتری داشتند. این مولفه، مولفه خصوصیات طبق در نظر گرفته شد. اگر در برنامه‌های اصلاحی هدف بهبود خصوصیات طبق باشد می‌توان از این صفات استفاده نمود.

مولفه اصلی سوم در حدود ۱۱/۴۲ درصد تغییرات اولیه را توجیه می‌کنند، که در این مولفه صفت وزن ۱۰۰ دانه ضریب منفی بالای داشت, بدین لحاظ این مولفه، به نام مولفه وزن صد دانه نامیده شد.

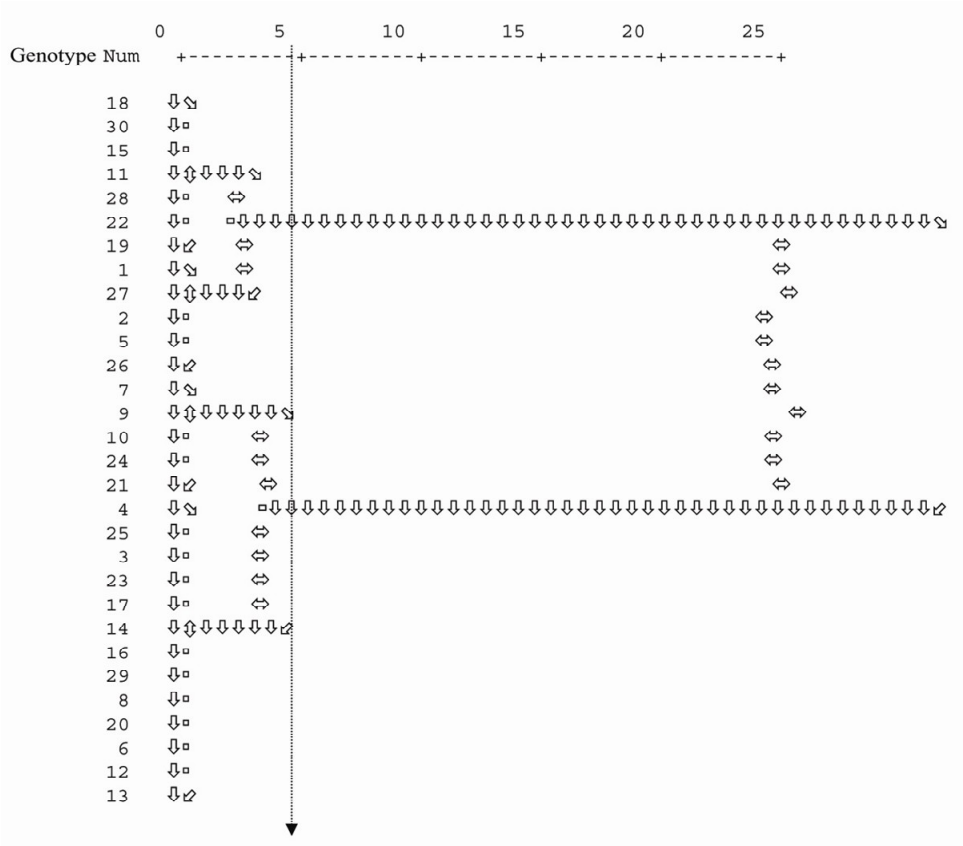
مولفه اصلی چهارم ۹/۸۹ درصد از تغییرات داده‌های اولیه را در برگرفته و مهمترین صفتی که تغییرات مثبت در این مولفه را موجب می‌شود درصد روغن است. بدین لحاظ این مولفه بنام مولفه درصد روغن نامگذاری گردید.

بنا به گزارش Digming & Yuguand (۱۹۹۳)، ۶ مولفه اصلی اول در حدود ۷۸ درصد تغییرات داده‌های اولیه را توجیه می‌کنند در حالیکه در مطالعه قدرتی و همکاران (۱۳۷۶) روی ۳۰ رقم گلرنگ حدود ۸۸ درصد از تغییرات داده‌های اولیه با ۱۰ مولفه اصلی تبین شده است. امیدی تبریزی (۱۳۷۰) گزارش کرد که هفت مولفه اول در حدود ۸۰ درصد از تغییرات داده‌های اولیه را توجیه کردند. بطوریکه مولفه اول با تبین ۲۹/۶۴ در صد از تغییرات کل از صفات

عملکرد بیولوژیک، تعداد طبق، تعداد شاخه فرعی و ارتفاع بوته متاثر بود.

تجزیه خوشه‌ای بر مبنای روش وارد با ضریب فاصله مربع فاصله اقلیدوسی برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها انجام شد. دندروگرام حاصل از ۳۰ ژنوتیپ گلرنگ بهاره بر اساس صفات مورد مطالعه در شکل ۳ نشان داده شده است. برش دندروگرام از فاصله ۵ واحد مربع اقلیدوسی ژنوتیپ‌ها را به دو گروه تقسیم می‌کند. گروه اول شامل ۱۲ ژنوتیپ بود که اکثر آنها ژنوتیپ‌های با عملکرد پایین بودند. گروه دوم شامل ۱۸ ژنوتیپ بود که می‌توان این گروه را به دو زیر گروه تقسیم کرد، بطوری که در زیر گروه اول ۵ ژنوتیپ محلی اصفهان ۱، رقم CH.۳۵۳، محلی رزقان، ورامین L.R.V..۵۱,۱۴۱ و محلی اصفهان ۲ قرار داشت. این ژنوتیپ‌ها از ژنوتیپ‌های برتر از نظر عملکرد دانه بودند. زیر گروه دوم شامل ۱۳ ژنوتیپ بود که اکثراً ژنوتیپ‌های محلی و اصلاح شده با عملکرد دانه بیشتر و متوسط بودند (جدول ۲). دلیل بالا بودن عملکرد دانه در ژنوتیپ‌های گروه دوم را می‌توان اولاً در بالا بودن پتانسیل ژنتیکی ژنوتیپ‌های موجود و ثانیاً سازگار بودن ژنوتیپ ها به محیط و اقلیم محل آزمایش دانست.

قدرتی و همکاران (۱۳۷۶) ۲۳ اکوتیپ گلرنگ بهاره ایران را به ۵ گروه تقسیم کردند. همچنین Yazdi-Samadi (۱۹۸۹) لاینها و ارقام گلرنگ ایرانی و خارجی را در ۵ گروه اصلی امریکائی، ایرانشهری، مرندی، ارومیه‌ای و مغانی و فارسی، اصفهانی و جیرفت قرار دادند. آنها نتیجه‌گیری کردند که شباهت در میان توده‌های فوق با توجه به شرایط مختلف اکولوژیکی احتمالاً به دلیل پایه ژنتیکی یکسان باشد.



شکل ۳: تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از صفات مورفولوژیک

جدول ۵: مولفه‌های اصلی، مقادیر ویژه و ضریب صفات مختلف در تجزیه به مولفه‌های اصلی

مولفه	مقادیر ویژه	سهم تجمعی ٪	ارتفاع بوته	زمان گلدهی	زمان رسیدگی	وزن کل بوته	تعداد طبق یک بوته	وزن کل طبق‌های یک بوته	وزن طبق اصلی	تعداد دانه در طبق اصلی	وزن هکتولیتر	وزن ۱۰۰ دانه	درصد روغن	عملکرد دانه
۱	۴/۸۲۳	۳۲/۱۵	۰/۶۷	۰/۳۱۹	۰/۴۴۳	۰/۵۵۷	۰/۲۶۸	۰/۴۸۶	۰/۵۱۷	۰/۶۷۶	۰/۵۶۲	۰/۰۰۳۲	۰/۰۸۵۰	۰/۹۰۲
۲	۳/۳۵۳	۵۴/۵۱	-۰/۳۸۷	-۰/۶۹۷	-۰/۴۴۸	۰/۵۵۴	۰/۵۳۵	۰/۸۲۳	۰/۵۵۴	۰/۱۳۲	-۰/۴۶۸	۰/۲۸۴	۰/۰۴۷	-۰/۱۲۳
۳	۱/۷۱۳	۶۵/۹۳	۰/۲۳۰	۰/۲۱۷	۰/۲۲۸	۰/۳۱۵	۰/۲۸۱	۰/۱۲۴	۰/۰۱۰۴	۰/۴۳۷	-۰/۱۵۹	-۰/۸۴۰	۰/۳۴۹	-۰/۳۴۲
۴	۱/۳۳۴	۷۴/۸۲	۰/۰۰۶۶	-۰/۱۵۳	-۰/۰۹۳	-۰/۳۲۴	-۰/۴۹۶	-۰/۱۱۳	۰/۴۴۸	۰/۲۵۷	۰/۱۷۹	۰/۰۹۲۳	۰/۷۶۲	-۰/۰۹۶

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به نتایج این آزمایش، بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در اکثر صفات اختلاف معنی‌داری وجود داشت و ژنوتیپ‌هایی که دارای عملکرد بالایی بودند از نظر ارتفاع بوته، تعداد دانه در طبق اصلی, وزن ۱۰۰ دانه، وزن هکتو لیتر و وزن طبق اصلی نیز برتری داشتند. همچنین عملکرد دانه در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بیشترین تاثیر خود را از چهار صفت ارتفاع بوته, تعداد دانه در طبق اصلی, وزن هکتولیتر و وزن ۱۰۰ دانه دریافت می‌کند. اگر هدف گزینش ژنوتیپ‌های با عملکرد بالا باشد می‌توان بطور مستقیم ژنوتیپ‌هایی که دارای عملکرد دانه بیشتر هستند و یا بطور غیرمستقیم ژنوتیپ‌هایی که از نظر چهار صفت فوق دارای مقادیر بیشتری هستند، را انتخاب کرد و در برنامه‌های اصلاح نباتات از آن صفات استفاده نمود.

منابع

اسکندری تربقان، م. (۱۳۸۳). ارزیابی ژنوتیپژها و تعیین همبستگی بین عملکرد دانه با اجراء عملکرد در گلرنگ در شرایط دیم. خلاصه مقالات هشتمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران. دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان. ۵-۳ شهریور. ص ۱۵.

امیدی تبریزی، ا.م.، و پوردوائی، ح. (۱۳۷۰). بررسی ارقام خارجی گلرنگ از نظر عملکرد دانه و روغن. گزارش پژوهش. بخش تحقیقات دانه‌های روغنی موسسه تحقیقات کرج.

امیدی تبریزی، ا. (۱۳۷۷). بررسی تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی ارقام گلرنگ بهاره از طریق روشهای آماری چند متغیره.پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته اصلاح نباتات. دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحدکرج.

اهدایی، ب.، و نورمحمدی، ق. (۱۳۶۳). اثر تاریخ کاشت روی عملکرد دانه و سایر صفات زراعی ارقام گلرنگ. مجله علمی کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز. ۹: ۴۲-۲۸.

رفیعی، ف.، و سعیدی، ق. (۱۳۸۴). تنوع ژنتیکی برای صفات زراعی مختلف در لاین‌های انتخابی از توده‌های بوی گلرنگ ایران و ژنوتیپ‌های خارجی. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، سال نهم. ۲: ۹۱-۱۰۶.

فیلی‌زاده، ی. (۱۳۷۰). بررسی و ارزیابی صفات کمی و کیفی ارقام و لاینهای گلرنگ. پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته زراعت. دانشگاه تربیت مدرس.

قدرتی، غ.ر.، و میرزائی ندوشن، ح. (۱۳۷۶). بررسی تنوع ژنتیکی و سیتوژنتیکی در توده‌های بهاره بومی گلرنگ ایرانی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تربیت مدرس.

Abel, G.H. and Driscoll, M.F. (1976). Sequential triats development and breeding for high yield. Crop Sci., 16: 213-216

Ashri, A., Zimmer, D.E. Lurie, A. Chaner, A. (1976). Evaluation of the world collection of safflower for yield and yield components and their relationship. Crop. Sci, 14: 799-802

Digming, K., Yuguand, J. (1993). Principal component of agricultural properties of 30 safflower cultivar. Third international safflower conf. China. 572-520.

Ghorpade, D.S., Tambe, S.L. Shinde, P.B. and Zope, R.E. (1993). Variability pattern in agro morphological characteristics in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Indian J. Genet, 53, 264-268.

Guo Yahai, X., and Lianlu, L. (1992). The relations between yield formation and development of flowering parts as well as growth of branches and leaves. Thied International Safflower conf. Beijing. China. 465-477.

Johnson, C., Ghorpade, P.B. and Bradley, V.L. (2001). Evaluation of the (U.S.D). A core safflower collection for seven quantitative traits. The international safflower conference, USA.

Khidir, M.O. (1974). Genetic variability and interrelation of some quantitative characters in safflower, J. Agric. Sci, 83: 197-202.

Kumar, H., Agrawal, R.K. Singh, R.B. and Singh, R.M. (1982). Correlation and path analysis of oil in safflower. Malayr. Appl. Biol, 11: 19-25.

Paliwal, R., Solahki, V. (1984), Path coefficient in safflower. Agri. J, 71(4): 257-258.

Solanaki, Z.S, and Paliwal, R.V. (1979). Correlation and path coefficient analysis in safflower Agri. J, 66: 558-560.

Tuncturk, M. and Vahdettin, C. (2004). Relationship among traits using correlation and path coefficient analysis in safflower. Asian Journal of plant Sciences, 3 (6): 683-686.

Weiss, E.A. (2000). Oil Seed Crops. Blackwell Science Ltd.. Oxford, London.

Yazdi-Samadi, B. and Abd–Mishani, C. (1989). Cluster analysis in safflower. Second international safflower conf. India. 1119-1125.

Yoguoy, J., Dingming., K. Yunfen., J. and Jikeng. Z. (1993). The analysis of the growth of safflower. Third Int. safflower conf. Bijing. china. 481-488.

Path analysis of grain yield, its components, and some morphological characterstics in spring safflower (*Carthamus tinctorius* L.)

Dadashi, M.[1], Ahmadzade, A.[2], Majidi, I.[3], Mohammadi BandarKheyli, A[1]., Alizade, B.[3]

1. Department of agriculture, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Iran
2. Department of agriculture, Islamic Azad University, Shabestar Branch, Shabestar, Iran
3. Agricultural Biotechnology Research Institute Karaj, Iran

Abstract

In order to study the correlation between grain yield and its components with some morphological characterstics, an experiment was conducted at the research station of Faculty of Agriculture, Islamic Azad University–Shabestar Branch in 2005. This experiment was arranged in a Randomized Complete Block Design with three replications, and 15 traits were measured. The results of analysis of variance showed that significant difference exist among genotypes in almost traits. Positive and significant relationships were found among grain yield with plant height, hectoliter weight, biological yield and oil yield but non-significant relationship was seen among grain yield with number of head per plant and oil percentage. Stepwise regression and path coefficient analysis of grain yield as dependent variables indicated that plant height, number of seeds per head, 100-seed weight and hectoliter weight had positive and a high effect on the grain yield. The greatest effect was related to the 100-seed weight (0.352) and the least effect was from the number of head per plant (0.138) on grain yield. The main head weight and number of seed per head impacts the most changes on 100-seed weight.

Keywords: Grain yield, Path analysis, Safflower, Correlation.

اثر دگر آسیبی کلزا بر رشد و فرایندهای بیوشیمیایی ریشه و گرهک سویا

*مریم نیاکان[۱]، اعظم احمدی[۱]، عباسعلی نوری نیا[۲]

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

۲. مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان

چکیده

ترکیبات آللوشیمیایی علاوه بر مهار رشد علف‌های هرز بر گیاهان زراعی نیز اثرات نامطلوبی دارد که بایستی در تناوب‌های زراعی مورد توجه قرار گیرد. کلزا از جمله گیاهانی است که دارای توان دگر آسیبی می‌باشد که بخش وسیعی از مناطق شمالی کشور را به خود اختصاص داده است. سویا نیز از جمله گیاهان استراتژیک می‌باشد که پس از کلزا کشت شده و می‌تواند تحت تاثیر ترکیبات آزاد شده از بقایای کلزا قرار گیرد. در این پژوهش اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی کلزا (رقم هایولا ۴۰۱) شامل ۰ (شاهد) ، ۵ ،۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد بر رشد و برخی ترکیبات آلی موجود در ریشه و گرهک سویا (رقم گرگان ۳) ۵۰ روز پس از کاشت در شرایط گلدانی مورد مطالعه قرار گرفت تا چگونگی پاسخ بخش زیر زمینی این گیاه به ترکیبات آللوشیمیایی موجود در عصاره آبی کلزا مورد ارزیابی قرار گیرد. نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش غلظت عصاره کلزا وزن تر و خشک ریشه سویا تفاوت معنی داری نیافت، ولیکن وزن تر و خشک گرهک کاهش را طی نمود. همچنین با ازدیاد غلظت عصاره کلزا از میزان پرولین ریشه و گرهک و نیز پروتئین ریشه سویا کاسته و با افزایش غلظت عصاره بر میزان پروتئین گرهک سویا افزوده شد. همچنین ترکیبات فنلی ریشه سویا نیز همسو با افزایش غلظت عصاره کلزا افزایش یافت ولیکن از مقدار این ترکیبات در گرهک کاسته شد که این کاهش قابل ملاحظه بود.

کلمات کلیدی: پروتئین، پرولین، دگرآسیبی، ریشه، سویا، فنل، قندهای محلول، کلزا، گرهک

مقدمه

آللوپاتی، تولید و آزادسازی ترکیبات شیمیایی سمی توسط یک گونه و اثر آن بر روی گونه‌های حساس گیرنده است که از جنبه‌های مختلف علمی مورد بررسی قرار گرفته است. پیشرفت‌های اخیر در زمینه زیست‌شناسی گیاهی، آللوشیمی را به عنوان یک توجیه عمیق اکولوژیکی و زیستی در ارتباط گیاه با گیاه معرفی می‌کند. این پیشرفت‌ها، همچنین فهم تغییرات مولکولی و بیوشیمیایی که توسط آللوکمیکال‌ها در گونه‌های گیاهی القا می‌شود و مکانیسم‌های پیچیده‌ای که توسط گیاهان مقاوم به آللوکمیکال‌ها استفاده می‌شود را آسان می‌سازد (Wire et al., 2004).

آللوکمیکال‌ها فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی متعددی را نظیر بازدارندگی رشد و جوانه‌زنی، بازدارندگی تقسیم و رشد طولی سلول، بازدارندگی رشد القاء شده با

*e.mail: mnniakan@yahoo.com

ژیبرلین یا اکسین، بازدارندگی فتوسنتز، بازدارندگی یا تحریک تنفس، بازدارندگی سنتز پروتئین و متابولیسم اسیدهای آلی، تغییر تراوایی غشاء، بازدارندگی سنتز لگ هموگلوبین در گرهک و بازدارندگی فعالیت آنزیم‌های ویژه‌ای را بر عهده دارند تحقیقات نشان داده است که ترکیبات آللوشیمی قادرند بر سنتز پروتئین تاثیر گذارند. برخی از آنها سبب افزایش میزان پروتئین می‌گردند و برخی دیگر مقدار آن را کاهش می‌دهند (Lee & Prisbylla, 1996).

همچنین ترکیبات آللوکمیکال با تاثیر بر نفوذپذیری غشاء موجب کاهش آب موجود در سلول و افزایش فشار اسمزی می‌گردند (Galindo & Dayan, 1999). یکی از اسیدهای آمینه فعال در پدیده تنظیم اسمزی پرولین می‌باشد که در ایجاد و حفظ فشار اسمزی درون گیاه نقش بسزایی دارد. پرولین یک اسید آمینه غیر ضروری است که به کمک آنزیم هیدروژناز از اسید گلوتامیک سنتز می‌شود (Handa et al., 1986).

ترکیبات فنلی به عنوان مولکول‌های آنتی اکسیدان عمل می‌کنند و از عمل اکسیدکننده‌های مخرب جلوگیری می‌نمایند. گزارشات نشان داده است که آللوکمیکال‌ها با کاهش ترکیبات فنلی در گیاه گیرنده باعث افزایش گروه‌های اکسیژن فعال در گیاه می‌شوند که بر رشد و نمو گیاه اثر سوئی دارد (Rajesh, 20004).

تحقیقات نشان داده است که گونه‌های خانواده شب بو از جمله کلزا توانایی ممانعت از جوانه‌زنی و رشد سایر گیاهان را دارا هستند که طی نتایج به دست آمده از آزمایشات، مشخص گردیده است که گلوکوزینولاتهای موجود در این گیاهان، سبب بروز این اثرات می‌گردد. وجود این ترکیبات اغلب سبب بروز طعم تند و بوی گزنده اندام‌های آنها می‌شود. گلوکوزینولات‌ها توسط آنزیم گلوکوزینولاز و یا تیوگلوکوزیداز به گلوکز، HSO_4 و یکی از ترکیبات و مشتقات گلیکون هیدرولیز می‌گردند.همچنین در سلول‌های کلزا آنزیم میروزیناز (Myrosinase) با نام علمی تیوگلوکوسیداز وجود دارد. این آنزیم قادر است گلوکز، گوگرد و سولفات را از گلوکوزینولات تجزیه کند (Zukalova & Vasak, 2002).

سویا نیز از جمله گیاهانی است که به واسطه کیفیت لیپید و پروتئین های موجود در دانه، سطح وسیعی از زمین های زراعی را به خود اختصاص داده است. ریشه این گیاه قادر به همزیستی با باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن از طریق تشکیل گرهک می‌باشد. فاکتورهای متعددی بر تشکیل گرهک و تثبیت نیتروژن اثر می‌گذارند که هورمونها، دما، آللوکمیکال‌ها و استرسها از این جمله‌اند. آزمایشات متعددی در مورد اثرات آللوپاتیک بر فرایند تثبیت نیتروژن و گرهک‌زایی گیاهان صورت گرفته است. تحقیقات نشان داده است که خاصیت آللوپاتی سبب بازدارندگی گرهک‌زایی و تثبیت نیتروژن می‌شود (میقانی، ۱۳۸۲).

تحقیقات متعددی به کاهش رشد و عملکرد سویا پس از کشت کلزا اشاره دارد (انصاری، ۱۳۸۴؛ تجری، ۱۳۸۴؛ مازندرانی، ۱۳۸۵). هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی کلزا بر رشد و تغییرات میزان پروتئین، پرولین و ترکیبات فنلی ریشه و گرهک سویا می‌باشد تا از این طریق چگونگی برخی از پاسخهای بیوشیمیایی این دو بخش با یکدیگر مقایسه و مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

از نمونه‌های کلزای کشت شده (رقم هایولا ۴۰۱) در مزرعه مرکز تحقیقات و کشاورزی گرگان واقع در کیلومتر ۵ جاده گرگان- آق قلا جهت آزمایش استفاده شد.

تهیه عصاره آبی از بقایای کلزا

در اواسط مرحله زایشی تعدادی از بوته‌های کلزا (رقم هایولا ۴۰۱) از مزرعه مرکز تحقیقات کشاورزی گرگان واقع در کیلومتر ۵ جاده گرگان-آق قلا برداشت و پس از شستشو با آب، در سایه خشک و سپس آسیاب شدند. برای تهیه

عصاره آبی کلزا از مخلوط پودر اندام هوایی و ریشه استفاده شد. به ۵ گرم پودر خشک کلزا، ۱۵۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۱۲ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد.عصاره‌ها از پارچه تنزیب چهار لایه ونیز جهت ایجاد شرایط استریل، از کاغذ صافی نایلونی ۰/۲ میکرونی عبور داده شد.از مایع صاف شده به عنوان عصاره آبی با غلظت ۱۰۰ درصد استفاده گردید (Narwal & Tauro, 1996). از این عصاره چهار غلظت ۵ و ۱۰ و ۱۵ و ۲۰ درصد تهیه شد. به منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی کلزا بر پارامترهای رشد، برخی از ترکیبات آلی موجود در ریشه و گرهک سویا از بذرهای کاشته شده سویا (رقم گرگان ۳) تحت شرایط گلدانی استفاده شد.

کاشت سویا در گلدان

ابتدا بذرهای سویا رقم گرگان ۳ با آب ژاول ۳ درصد ضدعفونی شد. سپس به منظور جوانه‌زنی، بذرها به مدت ۳ الی ۴ روز خیسانده شدند. در مرحله بعد محلول ۲۰ درصد قند تهیه شد و سطح بذرها به باکتری ریزوبیوم ژاپونیکوم آغشته شدند. پس از انجام مراحل فوق، بذرها در گلدان‌هایی با قطر ۲۰ سانتیمتر و ارتفاع ۱۷ سانتیمتر که حاوی پنج کیلوگرم ماسه و خاک به نسبت ۳:۱ بودند، کاشته شدند. محل نگهداری گلدان‌ها طبق شرایط آب و هوای گرگان دمای ۲±۱۸ درجه سانتی‌گراد در فضای باز و در معرض نور خورشید و به دور از بارندگی بود.

پس از اینکه دانه رست‌ها سر از خاک درآوردند، عصاره‌دهی آغاز شد بدین ترتیب که ۲۰ میلی‌لیتر عصاره آبی کلزا در غلظت‌های ۰ (شاهد)، ۵، ۱۰، ۱۵، و ۲۰ درصد هر یک روز در میان در طی ۸ هفته صورت گرفت. پس از آن سویاها به صورت کامل از خاک جدا شده و به آزمایشگاه منتقل شدند.

تعیین وزن تر و خشک ریشه و گرهک

پس از جداسازی اندام‌های هوایی، ریشه و گرهک گیاهان تحت تیمار، غلظت‌های متفاوت عصاره آبی کلزا در ابتدا توسط آب مقطر شسته و سپس خشک گشته و وزن تر آنها توسط ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد.

جهت تعیین وزن خشک ریشه و گرهک سویا، بخش‌های موردنظر به مدت ۲۴ ساعت در اون ۹۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و سپس وزن خشک آنها تعیین شد.

سنجش میزان پرولین

جهت سنجش پرولین، ابتدا نمونه‌های ریشه و گرهک را ازهر تیمار جدا گشته و میزان پرولین آنها توسط روش (Bates, 1973) تعیین شد.

سنجش پروتئین کل

پس از جدا سازی گرهک از ریشه، نمونه‌ها در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت، خشک شدند. سپس میزان پروتئین کل آنها مطابق با روش لوری (Lowry, 1951) مورد ارزیابی قرار گرفت.

سنجش ترکیبات فنلی

جهت سنجش میزان ترکیبات فنلی در گرهک و ریشه سویا از روش (Matta et al., 1963) استفاده شد.

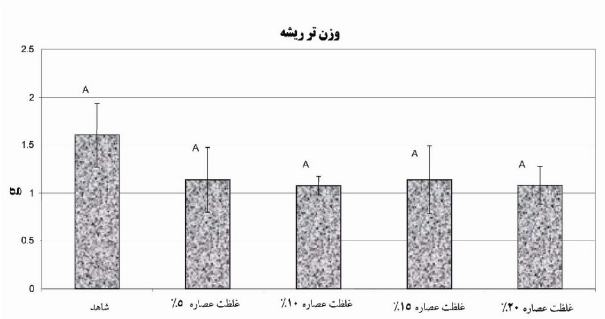
روش محاسبه آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از طرح بلوکهای کامل تصادفی در چهار تکرار انجام شد. همچنین مقایسه بین تیمارها و شاهد بر اساس آزمون دانکن در سطح $P\leq ۰/۰۵$ توسط برنامه آماری SAS صورت گرفت. رسم نمودارها با کمک نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

در این تحقیق وزن تر ریشه سویا با افزایش غلظت عصاره آبی کلزا کاهش یافت که این کاهش معنی دار نبود (نمودار ۱ و ۲). همچنین با افزایش غلظت عصاره آبی کلزا،

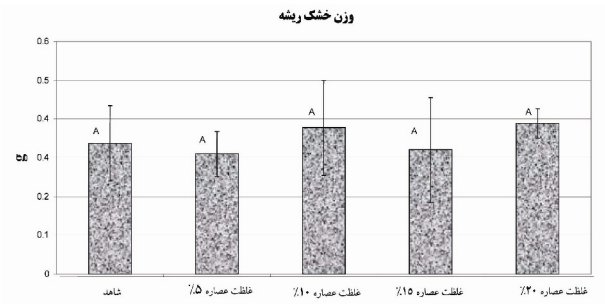
وزن تر گرهک کاهش یافت. بیشترین میزان وزن تر در گرهک‌های سویای شاهد و کمترین آن در گرهک‌های سویا در تیمار۲۰ درصد عصاره کلزا مشاهده شد. از سوی دیگر میزان وزن خشک گرهک سویا در شاهد نسبت به تیمار ۲۰ درصد افزایش یافت که این افزایش نیز معنی دار نبود (نمودار ۳ و ۴).



نمودار ۱: تغییرات وزن تر ریشه سویا تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی کلزا

* حروف غیر مشابه بر روی ستون‌ها تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال ۵٪ آزمون دانکن است.

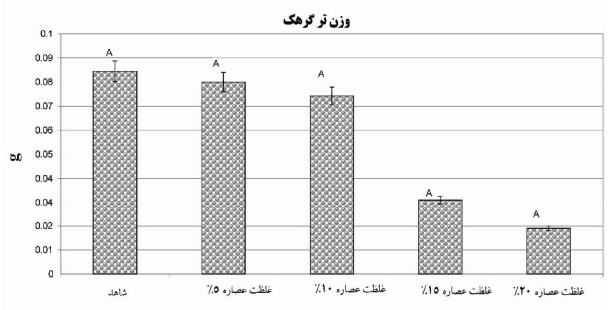
I: مقدار SE



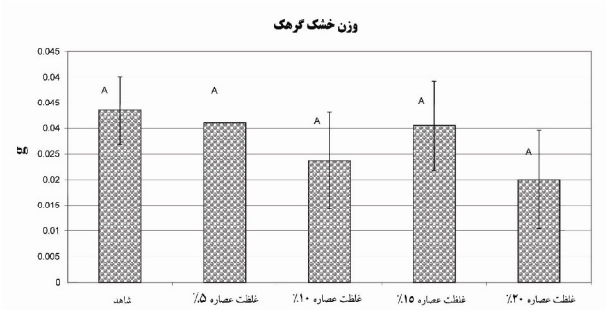
نمودار ۲: تغییرات وزن خشک ریشه سویا رقم تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی کلزا رقم هایولا

* حروف غیر مشابه بر روی ستون‌ها تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال ۵٪ آزمون دانکن است.

I: مقدار SE



نمودار ۳: تغییرات وزن ترگرهک سویا رقم تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی کلزا



نمودار ۴: تغییرات وزن خشک گرهک سویا رقم تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی کلزا رقم هایولا

عنوان شده است که ریشه نسبت به ساقه، حساسیت بیشتری به آللوکمیکال‌ها نشان می‌دهد، زیرا ریشه‌ها ابتدا آللوکمیکال‌ها یا ترکیبات سمی را از محیط جذب می‌کنند. علاوه بر بازدارندگی طویل شدن ریشه، ساختار غیرطبیعی در ریشه در نتیجه تیمار با عصاره‌ها بوجود می‌آید (Turke & Tawah, 2002)

رشد طولی گیاه می‌تواند تحت تاثیر عوامل هورمونی کنترل کننده طویل شدن سلول و نیز پدیده تقسیم سلولی قرار گیرد. آللوکمیکال‌ها می‌توانند از عمل هورمون‌های کنترل کننده رشد، جلوگیری به عمل آورند (Bais et al., 2003).

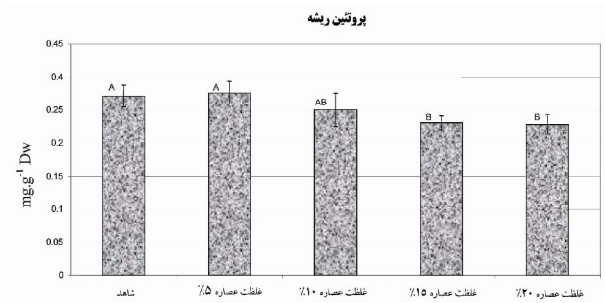
در تحقیقی مشخص شد که بعضی از فلاونوئیدها، با بازدارندگی انتقال قطبی اکسین در سطح طبیعی اختلال ایجاد کرده و منجر به سرکوب رشد و ایجاد ساختار غیرطبیعی ریشه می‌شوند (Brunn, et al., 1992).

Putnam (۱۹۸۵) و Einhelling (۱۹۹۵) گزارش نمودند، گاز سیانید هیدروژن که از تجزیه گلیکوزیدهای سیانوژنیک تولید می‌شود، بازدارنده قوی عمل میتوکندری است. این ترکیب از جوانه زدن بسیاری از دانه‌ها ممانعت نموده و بازدارنده رشد ریشه نیز می‌باشد.

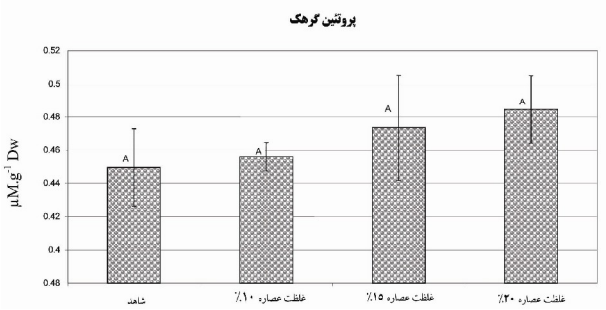
مکانیسم‌های مختلفی در کاهش رشد گیاهان، تحت اثر ترکیبات آللوپاتیکی شناخته شده است. از جمله، افزایش القاء آنزیم‌های دیواره‌ای مانند پراکسیدازهای محلول، پلی فنل اکسیدازها و فنل آلانین آمونیالیاز که در نتیجه فعالیت آنها، دیواره‌ها سخت شده و رشد کاهش می‌یابد. همچنین ترکیبات آللوپاتیکی ممکن است با اختلال در جذب آب، املاح و نور و ایجاد اختلال در عملکرد هورمون‌ها باعث کاهش رشد شوند (Al-Khatib et al., 1997).

در این تحقیق مشاهده گردید که رشد گرهک سویا نیز تحت تاثیر ترکیبات اللوکمیکال موجود در عصاره آبی کلزا قرار گرفت و حتی نسبت به ریشه حساس تر می‌باشد.

نتایج مقایسه میانگین میزان پروتئین ریشه سویا نشان داد با افزایش غلظت عصاره آبی کلزا میزان پروتئین ریشه کاهش یافت (نمودار ۵) بیشترین میزان پروتئین ریشه مربوط به تیمار ۵ درصد و کمترین آن مربوط به تیمار ۲۰ درصد عصاره آبی می‌باشد. میانگین تغییرات پروتئین گرهک سویا نشان داد که با افزایش غلظت عصاره کلزا برمقدار پروتئین افزوده می‌شود که این افزایش معنی‌دار نیست (نمودار ۶).



نمودار ۵: تغییرات میزان پروتئین کل ریشه سویا رقم تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی کلزا رقم هایولا



نمودار ۶: تغییرات میزان پروتئین کل گرهک سویا رقم تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی کلزا رقم هایولا

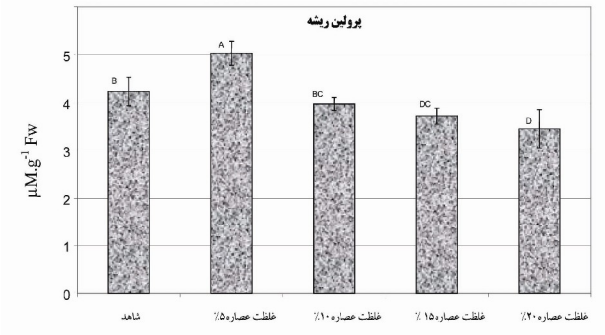
در این راستا تجری (۱۳۸۴) گزارش نمودند عصاره آبی تهیه شده از کلزاهای تحت تنش شوری سبب افزایش میزان پروتئین در مقایسه با شاهد در گیاه سویا گشت.

ترکیبات آللوشیمی می‌توانند بر روی سنتز پروتئین تأثیر گذارند. بعضی از این ترکیبات باعث افزایش میزان پروتئین می‌گردند و برخی دیگر مقدار آن را کاهش می‌دهند.

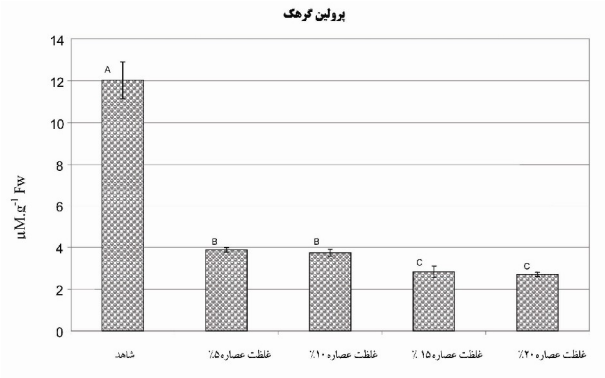
Tripathi (۱۹۹۸) گزارش نمود میزان پروتئین در برگهای سویا تحت تیمار با عصاره آبی برگهای درخت ابریشم و آکاسیا در غلظت ۵ و ۱۰ درصد افزایش یافت. همچنین وی با آزمایشات خود نشان داد که ترکیبات آلکالوییدی نظیر تانن و تیمول بیوسنتز پروتئین را در شرایط آزمایشگاهی کاهش می‌دهند. این آلکالوییدها در اتصال tRNA به اسید آمینه، اتصال اسید آمینه – tRNA به زیر واحد ریبوزوم و یا در مرحله ترجمه، در سنتز پروتئین اختلال ایجاد می‌کنند.

در این تحقیق به نظرمی رسد فرایند سنتز پروتئین در پاسخ به عصاره آبی کلزا در ریشه حساس تر از گرهک می‌باشد.

چنانچه در نمودارهای ۷و ۸ مشاهده می‌شود میزان پرولین در ریشه و گرهک سویا با افزایش غلظت عصاره آبی کلزا کاهش یافت که این روند در گرهک قابل ملاحظه بود.



نمودار ۷: تغییرات میزان پرولین ریشه سویا تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی کلزا رقم هایولا



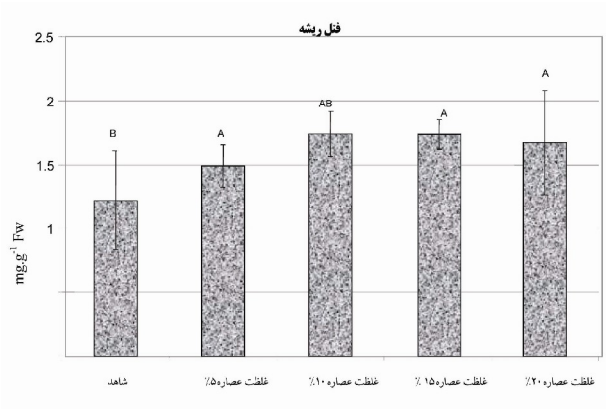
نمودار ۸: تغییرات میزان پرولین گرهک سویا تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی کلزا رقم هایولا

تجری (۱۳۸۴) گزارش نمود عصاره آبی تهیه شده از کلزاهای تحت تنش شوری، سبب کاهش میزان پرولین در مقایسه با شاهد شده است.

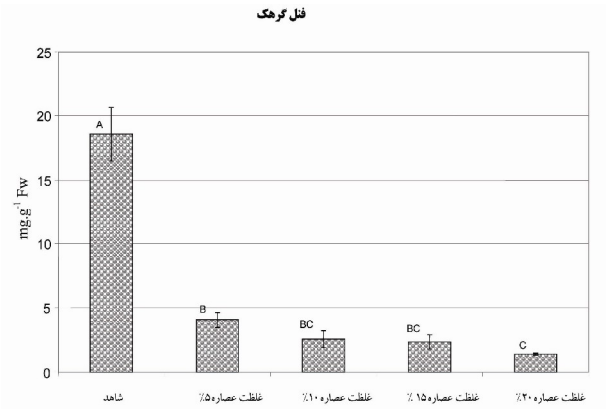
یکی از تنظیم کننده‌های اسمزی، پرولین است که افزایش آن موجب سازش سلول گیاهی برای زنده ماندن در شرایط تنش‌زا و حفاظت از آنزیم‌های سیتوزولی و ساختارهای مختلف سلولی می‌شود. تنش‌ها خصوصا تنش خشکی سبب افزایش محتوای پرولین در برگها و گرهک‌های بقولات می‌شود واساس بیوشیمیایی تجمع پرولین، هم به علت افزایش سنتز گلوتامات و هم کاهش اکسیداسیون آن است (Kohi et a., 1991).

در این تحقیق مشاهده گشت که میزان پرولین گرهک ها نیز دستخوش تغییرات معنی‌داری شد. در این رابطه می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که ترکیبات آللوکمیکالی موجود در عصاره کلزا اثر بازدارنده بر فرایند تثبیت نیتروژن داشته که بازتاب آن به شکل کاهش سنتز و میزان پرولین آشکار گشته است.

سنجش میزان ترکیبات فنلی در ریشه گیاهان سویا نشان داد که با افزایش غلظت عصاره کلزا بر میزان این ترکیبات افزوده می‌شود (نمودار ۹). همچنین چنانچه در نمودار ۱۰ مشاهده می‌شود با افزایش غلظت عصاره آبی کلزا به طور معنی داری از میزان ترکیبات فنلی در گرهک کاسته شده است.



نمودار ۹: تغییرات میزان ترکیبات فنلی ریشه سویا تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی کلزا رقم هایولا



نمودار ۱۰: تغییرات میزان ترکیبات فنلی گرهک سویا تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی کلزا رقم هایولا

گزارش شده است میزان ترکیبات فنلی در دانه رست‌های سویا که تحت تاثیر عصاره آبی تهیه شده از کلزا قرار گرفتند، نسبت به شاهد بیشتر بوده است (تجری، ۱۳۸۴).

در گرهک سویا، محتوای ترکیبات فنلی نمونه هایی که تحت تاثیر غلظت‌های ۲۰ و ۱۵ درصد عصاره کلزا قرار گرفته اند، نسبت به شاهد کاهش معنی داری داشت. بدین معنی که افزایش غلظت عصاره سبب کاهش معنی داری در محتوای ترکیبات فنلی گشت (نمودار ۱۰).

مازندرانی (۱۳۸۵) گزارش نمودند محتوای ترکیبات فنلی در دانه رست هایی که تحت تاثیر عصاره آبی کلزاهای قرار گرفتند نسبت به آب مقطر کمتر است.

مشخص گردیده است که ترکیبات فنلی نظیر تانن‌ها، فلاونوییدها و ... نقش آنتی اکسیدانی دارند و از عمل اکسیدکننده‌های مخرب جلوگیری می‌کنند. در برخی از تحقیقات دیده شده است که آللوکمیکال‌ها سبب کاهش ترکیبات فنلی می‌شوند، که این امر باعث افزایش گروههای اکسیژن فعال در گیاه گیرنده شده و روی رشد و نمو گیاه مورد نظر اثر دارد (Rajesh, 2004).

نتیجه‌گیری نهایی

در این تحقیق مشخص گردید که ریشه و گرهک پاسخ‌های متفاوتی نسبت به ترکیبات آللوکمیکالی موجود در عصاره آبی کلزا به نمایش گذاشتند. کاهش معنی دار وزن تر گرهک در مقایسه با ریشه و نیز روند نزولی قابل ملاحظه در میزان ترکیبات فنلی به عنوان ترکیبات آنتی اکسیدان در گرهک از یک سو و نیز کاهش میزان پرولین در آن از سوی دیگر نمایانگر حساس بودن رشد و نیز فرایند تثبیت نیتروژن در گرهک در پاسخ به اثر اللوپاتیکی کلزا را آشکار می‌سازد.

منابع

انصاری، م. (۱۳۸۴) اثر عصاره آبی و پوسانده دو رقم کلزا (PF, Hyola 401) بر جوانه‌زنی گندم، سویا و جو. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان.

تجری، م. (۱۳۸۴) بررسی اثر شوری بر توان آللوپاتیک کلزا از طریق مطالعه پارامترهای رشد، برخی از ترکیبات آلی و فعالیت‌های آنزیمی و نیز درصد جوانه‌زنی سویا و علف هرز گاو پنبه.پایان‌نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

مازندرانی، م. (۱۳۸۵) بررسی اثر آسکوربات بر توان آللوپاتیک کلزا از طریق مطالعه درصد جوانه زنی، رشد و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی دو رقم سویا (سپیده و DPX). پایان نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان.

میقانی، ف. (۱۳۸۲) دگر آسیبی از مفهوم تا کاربرد. انتشارات پرتو واقعه. صفحه ۱۲۴.

Al-Khatib, K., Libbey, C. and Boydston, R. (1997). Weed suppression with *Brassica* green manure crops in green Pea. Weed Science 45:439-445.

Bais, H.P., Vepachedu, R., Gilroy, S., Callaway, R.M. and Vivanco, J.M. (2003). Allelopathy and exotic plants invasion: From molecules and genes to species interactions. Scienc 301:1377–1380

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

Brunn, S.A., Muday, G.K., and Hawarth, P. (1992). Auxin transport and the interaction of phytotropins. Plant Physiol. 98: 101-107.

Einhelling, F.A. (1995). Interactions involving allelopathy in cropping systems.Agronomy Journal.88:886-893.

Galind, J., and Dayan, F.E. (1999). Dehydrozahizanin C, a natural sesquiterpenoide, causes rapid plasma membrane leakage. Phytochemistry. 52: 805-519

Handa, S., Handa. A.K., Hassegawa P.M. and Bressan, R.A. (1986). Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cell to water stress. Plant Physiology 80: 938-945.

Kohi, D.H., Kennelly, E.J., Zhu, Y.X., Schubert, K.R., and Sheare,G. (1991). Proline accumulation, nitrogenase (C2H2, reducing) activity, and activities of enzymes related to prolin metabolism in drought stressed soybean nodules. J. Exp. Bot. 42: 831-837.

Lee, P.L., and Prisbylla, M.P. (1996). The discovery and structural requirements of inhibitors of p-hydroxypyruvate dioxygenase. Weed Science, 45: 601-609.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall. R.J. (1951). Protein measurement with the foline phenol reagent. Journal of Biology and Chemistry 193: 256 – 275.

Matta, A.J. and Giai, I. (1969). Accumulation of phenols in tomato plant as effected by different forms of *Fusarium oxysporum. Planta* 50: 512-513

Einhelling,F.A.(1995). Interactions involving allelopathy in cropping systems.Agronomy Journal.88:886-893.

Narwal, S.S., and Tauro, P. (1996). Allelopathy in pests management for sustainable agriculture. Proceeding of the International Conference on Allelopathy, Vol.2

Putnam, A.R., and Weston, L.A. (1985). Adverse impacts of allelopathy in agricultural systems. In the Science of Allelopathy, ed. A.R. Putnam and Tang, S.C., U.S.A: John Wiley and sons. Inc.

Rajesh , K . T . (2004) . Macro nutrient deficiential antioxidant responses – influence on the activity and expression of superoxide dismutase in maize . Plant Science . P : 687-694 .

Tripathi, S., Tripathi, A., Kori, D.C., and Tiwari, S. (1998). Effect of tree leaves aqueous extracts on germination and seedling growth of soybean: Allelopathy J. 5:75-82.

Turk, M.A.,and Tawaha, A.M. (2002). Inhibitory effects of aqueous extracts of black mustard on germination and growth of lentil pak. J. Agronom. 1. 28-30.

Wire, T.L., Park, S.W., and Vivanco, J.(2004). Biochemical and physiological mechanisms mediated.Sience.85:(45-66)

Zukalova, H. and Vasak,J.(2002). The role and effects of glucosinolates of Brassica species_ review. Rost Vyr. 48:175-180.

Effect of canola allelopathy on growth and biochemical reactions in root and nodule of soybean

Niakan, M[1]., Ahmadi, A[1]., Norinia, A.A[2].

1. Department of biology, Islamic Azad University, Gorgan-Branch. Gorgan, Iran
2. Agricultural and Natural Research Center of Golestan Province, Gorgan, Iran

Abstract

Allelochemical compounds inhibit weed growth and have undesirable effects on crop plants that should attended in croprotation. Canola is a allelopathic plant that is cultivated in north of Iran .Soybean is a strategic plant that is planted after canola and be affected by released compounds of canola residue. In this research effect of different concentrations of aqueous extract of canola (cv Hyolla 401) includes 0(control), 5%, 10%, 15% and 20% on growth and some of the organic compounds such as soluble sugars, proline, protein, phenolic compounds in root and nodule of soybean (cv Gorgan 3) after 50 days were studied until their response to canola allelochemicals were evaluated. The results showed that by increasing of canola extract concentration fresh and dry weight soybean root did not change significantly while in nodule increased. Amounts of proline and total protein in soybean root in higher concentrations decreased and in nodule also decreased mostly. By increasing extract concentration of canola phenolic compounds in root increased but in nodule decreased that was significant.

Key words: Allelopathy, Canola, Nodule, Phenole, Proline, Protein, Root, Soybean, Soluble sugars

مطالعه تغییرات میزان آنزیم‌های پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز در دو رقم سویا (*Glycine max* L. merr) تحت تنش آبی

*حسن مدرس زاده، محمدعلی رضایی، مه‌لقا قربانلی

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

چکیده

رقم‌های مختلف از یک گونه، آنزیم‌های مختلفی را به منظور مقابله با تنش فعال می نمایند که شامل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز، آسکوربات پراکسیداز بوده و نقش مهمی را در دفاع از گیاهان در برابر انواع اکسیژن واکنشگربازی می‌کنند. هدف از این پژوهش، مطالعه تفاوت رفتاری آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز وآسکوربات پراکسیداز در دو رقم سویا شامل پرشینگ و DPX در برابر تنش خشکی و غرقابی وبررسی اثر تنش‌های مختلف آبی بر روی میزان فعالیت آنزیم‌های مذکور بود. درنتیجه آزمایشی در شرایط گلدانی انجام گرفت و تیمارهای آبی ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درصد ظرفیت اشباع آب خاک بر روی آنها اعمال گردید. فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی تفاوتهایی را از نظر نوع تنش و نوع اندام نشان دادند، به نحوی که فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه و گرهک تحت دو تنش غرقابی و خشکی افزایش یافت، اما در برگ فعالیت آنزیم تحت تنش خشکی و غرقابی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد و تنها در رقم پرشینگ، فعالیت آنزیم در تنش خشکی افزایش معنی‌داری را نشان داد. فعالیت آنزیم کاتالاز در دو اندام برگ و ریشه در رقم DPX در تنش غرقابی و در رقم پرشینگ در تنش خشکی افزایش یافت و در سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ به ازاء کاهش میزان آبیاری کاهش یافت، اما در ریشه فعالیت آنزیم نامبرده در رقم DPX تحت تنش غرقابی و در رقم پرشینگ تحت تنش خشکی افزایش معنی‌داری را نشان داد. نتایج مطالعات مشخص نمود که فعالیت آنزیم می تواند با توجه به نوع رقم، نوع تنش وحتی نوع اندام مورد مطالعه متفاوت باشد

کلمات کلیدی: آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز، تنش آبی، سویا، کاتالاز

مقدمه

تنش خشکی موجب افزایش تولید انواع اکسیژن واکنشگر و در نتیجه افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌شود (Smirnoff, 1993). همچنین کمبود شدید آب باعث اختلال در ارتباط بین پروتئین‌ها و لیپیدهای غشایی شده و منجر به کاهش فعالیت آنزیمی و ظرفیت انتقالی در دو لایه لیپیدی غشاء می‌شود (Yordanov et al., 2003).

اثر تنش خشکی بر روی پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی در تعدادی از گیاهان مانند گندم، برنج، سیب‌زمینی، علف‌های وحشی، گوجه‌فرنگی و ذرت مطالعه شده است. مطالعات

*e.mail: hasan_jelin@yahoo.com

نشان می‌دهد که پاسخ‌های اکسیدانی به حساسیت و مقاومت رقم‌های مورد مطالعه مربوط است (Alexieva et al., 2001). تحریک فعالیت‌های لیپولیتیک در گونه‌های حساس به خشکی در مقایسه با گونه‌های مقاوم به خشکی بیشتر است (Yordanov et al., 2003).

H_2O_2 به دلیل داشتن اثرات اکسیداتیو در متابولیسم گیاهان مضر بوده و توسط فعالیت کاتالاز از بین می‌رود. کاتالازها از سلول‌ها در برابر اثرات H_2O_2 محافظت کرده و نقش مهمی در افزایش مقاومت به استرس اکسیداتیو در شرایط نرمال بر عهده دارند (Ames و همکاران، ۱۹۹۳).

Halliwell & Cuteridge (۱۹۹۰) گزارش کردند که در محصولات دانه روغنی نظیر آفتابگردان، میزان رادیکال‌های آزاد نظیر سوپراکسید و پراکسید در بافت‌ها تحت تنش خشکی افزایش می‌یابد. در نتیجه باعث تخریب لیپیدها در گیاه شده و میزان بازدهی آن را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

مطالعات نشان داده است که درتنش خشکی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در نخود مهار شده، اما باعث تحریک فعالیت آنزیم پراکسیداز گردید. در گندم نیز اعمال تنش خشکی، باعث سرکوب فعالیت هر سه آنزیم مذکور گردید (Alexieva et al., 2001).

همچنین آزمایشات انجام شده بر روی ذرت نشان داد تنش خشکی اثر کمی بر روی فعالیت آنزیم‌های سرکوب کننده H_2O_2 مانند آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در سلول‌های مزوفیل، غلاف آوندی و کل بافت برگ داشته است (Brown, 1995). تنش آبی باعث افزایش ABA شده و ABA به عنوان یک سیگنال استرس عمل می‌کند و نقش مهمی در تنظیم پاسخ گیاهی در کل گیاه تا سطح سلول، بازی می‌کند (Jiang & Zhang, 2002). اسید آبسیزیک موجب افزایش تولید O_2^- (Jiang & Zhang, 2001)، H_2O_2 (Zhang et al., 2001) و القاء بیان ژن‌های کد کننده MnSOD و CuZn SOD (Kaminaka et al., 1999) و CAT (Guan et al., 2000) می‌شود.

مطالعات Baisak و همکاران (۱۹۹۴) بر روی برگ‌های اولیه گندم با استفاده از PEG نشان داد که تنش آبی باعث افزایش در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در آغاز آزمایش گردید، اما با گذشت زمان، فعالیت آن کاهش یافت. میزان فعالیت آسکوربات پراکسیداز نیز در زمان مواجهه گیاه با تنش ملایم افزایش داشته، اما میزان فعالیت آن در برابر تنش شدید آبی کاهش یافت (Baisak et al., 1994).

نتایج مطالعات Habibi و همکاران (۲۰۰۲) بر روی پنج رقم آفتابگردان در دو سطح شاهد و تنش خشکی تفاوت معنی‌داری از نظر میزان فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در سطح ($P<۰/۰۱$) نشان داد، به نحوی که فعالیت همه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در همه رقم‌های موردمطالعه تحت تنش خشکی افزایش داشت، اما ارتباط مثبتی بین ثبات محصول و فعالیت سه آنزیم در رقم‌ها وجود نداشت. در یکی از رقم‌های مورد مطالعه (Record) که بالاترین میزان فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز را از خود نشان داد، کمترین درصد جوانه‌زنی و بازدهی محصول در بین سایر رقم‌ها داشته و نتیجه گرفتند که انتخاب رقم مقاوم به خشکی با استفاده از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ممکن نیست. (Casano et al., 1997). نتایج نشان داده است که در گیاهان مقاوم به شرایط آنوکسی (فقدان اکسیژن) بعد از تیمار با فقدان اکسیژن، فعایت آنزیم‌های مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز (MDHAR) و دهیدروآسکوربات ردوکتاز (DHAR) افزایش یافته است (Biemelt et al., 1998). مطالعات انجام شده بر روی سویا نشان داد که تنش آنوکسیک (anoxic) به مدت یک تا ۲ ساعت تولید سوپراکسید را افزایش داد (Vantoai & Bolles, 19991). آزمایشات انجام شده بر روی ذرت نشان داد که غرقابی باعث کاهش کلروفیل و پراکسیداسیون لیپید شده، بنابراین تولید سوپراکسید و H_2O_2 در برگ افزایش می‌یابد.

درکوتاه مدت، غرقابی فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون ردوکتاز و آسکوربات پراکسیداز را افزایش داده اما در بلند مدت فعالیت این آنزیم‌ها کاهش می‌یابد. تجمع زیاد سوپراکسید بدلیل کاهش فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز تحت تنش غرقابی مشخص شده است (Yan et al., 1996). در دانه‌رست‌های برنج، فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز افزایش معنی‌داری در شرایط غرقابی نشان نداد (Ushimaru et al., 1999). بطور کلی آنزیم‌ها رفتارهای متفاوتی در برابر تنش‌ها از خود نشان می دهند و رقم‌های مختلف از یک گیاه نیز می‌تواند چنین رفتار متفاوتی را ایجاد نمایند. لذا تحقیقی به منظور مطالعه رفتار آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در دو رقم سویا صورت پذیرفت.

مواد و روشها

بذرهای دو رقم سویا شامل پرشینگ و DPX از ایستگاه تحقیقات کشاورزی استان گلستان تهیه و سپس بذور هر یک از رقم‌ها به تعداد 10 عدد بطور جداگانه در داخل ۴۸ گلدان به ابعاد ۲۴×۲۴×۲۴cm کشت داده شدند. خاک درون آن بر اساس آزمایش تجزیه خاک دارای بافت silt-clay و pH حدود ۷/۹ بود. بعد از مشخص کردن ظرفیت اشباع آب خاک، تیمارهای ۸۰ درصد (غرقابی) ۶۰ (شاهد)، ۴۰و۲۰ درصد (خشکی) ظرفیت اشباع در نظر گرفته شد و برای هر یک از تیمارها در هر رقم تعداد ۱۲ گلدان انتخاب گردید. گلدان‌ها در محیط آزاد و مناسبی قرار گرفتند. آبیاری نمونه‌ها بر اساس تیمارهای مذکور بعد از ظهور دانه رست‌ها و برگ‌های اولیه تک برگچه ای در روز هشتم بعد از کشت به فواصل ۵ روز در میان انجام شد و تا مرحله پر شدن دانه ادامه یافت. سنجش مربوط به فعالیت آنزیم ها در روز پانزدهم بعد از کشت انجام گردید. فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از روش (Koroi, 1989)، آنزیم کاتالاز با روش (Chance and Maehly, 1995) و آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز با روش (Arrigoni et al., 1994) مورد سنجش قرار گرفت. محاسبات آماری نمونه‌ها بصورت فاکتوریل در قالب کاملاً تصادفی و با ۴ تکرار صورت گرفت و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از روش دانکن و مراحل تنظیم متن و رسم نمودارها به ترتیب با استفاده از نرم‌افزار Excel و Word انجام شدند.

نتایج

فعالیت پراکسیداز

نمودار ۱،۲،۳ تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ، ریشه و گرهک را در دو رقم پرشینگ و DPX نشان می‌دهد.

برگ

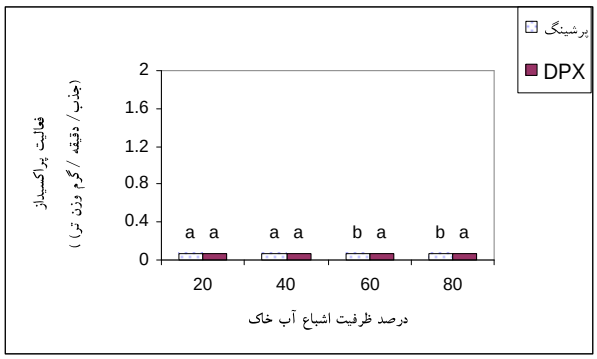
در رقم پرشینگ، مقادیر پایین‌تر آبی (۲۰ و ۴۰درصد) افزایش معنی‌داری را از نظر میزان فعالیت پراکسیداز نشان داد اما در رقم DPX، فعالیت پراکسیدازی بین سایر تیمارها، تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($p<0/05$). در مقایسه بین دو رقم نیز تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مشابه، مشاهده نشد (نمودار ۱).

ریشه

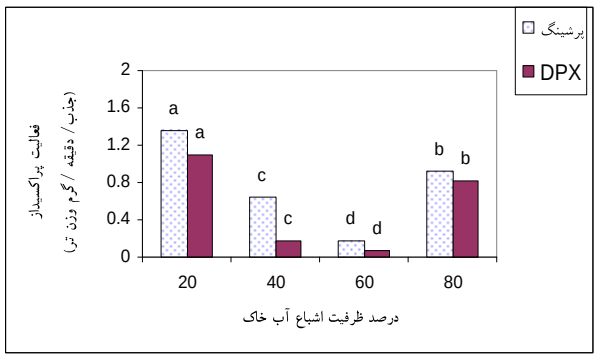
در هر دو رقم بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنزیم به ترتیب مربوط به تیمار ۲۰درصد (خشکی) و ۶۰ درصد بوده است. همچنین فعالیت آنزیم در هر دو رقم، بیشتر تحت تاثیر تنش آبی ۸۰ درصد (غرقابی) و ۲۰ درصد (خشکی) قرار گرفته است (نمودار ۲).

گرهک

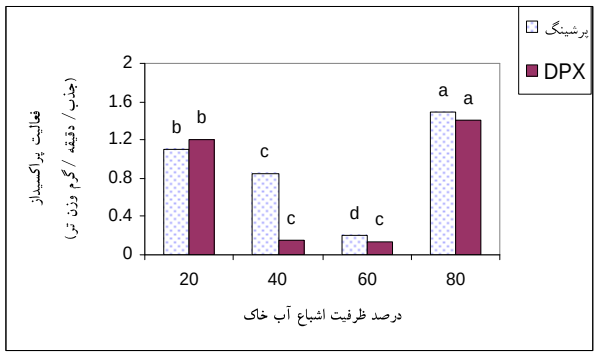
بررسی نتایج نشان داد که در هر دو رقم بالاترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار ۸۰ درصد (غرقابی) بوده است. همچنین در رقم پرشینگ، فعالیت آنزیم در مقادیر پایین‌تر آبی (۴۰ و ۲۰درصد)، تحت تاثیر تنش آبی قرار گرفته و در مقایسه با تیمار ۶۰ درصد، افزایش چشمگیری را نشان می‌دهد. در مقایسه بین دو رقم نیز فعالیت آنزیم در تیمارهای مشابه، اختلاف معنی‌داری نشان ندادند، به غیر از تیمار ۴۰ درصد که رقم پرشینگ، افزایش چشمگیری نسبت به رقم DPX در تیمار مشابه نشان داد (نمودار ۳).



نمودار ۱: تغییرات میزان فعالیت پراکسیداز برگ در دو رقم پرشینگ و DPX



نمودار ۲: تغییرات میزان فعالیت پراکسیداز ریشه در دو رقم پرشینگ و DPX



نمودار ۳: تغییرات میزان فعالیت پراکسیداز گرهک در دو رقم پرشینگ و DPX

آسکوربات پراکسیداز

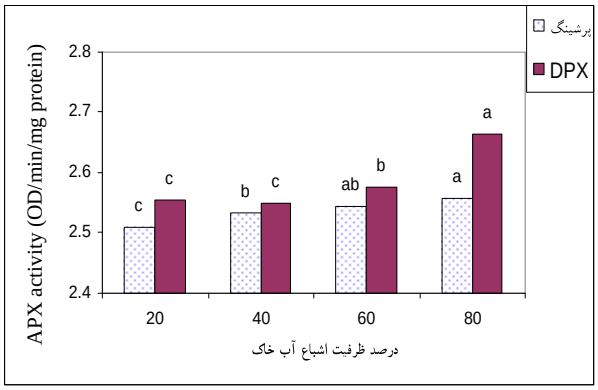
نمودار ۴ و ۵ فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را در دو اندام برگ و ریشه نشان می‌دهد.

برگ

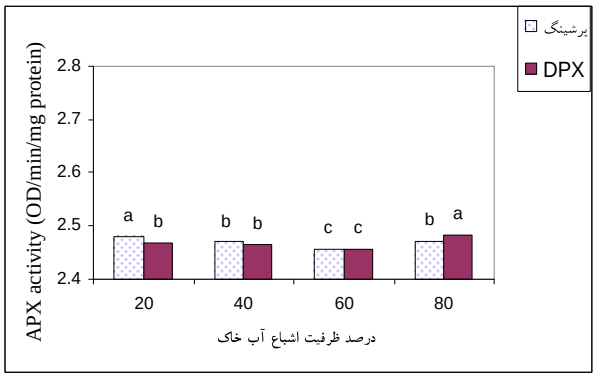
در هر دو رقم، کاهش میزان آبیاری، کاهش معنی‌داری را از نظر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نشان داد ($p<۰/۰۵$) و در مقایسه بین دو رقم فعالیت آنزیم، رقم DPX در همه تیمارها بویژه در تیمار ۸۰درصد (غرقابی) و ۲۰درصد (خشکی) در مقایسه با رقم پرشینگ بیشتر بود (نمودار ۴).

ریشه

در هر دو رقم، تیمار ۶۰ درصد کاهش معنی‌داری را نسبت به سایر تیمارها نشان داد ($p<۰/۰۵$) و بیشترین میزان فعالیت آنزیم در رقم DPX در تیمار ۸۰درصد و در رقم پرشینگ در تیمار ۲۰ درصد در مقایسه با سایر تیمارها مشاهده گردید (نمودار ۵).



نمودار ۴: تغییرات میزان فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX) برگ در دو رقم پرشینگ و DPX



نمودار ۵: تغییرات میزان فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX) ریشه در دو رقم پرشینگ و DPX

کاتالاز

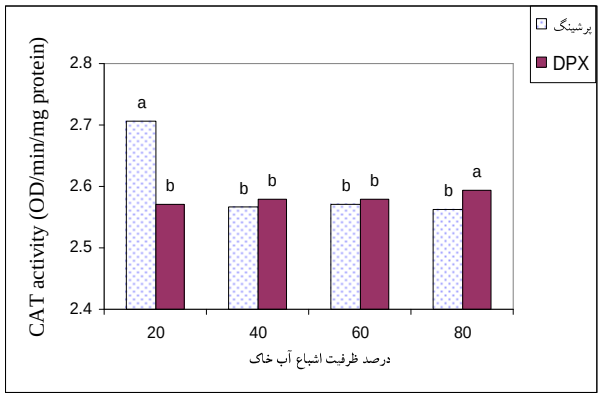
نمودار ۶ و ۷، فعالیت آنزیم کاتالاز را در دو اندام برگ و ریشه نشان می‌دهد.

برگ

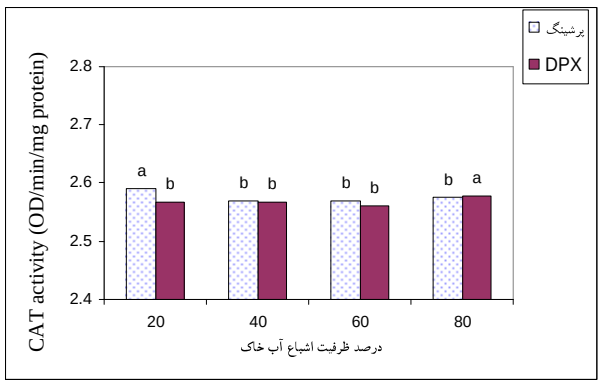
در رقم پرشینگ، میزان فعالیت آنزیم در تیمار ۲۰درصد افزایش معنی‌داری را نشان داد اما تفاوت معنی‌داری بین سایر تیمارها مشاهده نشد. در رقم DPX، تیمار ۸۰ درصد (غرقابی)، افزایش معنی‌داری را نشان داد (p<۰/۰۵)، اما تفاوت معنی‌داری بین سایر تیمارها مشاهده نشد (نمودار ۶).

ریشه

در رقم پرشینگ، فعالیت آنزیم در تیمار ۲۰درصد، افزایش معنی‌داری را نشان داد (p<۰/۰۵)، اما تفاوت معنی‌داری بین سایر تیمارها مشاهده نشد. در رقم DPX، تیمار ۸۰ درصد (غرقابی) افزایش معنی‌داری را نشان داد (p<۰/۰۵)، اما تفاوت فعالیت آنزیم در بین سایر تیمارها معنی‌دار نبود (نمودار۷).



نمودار ۶: تغییرات میزان فعالیت کاتالاز (CAT) برگ در دو رقم پرشینگ و DPX



نمودار ۷: تغییرات میزان فعالیت کاتالاز (CAT) ریشه در دو رقم پرشینگ و DPX

تغییرات میزان آنزیم در هر دو اندام برگ و ریشه مشابه بود، به نحوی که در هر دو اندام، بالاترین فعالیت آنزیم در رقم DPX در تیمار ۸۰درصد و در رقم پرشینگ در تیمار ۲۰درصد (خشکی) مشاهده گردید.

بحث و نتیجه‌گیری

میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مورد مطالعه با توجه به نوع رقم و شدت تنش، تفاوت‌هایی را نشان داد که با اظهارات Alexieva و همکاران (۲۰۰۱) مطابقت دارد. آنان بیان کردند که پاسخ‌های اکسیداتیو گیاهان به حساسیت و مقاومت رقم‌های مورد مطالعه، مربوط است. همچنین در پژوهش حاضر، مشخص گردید که فعالیت آنزیمی با توجه به نوع اندام نیز تفاوت آشکاری را نشان دادند.

در هر دو رقم، فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز در برگ، با کاهش میزان آبیاری کاهش یافت و تیمار ۸۰ درصد (غرقابی) بالاترین میزان فعالیت آنزیمی را از خود نشان داد. به نظر می‌رسد هر دو رقم به منظور مقابله با تنش اکسیداتیو ایجاد شده در اثر تنش خشکی در برگ از دیگر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان استفاده کرده، همچنان که مشاهده گردید در رقم پرشینگ، فعالیت آنزیم‌های CAT و POX در مقادیر پایین‌تر آبی، افزایش یافته است.

در ریشه فعالیت آنزیمی آسکوربات پراکسیداز در سایر تیمارها نسبت به تیمار ۶۰ درصد افزایشی را نشان داد و از نظر رفتار آنزیمی دقیقاً مشابه آنزیم کاتالاز در ریشه بوده است، به نحوی که در رقم DPX دارای بالاترین میزان فعالیت در تیمار ۸۰ درصد بوده و این در حالی است که بالاترین میزان فعالیت آن در رقم پرشینگ در تیمار ۲۰ درصد بوده است. به نظر می‌رسد که رقم پرشینگ به ازاء مقادیر پایین‌تر آبی تحت تاثیر قرار گرفته، اما رقم DPX در شرایط افزایش بیش از حد آب (غرقابی) واکنش نشان می‌دهد.

رقم DPX در مقادیر پایین‌تر آبی در اندام برگ افزایشی در فعالیت CAT و POX نشان نداد و به نظر می‌رسد علت این امر، استفاده از مکانیسم‌هایی باشد که منجر به افزایش جذب آب شده و تاثیر تنش خشکی را در این رقم مهار کرده

است از طرفی ممکن است فعالیت آنزیم‌های نامبرده در آستانه‌های بالاتری از تنش خشکی تحریک گردد.

در رقم پرشینگ، فعالیت کاتالازی در هر دو اندام برگ و ریشه تحت تیمار ۲۰ درصد که تنش خشکی محسوب می‌گردد، افزایش یافته، در حالی که سایر تیمارها فعالیت آنزیمی یکسان و مشابهی را نشان دادند، اما در رقم DPX چنین مساله‌ای دقیقاً در تیمار ۸۰ درصد (تنش غرقابی) مشاهده شد و در سایر تیمارها فعالیت آنزیمی مشابه بوده است. آنچه قابل ملاحظه است، این است که در هر دو رقم در دو تیمار ۴۰ و ۶۰ درصد که می‌توان آنها را به ترتیب به عنوان شاهد و تنش ملایم آبی درنظر گرفت، فعالیت آنزیمی ثابت بوده ونشان دهنده آن است که این آنزیم تحت تاثیر تنش‌های شدیدتر و جدی‌تر افزایش می‌یابد که با اظهارات Wassmann و همکاران (۲۰۰۴) مبنی بر تحت تاثیر قرار گرفتن آنزیم کاتالاز در تنش شدید هماهنگ است و نقش محافظتی را در سلول‌ها به منظور مقابله با H_2O_2 به عهده دارد.

نتایج مطالعات Vantoai and Bolles (۱۹۹۱) بر روی گیاه سویا نشان داد که تنش غرقابی باعث افزایش تولید رادیکال سوپراکسید می‌شود. از طرفی نتایج مطالعات بسیاری از محققین مانند (Zhnag et al., 2001 ؛Smirnoff, 1993) نشان داد که تنش خشکی باعث افزایش تولید انواع اکسیژن‌های واکنش‌گر نظیر H_2O_2 شده است و چنین مساله‌ای منجر به پاسخ اکسیداتیو در گیاه شده تا بتواند جلوی آسیب ناشی از انواع اکسیژن واکنشگر را بگیرند. بنابراین به نظر می‌رسد علت عدم افزایش فعالیت کاتالازی در تیمار ۲۰ درصد در رقم DPX و تیمار ۸۰ درصد در رقم پرشینگ که هر دو تنش محسوب می‌شوند، به دلیل استفاده از دیگر آنزیم‌های سرکوب‌گر ROS بوده و مقابله با تنش‌های مذکور وابسته به فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر POX و APX بوده و نشان‌دهنده آن است که فعالیت کاتالازی می‌تواند با توجه به نوع رقم و نوع تنش متفاوت باشد.

نتایج متناقضی از فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تنش خشکی در گیاهان مختلف گزارش شده است. مطالعات انجام شده بر روی نخود و گندم نشان داده است که در تنش خشکی، فعالیت CAT و SOD مهار شده، اما فعالیت پراکسیداز افزایش یافته است در گندم نیز فعالیت هر سه آنزیم کاهش یافت (Alexieva et al., 2001).

در پژوهش حاضر نیز مشخص گردید که فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه در سایر تیمارها نسبت به تیمار ۶۰ درصد که می‌توان آن را به عنوان شاهد درنظر گرفت، تحت تاثیرقرار گرفته، به ویژه در تیمار ۸۰ درصد (غرقابی) و ۲۰ درصد (خشکی) که افزایش چشمگیری را نشان دادند.

Dalton و همکاران (۱۹۹۳) فعالیت آسکوربات پراکسیداز را در میتوکندری جدا شده از گرهک سویا نشان دادند. همچنین Becana و همکاران (۲۰۰۰) بیان داشتند که انواع اکسیژن واکنشگر در تمامی مراحل نمو گرهک از آغاز تشکیل تا مرحله پیری دخالت دارند. در پژوهش حاضر نیز وجود فعالیت پراکسیدازی در گرهک در هر دو رقم به ویژه در دو تیمار ۸۰ درصد (غرقابی) و ۲۰ درصد (خشکی) نشان دهنده تولید انواع اکسیژن واکنشگر بوده که منجر به افزایش فعالیت این آنزیم گشته است. همچنین وجود فعالیت پراکسیدازی برگ در مقادیر پایین‌تر آبی در رقم پرشینگ، نشان دهنده استفاده رقم نامبرده از مکانیسم دفاعی آنتی‌اکسیدانی به منظور مقاومت در برابر تنش خشکی است که با نتایج مطالعات Ajay و همکاران (۲۰۰۲) مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری نهایی

بطور کلی می‌توان نتیجه‌گیری کرد که آنزیم‌ها تفاوت رفتاری متفاوتی را با توجه به نوع و شدت تنش از خود نشان می‌دهند. همچنین مشخص گردید که در شرایط تنش یکسان، رقم‌های مختلف از یک گونه، آنزیم‌های مختلفی را به منظور مقابله با آن فعال نموده و در یک رقم نیز، نوع و شدت تنش می‌تواند نوع خاصی از آنزیم را سنتز یا فعال کرده و حتی میزان فعالیت آنزیم‌ها با توجه به نوع اندام می‌تواند متفاوت باشد. به عبارت دیگر می‌توان گفت که نوع آنزیم می‌تواند با توجه به نوع رقم، نوع تنش وحتی نوع اندام مورد مطالعه متفاوت باشد.

Reference

Ajay, A., Sairam, R.K., and Srivasta, G.C., (2001). Oxidative stress and antioxidative system in plants current science, Vol, 82, No, 10, Pp. 1227-1238.

Alexieva, V., sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E. (2003). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. Plant, cell & environment, Vol, 24, Issue 12, page, 1337.

Ames, B.N., Shigena, M.K., and Hegen, T.M., (1993). Oxidants, antoxidants and the degenerative sidease of aging. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 90: 7915-7922.

Arrigoni, O. (1994). Ascorbate system in planty development.J. Bioenergy. Biomember, 26: 407-419.

Baisak, R., Rana, D., Acharya, R.B.B., and Kar, M., (1994). Alterations in the activities of active oxygen scavenging enzymes of wheat leaves subjected to water stress. Plant and cell physiology, Vol. 35, No.3, pp. 349-495.

Becana, M., Dalton, D.A., Moran, J.F., Iturbe-ormaetxe, I., Matamoros, M.A., and Rubio, M.C., (2000). Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules. Physiol. Plant. 109: 372-381.

Biemeit, S., Keetman, U., and Alberchnt, G., (1998). Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedling. Plant phyiol. 116: 651-658.

Brown, P.S., Knierel, D.P., and Pell, E.J., (1995). Effects of moderate drought on ascorbate peroxidase and glutathione reductase activity in mesophyll and bundle sheat cell of maize. Physiologia palntarum, 95(2), 274-280.

Chance, B., and Maehly, C., (1995). Assay of catalase and peroxidase. Method enzymol, 11:764-775.

Dalton, D.A., (1995). Antioxidant defenses of plants and fungs: pages 298-355. In: oxidative stress and antioxidant defenses in biology. S. Ahmed ed. Chapman and Hall, New York.

Guan, L., Zhao, and Scandalios, J.G., (2000). Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize cat1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H_2O_2 is the likely intermediary signaling molecular for the response. The plant journal, 22, 87-95.

Habibi, D., Boojar, M.M.A., Mahmoudi, A., Ardakani, M.R., and Teleghani, D., (2000). (4th International) crop science congress. Antioxidative enzymes in sunflower subjected to drought stress.

Halliwell, B., and Cutteridge, J.M.C., (1989). Free radicals and catalyctic metalions. Methods enzymes, 186: 1-16.

Jiang, M., and Zhang, J., (2001). Effects of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defense system and oxidative damage in leaves of maize seedling. Plant and cell physiology, 42, 1263-1273.

Jiang, M., and Zhang, J., (2002). Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. Journal of Exp. Bot. Vol. 53, No. 379, Pp. 2401-2410.

Kaminaka, H., Morita, S., Tokumoto, M., Masumura, T., and Tanaka, K., (1999). Differential gene expression of rice superoxide dismutase isoforms to oxidative and environmental stresses. Free radical research, 31, Pp. 219-225.

Koroi, S.A., (1989). Gelelektrophers tische and spectral photometrischoe unter uchungen zomeinfifss der temperature auf straktur and aktritat der amylase and peroxidase isoenzyme, physiol. Veg., 1989, 20:15-23.

Smirnoff, N., (1993). The role active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. New phytologist, 125, 27-58.

Ushimaru, T., Kanematsu, S., Shibasaka, M., and Tsuhi, H., (1999). Effects of hypoxia on the antioxidative enzymes in aerobically grown rice (Oryza sativa) seedlings. Physiologia plantarum, 107: 181-187.

Van toai, T.T., and Bolles, C.S., (1991). Postanoxic injury in soybean (*Glycin max*) seedling. Plant physiology. 97: 288-592.

Wassmann, S., Wassmann, K., and Nickenig, G., (2004). Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzyme Expression and Function in vascular cells. American heart association Hypertension, 44: 381.

Yan, B., Dai, Q., Liu, X., Hung, S., and Wang, Z., (1996). Flooding induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. Plant and soil, 179: 261-268.

Yordanov, I., Velikana, V., and Tsonev, T., (2003). Plant responses to drought and stress tolerance. Bulg, J., plant physiol, special issue, 187-206.

Study of content alterations of peroxidase, ascorbate peroxidase and catalase activity in two soybean cultivars (*Glycine max* L. merr) under water stress

Modareszadeh, H., Ghorbanli, M., Rezaei, M

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

Abstract

Different cultivars of one species activate various enzymes such as superoxide dismutase, catalase, peroxidase, glutathione reductase and ascorbate peroxidase in order to defense against the water stress.These enzymes have important role in plant defense against the reactive oxygene species. In this study, behavior different of peroxidase, ascorbate peroxidase and catalase and effects of water stress on activity of them against drought and flooding were investigated in two soybean cultivars (Glycine max L. cv. Pershing and cv. DPX). An experiment was carried out under potting conditions and 4 treatments (20, 40, 60 and 80% of water saturation capacity) were used. Antioxidant enzymes indicated differences with stress and organ. Peroxidase activity increased in nodule and root under drought and flooding stress but in leaf, peroxidase activity increased in lower water contents (20 and 40%) and in DPX, significant difference did not shown in the all. In both studied organs, catalase activity increased in flooding and drought, in DPX and Pershing, repectively but significant difference did not shown in other treatment. In the leaf, ascorbate peroxidase activity decreased with decreasing in irrigation but in root, its activity indicated significant increaseing in flooding and drought, in DPX and Pershing, repectively. Results indicated that enzymetic activity can vary by cultivar, stress and organ type, too.

Keywords: Ascorbate peroxidase, Catalase, Peroxidase, Soybean and Water Stress

Taxonomical Characterization of *Fischerella* sp. FS18 collected from paddy-fields of Golestan Province (Iran)

[*]Shokravi, Sh[1]., Amirlatifi, F[1]., Safaie, M[2]., Soltani, N[3].

1- Dep. Biology, Islamic Azad Univ, Gorgan Branch, Gorgan, Iran
2-Young research club, Islamic Azad Univ, Gorgan Branch, Gorgan, Iran
3- Dep. Petroleum Microbiology, ACECR, Research Institute of Applied Science, Tehran, Iran

Abstract

In a multidisciplinary way, taxonomical characterization of the cyanobacterium *Fischerella ambigua* (N?geli) Gomont, collected from paddy-fields of North of Iran have been investigated. Beside morphologies, ecophysiological studies including survivsl, growth and pigment composition at different condition of salinity, temperature and light intensity, and molecular investigations including 16S rRNA gene sequences of the cyanobacterium have been considered. The results indicate the drastic underestimation of the physiological and phylogenetic diversity of these cyanobacteria by the current morphology-based classification and the clear need for new taxa.

Keywords: Cyanobacteria, *Fischerella ambigua*, Iran, Paddy-Fields, Taxonomy

Introduction

It seems that in north paddy fields of Iran, especially Golestan province, some strains of stigonematales especially *Hapalosiphon* spp., and *Fischerella* spp., are common (Shokravi et al., 2001, 2002) but there is no clear report about their morphological characterizations and taxonomic situations. The species of stigonematalean cyanophytes are distributed all over the world but mainly scarcely and strictly in special (extreme) biotopes (Anagnostidis & Komarek, 1990).

Consequently, they are traditionally considered cosmopolitan micro-organisms with remarkable capabilities to acclimatize to broad ranges of environmental conditions (Shokravi et al., 2003; Geitler, 1932). Genera of the stigonematales exhibit the highest degree of morphological complexity and differentiation within the cyanobacteria (Anagnostidis & Komarek, 1990, Castenholz, 2001). Many populations of stigonematales show considerable morphological variation, even at one site (John et al., 2002). The complex variety of forms or developmental stages exhibited by *Fischerella*, which may include primary and secondary trichomes, hormogonia, unicells and amorphous cell aggregates. As we know this variations is not confined to the strains (Castenholz, 2001).

However, morphologybased classification may provide insufficient taxonomic resolution and cyanobacteria with similar or identical morphology may have significantly different physiology. In recent years, the analysis of 16S rRNA gene sequences has demonstrated that morphological groupings of cyanobacteria in some cases correspond to phylogenetically coherent taxa (Shokravi et al., 2007), whereas in others the traditional classification drastically underestimates extant diversity (Gugger et al., 2004). In bacteriology, in particular, the tolerances to and requirements for salt concentrations and temperatures have been recognized as important phenotypic properties correlating with phylogeny (Gugger and Hoffman, 2004). Light is evidently one of the most important factors, which determine the natural distribution of cyanobacteria (Fernandez–Valiente & Leganes, 1989). In addition to light, pH is another factor, which clearly affects the distribution of

[*]*e.mail: sshokravi@yahoo.com*

cyanobacteria. Most cyanobacteria grow in environments that are neutral to alkaline and in laboratory cultures the optimal pH ranges from 7.5 to 10. Generally, a wide range of adaptation to pH has been observed not only among different genera but also between different isolates of the same species (Soltani et al., 2006; Poza-carrion et al., 2001).

Besides survival of cyanobacteria in natural environments depends upon their ability to acclimate to the variable conditions of environmental factors. For cyanobacteria with *stigonematalean*-like morphology, uncertainties about the evolutionary coherence of the current generic classification have been expressed sporadically on the basis of analyses of lipid compositions or ultrastructure (Tabatabaii Yazdi et al., 2005).

Fischerella sp. FS18, have been the special strains for our field and laboratory experiments during few years ago until now (Shokravi et al., 2007) We have published some papers about physiology, ecophysiology, pharamaceutical and applied aspects of this strain (Ghasemi et al., 2005; Tabatabaii Yazdi et al., 2006; Soltani et al 2005; Soltani et al.; 2006; Soltani et al., 2007; Shokravi et al., 2007; Shokravi et al., 2008). Unfortunately we had no time for exact concentration on morphology and taxonomy of such a strain. Few researches have been done (Shokravi et al., 2007), but results seem non clear and doubtful. Both for description and identification.

The aim of this research was a new move to characterize the real taxonomical position and possibly determination and almost exact description of this strain. However, a comprehensive comparative study on the physiology and phylogeny of this cyanobacterum has been lacking and, therefore, the diversity within the botanical genus *Fischerella* remains largely unexplored. The question whether morphological counterparts from different environments are related or have undergone convergent evolution is particularly interesting. We have analyzed and compared the 16S rRNA gene sequences, morphologies, halotolerances, temperature requirements, illumination and pH as combined elements, pH as a unique factor, and pigment compositions of cultures of cyanobacterium *Fischerella* sp. FS18 collected from paddy-fields of North of Iran. A phylogenetic pattern emerges which is in part supported by phenotypic characteristics. We propose the reclassification at the species level of this cyanobacterium with tightly branched trichomes from paddy-fields.

Material and Methods

Cyanobacterial strains, cultivation and purification

Soil samples were obtained from paddy fields of different stations of Golestan province (north of Iran and near Caspian sea). A complete description about stations and their geographical and environmental conditions have been reported in Shokravi et al., (2002, 2003). The collected soils were cultured by usual methods (Kaushik, 1987). After colonization and isolation, the cyanobacterium *Fischerella* sp. FS18, was purified and turned to axenic condition (Kaushik, 1987). Identification was done according to John et al., (2002), Anagnostidis and Komarek (1990), Tiffany and Britton (1971), Prescott (1962), Desikachary (1959) and Geitler (1932). Stock cultures were grown in N-free medium. Cultured in solid BG11 medium ($MgSO_4.7H_2O$, 0.3mM; $CaCl_2.2H_2O$, 0.25 mM; $K_2HPO_4.3H_2O$, 0.18 mM; $Na_2MgEDTA$, 0.003 mM, Citrate ferric 0.02 mM; Acid Citric, 0.029 mM; Na_2CO_3 0.188 mM; microelements 1 mll^{-1}). The mixture was bubbled overnight with air to drive excessCO2 out of solution and thus reduce the amounts of carbonate and bicarbonate in the final mixture. The pH was then raised to 8±2 by addition of NaOH and the solution was autoclaved. Axenicity was controlled microscopically.

Illumination and pH

The cultivation was done under different illumination (2, 11, 24, 104, 300$\mu Em^{-2}s^{-1}$) and pHs (5, 6, 7, 8, 9). The temperature was adjusted on 30±1?C. Illumination was supplied with 40W cool white fluorescent tubes. Plates were placed at different distances from the light source to obtain a linear gradient of irradiance. Light measurements were made with a Licor LI-1000 Datalogger equipped with a quantum sensor. Alternatively, other experiments were carried out in batch cultures, using 300 ml of inoculated medium in 500 ml. Erlenmeyer flasks stoppered with cotton plugs. Culture was maintained without aeration or stirring and buffered and illuminated as above. After 48h of culture, when cells were fully adapted to light regime and pH, aliquots were taken and used for determinations.

Salinity Stress

Stock cultures were grown in the BG110. Cells in logarithmic phase of growth were collected from stock cultures and used as inoculate for experiments. BG110 medium of different salinity was made for inoculation of *Fischerella* sp. FS18. The required salinity was obtained by adding sodium chloride. The flasks were maintained for 21 days at 30±1°C under constant illumination of about 60$\mu Em^{-2}s^{-1}$. The cyanobacterium

was treated with different concentrations of NaCl (NaCl-free, 0.5 & 1%).

Determination of temperature requirements

Temperature ranges were determined by visual inspection of growth in test tube cultures with liquid media after incubation for a maximum of 14 days. All of the cultures received constant irradiance of 60 umol photons of white light m^{-2} s^{-1}. Temperatures tested were 4, 10, 15, 20, 25, 35, 40, 45 and 50 °C. Growing cultures were subjected to stepwise temperature shifts of a maximal 6 °C each time.

Growth rate measurements

The strains were grown in deep Petri dishes filled with liquid media. Growth rates were measured by optical density and biomass determinations. For each strain, the correspondence between optical density and biomass (dry wt) was checked (R^2=87%±8; data not shown). Growth was followed in triplicate cultures during periods of one week, so that four to curve doublings during exponential growth could be monitored. Linear regression analysis of the natural logarithms of the biooptical behavior values yielded estimates of growth rates. Means and standard deviations of triplicate measurements have been noticed.

Pigment composition

Chlorophyll content was determined spectrophotometrically at 665 nm according to Marker (1972). Phycobiliproteins were extracted after osmotic shock and measured spectrophotometrically at 652, 615 and 562 nm. (Soltani et al.2006). Carotenoides have been extracted and determinrd using Becker methods (Soltani, 2007)

Stattistical Analysis

All experiments were repeated three times. Data are the means of triplicate tests ± SD. Statistical differences were examined using the ANOVA test.

PCR amplification, cloning and sequence analysis of 16S

For this purpose, DNA content was first extracted from the cyanobacterium and then PCR was applied using two set primers. Sequences were amplified using the primers 5´- GGAATCTTCCGCAATGGG-3´ as forward and 5´-GACTACAGGGGTATCTAATCC -3´ as reverse, which amplify a ~400-bp region of the 16S rRNA gene. To extract of DNA from the *Synechococcus nidulans*, a fresh biomass was obtained by centrifuging at 12000 rpm. After washing of biomass two time with PCR distillated water, it was incubated at 96^0C for 5 min and then centrifuged at 12000 rpm. The supernatant was used as a template for PCR. The applied PCR condition has been described by Nubel et al., (9). PCR products were electrophoresed in a 1% (w/v) agarose gel using TBE buffer containing 1µg/ml ethidium bromide.

A single ~400-bp band of DNA was cut and extracted from the gel using the Core Bio Gel Extraction Kit. The sequence was determined by the CinaGene company with the primers. Sequence similarity searches were done with BLAST through the website of the NCBI.

Morphological observations

Morphological observations were made in liquid as well as on solid media. Thallus growth, filament structure, types of branching, position of the heterocysts, multiplication, in addition of biometrical information were recorded (Gugger & Hoffmann, 2004, Shokravi et al., 2007). Colony formation and cells shapes were evaluated by binocular and light microscope (in addition phase contrast, epifluoresscence, and electron microscopy) each day in two week periods.

Results

Microscopic observations

Usual morphological characteristics, seems true for this strain. Morphological observations with traditional approach strongly emphasize the preliminary identification. Unilateral and one cell layer true branches, intercalary heterocyst with oval to subcylindrical (to cylindrical) forms, mostly one cell layer main axes with portions with more than one layers of cells, and finally the high degree of hormogoniums (Figure 1), will make almost strong evidences for dependency to Fischerella (botanical) or form-genus II (microbial) classification systems (Desikachary, 1959; Gastenholtz, 2001).

Micromorphology of the vegetative cells of *Fischerella* sp. FS18, specially the arrangement of the thylakoids (Figure.2), may clear some doubts about real positions of the strain at the species level (personal communications with L.Hoffman). Circular arrangement of the thylakoids (Figure2), strongly emphasize belonging of the strain to Fischerella groups (Anagnostidis and Komarek, 1990).

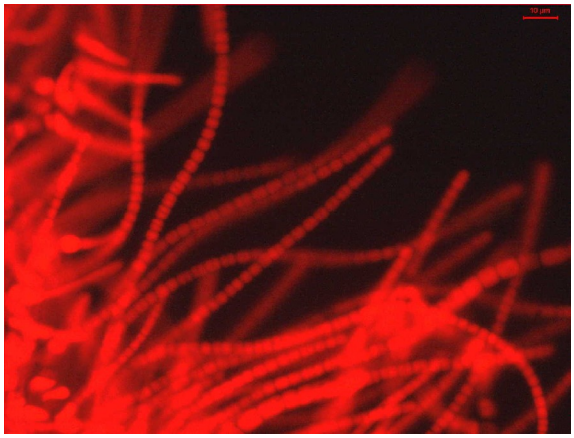


Figure 1: Hormogonia release in *Fischerella sp.* FS18 (fluorescence microscopy)

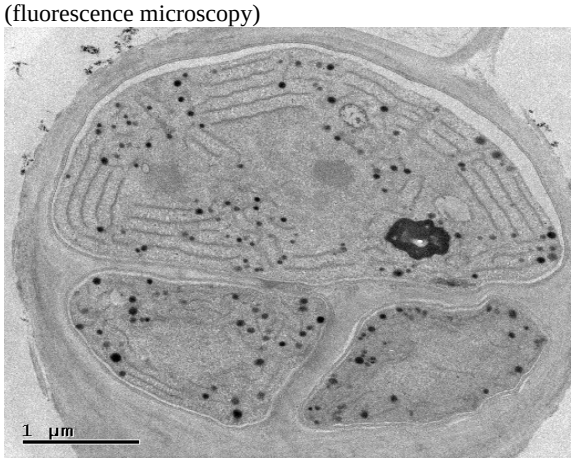


Figure 2: Electron micrograph of a vegetative cell of *Fischerella sp.* FS 18 with special thylakoids arrangement

The high degree occurrence of reserve granules may be related to nitrogen limitation during analysis (Soltani et al., 2006). About the certainty for the species determination, this kind of thylakoids arrangement makes close dependency to *Fischerella ambigua* (personal communications with L. Hoffman). In *F. musicola* and *F. epiphytica* the patterns of thylakoid arrangements differ with such a completely regular pattern (Anagnostidis and Komarek, 1990).

Morphological Variations and Biometrical Analysis

Morphological variations of *Fischerella* sp.FS18 can be related with both acidity and light. Variations were seen in pHs 5 and 9. In low light intensities, there is no hormogonium production in each acidic condition. Biometrical statistical analysis showed that it seems hard to reach a unique pattern in morphological variation analysis in vegetative cells and heterocysts of this strain, especially comparing the pattern of expanding width of main axes with the length and width of branches and even main axes too (Tables 1-4). High light intensity (300 µE m^{-2} s^{-1}), caused noticeable morphological variations especially in pH5. It seemed that in this condition, organism tends seriously to get a new or at least different topological configuration. In other light intensities, this pattern seemed relatively variable and possibly localized. In alkaline condition (pH9), the patterns of growth in low and medium light intensities were completely the same (Tables 1-4).

Table 1: Vegetative cell dimensions at the main axes 4th day after inoculations (um) at different pH and Irradiances

Light µE $m^{-2}s^{-1}$	PH5	PH6	PH7	PH8	PH9
300	17 x 8	13.2 x 7.2	12.5 x 6.5	12.5 x 8	9 x 8
107	13.5 x 8.75	12 x 8	13.5 x 9	11.5 x 8	11 x 5.25
24	14.5 x 9	14 x 6	9.5 x 7.5	13.5 x 6.5	10.5 x 7.75
11	12.75 x 6.5	10.5 x 8.5	10.5 x 8.5	8 x 5	9 x 7.25
2	9.2 x 4	9.6 x 5	9.5 x 6.5	9.25 x 6	10 x 6.5

Table 2: Vegetative cell dimensions at the branches 4th day after inoculations (um) at different pH and Irradiances

Light µE $m^{-2}s^{-1}$	pH5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
300	16 x 5.6	10.5 x 5.2	12.5 x 4	15.5 x 4	15.5 x 4
107	15 x 4	11.5 x 6	10 x 6	14 x 4.5	17.5 x 5
24	15.5 x 4.5	9.5 x 5	13.5 x 4	15 x 4	13.5 x 4
11	11.5 x 4	10.5 x 5	11.5 x 4.25	8.25 x 4	11.25 x 4
2	10.7 x 4	9.4 x 4	10 x 5	11.75 x 4	11.25 x 4

Table 3: Heterocyst cell dimensions at the main axes 4th day after inoculations (um) at different pH and Irradiances

Light µE $m^{-2}s^{-1}$	pH5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
300	16 x 6	14.5 x 6.5	14 x 6.5	14 x 6	13.5 x 7
107	12.5 x 9.5	12.5 x 7	14.5 x 8	11 x 6	11.5 x 5
24	16 x 8	11.5 x 7	12.5 x 7	13.5 x 6	12 x 6
11	14 x 6	13.5 x 7.5	12 x 7	11.88 x 5.75	11.5 x 5.75
2	11.75 x 6.8	11.75 x 7.5	11.5 x 6.75	10 x 6.75	10.25 x 6

Table 4: Heterocyst cell dimensions at the branches 4th day after inoculations (um) at different pH and Irradiances

Light µE $m^{-2}s^{-1}$	pH5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
300	14.5 x 6	13.5 x 5.5	12.5 x 4.5	13.5 x 7	12 x 5
107	13 x 6	14 x 7	11 x 7	13.5 x 5.5	11.5 x 6
24	11 x 6	16 x 5	13 x 4.5	14.5 x 5	11.5 x 6
11	10 x 5	14.5 x 5	13 x 5	11.63 x 4.25	11.5 x 5.75
2	10x4	12 x 5	14 x 4	11.5 x 4.25	11.75 x 5

The presence of sheath seems an important diagnostic feature between different genera of stigonematales. It is not possible to observe any sheath in our strain, but phase contrast photogaraphy seems the existence of such a sheath around main axes and branches (Figure 3.). Unfortunately until now we have not any research about the effects of irradiance and pH on sheath formation at stigonematalean species. However it may be possible an acclimative character or may be constitutive. In all the treatments we were able to see the sheath (even at pH 5). So it may be logical to conclude that this may be a constitutive than an acclimation reflection to environmental conditions (Shokravi, 2007).

Figure 3: Phase- contrast micrograph of of *Fischerella sp.* FS 18.

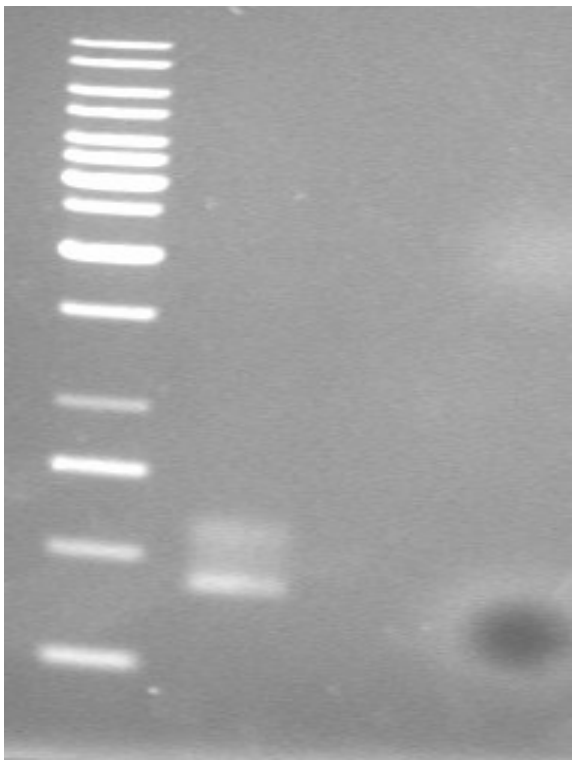


Figure 4: Agarose gel electerophoresis of DNA prepared from *Fischerella sp.* FS 18 which has been purified using PTB reagent.

16S rRNA gene sequences

The partial sequence of the 16S rRNA sequence of the *Fischerella sp.* FS 18 is as follows:

´TGGGGAATTTTcCgAATGGGCGAAAGCCT
GACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGC
TCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAT
AAGCAAGTGAAGGTACCTGAGGAATCAGCAT
CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTG

GGCGTAAAGCGTCCGTAGGTAGCAGTGTGTGT
CTATTGTTAAAGAGTTTGGCTTAACCAAATAA
AGGCGGTAGAAACTACACAGCTAGAGTGCGT
TCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGT
GGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGAC
ACTGAGGGACGaaaGctagGggAGCGAATGGGAT
TAgataCCCCAgTAGTCA3

The sequence of *Fischerella* sp. strain FS 18 was recorded in the NCBI under the accession number EU255584.

Salt requirements

The dependence of growth rates on salinity is illustrated in Figure 5. This strain not show a distinct and narrow salinity optimum, but were able to grow with close to optimum rates in freshwater medium (BG11). Thus, can be termed euryhaline. *Fischerella musicola* (Bornet & Flahault) Gomont tolerated a salinity of 10% but died at 13%. It is the same for *Nostochopsis lobatus*. At this organism, elevated temperature (38°C) resulted in increased growth rates at high salinities and an increased upper salinity limit of growth (20%). This temperature effect on halotolerance had previously been observed for some unicellular, extremely halotolerant cyanobacteria (Garcia-Pichel et al., 1998). We have no seen such ability in our strain.

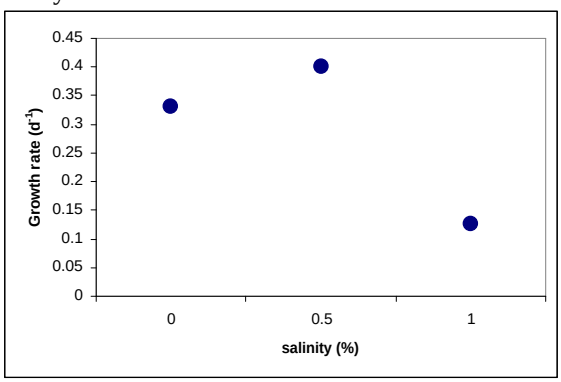


Figure 5: Comparisons of the growth rates of *Fischerella sp.* FS 18 at different salinities

Results revealed that the growth rate was higher in NaCl-free and salinity did not inhibit growth of other treatments. Similar results were seen in the case of other physiological processes. The light-saturated photosynthetic rate was higher in NaCl-free and it decreased with increasing salinity (Results not shown). Also growth and photosynthesis of this strain decrease (but not inhibit) with increasing NaCl in paddy fields. This is not true for *Nostochopsis sp*. (89-45 partial 16S rRNA gene, strain 89-45 AJ544081) () and not been reported until now for *Fischerella musicola* (Personal communication with L.Hoffman).

Temperature requirements

In our experiments, it showed growth between 35 and 45°C and did not grow at 50°C. Natural populations of *Fischerella* ambigua (Bornet & Flahault) Gomont showed an upper temperature limit of 51°C and maximum photosynthesis rates at 45 °C (Castenholz, 1977). The strains that had shown the highest tolerated 40 or 38 °C, respectively, and did not grow at 15 °C and below. Thus they displayed a lower temperature requirement compared to the *Fischerella* ambigua (Bornet & Flahault) Gomont (Castenholz, 2001).

Pigment compositions

Effect of irradiance and pH on chlorophyll concentration can be seen in Table 5. Chlorophyll content at pH 7 was higher than at pH 9 and pH 5 regardless of light intensities. The difference in chlorophyll content between pH 7 and pHs 5 and 9 was significant (ANOVA, $P<0.001$). Also there was higher chl content at 3 µmol photon m^{-2} s^{-1} than 300 µmol photon m^{-2} s^{-1} at pH 7 and 9. Differences were significant in both cases. This feature was not seen at pH 5, since there was no growth of this cyanobacterium at acidic pH and chlorophyll contents were very low at both light intensities (Soltani et al., 2006).

The amount of PBP at pH 7 was higher than in pH 9 and pH 5 (Table 1). Differences were statistically significant (ANOVA, $P<0.001$). By decreasing light intensity, these pigments varied in the same way that chlorophyll, but the differences were less pronounced. The PC and APC contents followed the same trend than total PBP, with higher values at pH 7 and low light intensity (Table 5). PC content at pH 5 was one order of magnitude lower than at the other pHs and APC was below the limit of detection at this acidic pH (Soltani et al., 2006).

The size of phycobilisomes can be usually represented by the ratio (PE (when present) +PC)/APC (Wyman & Fay 1986). At pH 5 it was not possible to calculate since no APC was detectable. The ratio was higher at pH 7 and high irradiance, but differences were not significant (ANOVA, $p<0.001$).

Table 5: Effect of combination of two pH values (7, 9) and two irradiances (3, 300 µmol photon.m^{-2}.s^{-1}) on pigment contents of *Fischerella ambigua* strain FS18 grown under the above conditions. Data are mean values of four experiments±SD

pH	Culture conditions µmol photon.m-^{2}.s^{-1}	Chla	PBP	APC	PC	PE
		µg.mg dw^{-1}				
5	3	6.81±1.3	9.83±2.3	0	14.99±1.1	0
	300	6.13±0.2	4.00±5.3	0	7.25±9.5	0
7	3	24.40±1.9	111.18±6.7	12.43±1.4	91.02±6.1	7.73±1.0
	300	19.48±1.9	101.36±13.9	10.14±2.55	83.28±11.4	7.94±0.42
9	3	11.99±2.8	79.21±28.3	7.80±9.4	65.68±21.4	5.71±4.9
	300	8.32±0.7	64.66±11.9	6.57±1.5	46.97±11.4	11.12±0.9

The ratios PBP/Chlorophyll or APC/Chlorophyll are used to show the relationship between photosystem II and photosystem I (Poza- Carri?n et al., 2001). The ratio PBP/chlorophyll increased significantly with the pH, but is not affected by light intensity. The APC/chl ratio was also higher at pH 9 than at pH 7 but differences were not significant. This ratio was also not affected by light intensity.

Phylogeny

Comparing 16S rRNA sequences (Figure 6) with the gene bank (Htpp://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) showed the highest level of similarities with *Fischerella* sp. partial 16S rRNA gene, strain 1711 AJ544076Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54 (Pt 2), 349-357 (2004) Gugger, M.F. and Hoffmann, L. (99%). So cleaning process have been operated using softwares and at the next time, comparing showed 100% similarity. Considering this high degree of similarity, at the second level of molecular determination, the strain has been identified as:

Fischerella sp. partial 16S rRNA gene, strain 1711 AJ544076Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54 (Pt 2), 349-357 (2004) Gugger,M.F. and Hoffmann,L. Phylogenic trees may be determined taxonomic position of the strain. Drawing phylogenic tree (Fig 4), show that this strain may be narrow borders with the following species:

Nostochopsis sp. 89-45 partial 16S rRNA gene, strain 89-45 AJ544081. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54 (Pt 2), 349-357 (2004) Gugger, M.F. and Hoffmann, L.

In addition the following strains may be positiones with the strain at the second evoloutionary level:

- *Nostochopsis lobatus* 92.1 partial 16S rRNA gene, strain 92.1. AJ544080. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54 (Pt 2), 349-357 (2004) Gugger,M.F.R.
- *Fischerella sp.* BB98.1 partial 16S rRNA gene, strain SAG 2027. AJ344560. Mol. Phylogenet. Evol. 23 (1), 82-90 (2002) Friedl, T.

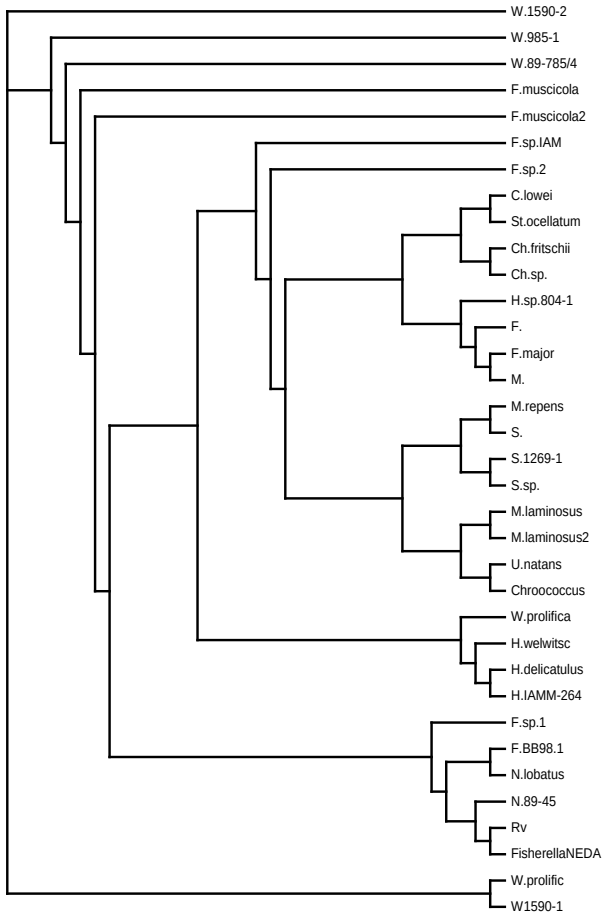


Figure 6: Phylogenetic tree based on 16srDNA sequence of stigonematalean cyanobacterium including *Fischerella sp.* FS18 (Fischerella Neda)

Discussion

Only a few stigonematalean morphotypes have been cultured, and therefore the high variability of morphotypes found in nature is under-represented in culture (Gugger & Hoffmann, 2004). Only two genera have been characterized from axenic culture strains, *Fischerella* (including *Mastigocladus*) and *Hapalosiphon*.

However results could be able to draw a relatively primitive picture of the combination effect of light

intensity and pH in morphological analysis of the organism. This organism showed variable characters from morphological point of view, and this variability was related with both acidity and light. The highest and lowest acidities (pH9 and pH5) showed the points for starting highest variations. On solid medium, all isolates had a creeping growth. This was in agreement with other papers (Gugger & Hoffmann, 2004; Shokravi et al., 2007).

High acidic condition had a remarkable inhibitory effect on the ability of germination. In pH 5, for instance, there was no growth in all irradiances (but slightly in conditions like 300 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$). In low light intensities, there was no hormogonium production in each acidity. This was true for both the first and second weeks. It has been emphasized that when mature cultures are inoculated on agar-solidified medium motile hormogonia are readily formed and easily isolated after migration on agar (Castenholz, 2001), but this situation could not be seen in all the acidities and irradiances. It seems that the potential of branch producing (especially main axes) decreased sharply in these conditions. In comparison with growth curves, it seemed that growth of the organism at least in neutral acidity, was not compatible with hormogonium production ability (Shokravi et al., 2007). In 4th day, very low light intensities caused more growth (or at least equal) than high light intensities. It is in agreement with Castenholz (2001), who emphasized that in nonthermophilic strains of *Fischerella*, hormogonia were not always formed under favorite conditions and sometimes the multiseriate axis was rare or lacking.

In the case of cell dimensions; limited light intensities (2 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$) could be able to transfer the effects of different pHs on variation of lengths of vegetative cells in the main axes (the same as brnches). These results are in opposite of (Anagnostidis and Komarek, 1990). In 24 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ light intensity, the effect of acidity on variation of cell sizes seemed obviously. The highest lengths in vegetative cells of the main axes (not branches) could be shown in pH 5 as well as liquid medium. Maybe the cells were enlarged but could not divide (Perona et al., 2003; Baftechi et al., 2002).

In the case of heterocysts, it seems that high light intensity (300 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$), changed the effects of pH on the width of these cells in the main axes. In branches, very high light intensities changed the effect of acidity on the diameter of heterocyst.

By statistical analysis, it is difficult to reach a unique pattern in morphological variation in vegetative cells of this strain. However, with this exception (cross expanding of the main axis), possibly high light intensity (300 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$), caused noticeable morphological variations especially in pH 5. In this condition, *Fischerella* tends to get a different topological configuration. In minimum light intensity (2 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$) and pH 5 cross enlargement of the main axis was seen.

In neutral condition (pH 7), the patterns of growth were different. In alkaline condition (pH 9), the pattern of growth in low and medium light intensities were completely the same. But in quantitative point of view is not comparable with neutral conditions. However results showed that this organism can be considered an alkalophilic organism. Optimal growth rates were observed at pH 7, which is nearly equal to acidity than that usually found in the rice fields from which the cyanobacterum was isolated (Soltani & Fernandez- Valiente, unpublished data).

Maximal rates of nitrogenase activity were found at neutral to little alkaline pH (pH 7, 8, Soltani & Fernandez- Valiente, unpublished data). This agrees with the neutral to alkalophilic nature of this cyanobacterium and could probably be related to the higher photosynthetic capacity per unit of dry weight shown by cells cultured at pHs 7-8 (Soltani et al., 2006).

Regarding physiological responses of *Fischerella* sp. FS 18 to NaCl, as shown in figs. 1 & 2, growth rate decreased with increasing in salinity though it continued in NaCl 1%. Maximum photosynthesis rate (P_{max}) is seen in control and confirms the results of short time experiments of photosynthesis. P_{max} decreased in NaCl 0.5 & 1%. Efficiency of photosynthesis reached to maximum in salinity 0.5% but the difference with control was not significant. Taking into account the results, it is concluded that salinity has significant effect on photosynthesis and affect on the usage of minimum light for photosynthesis. This cyanobacterium needs more light to survive in saline environment. This result is in agreement with the result of growth.. Results confirm the variation of chlorophyll content in different salinity. Figure 2 can demonstrate similar growth rate pattern which confirm the role of chlorophyll in cyanobacterial growth and changing of it with varied environmental factors.

Cyanobacteria regulate their relative concentrations of photosynthetic pigments in response to light intensity (Soltani et al., 2006). In general, there is an inverse correlation between light intensity and photopigment contents among cyanobacteria. In cultures of *Fischerella ambigua* strain FS18 we observed that cells grown at high irradiance showed lower values of chlorophyll than cells grown at low irradiance. The effect of light intensity was observed at pH 7 and 9 but not at pH 5 (Table 1). The chl content was higher in pH 7 than in pH 9 at both light

intensities. In *Fischerella ambigua* FS18, PC is the main component of phycobiliproteins, so the changes on total PBP mostly reflect the changes in PC. Total PBP and PC were affected by pH and light intensity. The highest PBP and PC content were observed at pH 7 and the lowest at pH 5. In agreement with other reports (Poza-Carri?n et al., 2001) total PBP and PC were lower at high irradiance, regardless of the pH. Since APC is a component of the core of phycobilisomes, and the core remains constant, a change in APC content reflects a change in the number of phycobilisomes.

Conclusion

Description of *Fischerella* sp. FS 18

Fischerella sp. FS 18 { *Fischerella* ambigua (Bornet & Flahault) Gomont 1895, P.52 }.

A branch and sheated filament with a prostrate portion giving rise to vertically elongate, much narrower, curved or straight branches in which 1 or more hormogonia are formed; cells sub-globose,quadrate,or cylindrical,usually loosely arranged in 1 to several series in the principal filament, in a single series only in the branches; hormogonia with cells closely adjoined and usually increasing in diameter toward the apices; heterocysts globose, barrel shaped, or quadrate; sheath either colorless or brownish, hormogones or lamellated.; plant mass consisting of prostrate mats of interwoven filaments from which vertical fascicles arise; sheaths colorless when young, becoming brownish; cells ovate or subglobular to quadrate in the main axis, rectangular in the branches, 4-6 times longer than wide; in solid medium all isolates had a creeping growth, motile hormogonia are readily formed and easily isolated after migration; circular arrangement of the thylakoids; halotolerant, euryhaline with trichomes coiled into a tight, closed helix, able to grow at salinities between 0 and 1% but not at marine salinitiesies; growth rate decreased with increasing in salinity though it continued in NaCl 1%., show a distinct and narrow salinity optimum, but were able to grow with close to optimum rates in freshwater medium,the highest tolerated 40 or 38 °C, and did not grow at 15 °C and below, Variable characters from morphological point of view, and this variability was related with both acidity and light. High acidic condition had a remarkable inhibitory effect on the ability of germination. In pH below 5, there was no growth in all irradiances (but slightly in conditions like 300 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$). In low light intensities, there was no hormogonium production in each acidity, PC is the main component of phycobiliproteins, there was no growth of this cyanobacterium at acidic pH and chlorophyll contents were very low at both light intensities; the amount of PBP at pH 7 was higher than in pH 9 and pH 5, the size of phycobilisomes was higher at pH 7 and high irradiance.

The axenic type strain is JAH FS!8, which was isolated from a microbial mat in a paddy –field near Ramsar, Mazandaran, Iran and has been deposited in the Iranian Microbial Culture Coollection with the code number ITCC1936. The DNA sequence of strain was recorded in the NCBI under the accession number EU255584.

Fischerella sp. partial 16S rRNA gene, strain 1711 AJ544076Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54 (Pt 2), 349-357 (2004) Gugger, M.F. and Hoffmann,L.

Acknowledgements

The authors would like to appreciate Professor Elvira Perona, Mrs. Ladan Baftechi for their kind collaboration in laboratory studies and Dr. Farzaneh Aziz Mohseni for the identification confirmation of cyanobacterial strain.

Refrences

Anagnostidis, K. and Komarek, J. (1990) Modern approaches to the classification of cyanobacteria. Stigonematales. Archieves for hydrobiology 14, 224-286.

Baftechi, L., Nejad Sattari, T., Ebrahimzadeh, H., Shokravi, Sh. (2002) The effects of light intensity and duration on growth and heterocyst frequency of the cyanobacterium *Fischerella sp*.- M.Sc. thesis, Faculty of Science, Tehran University.

Castenholz, R.W. (2001) Class I: "Chloroflexi". In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, eds. Boone, D.R.; Castenholz, R. W. and Garrity, G.M., New York, Springer-Verlag.

Poza-Carrion, C., Fernandez-Valiente, E., Pinas, F., Leganes, F. (2001) acclimation of photosynthetic pigments and photosynthesis of the cyanobacterium *Nostoc* sp. Strain UAM 206 to combined fluctuations of irradiance, pH, and inorganic carbon availability. Journal of Plant Physiology 158, 1455-1461.

Desikachary, T.V. (1959) Cyanophyta. Indian council of agricultural research monographs on Algae New Delhi, India.

Ghasemi Y., TabatabaeiYazdi, M., Shafiee, A., Amini, M., Shokravi, Sh., and Zarrini, G. (2004). Parsiguine, A novel antimicrobial substance from *Fischerella ambigua*. Pharm. Biol. 42: 318-322.

Geitler, L. (1932): Cyanophyceae von Europa Kryptogamen flora Akademiche Verlagsgesellschaft. Leipzig

Gross, E.M., Wolk, C.P., Juttner, F. (1991) Fischerellin, a New Allelochemical from the Fresh-Water Cyanobacterium Fischerella-Muscicola. Journal of Phycology 27, 686-692.

Gugger, MF., Hoffmann, L. (2004) Polyphly of true branching cyanobacteria (Stigonematales).- International Journal Of Systematic and Evolutionary Microbiology 54, 349-357.

Jensen, A. (1978) Chlorophylls and carotenoides, In: Handbook of Phycological Methods, Physiological and Biochemical Methods. eds. Hellebust, J.A. & Craigie, J.S., Cambridge University Press.

John, D.M., Whitton, B.W., Brook, A.J. (2002) The Freshwater Algal Flora of The British Isles - Cambridge University Press.

Kaushik, B.D. (1987) Laboratory methods for blue-green algae. Associated Publishing Company, New Delhi, India.

Perona, E., Abol, M., Bonilla, I., Mateol, P. (2003) Cyanobacterial diversity in Spanish River determined by means of isolation cultures. Morphological variability of isolates in relation to natural populations. Algological Studies 109 Cyanobacterial research 4, 475 486.

Prescott, G.W. (1962) Algae of the western great lake area. W.M.C. Brown Company Pub.

Shokravi, Sh., Tabatabaei, M., Ghasemi, Y., Baftechi, L., Soltani, N. (2003) The effects of light intensities and duration on antibacterial production abilities, morphological variations and ammonium liberations of *Fischerella* sp. collected from Paddy-fields of Iran. Proceeding of the 11th International symposium on phototrophic prokaryotes, Tokyo, Japan.

Shokravi, S., Soltani, N., Baftechi, L. (2002) Cyanobacteria as biofertilizer in paddy fields.- National Research Council of Islamic Republic of Iran,Grant no. NRCI 489-66. pp: 68-124

Shokravi, Sh., Soltani, N., Baftechi, L. (2003) Applied research management of cyanobacteria in Iran: problems and solutions. The first Iranian Congress on Applied Biology, Islamic Azad university, Mashhad, Iran.

Shokravi, Sh., Soltani, N., Zarrini Gh., Ghasemi Y. (2007) Acclimation of soil cyanobacterium Fischerella sp. FS18 under NaCl stress. Journal on Plant Science Researches, Vol1, No7, pp: 1-6.

Shokravi, Sh., Soltani, N., Fernandez Valiente E. (2008) Morphological variation of paddy field cyanobacterium *Fischerella sp*. From Iran under combined influence of pH and irradiance. Journal on Plant Science Researches, Vol1, No8, pp: 1-8.

Soltani, N., Khavari-Nejad, R., Tabatabaei, M., Shokravi, Sh., Fernandez-Valiente, E. (2006) Variation of nitrogenase activity, photosynthesis and pigmentation of cyanobacterium *Fischerella ambigua* strain FS18 under different irradiance and pH. World journal of microbiology and biotechnology 22(6), 571-576.

Soltani N, Khavari-Nejad R, Tabatabaei Yazdi M, Shokravi Sh, Fern?ndez-Valiente E. (2005) Screening of Soil cyanobacteria for antifungal and antibacterial activity. *Pharmaceutical Biology* 43(5): 455-459.

Soltani N, Khavari-nejad RA, Shokravi Sh.(2006) The effect of ammonium on growth and metabolism of soil cyanobacterium *Fischerella* sp. FS18. *Journal of Plant Science Researches*; 1:50-54.

Soltani N, Khavari-Nejad R, Tabatabaei Yazdi M, Shokravi Sh. (2007) Growth, survival and metabolism of cyanobacterium *Fischerella* sp. FS18 in different combined nitrogen Sources, *I.R.I. Science; submitted.*

Tabatabaei Yazdi M., Y. Ghasemi, A. Ghasemian, Sh. Shokravi, H. Niknahad, M. Amini, A. Dehshahri and M.A. Faramarzi (2005). Bioconversion of hydrocortisone by cyanobacterium *Fischerella ambigua* PTCC 1635. World. J. Microbiol. Biotechnol. 21: 811-814.

Tiffany, L.H., Britton, M. (1971) The algae of the Illinois. New York McGrow Hill.

Valiente, E.F., Leganes, L. (1989) Regulatory effect of pH and Incident Irradiance on the levels of Nitrogenase activity in the cyanobacterium UAM205 Journal of Plant Physiology 135, 623-627.

نشان ویژه سازی تاکسونومیک *Fischerella* sp. FS 18 جمع‌آوری شده از شالیزارهای استان گلستان (ایران)

شادمان شکروی[۱]، فریبا امیرلطیفی[۲]، مریم صفائی[۲]، ندا سلطانی[۳]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

۲. باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

۳. گروه میکروبیولوژی نفت، پژوهشکده نفت جهاد دانشگاهی، تهران

چکیده

در یک پژوهش چندوجهی، نشان ویژه‌سازی سیانوباکتریوم *Fischerella sp.* FS18 جمع‌آوری شده از شالیزارهای شمال ایران انجام گرفته است. علاوه بر بررسی مورفولوژی، تنوع‌پذیری مورفولوژیک در شرایط توام نور و pH و بررسی‌های اکوفیزیولوژیک شامل بقا، رشد و وضعیت رنگیزه‌ای، در شرایط متفاوت شوری، دما، شدت نور، pH و نیز بررسی مولکولی شامل وضعیت 16srRNA در سیانوباکتریوم انجام شده است. نتایج حاکی از آن است که نشان ویژه‌سازی بر اساس بررسی‌های چند وجهی مبتنی بر مجموعه تنوع‌پذیری مورفولوژیک، فیزیولوژیک و فیلوژنیک، برای شفاف ساختن جایگاه تاکسونومیک این سیانوباکتریوم و معرفی جدیدی از آن می‌تواند برطرف کننده برخی ابهام‌ها باشد. در نهایت نمونه با تلفیقی از صفات چندوجهی تحت نام *Fischerella ambigua* (N?geli) Gomont معرفی شده، توصیفی جدید از نمونه با تکیه بر نتایج بدست آمده ارائه گردیده است.

کلمات کلیدی: ایران، تاکسونومی، سیانوباکتریوم، شالیزار، فیشرلا

Antibacterial Activity Evaluation of *Plantago major* extracts

*Kiaei, E[1]., Mazandarani, M[2]., Aroodi, M[3]., Ghaemi, E[4].

1. Islamic Azad University-Gorgan branch, Gorgan, Iran
2. Department of biology, Islamic Azad University, Gorgan, Iran
3. Young Researchers Club, Islamic Azad University-Gorgan branch, Gorgan, Iran
4. Department of microbiology, Golestan University of Medical Science, Gorgan, Iran

Abstract

Plantago major L. is known for its antibacterial, antiflammatory, the treatment of wounds, fevers and dermal diseases. The aim of this study was to investigate the antibacterial activity of aqueous and infusion extracts of the aerial parts (leaves, roots, stems) *P. major* against on pathogenic bacteria. *P. major* were collected from North of Iran (Ziarat village).Its extracts obtained by perculation method. Antibacterial effects were assessed by Disc diffution method .The results showed that the aqueous axtract had better antibacterial effect than infusion extract and gram negative bacteria are resistant toward different extracts. *S. aereus, S. epidermidis* and *Micrococcus* are the most sensitive bacteria while the maximum inhibition zone was 13 to 18.2 mm. The results might confirmed the ethnobotanical use of the studied species for the treatment of various diseases.

Keywords: Antibacterial activity, Golestan Province, medicinal plant, *Plantago major* L.

Introduction

Medicinal plants have been used for centuries as remedies for human diseases because they contain components of therapeutic value (Ravn, et al., 2001).The antimicrobial agent may be defined as a chemical substance derived from a living source (plants, animals, or microbes)that in dilute solutions has the capacity to inhibit or destroy microorganism's growth (Torota et al., 2000).

Because of the side effects and the resistance that pathogenic microorganisms build against the antibiotics, much recent attention has been paid to extract biological active compounds from plant species that used in herbal medicine. In many parts of the word, medicinal plants are used for their antibacterial, antifungal and antiviral activities. These plant extracts were used as a source of medicinal agents to cure urinary tract infections, cervicitis, vaginitis, gasterointestinal disorder and skin infections (Meyer et al., 1999).

Plantago major L. belongs to Plantaginaceae and is one of the most medicinal herbs up to 30 cm, in height, with oval leaves that come out of the ground forming a rosette and wrapping part of the stem (Samuelsen et al., 2000), with wild form,it grows in many climate, from sea level to 2700 m altitude in Golestan province. The plant has been traditionally used as a remedy for stomach upset.stomachache, stomach and intestine inflammation, abscesses, cold, wounds, dysentery, burns, angina, asthma, fever, tuberculosis, whooping cough, chronic renal inflammation, dermal diseases, bronchitis (Holtez et al., 2002; Labhilili et al., 1997; Lynch et al., 1990).

Researcher's belived that the therapeutic effects of Plantago Herb might be mainly ascribed to the biological activities of the major components, plantamajoside, acteoside, plantaginin, acubin and catalpol, etc. Acubin has been reported as a powerful anti-toxin agent (Dulger, et al., 2004).

In Golestan province *Plantago major* have been used in forklore medicine as a diuretic, wounds, fevers and dermal diseases.however, little antibacterial study has been performed on this plant.

The aim of this study was to test the antibacterial activity of different extracts of *Plantago major* that collected from this region on inhibiting the growth of towelve pathogenic bacteria.

*e.mail: e_kiaie2004@yahoo.com

Materials and methods

Plant collection

The different parts of *P.major* (roots, stems and leaves) were collected; in its endogenous localities from 1700-2700 meter above the sea level in south east of Golestan province (Ziarat village) by transect method. Its botanical name identified in the plant systematic laboratory, college of sciences, Islamic Azad University of Gorgan branch, where voucher specimens were deposited. The samples shade dried for about one week and powdered.

Preparation of extracts

Aqueous extract

One hundred milliliter of hot sterile distilled water, 70-80°C,was added to the 30g powder samples which were allowed to soak for 24 h in water bath at 45-50°C .The extracts were filtered by using filter-paper and sterially dilueted by steril water to 12/5, 25, 50 and 100 mg/ml (Mashhadian et al., 2005).

Infusion extract

30 g powder of dried powdered of different plant parts were added to 200 mL of water and boiled for 30 min,then the solid phase were decanted by filtering and aqueous phase was used for research. After the preparation of extracts they soaked in sterile paper Blank. (Dulgar et al., 2004; Mashhadian et al., 2005).

Antibacterial activity

Test organisms

The test organisms used in the study were obtained from Persian Type Culture Collection, Tehran, Iran (PTCC), namely: *Shigella dysentria* (PTCC1188), *Psodomonas aeruginosa* (PTCC1430), *Eshershia coli* (PTCC1399), *Staphylococcus aureus* (PTCC1431), *Bacillus cereus* (PTCC1015), *Salmonella tayphimorium* (PTCC1596), *Staphylococcus epidermidis* (PTCC1114), *Enterococcus fecalis* (PTCC1393), *Proteus mirabilis* (PTCC1076), *Listeria monosytogenes* (PTCC1163), *Kelebciella pnumonie* (PTCC1291) and *Micrococcus* (PTCC1217).

Antimicrobial activity

The antibacterial effects were tested by the disc diffusion method, briefly, Muller Hinton Agar plates were culture with a standardized inoculums (1.5×10^{8} cfu/ml equal to 0.5 McFarland) of each bacterial strains, then the blank discs contain specific amount of exteracts were carefully placed at the labeled seeded plate. The plates were incubated aerobically at 37°C and examined for zones of inhibition after 24h. The inhibition zones were measured with a ruler and compared with the control disc (disc containing only propylene glycol that used as diluents of ethanolic extract and disc containing Gentamaycin as positive control).Each test was repeated 3 times and means inhibition zone were recorded. Inhibitory zone≥12mm used as good inhibitory effect of extract (Nostro et al., 2000).

Results

The *P. major* showed significant difference antibacterial effect against the tested bacteria.We found that the root of *P. major* have got the best antibacterial efficacy compared to other parts. The aqueous extract of stem had antibacterial activity against *S. aureus, S.epidermidis, Micrococcus, E. fecalis* and *Sal. tayphimorium*, with inhibition zone of 12.2 to 14.8 mm. The aqueous extract of leave was effective only on the *Staphylococcus* (13 to 15 mm) but the aqueous extract of roots showed effect on *S. aureus, S. epidermidis, Micrococcus, E. fecalis, Sal. tayphimorium, P. mirabilis* and *K. pnumonie* (12.8 to 18.2 mm).

Infusion exteract, however, had effect on the *S. aureus, S.epidermidis* and *Micrococcus* and *P. mirabilis* (Tabal 1).The best antibacterial effects were seen in 100 mg/ml concentration of aqueous extract.

S. aureus, S.epidermidis, Micrococcus were the most sensitive bacteria to both extracts.The extracts show alittle effect on bacteria such as: *E. coli, Sh. dysenteria, Ps. aeruginosa,* L. *monocytogenes, B.cereus* (Tabal 1).

We find that the gram positive bacteria are more sensitive to the extracts especially to aqoeous extracts than gram negative bacteria (Figure1).

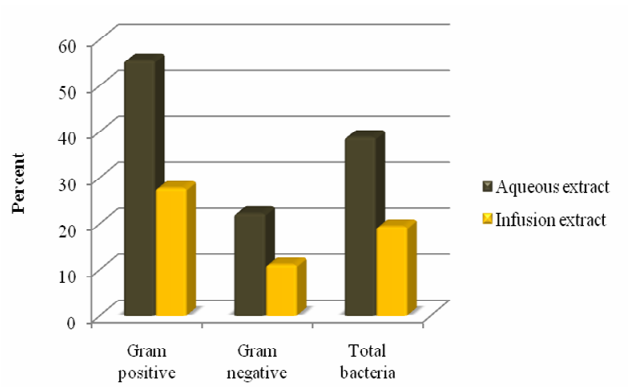


Figure1. Antibacterial effects of aqueous and infusion extracts of *P.major* on gram positive and negative tested bacteria

Table 1: Antibacterial properties of exteracts from different parts of plants against Gram-negative and Gram-positive tested bacteria

Name of bacteria	Kind of extract	Antimicrobial activity											
		stem				leaf				root			
		*100	50	25	12/5	100	50	25	12/5	100	50	25	12/5
S. aureus	Aqueous	**14.2	10	9	-***	13	12	10.5	8	18.2	16	13	11
	Infusion	12.5	10	8	-	10.1	-	-	-	13.3	11	9.6	8.7
S. epidermidis	Aqueous	14.1	9	-	-	15	13	11.5	9	13	11.3	10	9.5
	Infusion	9.5	8	-	-	12.3	10	9.1	-	10	9	8	-
E. fecalis	Aqueous	12.2	11	9	8	8.5	-	-	-	12.8	10.9	8	-
	Infusion	8	-	-	-	-	-	-	-	9	8	-	-
L. monocytogenes	Aqueous	9	8.5	8	-	9	-	-	-	9.5	9	8.2	-
	Infusion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B.cereus	Aqueous	9.5	8.7	-	-	-	-	-	-	9.9	8	-	-
	Infusion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Micrococcus	Aqueous	14.8	10	8	-	8.5	8	-	-	13.3	10.1	9	8.5
	Infusion	13	-	-	-	11	9.5	8.3	-	13.4	11	9.5	8
E. coli	Aqueous	-	-	-	-	-	-	-	-	9.2	8.5	-	-
	Infusion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sh. dysenteria	Aqueous	8.5	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-
	Infusion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. mirabilis	Aqueous	10	9.5	8	-	-	-	-	-	13.1	10.5	9	8.5
	Infusion	-	-	-	-	-	-	-	-	12.5	9.1	-	-
P. aeruginosa	Aqueous	-	-	-	-	-	-	-	-	10	9	8	-
	Infusion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sal. tayphimorium	Aqueous	12.5	11	-	-	-	-	-	-	13.3	8.1	-	-
	Infusion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K. pnumonie	Aqueous	11	-	-	-	-	-	-	-	14	9.3	9	8.5
	Infusion	9	-	-	-	-	-	-	-	11.5	-	-	-

*The concentration of extract: 100,50,25,12.5 mg/ml
**Inhibition zone around paper disc (mm), which is mean of three time repeat of test.
***Inhibition zone less than 8 mm

Discussion

Golestan province has been a region for practicing folklore medicine.However very little information are available on the ethnobotany an antibacterial effect of herbal medicine in this area.

We found that, *P. major* is widely used in the southern mountainous villages of Golestan province for treating of skin infection, respiratory organs, anti inflammation and against wounds.

Extracts of *P.major* have been reported to exhibit antibacterial activity (Simon, et al., 1999) and can suppress the humoral immune responses, especially in primary immune response (Rezaeipoor, et al., 2000). A study conducted by Holetz et al. indicated that *P. major* had some activity on *S. aureus* (ATCC25923) (Holetz et al., 2002).

Another study showed no activity for *P. major* against *E. coli* and *P. aeruginosa* (Hassawi et al., 2006).

Aqueous extracts have been shown antimicrobial activity against *Salmonella typhimurium*, and weaker activity against *Mycobacterium phlei* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, but they did not inhibit the growth of *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* and *P.mirabilis* (Moskalenko, et al., 1986, McCutcheon et al., 1994). The aqueous extract was active against *B.cereus* with the doses of 0.40 and 0.20 g/mL and the aqueous extract inhibited *B.cereus* growth in a dose-dependent fashion.

In Denmark the Minimum Inhibitory Concentration value *P.major* has been evaluated for seven plant pathogenic bacteria and for E. coli (ML 30)200mg/ml and S. aureus (502 A) 100mg/ml after preliminary investigations by the agar diffusion method (Ravn et al.,2001).

In France *P.major* inhibited the growth of *S. aureus* (8.7mm) at 200mg/ml only and had no effect on *Klebsiella sp*., *P. aeruginosa*, *E. coli* and *Enterobacter* (Kharma et al.,2006).

This finding were confirmed our results, because we find *P.major* extract show good effect on *S. aureus* and some other gram positive bacteria, but low or no active against tested gram negative bacteria such as *E. coli* and *P. aeruginosa*.

Antibacterial effect of *P.major* in various part of the world may be due to difference in the environment conditions, genetic variations and different chemical composition.

Under our experimental conditions, antibacterial activity was more pronounced against gram positive bacteria then gram negative bacteria. The reason for the different sensitivity could be ascribed to the morphological differences between these microorganisms, gram negative bacteria having an outer phospholipidic memberance carrying the structural lipopolysaccharide components. This makes the cell wall impermeable to lipophilic solutes, while porins constitute a selective barrier to the hydrophilic solutes with an exclusion limit of about 600 Da (Nikaido, et al.,1985).The gram positive bacteria should be more susceptible having only an outer peptidoglycan layer which is not an effective permeability barrier (Melendez et al., 2005; Nostro et al., 2000).

In our preliminary test,aqueous extract of *P. major* was found to possess activity against *S. aureus*, *S.epidermidis* and *Micrococcus* .These result, therefore,led us to select the *P. major* extracts for evaluating antibacterial activity especially against gram positive bacteria.

References

Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R., (2002). Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 97(7): 1027-1031.

Dulger, B., Gonuz, A., (2004). Antimicrobial activity of certain plants used in Turkish traditional medicine.Asian Journal of plant Sciences, 3(1):104-107.

Gupta, M.P., Arias, T.D., Correa, M., Lamba, S.S., (1979). Ethnopharmacognostic observations on Panamanian medicinal plants. Part I. Quarterly Journal of Crude Drug Research, 17: 115–130.

Hassawi, D., Kharma, A., (2006). Antimicrobial activity of some medicinal plants against pathogenic bacteria and fungi. Journal of biology science, 6:109-114.

Kharma, A., Hassawi, D., (2006). The genetic relationship and antimicrobial activity of Plantago species against pathogenic bacteria.World journal of agricultural sciences, 2(3):311-318.

Labhilili, M., Lmad, E., (1998). Techniques in biomolecular analysis.Wana Newsletter. 14:4-5.

Lynch, M., (1990). The similarity index and DNA fingerprinting. Molecular biology and evolution, 7:478-484.

McCutcheon, A.R., Ellis, S.M., Hancock, R.E.W., Tower, G.H.N., (1994). Antifungal screening of medicinal plants of British Columbia native peoples. Journal of Ethnopharmacology, 44: 157–169.

Moskalenko, S.A., (1986). Preliminary screening of Far-Eastern ethnomedicinal plants for antibacterial activity. Journal of Ethnopharmacology, 15: 231–259.

Meyer, J.J.M., Afolayan, A.J., Taylor, M.B., (1999) Inhibition of herbs simplex virus type Iby aqueous extracts from medicinal plants. Journal Ethnopharmacology, 52:41-43.

Mashhadian, N.V., Rakhshandeh, H., (2005). Antibacterial and antifungal effects of *Nigella sativa* exteracts against *S. aureus*, *P. aeroginosa* and *C. albicans*.Pakistan Journal of Medical Sciences, 21(1): 47-52.

Melendez, P.A., Capriles, V.A., (2005). Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. Phytomedicine, 13(4) : 272-276.

Nikaido, H., Vaara, M., (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiological Reviews, 1, 1-32.

Nostro, A., Ger, M.P., Angelo, VD,Cannatelli, M.A.C., (2000). Exteraction method and biouautography for evallution plant antimicrobial activity.Applied Microbiology. 15:379-85.

Ravn, H., Brimer, L. (2001). Structure and antibacterial activity of plantamajoside, a caffeic acid sugar ester from *Plantago major subs major*. Phytochemistry, 27(11): 3433-3437.

Rezaeipoor, R., Saeidnia, S., Kamalinejad, M. (2000) The effect of Plantago ovate on humoral immune responses in experimental animals. Journal Ethnopharmacology. 72:283-286.

Samuelsen, A.B., Hetland, G., Loslash, Vik, M., Paulsen, B.S., (2000). Protective Effect of Plantago major L. Pectin Polysaccharide against Systemic Streptococcus pneumoniae Infection in Mice. Scandinavian Journal of Immunology. 52(4): 348-355.

Simon, J.E., Chadwick, A.F., Craker, L.E., (1999). Herbs:An Indexed Bibliography.The scientific literature on selected herbs and aromatic and medicinal plants of the temperate zone.Archon books,Hamden,CT., 770.

Torota, G.J., Becker, J.F., (2000). Life science, fifth edition. USA: Macmillan.

بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره‌های گیاه داورویی بارهنگ با نام علمی *Plantago major*

الهه کیائی[۱]، معصومه مازندرانی[۲]، محبوبه آرودی[۳]، عزت الله قائمی[۴]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان
۲. . گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان
۳. باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان
۴. گروه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان

چکیده

خصوصیات ضدباکتریایی و ضدالتهابی گیاه دارویی بارهنگ کبیر شناخته شده است و از آن در درمان زخم، تب و بیماری‌های پوستی استفاده می‌کنند. این تحقیق به منظور بررسی اثر آنتی‌باکتریایی عصاره‌های آبی و جوشانده اندام‌های مختلف گیاه بارهنگ علیه باکتریهای پاتوژن انجام شده است. پس از جمع‌آوری گیاه از شمال ایران (روستای زیارت) و خشک کردن آن عصاره‌ها به روش پرکولاسیون آماده شدند. بررسی اثر ضدباکتریایی، به روش انتشار در آگار انجام گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره آبی نسبت به عصاره جوشانده این گیاه فعالیت ضدباکتریایی بیشتری دارد و باکتری‌های گرم منفی نسبت به کلیه عصاره‌ها مقاوم بودند. باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس و میکروکوکوس حساس ترین باکتری‌ها نسبت به عصاره‌های مورد بررسی بودند. در حالی که حداکثر هاله عدم رشد آنها بین ۱۸/۲-۱۳میلیمتر ارزیابی شد. این مطالعه نشان می‌دهد که گیاه بارهنگ ممکن است اثرات خوبی در درمان بیماری‌های مختلف داشته باشد، بنابراین کاربرد بالینی آن نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

کلمات کلیدی: بارهنگ کبیر، *Plantago major*، گیاهان دارویی، فعالیت ضدباکتریایی، استان گلستان

Variation bioactive metabolites of *Tanacetum parthenium* L. in two regions in North of Iran.

*Mazandarani, M[1]., Naseri, Gh.R[1]., Rezaei, M.B[2]

1. Dep. Biology, Islamic Azad Univ, Gorgan Branch, Gorgan, Iran
2. Forest and Rangeland Institute, Tehran, Iran

Abstract

Tanacetum parthenium L. is one of the most important medicinal herbs, has been used by the rural people of Golestan province for sedative pain, fever, headache, arthritis, asthma, toothache and menstrual disorders.Variation in bioactive components of *Tanacetum parthenium* L. were studied and compared for their essential oil, flavonoids and alkaloids of different parts of plant in two geographical regions of this province. Results showed *T. parthenium* which originated from 2200m produced the highest essential oils, flavonoids and alkaloids, especially in leaves but with low quality and quantities and reduced in flowers. Further more stem have not any bioactive components in two regions.

Key words: *Tanacetum parthenium* L, essential oil, flavonoid, alkaloid, Golestan province

Introduction

Tanacetum species, belongs to Asteraceae family totaling over 200 and distributed over Europe and West Asia and growing up to altitudes of 2000 meters contains several strongly scented annual and perennial species, and now grows in North and South America, Europe, North Africa, China, Japan and Australia (Jaime and Teixeira., 2004).

The aromatic herb fever few (*Tanacetum parthenium* L.) has long been used as a folk remedy for fever, migrain and arthritis (Thersa et al., 2001). It has been historically used for the treatment of headache, menstrual irregularities, stomachache and fevers by Greek and European herbalist (Tiuman et al., 2005 and Tyler, 1993). How ever, this aromatic plant was somewhat forgotten by pharmacists until late 1970 when claims of its efficacy in prevention 0f migraine were publicized in Britain (Groenewegen, Knight, & Heptinstall., 1992).

The terpenes in the essential oil are thought to associate with the biological activity of *Tanacetum*. Some earlier works have been reported on the essential oils of various *Tanacetum* species (Nori-Shargh et al., 1999, Baser et al., 2001, Goren et al., 2001 and Beauchamp et al., 2001). The volatile compounds from *T. vulgare* have been examined in detail (Keskitalo et al., 2001). In the case of *T. argyrophyllum*, α-thujone is reported to predominate in its essential oil (Goren et al., 2001). With respect to *T. parthenium*, many studies have been found that relate to the sesquiterpene lactone parthenolide of essential oil and flavonoids, which exhibit strong biological activity (Changquing et al., 2006, Awang, 1998, Jain and Kulkarni, 1999, Williams et al., 2003 and Long et al., 2003). Camphor and chrysanthenyl acetate were the main components of the essential oil of *T. parthenium* originated from England and Netherlands, it is aromatic perennial plants, wich wide distributed in the northern hemisphere (Hulten, 1968; Hussey, 1974; and Heywood, 1976).

Fever few is now among the 50-top-selling supplements in USA, which is commercially available like other common herbs in capsules or tea bags for migraine prevention (Susrurluk et al., 2007). Many researchers have studied that the bioactive component corresponding for the pharmacological functionality in essential oil and flavonoids (Mittra et al., 2000).

Further studies also showed that parthenolide of essential oils were effective in inhibition of some tumor cells (Wen et al., 2002) and inflammatory (Tiuman et al., 2005).

In addition fever few contains inherent constituents such as aromatic components (e.g.camphor) and flavonoids (e.g.luteolin and apigenin) was reported to significantly inhibit UV-induced mouse skin tumor genesis (McVean et al., 2000) and other tumors (Pedrialla & skibsted, 2002).

*e.mail: dr_mazandarani7@yahoo.com

As well known, many flavonoid in leaves and flowers of this plant possess anti-inflammatory and antioxidant activities such as metal chelating and free radical scavenging capacities (Pedrialla and skibsted, 2002) with privation of chronic diseases such as cardio vascular disease and cancer (Sultana & Saleem., 2004).

However due to wild dispersal of this plant in North of Iran (Golestan province) and has been long used in Golestanian traditional medicine, the objectives of our study were to investigate and compare of variation bioactive components of plant different parts in two natural geographical origins in south of Golestan province (Deraznoo mountain in 2200m and Ziarat in 500m).

Material and methods

Plant material

Aerial parts in blooming (leaves and flowers) of plant were collected in late of August of 2006 from two natural different regions (Deraznoo in 2200m and Ziarat in 500m) in Golestan province in North of Iran. They were dried in the shade for one week and powdered. Their botanical name identified in the plant systematic laboratory, college of science, Islamic Azad University of Gorgan Branch, Iran where voucher specimens were deposited.

Essential oil

200 gr of the dried powders of separate leaves and flowers were separately subjected to hydro distillation for 2h, in full glass apparatus. The oil was isolated using a Clevenger type apparatus and stored frozen in dark glass bottles until they were used. (Orav et al., 2006)

Oil analysis

The oils were analyzed by GC (9-A-shimadzu) and GC-MS (Varian - 3400) column (DB - 1, 60 mm 0.25 mm fused silica capillary column film thickness 0.25µm using a temperature program of 50-250°C at a rate of 4°C/min, injector temperature 260°C, carrier gas: Helium, the constituents were identified by comparison of their mass spectra with those in the computer liberary and with authentic compounds. The identifications were confirmed by comparison of their retention indices with those of authentic compounds or with literature data. The components of the oils were identified by matching their mass spectra and retention indices with those of the Wiley 275 library in the computer library and literature. The yield of each component was calculated per kg of the plant material, while its percentage composition was determined from the peak areas of the total oil composition.

Gas Chromatography

GC analyses were performed using a shimadzu – 9A gas chromatograph equipped with a flame ionization detector and quantitation was carried out on Euro Chrom 2000 from KNAUER by area normalization method and neglecting response factors. The analysis was carried out using a DB – 1 fused-silica column (60m x 0.25mm, film thickness 0.25µm, J & W Scientific Inc., Rancho Cordova, CA). The operating conditions were as follows: injector and detector temperature 250°C and 265°C, respectively; carrier gas, helium. Oven tem-perature programme was 40°C-250°C at a rate of 4°C/min.

Gas Chromatography / Mass Spectrometry

The GC/MS unit consisted of a varian Model 3400 gas chromatograph coupled to a Saturn II ion trap detector was used. The column was same as GC, and the GC conditions were as above. Mass spectrometer conditions were: ionization potential 70eV; electron multiplier energy 2000V.

The identity of the oil components was established from their GC retention indices, relative to C_7–C_{25} n–alkanes, by comparison of their MS spectra with those reported in the literature and by computer matching with the Wiley 5 mass spectra library, whenever possible, by co–injection with standards available in the laboratories.

Ethanolic extraction

Plants parts were dried, ground to find texture and after which it, 70% ethanol were added to 100 gr of dried plants powder in decanter for extended periods and the result ant extracts were obtained in period of 72h. the resultant extracts were concentrated, under reduced pressure finally each samples were diluted with propylene glycol for provide 4 concentration: 200, 100, 50 and 25 $mg.ml^{-1}$. (Mashhadian, et al., 2005)

Investigate quality of flavonoid and alkaloid

Falvonoids

The alcoholic extract (5ml, corresponding to 1g of plant material) was treated with a few drops of concentrated HCl and magnesium turnings (0.5g). The presence of flavonoids was indicative if pink or magenta-red color developed within 3 min (5).

Alkaloids

The alcoholic extract (corresponding to 2.5g of plant material) was evaporated to dryness and the residue was heated on a boiling water bath with 2N HCl (5ml). After cooling. The mixture was filtered and the filtrate was divided into two equal portions. One portion was treated with a few drops of Mayer's reagent and other with equal amounts of Wagner's reagent (3). The samples were then observed for the presence of turbidity or precipitation. A (+) score was recorded if the reagent produced only a slight opaqueness: a (++) score was recorded if a definite turbidity. But no flocculation was observed and a (+++) score was

recorded if definite heavy precipitate or flocculation was produced (4).

Results and discussion

Tanacetum parthenium L. (Tancy) commonly known as fever few and locally name " Dawoody vahshi "belongs to Asteraceae family is a perennial herb 14-45 cm in height, having a strong smell and greenish yellow feather like leaves. It is widely distributed in hedges and wants places 500 to 2200m in throughout of sunny position the road mountain in south of Golestan province in North of Iran.

The leaves have long been used as infusions or can be chewed in conditions like fever, migraine, headache, arthritis, asthma, toothache and menstrual pains by rural peoples of this region in Golestanian traditional medicine.

In this research we investigated and compared. The quantities of essential oils and quality of the most bioactive metabolites of plant (flavonoids and alkaloids) in different parts (leaves and flowers) in two geographical origins: Deraznoo in 2200m and Ziarat region in 500m, respectively. Results showed in Table 1 and Fig 1, 2.

The essential oil yields (v/w, on dried mass basis) of *T. parthenium* parts grown in Ziarat,were 0.66% in flowers and 0.12% in leaves, but in Deraznoo 0.49% and 0.16%, respectively; close to those reported for *T. argyrophyllum* (0.96–1.03%) and *T. parthenium* (0.30–0.83%) (Hendriks et al., 1996; Goren et al., 2001).

In height region (2200m), the essential oil percentage, quality flavonoids and alkaloids were increased especially in leaves. In two regions, stem have not any bioactive components.

Table1: Essential oil variation in different parts of plant (leaves and flowers).

	Ziarat (900m)		Deraznoo (2200m)	
Tanacetum parthenium	flawers	leaves	flawers	leaves
	0.66%	0.12%	0.49%	0.16%

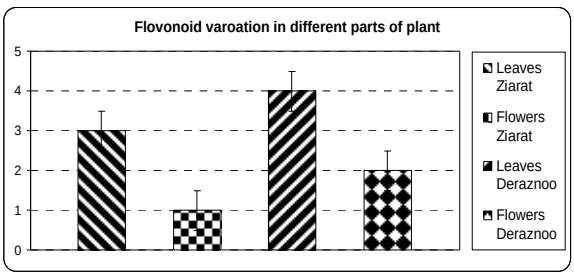


Figure 1: flavonoid variation in different parts of plant (leaves and flowers).

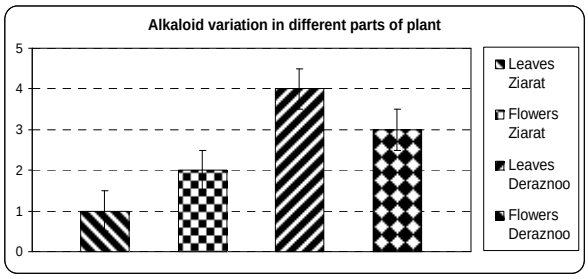


Figure 2: Alkaloids variation in different parts of plant (leaves and flowers).

According similar researches, we reported monoterpens of essential oils and flavonoids were considered as the most important biologically active principal of fever few (Shiravastara et al., 2006). The composition variation of sesquiterpen lactones, flavonoids of *T. parthenium* varies markedly and several chemo types from different geographical origins have already been classified. In similar reported, Tancy have different flavonoids from Tier Adel fuego, Argentina (Gorene, 2001), England and USA, tansy oil terpenoids and flavonoids obtained from two Canadian grown plants contained different quality and quantities (Keskitalo et al., 2001).

T. parthenium L. which originated from south west of Finland produced the highest bioactive compounds in flowers and reduced in leaves but in high concentration of flavonoids from South Finland in leaves (Susruluk et al., 2007).

Several authors have studied the variation of chemo type of terpenoides and flavonoids. Sorsa & et al found that camphor was the main components of flower in northern, but thujon in southern Finland (Susruluk et al., 2007), Sabinene, bornyl acetate and germacrene-D (Holopainen, 1989), essential oil quantities and their chemo type were detected from fever few grown in different regions of Finland.

Fever few also contains other variation secondary products such as less sesquiterpenes (Hethelyi et al., 1999) and several flavonoids compounds, but the other groups that grown different parts of Ognyanov and Todorova consist monoterpene glycocosides, sesquiterpene lactone (Schearer, 1984) such as parthenolide (Hendrisk and Bos, 1990) triterpens (Williams et al., 2003) and flavonoids (Christensen, 1999).

Variation fever few essential oil and chemo types in different origins have been investigated by the other authors (Keskitalo et al., 2001), Many factors are known to influence secondary metabolites (leaf/flower), ontogeny of plant sampling (Hendrisk et al., 1990) seasonal changes and even the extraction method (Gorene et al., 2001) many cause variation in the composition of secondary metabolites.

Jain and Kulkarni were reported that fever few extract exerted anti nociceptive and anti inflammatory effects (Jain and Kulkarni, 1999).

Williams et al. reported f *T. parthenium* showing activity of mitotic blocker, due to rich various flavonoids in leaves and disc-floret useful anti-inflammatory properties (Williams et al., 2003).

Conclusions

The goals of this study to compare the variation quantities and quality bioactive composition different parts of plant in two geographical origins in North of Iran. Assessment variation chemical of *T. parthenium* and its most used by the rural healers for migraine disorders allow us to identify unique chemo types with potential industrial value and bioassay the activity of the secondary bioactive metabolites. With such information the most desirable chemotypes can be selected for plant drugs product.

References

Awang, D.V., (1998). Prescribing therapeutic feverfew *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip., syn. (*Chrysanthemum parthenium* (L.) Bernh.), Integrative Medicine 1 (1), pp. 11–13.

Baser K.H., **Demirci, C.B., Tabanca, N., ? zek, T., and Goren**, **N. (2001)** Composition of the essential oils of *Tanacetum armenum* (DC.) Schultz Bip., T. balsamita L., T. chiliophyllum (Fisch. & Mey) Schultz Bip. var. chiliophyllum and T. haradjani (Rech. Fil.) Grierson and the enantiomeric distribution of camphor and carvone, Flav. Fragr. J. 16, pp. 195–200.

Changqing, W., Feng, C., Xi, W., Hyun-Jin, K., Guo-qing, H., Vivian, H.Z., George, H. (2006). Antioxidant constituents in feverfew (*Tanacetum parthenium*) extract and their chromatographic quantification. Available online at www.sciencedirect.com. Food Chemistry 96 (2006) 220-227.

Goren, N., Demirci, B., and Baser, K.H.C. (2001). Composition of the essential oils of Tanacetum spp, From Turkey. Flav. Fragr. J. 16, pp. 191–194.

Groenewegen, W.A., Knight, D.W., and Heptinstall, S. (1992). Progress in the medicinal chemistry of the herb feverfew. In G.P. Ellis & D.K. Luscombe (Eds.). Progress in medicinal chemistry. pp. 217-238.

Hendriks, H., Bos, R., and Woerdenbag, J., (1996). The essential oil of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip, Flav. Fragr. J. 11, pp. 367–371.

Hethelyi, E., Tetenyi, P., Danos, B., and Koczka, I. (1999). Phytochemical and antimicrobial studies on the essential oils of the Tanacetum vulgare clones by gas chromatography/mass spectrometry, Herba Hung 30, pp. 82–90.

Holopainen, M., and Kauppinen, V. (1989). Antimicrobial activity of different chemotypes of Finnish tansy, Planta Med. 55 (1989), p. 103.

Hulten, E., (1968). Flora of Alaska and Neighboring Territories. A Manual of the Vascular Plants, Stanford University Press, Stanford CA, 1008 p.

Hussey, J., (1974). Hussey, Some useful plants of early New England, Econ. Bot. 28, pp. 311–337.

Jaime, A., Teixeira, S., (2004). Minning the essential oils of the Anthemidaea, A.J. Biotech. 3, (12). 706-720.

Jain, N.K. and Kulkarni, B. (1999). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Tanacetum parthenium* L. extract in mice and rats, J. Ethnopharmacol. 68, pp. 251–259.

Keskitalo, M., Pehu, E., and Simon, J.E (2001). Variation in volatile compounds from tansy (*Tanacetum vulgare* L.) related to genetic and morphological differences of genotypes, Biochem. Syst. Ecol. 29, pp. 267–285.

Long, C., Sauleau, P., David, B., Lavaud, C., Cassabois, V., Ausseil, F., and Massiot, G. (2003). Bioactive flavonoids of Tanacetum parthenium revisited, Phytochemistry 64, pp. 567–569.

Mashhadian, N.V., Rakhshandeh, H., (2005). Antibacterial and antifungal effects of *nigella sativa* extracts against S.aureus, P. aero ginosa and C. albicans. Pakistan Journal of medical science, 21(1): 47-52.

McVean, M., Xiao, H., Isobe, K-I., & Pelling, J.C. (2000). Increase in wild-type p53 stability and transactivational activity by the chemopreventive agent apigenin in keratinocytes. Carcinogenesis, 21(4), 633-639.

Mittra, S., Datta, A., Singh, S.K., & Singh, A. (2000). 5-Hydroxy-tryptamine-inhibiting property of feverfew: role of parthenolide content. Acta pharmacola gica Sinica, 21, 1106-1114.

Nori-Shargh, D., Norouzi-Arasi, H,. Mirza, M., Jaimand, K., and Mohammadi, S. (1999). Chemical composition of the essential oil of Tanacetum polycephalum (Schultz Bip. ssp. heterophyllum), Flav. Fragr. J. 14, pp. 105–106.

Orav, A., Raal, A., Arak, E., and Kailas, T. (2006). Composition of essential oil of Artemisia absinthium L. of different geographical origin. Estinian Acad. Sci. Chem. 55, 3, 155-165.

Pedrialla, P., & Skibsted, L.H. (2002). Antioxidant synergy and regeneration effect of quercetin, (-)-epicatechin, and (+) catechin on α-tocopherol in homogeneous solutions of peroxidating methyl linoleate. Journal of Agricultural and Food chemistry, 50, 7138-7144.

Schearer, W.R., (1984). Components of oil of tansy (*Tanacetum vulgare*) that repel Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineara*), J. Nat. Prod. 47, pp. 964–969.

Shiravastara, R., Pechadre, J.C., John, G.W., (2006). *Tanacetum parthenium* and *Salix alba* combination in migraine prophylaxis, J. Pub med, 26(5), 287-295.

Sultana, S., and Saleem, M. (2004). *Salix caprea* inhibits skin carcinogenesis in "murine Skin: inhibition ofoxidative stress, ornithine decarboxylase activity and DNA synthesis, Journal of Ethnopharmacology. pp. 267-276.

Theresa, H, Piela, S., and Xiufang, L. (2001). Feverfew extracts and the sesquiterpene lactone parthenolide inhibit intercellular adhesion molecule-1 expression in human synovial fibroblasts. Cellular immunology 209, 89-96.

Tiuman, T.S., Nakamura, T.U., and Nakamura, C.V., 2005. Antileshmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from T. parthenium, antimicrobial agent and Chemotherapy. (49) 176-182.

Tyler, V.E. (**1993**). The honest herbal: a sensible guide to the use of herbs and related remedies (third ed.), Pharmacey.tiealProducts Press, Binghamton. pp. 133-134.

Wen R. You, S.Y. Lee, C.H. Song and D.G. Kirn. (**2002).** Oxidative stress-mediated apoptosis. The anticancer effect of the sesquiterpene lactone parthenolide, Journal of Biological Chemistry 277(41), pp. 38954-38964.

Williams, C., Harborne, J.B. Geiger, H. Robin, J. and Hoult, S. (2003). The flavonoids of *Tanacetum parthenium* and T. vulgare and their anti-inflammatory properties, Phytochemistry 51, pp. 417–423.

مقایسه متابولیت‌های ثانوی اندام‌های مختلف گیاه دارویی *Tanacetum parthenium* L. در دو رویشگاه شمال ایران

معصومه مازندرانی[۱]، غلامرضا ناصری[۱]، محمدباقر رضایی[۲]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

۲. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی کشور، تهران

چکیده

گیاه دارویی داوودی وحشی با نام علمی *Tanacetum parthenium* L. یکی از گونه‌های مهم و ارزشمند دارویی استان گلستان است که در طب سنتی مردم آن منطقه از ارزش خاص دارویی مخصوصاً به عنوان تب‌بر قوی، مسکن سردرد، کمردرد، دندان درد، دردهای قاعدگی، آسم و ضدالتهاب مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این تحقیق به بررسی و مقایسه مهمترین مواد موثره ثانوی اندام‌های گیاه موردنظر در دو رویشگاه متفاوت و طبیعی جنوب شرق استان گلستان پرداختیم. نتایج نشان داد با افزایش ارتفاع بر میزان روغن اسانسی، فلاونوئید و آلکالویید مخصوصاً در برگ‌های گیاه افزوده می شود و تقریبا در هر دو رویشگاه ساقه گیاه فاقد متابولیتهای مورد مطالعه می‌باشد.

کلمات کلیدی: *Tanacetum parthenium* L.، روغن اسانسی، فلاونوئید، آلکالوئید، اندام‌ها، رویشگاه‌های متفاوت، استان گلستان

Three New Records of Oscillatorian Cyanophyta for the Paddy –Fields Algal Flora of Iran

Siahbalaie, R[1]., Afsharzadeh, H.[1]., *Shokravi, Sh[2]

1. Dep. Biology, Faculty of Science, Isfahan Univ., Isfahan, Iran
2. Dep. Biology, Islamic Azad Univ-Branch Gorgan, Gorgan, Iran

Abstract

In this study, three Cyanophyceae species new for Iran are reported. These specimens are *Oscillatoria okeni* Agardh ex.Gomont, *O.earlei* Gardner and *O.bornetii* Fritsch. They were determined to be epidaphic and endaphic which were found at the paddy-field of Golestan province north of Iran and near the Caspian Sea.

Key Words: Cyanophyta, Iran, Paddy-Field, Taxonomy

Introduction

The species of Oscillatorean cyanophytes are distributed all over the world (Anagnostidis & Komarek, 1990). Many populations of Oscillatoriacen cyanophyta show considerable morphological variation (John et al., 2002). However a combination of traditional and modern taxonomy (in addition of physiology and biochemistry); need to determine the real place of this genus and oscillatorean cyanophyta as a whole. Although it has been emphasized that the taxonomy, however, based still on morphological characters (Anagnostidis & Komarek, 1990).

It seems that in north paddy fields of Iran, especially Golestan province, some strains of Oscillatorian cyanophyta especially are common (Shokravi et al., 2002, 2003) but there is no clear report about their morphological characterizations and taxonomic situations. Morphological variability, degree of polymorphism and geographical variation in form of the *Oscillatoria, lyngbya* and *plankthothrix* make some problems in studying of this organism. Our personal experiments have shown that using famous common manuals for determination of this genus like the other oscilatoriales in our country have no useful results and it is seriously need revision of these manuals or even identification keys with regard to special morphological variations of specimens with emphasize on local conditions (Shokravi et. al 2002).

Material and Methods

Soil samples were obtained from paddy fields of different stations of Golestan province (north of Iran and near Caspian sea–Fig.1). A complete description about stations and their geographical and environmental conditions have been reported in Shokravi et al. (2002). The collected soils were cultured by usual methods (Kaushik, 1987). After colonization and isolation, the cyanobacterium *Fischerella* sp., was purified and turned to axenic condition (Kaushik, 1987). Identification was done according to John et al. (2002), Anagnostidis and Komarek (1990), Tiffany and Britton (1971), Prescott (1962), Desikachary (1959) and Geitler (1932). Stock cultures were grown in N-free medium. Cultured in solid BG11 medium ($NaNO_3$, 17.65 mM; $MgSO_4.7H_2O$, 0.3 mM; $CaCl_2.2H_2O$, 0.25 mM; $K_2HPO_4.3H_2O$, 0.18 mM; $Na_2MgEDTA$, 0.003 mM, Citrate ferric ammonium, 0.02 mM; Acid Citric, 0.029 mM; Na_2CO_3 0.188 mM; microelements 1 ml l^{-1}). The cultivation was done under different illumination (2, 11, 24, 104, 300µE m^{-2} s^{-1}) and pHs (5, 6, 7, 8, 9). The temperature was adjusted on 30±1°C. Illumination was supplied with 40W cool white fluorescent tubes. Plates were placed at different distances from the light source to obtain a linear gradient of irradiance**.** Light measurements were made with a Licor LI-1000 Datalogger equipped with a quantum sensor. Alternatively, other experiments were carried out in batch cultures, using 300 ml of inoculated medium in

*e.mail: sshokravi@yahoo.com

500 ml. Erlenmeyer flasks stoppered with cotton plugs. Culture was maintained without aeration or stirring and buffered and illuminated as above. After 48h of culture, when cells were fully adapted to light regime and pH, aliquots were taken and used for determinations.

Morphological observations were made in liquid as well as on solid media. Thallus growth, filament structure, in addition of biometrical information were recorded (Gugger & Hoffmann, 2004). Colony formation and cells shapes were evaluated by binocular and light microscope (in addition phase contrast and epifluoresscence, microscopy) each day in two week's periods. The growth curves were attained via measurement of chlorophyll daily by Jensen method (1978). Statistical analysis was done with software SPSS ver.10.

This spiciments show the high distribution, that it depends on physical and chemical charecteries of the soil, specially pH(Table1).

Fig1. Goles tan Province map. Stations have been shown with*

Table1. Distrobotion of blue-green algae Oscillatoria in the paddy field of Golestan province

Genus	Species	spring					summer					autumn					winter				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Oscillatoria	earlei	F	R	R	R	F	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	R	-	R	-	-
	okeni	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-
	bornetii	R	R	F	F	R	R	R	R	F	F	R	F	F	R	R	R	F	R	R	R

D= Dominant (75-100%), A= Abundence (50-75%), F= Frequence (25-50%), R= Rare (< 25%).
1- Aliabad ,2-Kordkoy ,3-Minodasht ,4- Azadshahr,5-Gorgan

Results

In this study 17 species from blue-green algae Oscillatoria at the paddy field of Golestan province was identified.only new records listed in this paper.the taxonomy of this species is as follows.

Divisoin:Cyanobacteria
Classis:Cyanophyceae
Order:Oscillatoriales
Familia:Oscillatoriaceae
Genus:Oscillatoria

***Oscillatoria okeni* Agardh ex.Gomont**

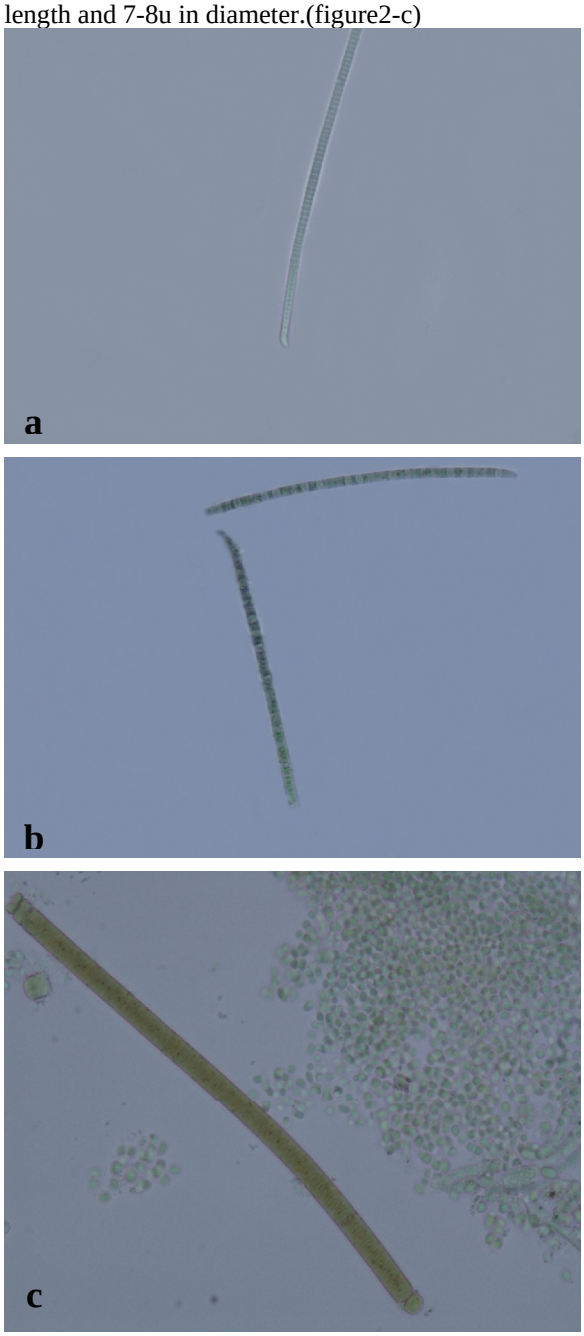
Trichome green, more or less curved toward the ends; apical cell without calyptra, obtuse; cells ungranulate, 3u in length and 4u in diameter (Fig. 2-a).

***O.earlei* Gardner**

Trichome green, relatively erect, not constricted, usually short and nearly curved toward the apical cell; apical cell at light microscopy seems conspicuously tapered, not capitate and not calyptrate; cells 1.3u in length and 3-3.2u in diameter (Fig 2-b).

***O.bornetii* Zukal**

Trichome more or less erect, slightly curved, not tapering or even decreasing in diameter through the end; apical cell rounded, not capitate, not calyptrate; cells granulated, not constricted at the cross wall, 3u in length and 7-8u in diameter.(figure2-c)



a) Oscillatoria okeni Agardh ex.Gomont
b) O.earlei Gardner
c) O.bornetii Zukal

Figure2. Three new records of Oscillatorian Cyanophyta for the paddyfields Algal Flora of Iran

Discussion

Cyanobacterian researches is a new matter in Golestan province and Iran as a whole. So only a few oscillatorian morphotypes have been cultured, and therefore the high variability of morphotypes found in nature is under-represented in culture (Shokravi et al.2002). Before this, only some genera of stigonematalean cyanophyta have been characterized from axenic culture strains, including some strains of *Fischerella* and *Nostoc* (Soltani et al 2006).

However results could be able to draw a relatively primitive picture of the morphological and taxonomical situation of oscillatorian cyanophyta in paddy-Fields of North of Iran. These organisms showed relatively variable characters from morphological point of view. It seems that pH fluctuations caused noticeable changes in the morphology of the organism. The highest and lowest acidities (pH9 and pH5) showed the points for starting highest variations. On solid medium, all isolates had a creeping growth. This was in agreement with other papers (Perrona et al., 2004).

By statistical analysis, it is difficult to reach a unique pattern in morphological variation in vegetative cells of this strain. However, with this exception (cross expanding of the main axis), possibly high light intensity (300 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$), caused noticeable morphological variations especially in pH 5. In this condition, *O.okeni* tends to get a different topological configuration. In minimum light intensity (2 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$) and pH 5 cross enlargement of the trichome of *O.bornetti* was seen. However results showed that these organisms can be considered an alkalophilic organism. Optimal growth rates were observed at pH 7 for *O.okeni and O.bornetti*, but pH 8.4 for *O.earlei* which is nearly equal to acidity than that usually found in the rice fields from which the cyanobacterum was isolated (Soltani & Fernandez- Valiente, unpublished data).

Acknowledgments

The authors would like to appreciate Professor Elvira Perona, Mrs. Ladan Baftechi for their kind collaboration in laboratory studies and Dr. Youness Ghasemi for the molecular identification confirmation of cyanobacterial strains.

Refrences

Anagnostidis, K. and Komarek, J. (1990) Modern approaches to the classification of cyanobacteria. Stigonematales. Archieves for hydrobiology 14, 224-286.

Anand, N.L., Radha, R.S., Hopper, G.R., Subramanian, T.D. (1990) Blue-green algae as biofertilizers: Certain view points on the choice of suitable isolates. Perspective in phycology, International symposium of phycology at university of Madras, Today and Tomorrow's Publishers. New Delhi, India.

Poza-Carrion, C., Fernandez-Valiente, E., Pinas, F., Leganes, F. (2001) Acclimation of photosynthetic pigments and photosynthesis of the cyanobacterium *Nostoc* sp. Strain UAM 206 to combined fluctuations of irradiance, pH, and inorganic carbon availability. Journal of Plant Physiology 158, 1455-1461.

Desikachary, T.V. (1959) Cyanophyta. Indian council of agricultural research monographs on Algae New Delhi, India.

Falch, BS., Konig, G.M., Wright, AD., Sticher, O., Ruegger, H., Bernardinelli, G. (1993) Ambigol a and B - New Biologically Active Polychlorinated Aromatic Compounds from the Terrestrial Blue-Green Alga *Fischerella ambigua*. Journal of Organic Chemistry 58, 6570-6575.

Geitler, L. (1932) Cyanophyceae von Europa Kryptogamen flora Akademiche Verlagsgesellschaft.- Leipzig

Gross, EM., Wolk, CP., Juttner, F. (1991) Fischerellin, a New Allelochemical from the Fresh-Water Cyanobacterium Fischerella-Muscicola. Journal of Phycology 27, 686-692.

Gugger, MF., Hoffmann, L. (2004) Polyphly of true branching cyanobacteria (Stigonematales). International Journal Of Systematic and Evolutionary Microbiology 54, 349-357.

Jensen, A. (1978) Chlorophylls and carotenoides, In: Handbook of Phycological Methods, Physiological and Biochemical Methods. eds. Hellebust, J.A. & Craigie, J.S., Cambridge University Press.

John, D.M., Whitton, B.W., Brook, A.J. (2002) The Freshwater Algal Flora of The British Isles - Cambridge University Press.

Kaushik, B.D. (1987) Laboratory methods for blue-green algae. Associated Publishing Company, New Delhi, India.

Baftechi, L., Nejad Sattari, T., Ebrahimzadeh, H., Shokravi, Sh. (2002) The effects of light intensity and duration on growth and heterocyst frequency of the cyanobacterium *Fischerella sp*.- M.Sc. thesis, Faculty of Science, Tehran University.

Boussiba, S. (1988) *Anabaena azollae* as biofertilizer. In: Algal biotechnology, eds, Stadler, T., J., Millon, M.C.Verdus, Y. Karamanos,H.Morvan and D. Christiaen, Elsevier applied science.

Castenholz, R.W. (2001) Class I: "Chloroflexi". In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, eds. Boone, D.R.; Castenholz, R. W. and Garrity, G.M., New York, Springer-Verlag.

Perona, E., Abol, M., Bonilla, I., Mateol, P. (2003) Cyanobacterial diversity in Spanish river determined by means of isolation cultures. Morphological variability of isolates in relation to natural populations. Algological Studies 109 Cyanobacterial research 4, 475 486.

Prescott, G.W. (1962) Algae of the western great lake area. W.M.C. Brown Company Pub.

Shokravi, Sh., Tabatabaei, M., Ghasemi, Y., Baftechi, L., Soltani, N. (2003) The effects of light intensities and duration on antibacterial production abilities, morphological variations and ammonium liberations of *Fischerella* sp. collected from Paddy-fields of Iran. Proceeding of the 11th International symposium on phototrophic prokaryotes, Tokyo, Japan.

Shokravi, S., Soltani, N., Baftechi, L. (2002) Cyanobacteria as biofertilizer in paddy fields.- National Research Council of Islamic Republic of Iran,Grant no. NRCI 489-66.

Shokravi, Sh., Soltani, N., Baftechi, L. (2001) Applied research management of cyanobacteria in Iran: problems and solutions. The first Iranian Congress on Applied Biology , Islamic Azad university, Mashhad, Iran.

Soltani, N., Khavari-Nejad, R., Tabatabaei, M., Shokravi, Sh., Fernandez-Valiente, E. (2006) Variation of nitrogenase activity, photosynthesis and pigmentation of cyanobacterium *Fischerella ambigua* strain FS18 under different irradiance and pH. World journal of microbiology and biotechnology 22(6), 571-576.

Tiffany, L.H., Britton, M. (1971) The algae of the Illinois. New York McGrow Hill.

Valiente, E.F., Leganes, L. (1989) Regulatory effect of pH and Incident Irradiance on the levels of Nitrogenase activity in the cyanobacterium UAM205 Journal of Plant Physiology 135, 623-627.

گزارش سه گونه جدید اسیلاتوریا برای فلور شالیزارهای ایران

رقیه سیاه‌بالایی[۱]، حمید افشارزاده[۱]، شادمان شکروی[۲]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

۲. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان

چکیده

در این پژوهش، سه گونه جدید سیانوفیت برای نخستین بار از ایران گزارش شده است. این گونه‌ها عبارتند از: *Oscillatoria okeni* Agardh ex.Gomont, *O.earlei* Gardner and *O.bornetii* Fritsch. گونه‌های مذکور به صورت اپی دافیک و اندافیک از شالیزارهای استان گلستان، مجاور دریای خزر معرفی گردیده است.

کلمات کلیدی: ایران، تاکسونومی، سیانوفیتا، شالیزار

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.