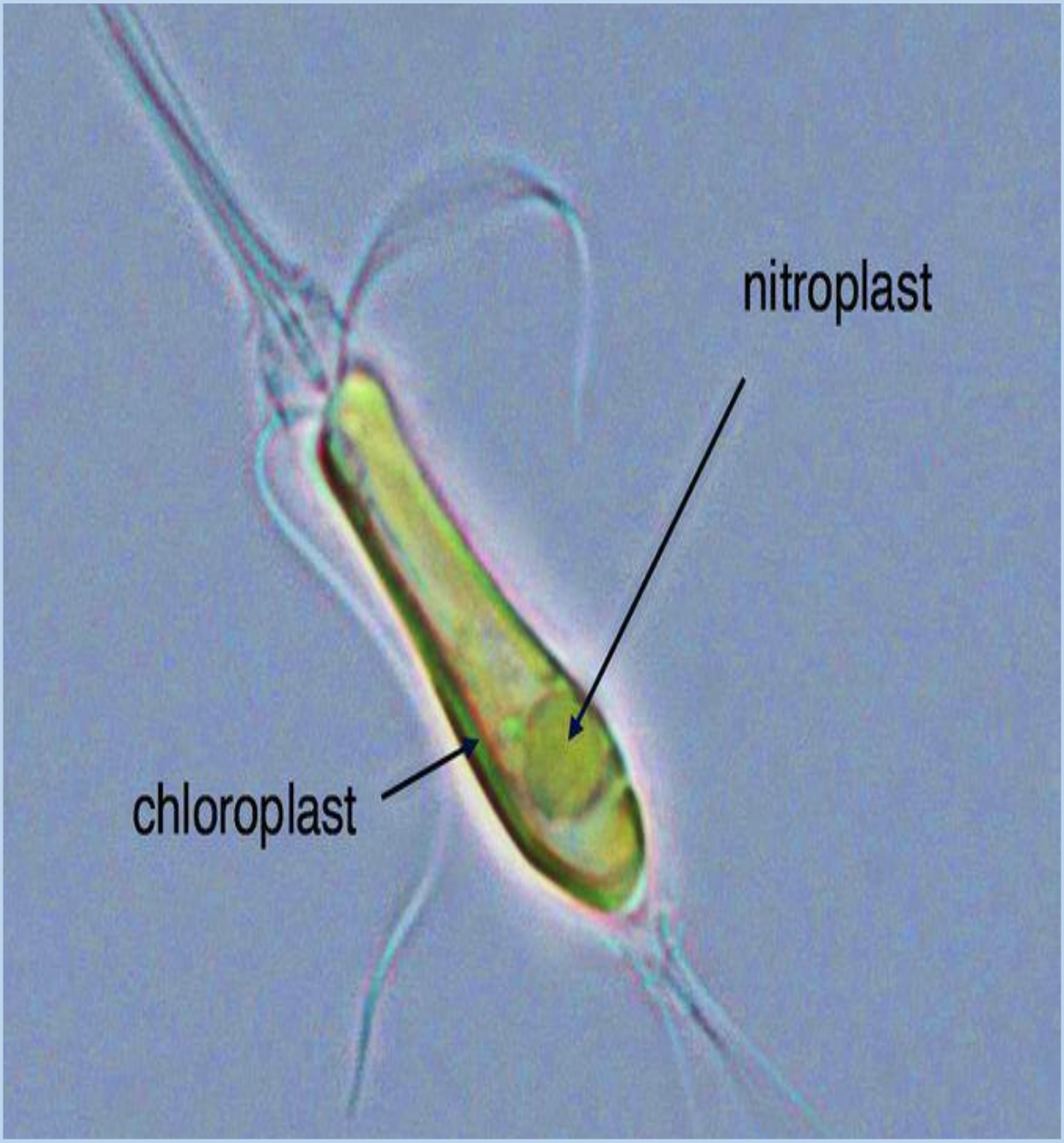
انجمن زیست شناسی ایران

مجله زیست شناسی ایران

دوفصلنامه

جلد ۶، شماره ۱۲، پائیز و زمستان ۱۴۰۱

ISSN 2008-9406



مجلهٔ زیست‌شناسی ایران

جلد۶، پیاپی۱۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۱

صاحب امتیاز: انجمن زیست شناسی ایران

مدیر مسئول : دکتر محمد نبیونی

سردبیر: دکتر علی فرازمند

ویراستار: دکترعلی فرازمند

مدیر اجرایی: امیرحسین بندلی

آماده‌سازی جلد: امیرحسین بندلی

ناظر چاپ: عارف آریافر

چاپ: نشر کُنام

هیئت تحریریه:

دکتر ناصر آق

دکتر سعید امین‌زاده

دکتر اباصلت حسین‌زاده

دکتر فرشاد درویشی

دکتر غلامرضا رکنی لموکی

دکتر علیرضا ساری

داوران:

دکتر سمیه اسمعیلی رینه، دکتر وحید اکملی، دکتر منصورافشارمحمدیان، دکتر سعید امین‌زاده، دکتر علیرضا ایرانبخش، دکتر سعیده جعفری نژاد، دکتر فرشاد درویشی، دکتر شکیبا درویشعلیپور، دکتر اتابک روحی امینجان، دکتر علیرضا ساری، دکتر سپیده سپهری، دکتر محسن شریفی، دکتر زهرا علیزاده، دکتر مرتضی عطری، دکتر عطاالله کالیراد، دکتر ربابه لطیف، دکتر رضاندرلو، دکتر حلیمه حسن پور

آدرس: تهران، خیابان شهید یدالله کلهر، پلاک ۲۸۵- واحد۱۷، دفتر انجمن زیست‌شناسی ایران

سایت اینترنتی: www.ibs.org.ir

سایت مجله زیست‌شناسی ایران: www.ijbio.ir

تلفکس : ۰۲۱۶۶۹۱۶۰۰۷

۱۵۰،۰۰۰ ریال

راهنمای نگارش مقاله

الف) هدف: مجله زیست شناسی ایران به شکل فصلنامه و هر سه ماه یکبار توسط انجمن زیست شناسی ایران منتشر می‌شود. هدف از انتشار این مجله معرفی مسائل و مفاهیم آموزشی و پژوهشی و کاربردی دانش زیست شناسی، بویژه در کشور، در زمینه های مختلف و متنوع علوم است، جهت افزایش سطح دانش زیست شناسی و آشنا ساختن جامعه با تحولات و چالشهای آن در سطح ملی و بین المللی است.

ب) نکات راهنما در نگارش:

۱- در مقاله، قواعد دستور زبان فارسی و رسا بودن جملات مورد توجه ویژه قرار گیرد.

۲- مقالات ارسالی برای چاپ در این مجله نباید قبلاً چاپ شده (مگر در شکل خلاصه در گردهماییها) و یا به طور همزمان برای چاپ به مجلات دیگر ارائه شده باشد.

۳- مسئولیت درستی مطالب مندرج در مقاله بر عهده نویسنده یا نویسندگان مقاله است.

۴- مجله در پذیرش، رد، و اصلاح (ویرایش و پیرایش) مقالات آزاد است.

۵- استفاده از مقالات مجله با ذکر مآخذ آزاد است.

۶- مقالات دریافتی توسط هیأت تحریریه با همکاری متخصصان داوری شده، در صورت تصویب با رعایت نوبت به چاپ می رسد . تصمیم نهایی برای چاپ مقاله توسط هیأت تحریریه صورت می گیرد.

ج) روش تنظیم مقاله: از اساتید، متخصصان و پژوهشگرانی که مایل به چاپ مقالات خود در مجله زیست شناسی ایران هستند خواهشمند است نکات زیر را در تدوین و ارسال مقاله رعایت فرمایند.

۱- مقالات ارسالی می تواند به شکل مروری و یا مقاله علمی پژوهشی در زمینه آموزش و پژوهش و نقد برنامه های آموزشی باشد.

۲ – در مقالات مروری باید مقتضیات و ضروریات ویژه این شکل از مقالات رعایت شود. انتظار می رود کانون توجه این مقالات مسائل روز و در عین حال عامتر علمی باشد.

۳- مقالات باید به زبان فارسی تهیه شوند و هر مقاله یک چکیده به انگلیسی داشته باشد.

۴- مقالات نباید از ۱۲ صفحه چاپ شده در مجله (حدود ۶ هزار کلمه) تجاوز کند.

۵- مقالات بایستی با حداقل فاصله خطوط ۱/۵ سانتیمتر و به صورت یک رو در کاغذ قطع A4 تایپ شود. حاشیه بالا و پایین و طرفین ۳ سانتیمتر در نظر گرفته شود تا امکان ویرایش آن فراهم باشد.

۶- هر مقاله باید دارای قسمتهای زیر باشد: عنوان مقاله، مشخصات مؤلف یا مؤلفین و آدرس دقیق همراه با شماره تلفن و email فرستنده (مسئول مکاتبات)، چکیده به فارسی و انگلیسی با ۲ تا ۵ واژه کلیدی (keywords)، و فهرست منابع.

۷- شکلها، جداول و نمودارها شماره گذاری و به همراه زیر نویس آنها در انتهای متن جداگانه آورده شود.

۸- فهرست منابع باید به ترتیب زیر به صورت الفبایی (نام خانوادگی اولین مؤلف) تنظیم و شماره هر مورد در متن داخل پرانتز آورده شود: مقاله) نام خانوادگی مؤلف یا مؤلفین، حروف نخست نام کوچک، (سال انتشار)، عنوان مقاله، نام مجله و شماره مجله و شماره صفحات. و کتاب) نام خانوادگی مؤلف یا مؤلفین، حروف نخست نام کوچک، سال انتشار، و کتابهای ترجمه: نام کتاب، تعداد صفحات، نام خانوادگی مؤلف یا مؤلفین، حروف نخست نام کوچک، سال انتشار، نام مترجم یا مترجمین، تعداد صفحات.

۹ – در نوشتن منابع، در صورت استفاده از منابع فارسی، ابتدا این منابع و سپس منابع خارجی آورده شود.

۱۰- تایپ مقاله با 2007 یا word 2003 در محیط ویندوز یک ستونی انجام شود.

۱۱- در صورت دسترسی به مشخصات DOI ، لطفاً در پایان مقاله وارد کنید.

برای ارسال مقاله به صورت online از سایت مجله زیست شناسی ایران به نشانی www.ijbio.ir استفاده فرمایید.

فهرست

توسعه آموزش زیست شناسی با استفاده از مدل سازی و دست سازه ها ۲۰۳
حسین فراست

رشد افسارگسیخته سرخس آبی (Azolla filiculoides, Lam.) در تالاب انزلی؛ تراژدی معرفی یک گونه مهاجم به یکی از مهم‌ترین پیکره‌های آبی ایران..... ۲۲۶
علیرضا رادخواه، سهیل ایگدری، هادی پورباقر و اسماعیل صادقی‌نژاد ماسوله

توسعه فناوری حسگرها و تکنیک‌های مولکولی شناسایی تهدیدهای زیستی ۲۳۶
آناهیتا شریعت

معرفی ترکیب نشانگرهای مولکولی جدید در تعیین جنسیت ماهیان خاویاری به منظور تشخیص جنسیت در سنین مختلف ۲۴۸
امید جعفری، حامد پاکنژاد و مریم نصراله پورمقدم

تکنولوژی CRISPR-CAS و کاربرد آن در مرحله پس از برداشت گیاهان باغبانی ۲۵۵
محمد فضلی

جدال ملکولی ویروس‌های بیمارگرگیاهی با گیاهان میزبان..... ۲۶۰
مهرداد صالح‌زاده و سعیده دهقانپور فراشاه

تحقیق در زمینه یک بیماری فراگیر..... ۲۷۱
حورا بحرالعلوم، ساقی نورایی، سعید امین زاده

مروری بر خواص پروبیوتیک جلبک اسپرولینا ۲۷۴
بهاره نوروزی

توسعه آموزش زیست‌شناسی با استفاده از مدل‌سازی و دست‌سازه‌ها

حسین فراست*

ایران، تهران، دانشگاه فرهنگیان، گروه آموزش زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۰۱

چکیده

استفاده از روش‌های فعال و نو به جای روش‌های سنتی در آموزش، می‌تواند فرایند یادگیری را بهبود و ارتقاء بدهد. در راستای برنامه‌های گروه آموزشی زیست‌شناسی و دبیرخانه کشوری زیست‌شناسی (بند فعالیت‌های بومی) و به منظور ایجاد خلاقیت در دانش‌آموزان، به ویژه در دروس علوم تجربی و زیست‌شناسی، استفاده از مدل‌سازی و دست‌سازه‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد. هدف این مقاله ارائه نمونه‌هایی از کاربرد و مزایای مدل‌سازی در آموزش زیست‌شناسی به صورت موضوعی است. جامعه آماری این مطالعه تمام کتاب‌های زیست‌شناسی در مقطع متوسطه دوم در رشته زیست‌شناسی می باشد. روش تحقیق در این پژوهش توصیفی بوده و با استفاده از مطالعات اسنادی، ترجمه محتوای تارنماهای فراهم کننده راه‌حل‌های آموزشی برای مؤسسات آموزشی و نیز، استفاده از تجربیات شخصی نویسنده، انجام شده است. نتایج پژوهش حاکی از آن است که ارائه آموزش مبتنی بر مدل سازی در مقایسه با روش‌های مرسوم می‌تواند در سطوح مختلف شناختی بلوم از جمله دانش، فهم و به ویژه درک و کاربست مطالب تأثیر مثبتی داشته و می‌تواند بهبود فعالیت‌های یاددهی- یادگیری شده و کارآیی و اثربخشی نظام آموزشی را به دنبال داشته باشد. در این مطالعه بیش از ۲۵ طرح و مدل در آموزش زیست‌شناسی ارائه شده است، و بنابراین امکان‌پذیری استفاده عملی از روش مدل سازی در آموزش زیست‌شناسی مورد تایید و تاکید قرار گرفته است. در نهایت پیشنهاد می‌شود که تدوین تدریس با استفاده از مدل‌ها و دست‌سازه‌ها توسط مدرسان زیست‌شناسی توسعه یابد، چرا که از این طریق می‌توان با کمک فراگیران کمبود امکانات آزمایشگاهی را به طور نسبی جبران نمود.

واژگان کلیدی: مدرسه، آموزشگاه، یادگیری، تدریس، علوم پایه.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: Hussein.Farasat@gmail.com

مقدمه

دنیای امروز نیازمند آموزش و تربیت افراد، دانش‌آموزان و دانشجویانی است که قدرت شناخت و استفاده از آموخته‌های خود را دارند. ژان پیاژه یکی از اهداف مهم تربیت در جهان معاصر را پرورش هوش، یعنی قدرت فهم و آفرینندگی و حل مسائل زندگی، در فراگیران دانسته و نیل به این هدف را مستلزم پرورش روح علمی و آشنایی با علوم تجربی می‌دانسته است (کیانی، ۱۳۸۶).

مدل‌ها و دست‌سازه‌های علمی نقش کلیدی در تبیین و درک علمی دارند. آنها بازنمایی‌هایی هستند که پدیده‌های پیچیده را توصیف یا ساده می‌کنند، در پیش‌بینی رویدادهای آینده به‌کار می‌روند و برقراری ارتباط میان ایده‌ها را تسهیل می‌کنند (اسوبودا و پاسمور، ۲۰۱۳)، همچنین آنها موجودیت‌هایی را قابل مشاهده می‌کنند که مشاهده آنها با چشم غیرمسلح امکان‌ناپذیر است (فرانکوئور، ۱۹۹۷). ایده‌ی یک مدل، رسیدن به حقیقت نهایی نیست، بلکه درک بهتر پدیده‌هاست. این بدان معنی است که آنها را می‌توان به عنوان نظریه‌هایی دید که برای معنا بخشیدن به پدیده‌های مشاهده شده ساخته شده‌اند (داشل و ریچارد، ۱۹۹۰).

مدل‌ها را می‌توان به‌عنوان بازنمایی چیزها مورد استفاده قرار داد، یا از آن‌ها برای تولید داده‌های جدید استفاده کرد (گووئا و پاسمور، ۲۰۱۷). مدل‌ها که برای بازنمایی مورد استفاده قرار می‌گیرند اغلب رویکرد گذشته‌نگر (Retrospective) دارند، زیرا داده‌های موجود را خلاصه یا تجسم می‌کنند. از طرف دیگر، مدل‌هایی که برای پیش‌بینی رویدادهای آینده و درک جهان اطراف ما استفاده می‌شوند رویکردی آینده‌نگر (Prospective) دارند (کرل و کروگر، ۲۰۱۷؛ پاسمور و همکاران، ۲۰۱۴؛ آپمیر زو بلزن و کروگر، ۲۰۱۰). استفاده از مدل‌ها، چه به صورت گذشته‌نگر و چه به صورت آینده‌نگر، پلی بین نظریه علمی و جهان تجربه

شده بنا می‌کند (جوستی و گیلبرت، ۲۰۰۳). داشتن درک اولیه از مدل‌ها و کاربری آنها در علم و فرآیندهای تصمیم‌گیری چنان مهم است که آشنایی همگانی با آنها توصیه می‌گردد (ادنباگ، ۲۰۰۵؛ اوه و اوه، ۲۰۱۱).

اعتقاد بر این است که دانش‌آموزانی که درک دقیقی از علم دارند، درک می‌کنند که دانش علمی و مدل‌ها، سازه‌های انسانی هستند که برای توضیح و پیش‌بینی بخش‌هایی از پدیده‌ها طراحی شده‌اند (اسکوارز و وایت، ۲۰۰۵). درک هر دو دیدگاه گذشته‌نگر و آینده‌نگر در مدل سازی برای دانش‌آموزان مهم است. درک مدل‌های علمی و فرآیند مدل‌سازی نه‌تنها می‌تواند یادگیری محتوای علم را تسهیل کند، بلکه به فهم بهتر روشی که علم پدیده‌ها را به تصویرکشیده و بررسی می‌کند نیز کمک می‌کند. دانش دانش‌آموزان در مورد علم زمانی افزایش می‌یابد که بتوانند آنچه را که در یک مدل به تصویر کشیده شده را تعریف کنند و همچنین بین انتخاب‌هایی که هنگام ساخت مدل انجام شده‌اند و آن تعاریف، ارتباط ایجاد کنند. درک استفاده از مدل‌ها در علم بخشی از فرادانش علمی (Scientific meta-knowledge) است (وایت و همکاران، ۲۰۱۱) و به سواد علمی دانش‌آموزان می‌افزاید (گیلبرت، ۱۹۹۱).

در جنبه ماهیت سازه‌ها و مدل‌ها، دانش‌آموزان مدل را با نمونه اصلی مقایسه می‌کنند و توضیح می‌دهند که تا چه حد می‌توان مدل را با نمونه اصلی منطبق دانست. ساخت مدل‌های چندگانه از یک سوژه به این واقعیت اشاره دارد که با تمرکز بر جنبه‌های مختلف نمونه اصلی یا انعکاس آنها به روش‌های متفاوت، از چندین مدل می‌توان برای نمایش یک نمونه اصلی استفاده کرد. از آنجایی که هیچ مدل واحدی نمی‌تواند یک شی یا فرآیند را در تمام جنبه‌های آن نشان دهد، از مدل‌ها و دست‌سازه‌های مختلف می‌توان برای کشف جنبه‌های مهم و دشوار یک مفهوم استفاده شود. برای این کار، مدل اغلب ساده‌سازی می‌شود و با نیاز و دانش قبلی پرسش‌گر تطبیق داده می‌شود و تنها بر جنبه‌هایی تأکید می‌شود که برای توضیح یک ایده کلیدی اهمیت زیادی دارند (هاریسون و ترگست، ۲۰۰۰). بر اساس همین هدف است که سازندگان مدل‌ها و دست‌سازه‌ها تلاش می‌کنند که یادگیری و توسعه نحوه تفکر فراگیران در مورد یک پدیده زیستی یا تغییر علمی را تسهیل کنند. بسته به هدفی که در آموزش آن مفاهیم و پدیده‌ها دنبال می‌شود، مدل‌ها می‌توانند توضیحی، پیش‌بینی کننده و یا کاربردی باشند (اوسکینسون، ۲۰۱۴).

بیان مسئله و ضرورت تحقیق

علوم تجربی را علوم طبیعی نیز می‌نامند، شاخه‌ای از دانش که در اغلب فعالیت‌های روزمره با آن مواجه هستیم؛ لذا آموزش زیست‌شناسی باید بتواند نقش اساسی خود را در بهبود رابطه انسان با طبیعت نشان دهد. اکنون دیگر زیست‌شناسی تنها یک موضوع درسی برای انتقال مفاهیم و تعاریف و دارای اهداف محدود نیست؛ بلکه بنا به ماهیت و نقش ارزنده‌ای که در آموزش عمومی افراد جامعه ایفا می‌کند، مسئول توسعه و تعمیم مفاهیم، توان استدلال و خلاقیت، ایجاد انگیزه، پرورش تفکر انتقادی، تقویت زیبایی‌شناسی و افزایش توان به کارگیری آموخته‌ها و ایجاد ارتباط بین آنها در دانش‌آموزان است. شیوه کنونی سنتی آموزش زیست‌شناسی، نتوانسته است یادگیری و آموزش برای عموم دانش‌آموزان را به نحو مطلوب انجام دهد؛ زیرا آموزش به روش سنتی، تعاریف و مفاهیم را به صورت انتزاعی معرفی می‌کند و دانش‌آموزان را به حفظ طوطی‌وار مطالب درسی وامی‌دارد. این در حالی است که استفاده از دست‌سازه‌ها و مدل‌ها می‌تواند در توصیف و ساده‌سازی پدیده‌ها و فرآیندهای علمی پیچیده مورد استفاده قرار گیرد و موجودیت‌های انتزاعی مفاهیم علمی را برای دانش‌آموزان قابل مشاهده کند و برای پیش‌بینی رویدادهای آینده نیز استفاده شود.

با توجه به این که بیشترین محتوای آموزشی مربوط به زیست‌شناسی در کتاب‌های درسی هر دوره آموزشی در سطح دانش متمرکز شده است (مهدیان و همکاران، ۲۰۰۲)، هدایت فراگیران برای ساخت خلاقانه دست‌سازها با استفاده از مفاهیمی که در متن کتاب‌های درسی آمده است موجب تعامل فراگیر و محیط می‌شود، مطالب انتزاعی را عینی و ملموس کرده و به عرصه تجربه در دنیای واقعی می آورند، به درک مفاهیم علمی و عینی کردن مفاهیم کمک می‌کنند. این عینی کردن به نوبه خود سبب مفهومی کردن یادگیری و معنادار کردن مفاهیم می گردد، یعنی باعث میشود دانش‌آموزان به جای آن که مطالب و مفاهیم را حفظ کنند، آنها را درک کرده و در جایگاه مناسبی در ساخت

شناختی (Cognitive construction) خود قرار دهند (نظریه ساخت گرایی) و رابطه صحیحی بین مفاهیم و تجارب جدید و طرح‌واره‌های[۲۰] ذهنی موجود مربوط به مفاهیم و تجارب قبلی برقرار سازند و به درکی مفهومی و معنادار دست یابند.

هدف ما در این پژوهش معرفی موضوعاتی از زیست‌شناسی در مقطع دبیرستان با قابلیت ساخت و استفاده از دست‌سازه‌ها و مدل‌ها در تدریس زیست‌شناسی بر اساس مفاهیمی است که در متن کتاب‌های درسی آمده است. همچنین میزان اثر بخشی استفاده از دست‌سازه‌ها و مدل‌ها در تدریس و ایجاد یادگیری معنادار در دانش‌آموزان به مورد بررسی قرار می گیرد.

فرضیه‌های پژوهش

۱ – تدوین ساختار آموزش زیست‌شناسی با استفاده از دست‌سازه‌ها و مدل سازی امکان پذیر است.

۲ – ترغیب دانش‌آموزان به مدل سازی در سطوح مختلف یادگیری مباحث زیست‌شناسی مورد توجه قرار می گیرد.

روش پژوهش

این مطالعه در مورد مباحث زیست‌شناسی انجام شده است و جامعه آماری مشتمل بر تمام کتاب‌های زیست‌شناسی در مقطع متوسطه دوم یعنی کتاب‌های زیست‌شناسی دهم، یازدهم و دوازدهم در رشته علوم تجربی می باشد. با توجه به ماهیت موضوع پژوهش و به دلیل محدود بودن جامعه آماری از نمونه گیری صرفه نظر شده و کل جامعه آماری برای نمونه در نظر گرفته شده است. در طی شش ترم متوالی از دانشجویان رشته آموزش زیست‌شناسی در مقطع کارشناسی در دانشگاه فرهنگیان خواسته شد که بخش‌هایی از محتوی آموزشی زیست‌شناسی که قابلیت اجراء و ساخت دست‌سازه و مدل سازی دارند را به صورت موضوعی انتخاب کنند، و دست‌سازه‌ها و مدل‌های خلاقانه‌ای که می‌توانند در تدریس درس زیست‌شناسی استفاده کنند را بسازند و در آزمایشگاه ارئه کنند. در مواردی دست‌سازه‌ها و مدل‌هایی که توسط شخص نویسنده در کلاس‌های درس مورد استفاده قرار گرفته، نیز ارائه شده است. بخشی از موارد اراده شده مربوط به نمایشگاه‌های دست‌سازه‌ها و مدل‌های زیست‌شناسی دانش آموزی، تارنماهای معتبر ارائه دهنده راهبردهای آموزشی، مقالات و مجلات علمی هستند که برای تکمیل این پژوهش ارائه شده‌اند.

مراحل طراحی دست‌سازه‌ها و مدل‌ها:

برای طراحی دست‌سازه‌ها و مدل‌های آموزشی، یادگیرنده در یک فرایند فعال قرار گرفته که شامل مراحل زیر می شود:

۱- تدریس مفاهیم و ساختار کلی و جزیی موضوع برای فراگیر.

۲- ارائه پیشنهاد ساخت دست‌سازه در مورد موضوع مورد بحث با استفاده از مواد و متریال‌های در دسترس دانش آموز (نظیر: پارچه، یونولیت، کاغذ، چوب، گچ، فوم آلومینیومی، پلاستیکی، مواد غذایی و خوراکی، وسایل دور ریختنی، گل و مانند آن).

۳- یادگیرنده مفاهیم اختصاصی مرتبط با مفهوم کلی را با استفاده از مواد و متریال‌های موجود در قالب دست‌سازه و مدل‌های خلاقانه خود تهیه می کند. این کار می‌تواند به صورت گروهی یا انفرادی انجام شود..

۴- مدرس یا یادگیرنده با کنار هم قرار دادن مفاهیم اختصاصی به جستجوی ساختاری می گردند که بتواند آنها را به یکدیگر مرتبط سازد.

۵- در نهایت مفهوم علمی به صورت دستی و یا با برنامه‌های رایانه‌ای طراحی می‌شود.

یافته‌ها

در بخش یافته‌ها مواردی از دست‌سازه‌ها و مدل‌هایی که در نمایشگاه‌های مختلف زیست‌شناسی، تارنماهای معتبر ارائه دهنده راهبردهای آموزشی، مقالات و مجلات معرفی شده‌اند، ارائه شده است. در مواردی دست‌سازه‌ها و مدل‌هایی که توسط نویسنده در کلاس‌های درس مورد استفاده قرار گرفته، نیز ارائه شده است.

انواع دست‌سازه‌ها و مدل‌های قابل استفاده در آموزش زیست‌شناسی:

۱ – ساخت

دست‌سازه‌های آموزشی با استفاده از نخ و پارچه

یکی از مباحث به نسبت سخت برای دانش‌آموزان، آشنایی با ساختار سلول و اندامک‌های درون آن (شامل: دستگاه

گلژی، شبکه آندوپلاسمی، میتوکندری، کلروپلاست، لیزوزوم، ریبوزوم، پری اکسیزوم و واکوئل) و آشنایی با شکل و نقش آنها است. تهیه دست‌سازه‌های مربوط به سلول‌ها نیازمند داشتن دانش اولیه از وجود و انواع دیواره، نوع اندامک‌های اختصاصی سلول‌های گیاهی و جانوری، شکل اندامک‌ها و جایگاه قرار گیری آنهاست. داشتن این آگاهی‌ها باعث می‌شود که دانش آموز با دقت بیشتر این دست‌سازه‌ها را ساخته و عمق بیشتری در یادگیری مفاهیم ایجاد کند. به کار بردن پارچه‌هایی با رنگ بندی متفاوت و برخورد روزانه در محیط زندگی یادگیری را بیشتر تثبیت خواهد کرد. شکل ۱- دست‌سازه و مدل دو بعدی از سلول‌های گیاهی و جانوری، مورفولوژی قلب و مسیر عروق با استفاده از نخ و پارچه.

۲ – ساخت

دست‌سازه‌های آموزشی با استفاده از یونولیت

یونولیت موجود در بسته‌بندی لوازم خانگی یا یونولیت‌های صفحه ای با قطرو ابعاد متفاوت را می‌توان به عنوان یکی از متریال‌های مناسب در ساخت دست‌سازه‌ها مورد استفاده قرار داد. ابزارهایی که می‌تواند برای برش یونولیت مورد استفاده قرار گیرند عبارتند از تیغ موکت بری یا سیم‌های باریکی که با جریان الکتریکی داغ می‌شوند. لازم به ذکر است که برای چسباندن قطعات یونولیتی، بعد از طراحی بخش‌های مختلف و برش آنها، از چسب مایع استفاده نشود چرا که یونولیت را ذوب می—کند. بنابراین به جای چسب بهتر است که از سریش استفاده شود.

۳ – ساخت

دست‌سازه و مدل‌های آموزشی با استفاده از خمیر بازی

شکل پذیری، تنوع رنگ و در دسترس بودن خمیر بازی و قابلیت اتصال ساده قطعات خمیر به یکدیگر سبب می‌شود که بتوان از خمیر بازی به عنوان وسیله مناسبی برای ساخت الگوهای ویژه ای از پدیده‌های هنری (و از جمله زیستی) استفاده کرد.

شکل ۱- دست‌سازه ها

با خمیر بازی می‌توان ابتدا مفاهیم ساده و جزیی موجود در ساختار مورد نظر را به صورت جداگانه ساخت و سپس آنها را در کنار یکدیگر قرار دارد تا ساختار کلی پدیده مورد نظر شکل بگیرد. در شکل ۳ می‌توانید دست‌سازه و مدل ساخته شده از ساختار پوست با استفاده از خمیر بازی را مشاهده کنید که در آن اجزاء پوست شامل بافت پوششی، انواع گیرنده‌های پوست (دما، لمس، درد و فشار)، ساختار مو و بافت چربی نشان داده شده است.

شکل ۲- مدل سه بعدی از سلول‌های گیاهی و جانوری با استفاده از یونولیت.

شکل ۳- دست‌سازه و مدل ساختار پوست و سلول گیاهی با استفاده از خمیر بازی.

۴ – ساخت

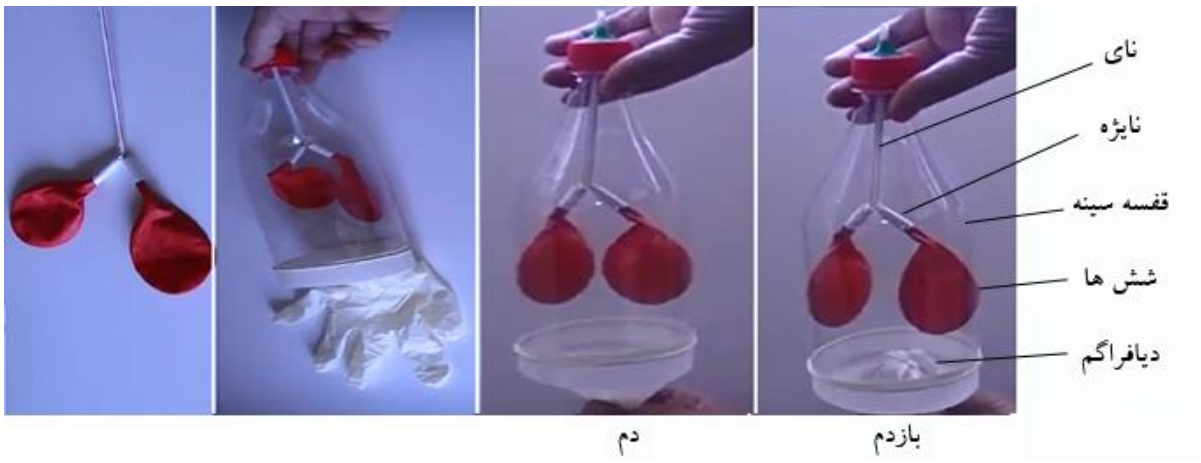
مدل قفسه سینه و عملکرد دیافراگم و شش‌ها

در شکل ۴ با استفاده از بطری نوشابه، نی، دستکش لاستیکی و دو بادکنک سالم مدل قفسه سینه برای درک عملکرد دیافراگم و شش‌ها ساخته شده است. در این مدل بادکنک‌ها معادل شش‌ها، نی معادل نای، دو شاخه پایین نی‌ها معادل نایژه‌ها، دیواره بطری نوشابه معادل دنده‌ها و دیواره قفسه سینه و و دستکش ته ظرف بطری نوشابه معادل دیافراگم هستند. با پایین کشیدن دستکش ته ظرف، وضعیت دیافراگم و شش‌ها طی دم و با بالا بردن دستکش ته ظرف وضعیت دیافراگم و شش‌ها طی بازدم قابل درک خواهد شد.

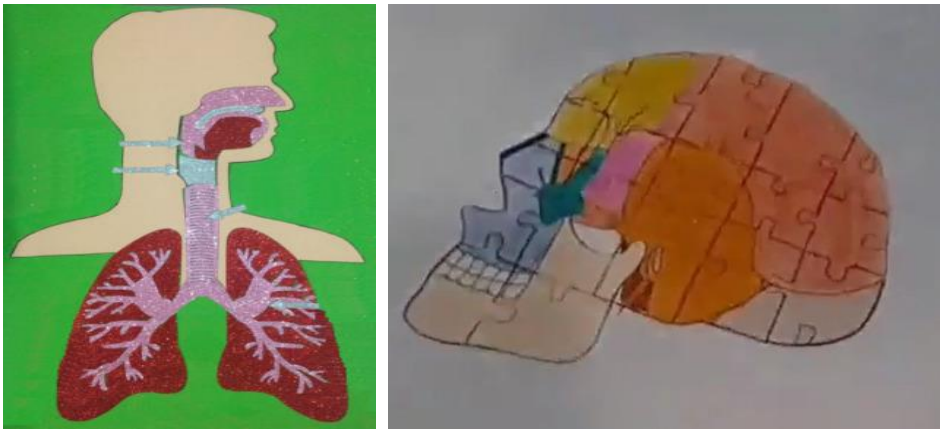
۵ – ساخت مدل

دو بعدی شش‌ها و مجاری تنفسی با استفاده از کاغذ

دست‌سازه‌های کاغذی را به راحتی می‌توان برای ساخت شکل دو بعدی بسیاری از اندام‌های بدن مورد استفاده قرار داد. قابلیت برش آسان، رنگ پذیری و اتصال بخش‌های مختلف با استفاده از کاغذ، مقوا و یا کارتن، ساخت مدل‌ها را تسهیل می کند. شکل ۵ مدل شش‌ها و مجاری تنفسی با استفاده از کاغذ را نشان می دهد.



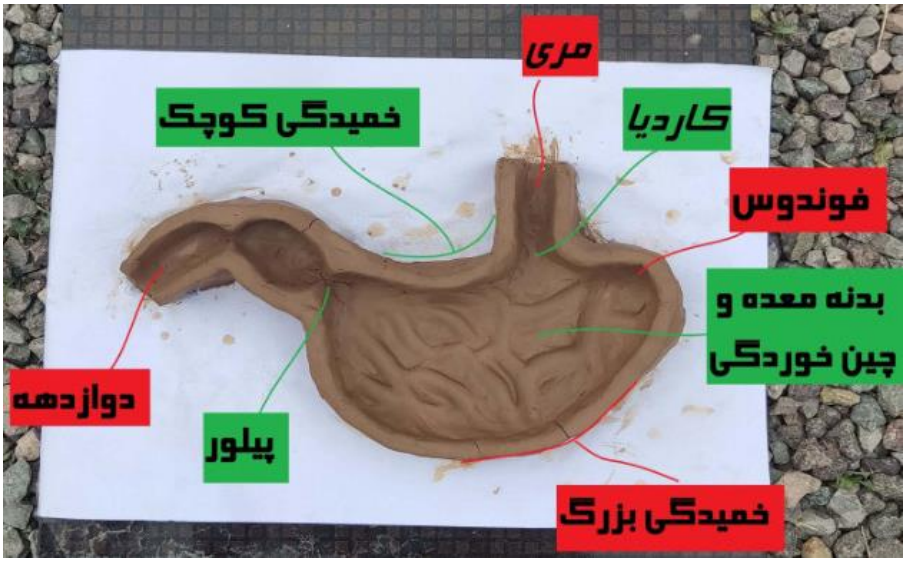
شکل ۴– مدل قفسه سینه و عملکرد دیافراگم و شش‌ها با استفاده از وسایل دور ریختنی.



شکل ۵- مدل شش‌ها و مجاری تنفسی و موقعیت استخوان‌های جمجمه با استفاده از کاغذ.

۶ – ساخت مدل معده با استفاده از گِل رُس

دست‌سازه‌های رسی یکی از روش‌های کم هزینه در درگیر شدن دست‌ها در یادگیری برای آموزش ساختارهای آناتومیکی سه‌بعدی در کلاس‌های درس زیست‌شناسی هستند که به دانش‌آموزان کمک می کنند ضمن یادگیری، اوقات مفرحی را تجربه کنند. این دست‌سازه‌ها را به راحتی می‌توان برای ساخت شکل سه بعدی بسیاری از اندام‌های بدن از جمله استخوان، کلیه، مغز و ... مورد استفاده قرار داد. در دسترس بودن و شکل پذیری، خشک شدن آسان، قابلیت رنگ پذیری و یا حتی پختن آنها در کوره‌های سفال گری از مزایای دیگر آنهاست. شکل ۵ مدل آنوتومیکی معده، بخش‌های مختلف آن و حتی چین و چروک سطح داخلی معده با استفاده از گل رس را نشان می دهد. باید توجه داشت که ساخت این مدل‌ها زمانی امکان پذیر است که درک درستی از مفاهیم درس اتفاق افتاده باشد و مدل سازی با این اطلاعات اولیه می‌تواند در تعمیق مفاهیم اثر بخش باشد.



شکل ۶- مدل آناتومیکی معده با استفاده از گِل رُس.

شکل ۷- مدل فسیل‌ها با استفاده از گچ.

۷ - ساخت مدل فسیل‌ها با استفاده از گچ

دست‌سازه‌های گچی را مشابه با همان ویژگی‌هایی که برای دست‌سازهای رسی مطرح شد، می‌توان مورد استفاده قرار داد؛ با این تفاوت که که اگر گچ به صورت زنده تهیه شود سریعتر خشک شده و حالت پذیری آن نیز سریع تر خواهد بود. از طرفی می‌توان با تراشیدن بخش‌های از گچ شکل‌های سه بعدی خاصی را ایجاد کرد. شکل ۷ دست‌سازه‌هایی از ساخت فسیل‌های جانوری به صورت فرورفته و برجسته را نشان می دهد.

۸ - ساخت مدل با استفاده از مواد غذایی و خوراکی

شکل دادن مواد غذایی در راستای مفاهیم زیست‌شناسی می‌تواند محصول پیش دانسته‌های آموخته شده قبلی بوده و منجر به تعمیق آموخته‌ها برای فرد سازنده و یادگیری بیشتر مشاهده کنندگان این مدل‌ها شود. در شکل ۸ برش کلیه برای پیتزایی طراحی شده که در آن بخش قشری و مرکزی کلیه به خوبی قابل تشخیص است. با استفاده از برش‌های سوسیس هرم‌های کلیه نمایش داده شده است. تاحیه لگنچه با استفاده از برش قارچ و گلومرول‌ها با قطعاتی از گوجه در ناحیه قشری نشان داده شده است. شکل ۸ قسمت ب فرایند الحاق وزیکول‌های داخلی به غشا را نشان می دهد. در این طراحی به خوبی می‌توان درک کرد که لایه خارجی غشا وزیکول‌ها به لایه داخلی غشا سلول و لایه داخلی غشا وزیکول به لایه خارجی غشا سلول می پیوندد و نهایتا موارد درون آن به بیرون سلول ترشح و یا دفع می‌شود . در طرح سلول که با

استفاده از مواد غذایی تهیه شده است حالت میتوکندری، شبکه آندوپلاسمی، هسته، ریبوزوم‌ها و لیزوزوم‌ها به خوبی نشان داده شده‌اند.

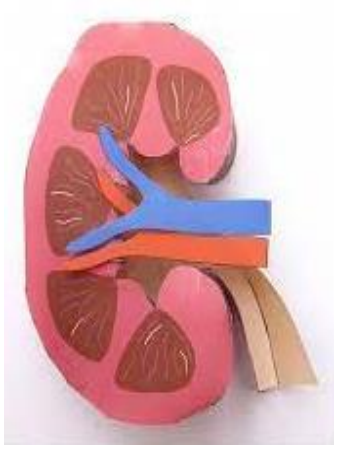
۹ – ساخت
مدل و دست‌سازه‌های زیست‌شناسی با استفاده از چوب

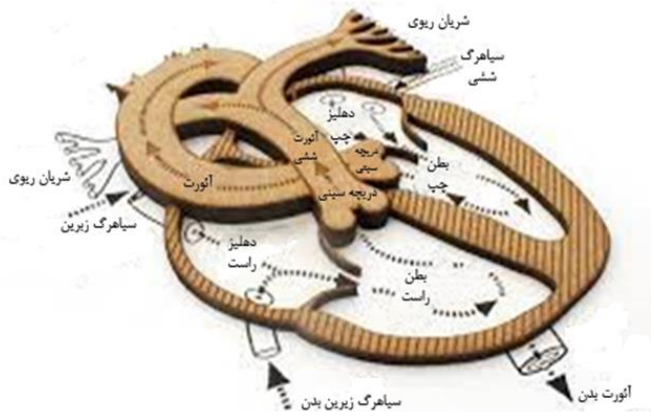
در دسترس بودن چوب و تخته و قابلیت برش و تراش آسان همراه با رنگ آمیزی و ماندگاری دست ساخته، این شرایط را فراهم می کند که فراگیران و مدرسان بتوانند برای ساخت دست‌سازه‌های دو بعدی و سه بعدی زیست‌شناسی از چوب استفاده کنند. چند مورد از دست‌سازه‌های چوبی ساخته شده در شکل ۹ ارائه شده است. ساخت اسکلت دایناسورها با استفاده از نقشه‌های آماده که در سایت‌های مخلف وجود دارد می‌تواند جذابیت و یادگیری بهتری از وضعیت این جانوران منقرض شده را برای فراگیران فراهم کند.

۱۰ – ساخت مدل
و دست‌سازه‌های زیست‌شناسی با استفاده از حبوبات

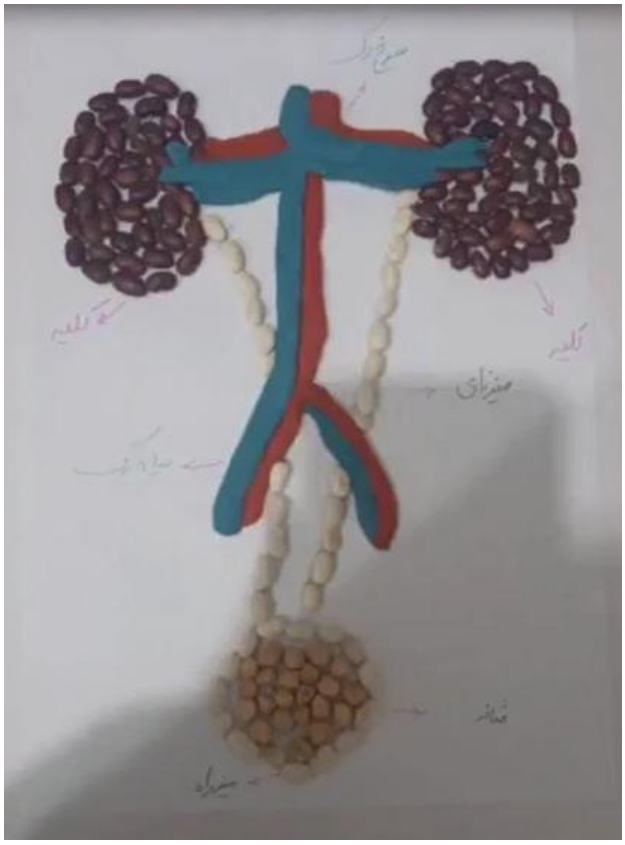
شکل ۱۰ استفاده از حبوبات برای طراحی و مدل سازی ارتباط کلیه، میزنای و مثانه را نشان می دهد که همراه با خمیر بازی برای نشان دادن ارتباط این بخش‌ها با رگ‌های خونی استفاده شده است. سازمان دادن این طرح می‌تواند مفاهیم از پیش آموخته نظیر شکل لوبیایی کلیه‌ها، زوج بودن آنها، نقش میزنای در ارتباط دادن کلیه‌ها و مثانه، شکل و تعداد مثانه سازنده را بیان کند و در آموزش همین مفاهیم برای سایر فراگیران اثر بخش باشد.

شکل ۸– ساخت مدل برش کلیه (بالا) و فرایند اگزوسیتوز (پایین) با استفاده از مواد غذایی.





شکل ۹- ساخت مدل سه بعدی اسکلت دایناسور و قلب، و مدل دو بعدی مغز، قلب و کلیه با استفاده از برش و تراش چوب.



شکل ۱۰- استفاده از حبوبات برای طراحی و مدل سازی ارتباط کلیه، میزنای و مثانه

۱۱ – ساخت مدل DNA با استفاده از یونولیت

یکی از مباحث بسیار مهم در تدریس زیست‌شناسی، ساختار مولکول DNA است. در مسیر علم با ارائه مدل واتسون و کریک درک ساختار این مولکول برای دانشمندان امکان پذیر شد. برخی از مدل‌های ساده‌تر را که می‌توان به وسیله مدرسان یا فراگیران ساخت، تدریس یا یادگیری این مبحث را ساده تر می‌کند. شکل ۱۱ دست‌سازه‌ای ساخته شده از یونولیت و موی بافته شده برای مولکول DNA را نشان می دهد. استفاده از دست‌سازه اطلاعاتی را در اختیار فرا گیر قرار می دهد که تدریس این مبحث را برای معلم و یادگیری آن برای فراگیر تسهیل می کند. با استفاده از این مدل می‌توان به راحتی نشان داد که مولکول DNA دورشته است، شبیه نردبان است، در نرده‌های این نردبان گروه قند و فسفات و در پله‌ها آن بازهای آلی وجود دارد، در مقابل باز آلی C باز آلی G و در مقابل باز آلی A باز آلی T قرار می گیرد و بلعکس.

۱۲ – ساخت

مدل جایگاه اندام‌های گوارشی با استفاده از یونولیت

شکل ۱۲ دست‌سازه‌ای یونولیتی برای جایگاه اندام‌های گوارشی در بدن انسان را نشان می دهد. همچنان که در این دست‌سازه دیده می‌شود، می‌توان هر یک از بخش‌های دستگاه گوارش را با رنگ متفاوت رنگ آمیزی کرد تا قابلیت بهتری برای تدریس داشته باشد. با استفاده از این مدل به راحتی می‌توان انواع، شکل، جایگاه قرارگیری و ارتباط اندام‌های گوارشی با یکدیگر را برای فراگیران مشخص کرد.

۱- مدل سازی تجسمی جایگاه اندام با استفاده از برش‌های پارچه یا کاغذ بر روی بدن:

۲- شکل ۱۳ مدل سازی تجسمی جایگاه اندام با استفاده از برش‌های پارچه یا کاغذ بر روی بدن یک دانش آموز را نشان می دهد. در این مدل، ذهن و بدن دانش‌آموزان برای کشف علم با یکدیگر کار می‌کنند. بازخورد جسمی و همچنین اقدامات نتیجه گیری باعث تقویت

روند یادگیری آنها می‌شود. این ایده به خوبی می‌تواند به وسیله لباس‌های پوشیدنی به تفکیک هر یک از دستگاه‌های بدن طراحی و ساخته شود و در روند تدریس مورد استفاده قرار گیرد.

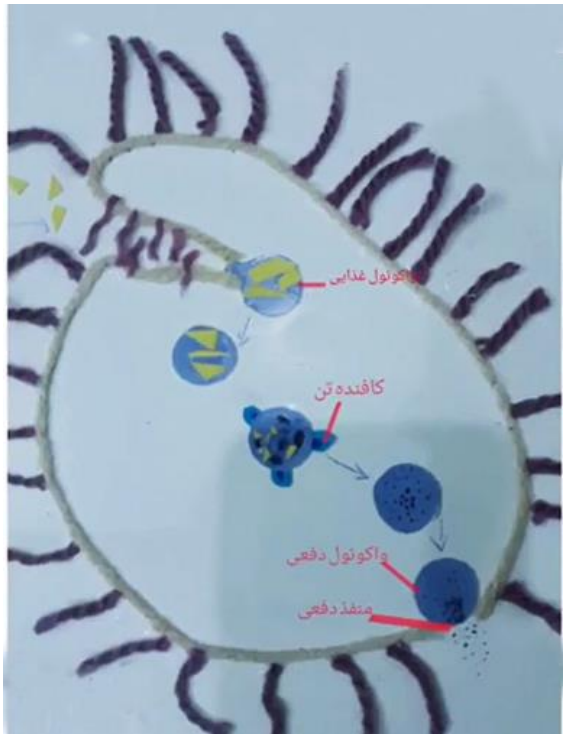
شکل ۱۱- مدل مولکول DNA با استفاده از یونولیت و موی بافته شده

۳- ساخت مدل نوکلئوزوم با استفاده از خمیر بازی: درجه فشردگی کروموزوم و ساختار نوکلئوزوم‌ها را می‌توان با استفاده از خمیر بازی مشابه با آنچه در شکل ۱۴ مشاهده می‌شود به صورت یک دست‌سازه طراحی کرد. نوکلئوزوم‌ها ساختارهایی هستند که در نتیجه پیچیدن DNA (حدود دو دور) به دورد ۸ مولکول هیستون پدید می آیند. با استفاده از این طرح می‌توان به اهمیت هیستون‌ها به عنوان پروتئین‌هایی در ساختار کروموزوم که در پیچ خوردن و فشرده کردن مولکول DNA کمک می‌کنند اشاره کرد.

شکل ۱۲- دست‌سازه ای یونولیتی برای جایگاه اندام‌های گوارشی. ←

شکل ۱۳- مدل سازی تجسمی جایگاه اندام با استفاده از برش‌های پارچه یا کاغذ بر روی بدن.

شکل ۱۴- ساخت مدل توکلئوزوم با استفاده از خمیر بازی.

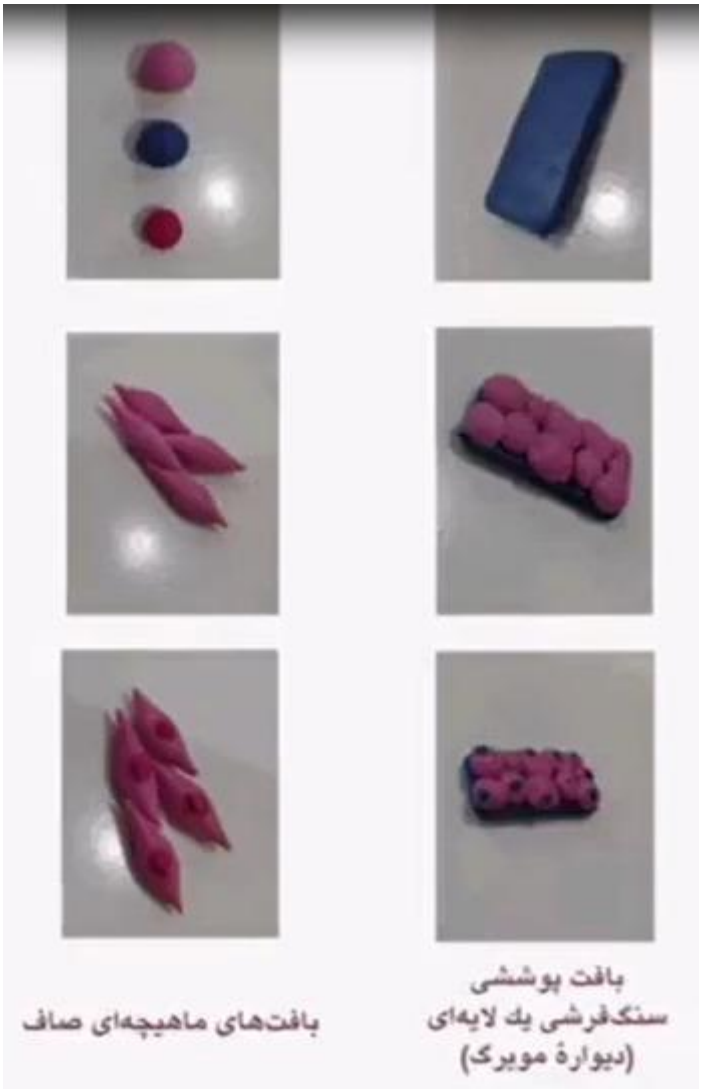


شکل ۱۵- مدل پارامسی و مراحل تغذیه در آن با استفاده از نخ و کاغذ.

۴- ساخت مدل پارامسی و مراحل تغذیه در آن با استفاده از نخ و کاغذ : یکی از محدودیت‌ها در مطالعه جانداران میکروسکوپی، عدم دسترسی به میکروسکوپ در بسیاری از مدارس است. از این رو ساخت دست‌سازه‌هایی مربوط به شکل و ساختار این جانداران تا حدودی می‌تواند این خلاء را پر کند. شکل ۱۵ مدل ساخته شده از پارامسی و مراحل تغذیه در آن را نشان می دهد. با استفاده از این طرح به راحتی می‌توان نشان داد که این جاندار تک سلولی

است و در اطراف آن تعداد زیادی مژک وجود دارد. این جاندار تک سلولی دارای دهان سلولی است که مواد غذایی با زنش مژک‌ها به آن وارد می‌شوند و واکوئل غذایی با روش آندوسیوز در انتهای آن تشکیل می‌شود. لیزوزوم‌ها (کافنده تن) به واکوئل‌های غذایی اضافه می‌شوند و واکوئل گوارشی تشکیل می‌شود. پس از جذب مواد واکوئل دفعی تشکیل و مواد زاید با فرایند اگزوسیتوز از منفذ دفعی به خارج دفع می‌شود.

۵- مدل بافت‌ها با استفاده از خمیر بازی : انواع بافت‌ها و شکل سلول‌های هر بافت را می‌توان با استفاده از خمیر بازی طراحی کرد. مدل سازی بافت‌های پوششی و بافت ماهیچه ای صاف با این روش در شکل ۱۶ نشان داده است. با استفاده از این طرح ساده به راحتی می‌توان نشان داد که در بافت‌های پوششی غشاء پایه وجود دارد و سلول‌ها به صورت فشرده در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند. در حالی که در بافت ماهیچه ای صاف سلول‌های دوکی شکل و فاقد غشاء پایه هستند.



شکل ۱۶- ساخت مدل بافت‌ها با استفاده از خمیر بازی.

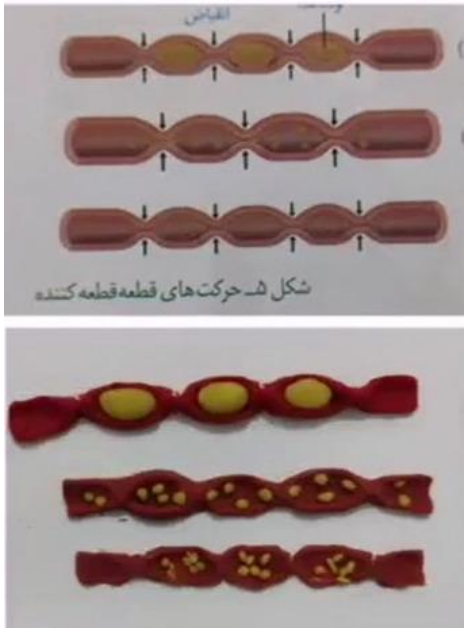
۶- مدل سه بعدی گل با استفاده از صابون: صابون قالبی با قابلیت برش آسان می‌تواند در ساخت مدل‌هایی نظیر مدل سه بعدی گل مورد استفاده قرار گیرد. اگر چه در بسیاری موارد استفاده از گل‌های طبیعی برای بررسی ساختار گل آسان‌تر است، اما مهارت مدل سازی آنها در مواردی که امکان دسترسی به آنها وجود ندارد اهمیت پیدا می کند. شکل ۱۷ یک مدل سه بعدی گل را نشان می دهد. با استفاده از این مدل‌ها می‌توان تعداد قطعات گل را به فراگیران نشان داد و دیاگرام گل را به صورت دو بعدی ترسیم کرد.

۷- مدل سه بعدی حرکات قطعه قطعه شونده با استفاده از خمیر بازی: شکل ۱۸ مدل سه بعدی حرکات قطعه قطعه شونده با استفاده از خمیر بازی را نشان می دهد. همچنان که در مدل ساخته شده مجسم شده است وقوع این حرکات می‌تواند با ایجاد توده‌های ریزتر غذای گوارش یافته به جذب غذا و حرکات توده غذا در روده کمک کنند. درک واقعی از حرکات قطعه قطعه شونده با مدل سازی از آنها می‌تواند تکمیل شود.

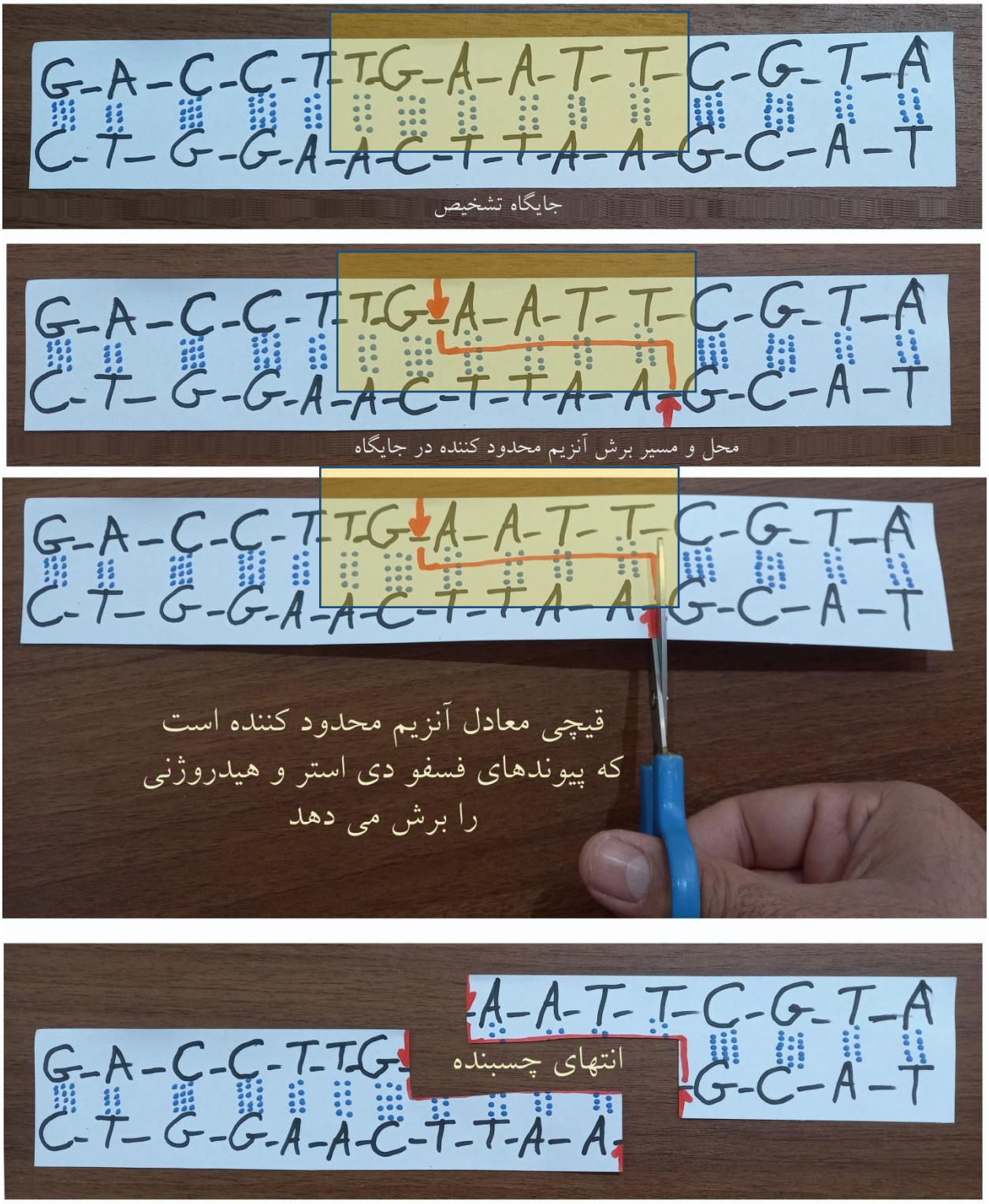
۸- مدل سازی ایجاد انتهای چسبنده در عمل آنزیم محدود کننده با استفاده از کاغذ و قیچی: آنزیم‌های محدود کننده می‌توانند جایگاه تشخیص آنزیم را به دو صورت صاف یا چسبنده برش بزنند. یکی از آنزیم‌های اندونوکلئاز که انتهای چسبنده ایجاد می کند EcoRI است که توالی $\frac{GAATTC}{CTTAAG}$ را ششناسایی و پیوند قسقو دی استر را بین نوکلئوتیدهای G و A در هر دو رشته برش می زند. برای تسهیل درک این موضوع برای فراگیران می‌توان از مدل کاغذی (توالی DNA) و قیچی (نقش آنزیمی) استفاده کرد. با این مدل می‌توان نشان داد که آنزیم EcoRI یک آنزیم اندونوکلئاز است که توانایی شکستن ۲ پیوند فسفودی استر و ۸ پیوند هیدروزنی در هر جایگاه تشخیص را دارد و بعد از برش DNA دو انتهای چسبنده تک رشته ای با توالی AATT و TTAA ایجاد می کند که مکمل یکدیگرند.

۹- مدل سازی ایجاد DNA نوترکیب با استفاده از کاغذ و قیچی: برای تسهیل درک تولید دنای نوترکیب برای فراگیران می‌توان از مدل نوار کاغذی (به عنوان توالی DNA) و قیچی (به عنوان آنزیم محدود کننده) و نوار چسب (به عنوان آنزیم لیگاز) استفاده کرد. با این مدل می‌توان نشان داد که آنزیم EcoRI به عنوان یک آنزیم اندونوکلئاز دو جایگاه تشخیص در ژنوم انسانی و یک جایگاه تشخیص در توالی پلازمیدی دارد و بعد از برش توالی ژنوم انسانی و پلازمیدی انتهای چسبنده یکسانی را ایجاد می کند که مکمل یکدیگرند، و با ایجاد رابطه مکملی (ایجاد پیوند هیدوژنی) زمینه تشکیل دنای نوترکیب فراهم می‌شود. تشکیل پیوند فسفودی استر می‌تواند با اتصال لبه‌های انتهای چسبنده با نوار چسب نشان داده شود.

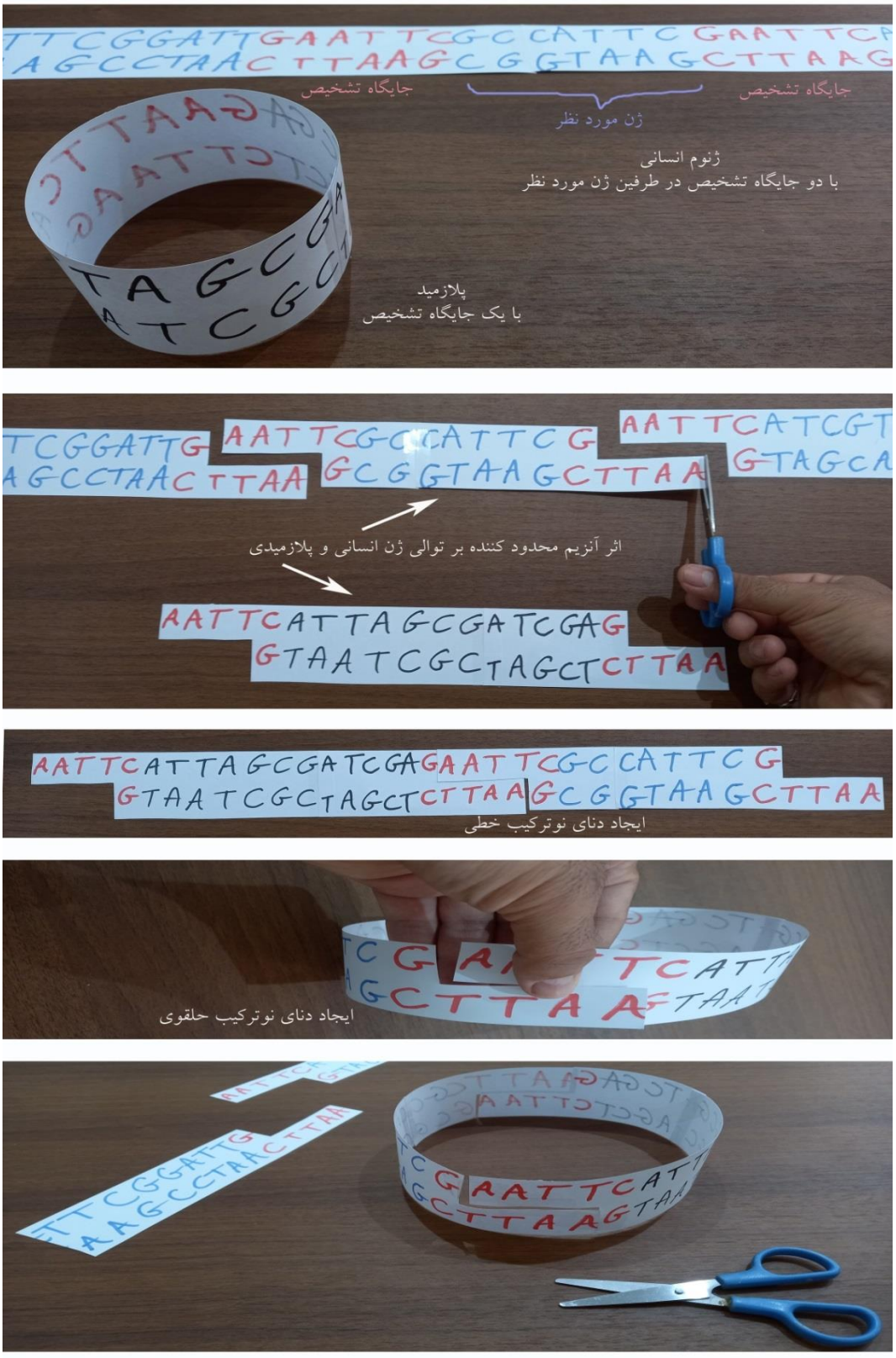
شکل ۱۷- مدل سه بعدی گل با استفاده از صابون قالبی



شکل ۱۸- مدل سه بعدی حرکات قطعه قطعه کننده با استفاده از خمیر بازی.



شکل ۱۹- مدل سازی ایجاد انتهای چسبنده در عمل آنزیم محدود کننده با استفاده از کاغذ و قیچی.



شکل ۲۰- مدل سازی ایجاد DNA نوترکیب با استفاده از کاغذ و قیچی

۱۰-مدل‌سازی از ریخت‌شناسی خارجی میوه‌ها و جانوران با استفاده از خمیر بازی: شکل ۲۰ ساخت شکل ظاهری بادنجان و نهنگ با استفاده از خمیر بازی را نشان می دهد. شکل پذیری خمیر بازی این قابلیت را فراهم می کند تا فراگیر ضمن ساخت آنها به طور دقیق تر با جزئیات ریختی آنها آشنا شوند.

۱۱-مدل مجسمه‌های سنگی یا بتنی اندام‌ها و جانوران: شکل ۲۱ مجسمه سنگی قلب و مجسمه بتنی پرنده را نشان می دهد. ساخت این مدل‌ها می‌تواند در جهت آشنایی با ریخت‌شناسی اندام و ویژگی ساختاری موجودات زنده اثر بخشی مناسبی داشته باشد.

شکل ۲۱- تولید مورفولوژی خارجی میوه‌ها و جانوران با استفاده از خمیر بازی

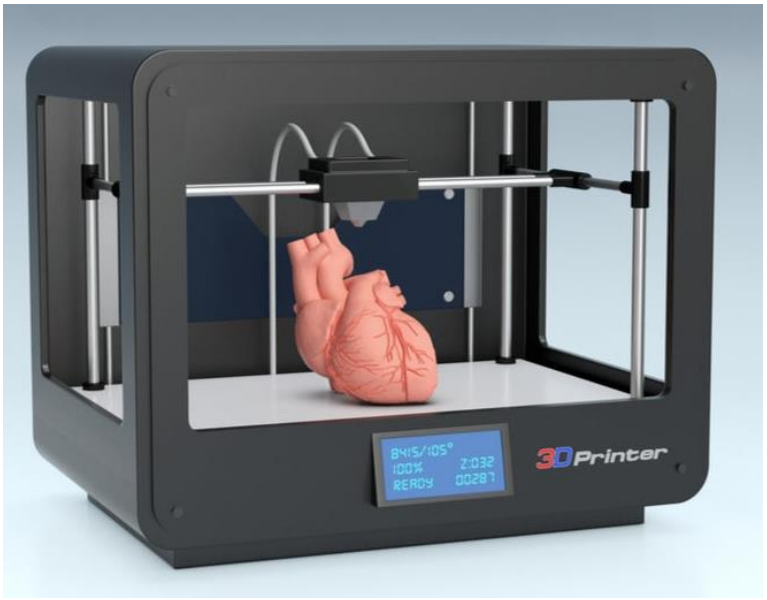
شکل ۲۲ - مدل مجسمه‌های سنگی، بتنی یا چوبی اندام‌ها و جانوران

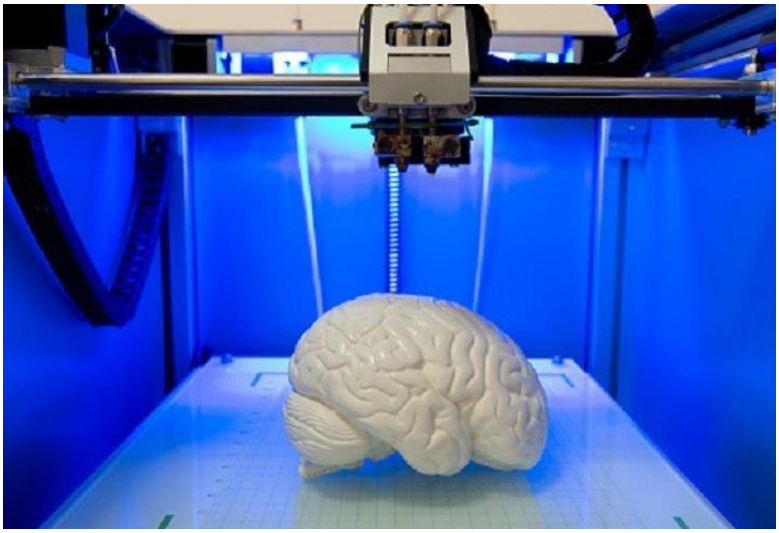
۱۲ – مدل سازی مورفولوژی جانوری با روش عروسک سازی: شکل ۲۲ نمونه ای از ساخت مدل‌های جانوری در قالب عروسک‌های کاریکاتوری را نشان می دهد. ساخت این مدل‌ها نیاز به آشنایی دقیق با ساختارهای زیستی و جانوری داشته که ضمن ایجاد جذابیت‌های آموزشی می‌تواند شرایط یادگیری را تسهیل کند. مدل هزار پای گوشتخوار در شکل ۲۲ ویژگی ساختاری این جانور از جمله بندبند بودن بدن، اتصال یک جفت پا به به هر بند بدن، وجود یک جفت شاخک را به خوبی نشان می دهد.

۱۳ – تهیه مدل کره چشم با استفاده از یونولیت و کاغذ: شکل ۲۴ مدلی یونولیتی از کره چشم می باشد که می‌تواند برای نشان دادن موقعیت صلبیه، رگ‌های خونی سطح آن، عضلات خارج چشم، محل خروج عصب چشم و نشان دادن این موضوع که این مدل مربوط به کره چشم چپ می باشد اهمیت داشته باشد.

شکل ۲۳– مدل سازی مورفولوژی جانوری با روش عروسک سازی

شکل ۲۴– تهیه مدل کره چشم با استفاده از یونولیت و کاغذ





شکل ۲۵ – تهیه مدل قلب و مغز با استفاده از پرینتر سه بعدی

۱۴ – تهیه مدل با استفاده از پرینتر سه بعدی: در برخی از موارد نیاز به ساخت قطعات یا مدل‌های بیولوژیکی داریم که شمن داشتن کاربرد به عنوان ابزار کمک آموزشی، دارای ظرافت دقیقی باشند تا مفاهیم آموزشی را به صورت کاملتر و واقعی تر به فراگیر منتقل کنند. در چنین مواردی مدل مورد نظر به صورت دیجیتال طراحی شده و با استفاده از پرینتر سه بعدی با رنگ‌های مد نظر ساخته می‌شود. اگر چه در این روش پرینتر سه بعدی مکانیزه در ساخت مدل مورد نظر دخالت دارد ولی در هر حال یک شیوه مدرن برای ساخت قطعات و مدل‌های مورد نظر در علم و صنعت به شمار شمار می آید (شکل ۲۵).

بحث و نتیجه گیری

بررسی فرضیه‌های پژوهش

فرضیه اول: تدوین ساختار آموزش زیست‌شناسی با استفاده از دست‌سازه‌ها و مدل سازی امکان پذیر است.

نمونه‌های ارائه شده از مدل‌ها و دست‌سازه‌های مباحث زیست‌شناسی نشان می دهد که این روش‌ها را می‌توان در تدوین ساختار آموزش زیست‌شناسی به عنوان یک ابزار کمک‌آموزشی مورد استفاده قرار داد. با استفاده از روش مدل سازی و استفاده از دست‌سازه‌ها می‌توان حجم وسیعی

از مفاهیم آموزشی را در مدارس و دانشگاه‌ها به صورت ساده‌تر و با اتلاف وقت کمتر نسبت به روش‌های سنتی به دانش‌آموزان و دانشجویان منتقل کرد و آن‌ها را در رسیدن به سطوح عالی تفکر انتزاعی و حل مسئله یاری داد. استفاده از این روش یادگیری، یادسپاری و یادآوری مطالب گسترده زیست‌شناسی در گرایش‌های مختلف را با استفاده از مدل‌ها و دست‌سازه‌ها را تسهیل می‌کند. استفاده از راهبردهای نوین آموزشی از جمله شیوه مدل‌سازی و استفاده از دست‌سازه‌ها علاقه و رغبت فراگیران و معلمان در استفاده از این راهبردهای تدریس را به شیوه‌ای مؤثر افزایش می‌دهد.

فرضیه دوم: ترغیب دانش‌آموزان به مدل سازی در مباحث زیست‌شناسی سطوح مختلف یادگیری را مورد توجه قرار می دهد.

با توجه به تفاوت در سبک‌های یادگیری دانش‌آموزان و تفاوت‌های فردی در آنان، استفاده از مدل سازی و دست‌سازه‌ها به هر دانش‌آموز کمک می‌کند تا از عملکرد های شناختی سطح بالا مانند تحلیل، ساخت، ترکیب و ارزشیابی به‌طور مداوم استفاده کند. استفاده از انواع متفاوت مدل‌ها و دست‌سازه‌ها می‌تواند شیوه‌های نادرست فکری دانش‌آموزان را اصلاح و بهترین راهبرد یادگیری را با توجه به موقعیت‌های یادگیری فراهم کند. در آموزش زیست‌شناسی دبیرستان، استفاده از دست‌سازه‌ها و مدل‌ها می‌توانند برای توصیف و ساده‌سازی پدیده‌ها با به تصویر کشیدن ویژگی‌های کلی مورد استفاده قرار گیرد. دست‌سازه‌ها و مدل‌ها می‌تواند فرآیندهای علمی پیچیده را نشان دهند، از جمله وضعیت اندام‌ها در بدن، شکل سلول‌ها و ساختار اندامک‌های آنها، و هم می‌توانند برای قابل مشاهده کردن موجودیت‌های انتزاعی و پیش‌بینی رویدادهای واقعی استفاده شوند. با این حال، استفاده از مدل‌ها در آموزش زیست‌شناسی اغلب به اهداف توضیحی یا ارتباطی محدود می‌شود و از عملکرد علمی که همراه با استفاده از مدل‌ها در علم است، غفلت می‌کند. این موضوع تا حدی به این دلیل است که بسیاری از معلمان تجربه مدل سازی علمی را ندارند. آنها مدل‌ها را ابزاری مفید برای آموزش در مورد محتوای علمی می دانند، اما نه در مورد ماهیت علم (ویندشیتل، تامپسون و براتن، ۲۰۰۸).

این امر، ایجاد دیدگاه علمی پیچیده‌تر در مورد استفاده از مدل‌ها و دست‌سازه‌ها در زیست‌شناسی برای دانش‌آموزان را دشوار می‌کند.

در مورد ساخت مدل‌ها و دست‌سازه‌ها از دو جنبه می‌توان آنها را مورد توجه قرار داد ۱: استفاده از دست‌سازه به وسیله معلم در تدریس ۲: ساخت دست‌سازه‌ها به وسیله فراگیر. در مواردی که معلم از دست‌سازه‌ها برای تدریس استفاده می کند بحث از حالت انتزاعی و سخنرانی صرف خارج شده و یادگیری می‌تواند به سطوح بالاتر در هرم یادگیری از جمله مشاهده، دیدن و به کار بستن انتقال داده شود و اثربخشی تدریس افزایش یابد. در مواردی هم که از فراگیر خواسته می‌شود تا بر اساس تدریس انجام شده و با شناختی که از موضوع بحث پیدا کرده است دست‌سازه یا مدلی را بسازد و به کلاس ارائه کند، در نتیجه سازماندهی ذهنی مطالب علاوه بر عمق بخشی به مفاهیم درس، فراگیر طرح خلاقانه‌ای را جستجو می کند که بتواند مفاهیم آموخته شده را به صورت تجسمی بازآرایی کند. بنابراین استفاده از دست‌سازه در تدریس معلم و یادگیری فراگیر اثر بخشی لازم را دارد.

باید توجه داشت که هر یک از دست‌سازه‌ها و مدل‌هایی که در بخش یافته‌ها ارائه شده است می‌تواند با روش‌ها و متریال‌های دیگر نیز ساخته شوند. در تمام موارد دانش آموز پس از یادگیری مفاهیم دقیق درس در سطوح دانشی قرار می گیرد که می‌تواند آنها را به کار گرفته و به سطوح بالاتر یادگیری یعنی آنالیز، ترکیب و به کارگیری دست یابد. آنچه مهم است محدودنساختن دانش آموز و اجازه دادن به تکمیل پروژه‌ها با روش‌های خلاقانه و ابتکارات شخصی است.

به طور کلی مدل‌سازی به پژوهش و آموزش علمی در زمینه علوم زیستی، اکتشاف جهان زنده، تبیین پدیده‌ها و فرآیندها و تدوین پیش‌بینی‌ها در مورد پدیده‌های مورد مطالعه به نحو احسن کمک می کند. کسب مهارت و تمرین مکرر الگوسازی در مطالعه زیست‌شناسی دوره متوسطه در کنار سایر روش‌های یادگیری اکتشافی خاص زیست‌شناسی، اولین گام در جهت شکل گیری تفکر علمی دانش‌آموزان و حرکت به سوی شکل گیری و تمرین شایستگی‌ها در زمینه‌های علمی، مشاهده، بررسی و توضیح جهان زنده است. باید بر این نکته تاکید کنیم که روش

مدل‌سازی فرصت تحریک و شکل‌گیری توانایی‌های فراشناختی را در اختیار دانش‌آموزان قرار داده و می‌تواند مراحل یادگیری، تشریح و استدلال را به نمایش گذاشته و نقش مهمی در بیمه کردن یک یادگیری معنادار، منطقی و پایدار داشته باشد. در کنار مدل‌های سنتی که می‌توانیم در درس‌های زیست‌شناسی از آنها استفاده کنیم، توسعه فناوری اطلاعات و ارتباطات فرصت‌های مختلفی را برای استفاده از ظرفیت‌های روش مدل‌سازی که برای نوسازی تدریس زیست‌شناسی دبیرستان ضروری است، ارائه می‌دهد.

پیشنهادات

۱- به دانش‌آموزان تأکید شود می‌توانند هر دست‌سازه ای را که به موضوع درس مربوط باشد درست کنند و به نمایش بگذارند (پرورش خلاقیت).

۲- نمره خوبی برای دست‌سازه‌ها در نظر گرفته شود (تشویق).

۳- برگزاری نمایشگاه دائمی دست‌سازه‌های دانش آموزی و دانشجویی درس علوم تجربی و زیست‌شناسی.

۴- برگزاری مسابقه دست‌سازه‌های دانش آموزی و دانشجویی.

۵- نصب مدل‌ها و دست‌سازه‌های دانش آموزی در محیط کلاس و آزمایشگاه.

۶- شرکت دادن فعال دانش‌آموزان سازنده مدل‌ها و دست‌سازه‌ها در فعالیت‌های آموزشی درس علوم‌تجربی و زیست‌شناسی.

۷- هدایت مدل‌ها و دست‌سازه‌ها با ابتکارات جدید به سمت جشنواره‌های خوارزمی یا جابر بن حیان.

۸- برگزاری دوره‌های ضمن خدمت برای معلمان با هدف به کار گیری روش مدل‌سسسازی و دست‌سازه‌ها در تدریس.

منابع

کیانی ف. (۱۳۸۶). رویکردهای فیزیک و تأثیر آن در آموزش، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه الزهرا، تهران.

مهدیان، مهرداد؛ منیری، رضوان؛ وکیلی، زریچهر؛ رمضانی، یداله. (۱۳۸۱). ارزیابی اهداف یادگیری گروههای آموزشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان .مجله ایرانی آموزش در علوم پزشکی. ۲ :۲۸-۳۸.

Francoeur, E. (1997). The forgotten tool: The design and use of molecular models. Social Studies of Science, 27, 7–40. doi:10.1177/030631297027001002.

Gouvea, J., & Passmore, C. (2017). ‘Models of’ versus ‘Models for’. Science and Education, 26, 49–63. doi:10.1007/s11191-017-9884-4.

Gilbert, S. W. (1991). Model building and a definition of science. Journal of Research in Science Teaching, 28, 73–79. doi:10.1002/tea.3660280107.

Harrison, A. G., & Treagust, D. F. (2000). A typology of school science models. International Journal of Science Education, 22, 1011–1026.

Hoskinson et al. (2014). Bridging physics and biology teaching through modelling, American Journal of Physics.82 (5), 434 – 441.

Justi, R. S., & Gilbert, J. K. (2003). Teachers’ views on the nature of models. International Journal of Science Education, 25, 1369–1386. doi:10.1080/0950069032000070324.

Krell, M., & Krüger, D. (2017). University students’ meta-modelling knowledge. Research in Science and Technological Education, 35, 261–273. Doi:10.1080/02635143.2016.1274724.

Odenbaugh, J. (2005). Idealized, inaccurate but successful: A pragmatic approach to evaluating models in theoretical ecology. Biology and Philosophy, 20, 231–255. doi:10.1007/s10539-004-0478-6.

Oh, P. S., & Oh, S. J. (2011). What teachers of science need to know about models: An overview. International Journal of Science Education, 33, 1109–1130. doi:10.1080/09500693.2010.502191.

Passmore, C., Gouvea, J. S., & Giere, R. (2014). Models in science and in learning science: Focusing scientific practice on sense-making. In M. Mathews (Ed.), International handbook of research in history, philosophy and science teaching. Dordrecht: Springer. doi:10.1007/978-94-007-7654-8.

Schwarz, C. V., & White, B. Y. (2005). Meta-modeling knowledge: Developing students’ understanding of scientific modeling. Cognition and Instruction, 23, 165–205. doi:10.1207/s1532690xci2302_1.

Svoboda, J., & Passmore, C. (2013). The strategies of modeling in biology education. Science and Education, 22, 119–142. doi:10.1007/s11191-011-9425-5.

White, B. Y., Collins, A., & Frederiksen, J. R. (2011). The nature of scientific meta-knowledge. Models and Modeling. Dordrecht: Springer. doi:10.1007/978-94-007-0449-7.

Upmeier zu Belzen, A., & Krüger, D. (2010). Modellkompetenz im biologieunterricht [model competence in biology education]. Zeitschrift Für Didaktik Der Naturwissenschaften, 16, 41–57.

Windschitl, M., Thompson, J., & Braaten, M. (2008). Beyond the scientific method: Model-based inquiry as a new paradigm of preference for school science investigations. Science Education, 92, 941–967. doi:10.1002/sce.20259.

Developing the teaching of biology by means of modeling and hand-made models

Farasat H.

Dept. of Science, Farhangian University, Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

In line with the programs of the biology education group and the national biology secretariat (local activities section) and in order to create creativity in students, especially in experimental science and biology courses, the use of modeling and hand-made structures is of particular importance. The purpose of this article is to provide examples of the use and advantages of modeling in the compilation of biology education in a thematic manner. The statistical society of this study includes all biology books in the second secondary level in the field of biology. The research method in this descriptive research was done by using documentary studies, translating the content of sites that provide educational solutions for educational institutions and using the author's personal experiences. In this study, more than 25 plans and models are presented in biology education, so it can be stated that the modeling method can be implemented in biology education. Compared to conventional methods, modeling-based education can have a positive effect on various cognitive levels of Bloom, including knowledge, understanding, and especially understanding and application of materials, and it leads to the improvement of teaching-learning activities.

Keywords: School, Institute, Teaching, Learning, Basic Sciences.

رشد افسارگسیخته سرخس آبی (*Azolla filiculoides*, Lam.) در تالاب انزلی؛ تراژدی معرفی یک گونه مهاجم به یکی از مهم‌ترین پیکره‌های آبی ایران

علیرضا رادخواه[1*]، سهیل ایگدری[1]، هادی پورباقر[1] و اسماعیل صادقی‌نژاد ماسوله[2]

[1] ایران، کرج، دانشگاه تهران، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات

[2] ایران، بندر انزلی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۱

چکیده

در پژوهش حاضر، یکی از مهم‌ترین معضلات زیست‌محیطی و نمونه‌های تهاجم بیولوژیک در ایران که سال‌ها بلای جان تالاب انزلی در شمال کشور شده، مورد بررسی قرار گرفته است. سرخس آبی یا آزولا (*Azolla filiculoides*) نام یک گونه غیربومی و مهاجم است که در بسیاری از اکوسیستم‌های شمالی کشور از جمله تالاب انزلی وارد شده است. این گونه که بومی قاره آمریکا است، به‌طور گسترده از طریق مکانیسم‌های مختلف در سراسر جهان گسترش یافته است. متاسفانه اگرچه مدت تقریباً زیادی از زمان معرفی آزولا به تالاب انزلی در شمال کشور می‌گذرد، اما هنوز، همچنان اقدامات مناسبی از سوی سازمان‌های ذی‌ربط از جمله سازمان‌های محیط‌زیست و شیلات برای مبارزه با این گونه مهاجم صورت نگرفته است. در این تحقیق، مکانیسم‌های مختلف در مبارزه با گیاه آزولا مورد بحث قرار گرفت. بررسی‌ها نشان داد که در کنار روش‌های کنترل مکانیکی، شیمیایی و بیولوژیکی، همچنان پیشگیری به‌عنوان رویکرد اولیه محسوب می‌شود. بنابراین، در اولین اقدام لازم است که سازمان‌های ذی‌ربط از انتشار بیشتر گونه‌های مهاجم از جمله آزولا به پیکره‌های آبی کشور جلوگیری کند. در ادامه، در میان روش‌های مختلفی که ذکر شد، روش‌های مکانیکی و بیولوژیکی به‌دلیل اثرات زیست‌محیطی کمتر بر روی اکوسیستم، مورد توجه قرار گرفته‌اند. اگرچه به‌نظر می‌رسد که در زمینه مبارزه با انتشار گیاه آزولا در تالاب انزلی، سریع‌ترین راهکار استفاده از شیوه‌های مکانیکی باشد، با این حال، این روش به‌دلیل امکان تکه شدن گیاه و احتمال رشد مجدد آن چندان مناسب نیست. در بین روش‌های مذکور، استفاده از رویکردهای بیولوژیکی در صورتی‌که توسط کارشناسان و محققان خبره با توجه به کلیه جوانب اتخاذ شده باشد، می‌تواند کمک‌کننده باشد. از جمله مطالعات و تجربیات موید این موضوع می‌توان به کنترل بیولوژیکی گیاه آزولا در آفریقای جنوبی در طی سال‌های گذشته اشاره کرد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که استفاده از حشراتی مانند سرخرطومی (*Stenopelmus rufinasus*) می‌تواند به عنوان یک عامل بیولوژیک برای کنترل آزولا در تالاب انزلی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: آزولا، گونه مهاجم، تالاب انزلی، کنترل بیولوژیک، سرخرطومی آبی، اثرات زیست‌محیطی

*نویسنده مسئول؛ پست الکترونیک: alirezaradkhah@ut.ac.ir

مقدمه

یکی از چالش‌های زیست‌محیطی مهمی که امروزه تنوع زیستی در سطح جهان را تهدید می‌کند، تهاجم بیولوژیکی است. گونه‌های غیربومی مهاجم در خارج از محدوده طبیعی خود تاثیرات منفی بر تنوع زیستی جانوران و گیاهان بومی در منطقه جدید برجای می‌گذارند که این وضعیت می‌تواند تا مرز خطر و نابودی گونه‌های بومی پیش رود (رادخواه و همکاران، ۱۳۹۷). این تهاجم نه تنها برای طبیعت یک کشور، بلکه برای اقتصاد آن نیز پیامدهای نگران کننده‌ای به‌همراه دارد. از جمله نمونه‌های شاخص برای تهاجم بیولوژیکی در ایران می‌توان به ورود سرخس آبی به نام آزولا (*Azolla filiculoides* Lam.) از فیلیپین به بندر انزلی در شمال استان گیلان اشاره کرد. این گونه

گیاهی برای اولین بار در سال ۱۹۸۶ برای انجام مطالعات در مورد ظرفیت تثبیت نیتروژن وارد کشور شد و از آن پس، به یک کود ایده‌آل برای شالیزارهای برنج و همچنین یک افزودنی برای خوراک گاو تبدیل شد. با توجه به توانایی این گونه در انتشار به‌واسطه انسان، وسایل نقلیه یا باد، آب و حیوانات، در نهایت در اوایل دهه ۱۹۹۰ به تالاب انزلی نیز راه یافت. آزولا پس از معرفی به تالاب انزلی به‌سرعت رشد کرد و به توده‌های متراکمی تبدیل شد که گستره وسیعی از آب‌های سطحی را می‌پوشاند (Hashemloian and Azimi, 2009). گسترش و انتشار افسارگسیخته این گیاه در تالاب انزلی در طول سال‌های گذشته موجب شد که خسارت‌های متعددی در بخش‌های زیست‌محیطی، اقتصادی، گردشگری و اجتماعی به پیکره این اکوسیستم مهم و همچنین، نواحی مجاور آن در شمال کشور وارد شود.

گرچه مدت تقریباً زیادی از زمان معرفی آزولا به‌عنوان یک گونه غیربومی و مهاجم به تالاب انزلی در شمال کشور می‌گذرد، اما و هنوز اقدامات مناسب و شایسته‌ای از سوی سازمان‌های ذی‌ربط از جمله سازمان‌های محیط‌زیست و شیلات برای مبارزه با این گونه مهاجم صورت نگرفته است. در این مطالعه، پس از معرفی گیاه آزولا و مشکلات زیست‌محیطی حاصل از آن، مکانیسم‌های مختلف مبارزه با این گونه گیاهی مورد توجه قرار گرفته است و تجربیات سایر کشورها در رابطه با این مسئله تبیین شده است. امید است که مطالب ارائه شده در ان تحقیق بتواند در جهت طرح مسائل و معضلات زیست‌محیطی تالاب انزلی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین اکوسیستم‌های آبی کشور و همچنین بیان راه‌حل‌های موجود، مورد توجه قرار گیرد.

خصوصیات بیولوژیک

آزولا (*A. filiculoides*) یک سرخس کوچک هتروسپور و آبزی است که به‌ندرت به بیش از ۲۵ میلی‌متر می‌رسد (O'Keeffe, 1986). ماکروفیت آزولا از یک ریزوم اصلی تشکیل شده است که به ریزوم‌های ثانویه منشعب می‌شود. در این گیاه، مواد مغذی مستقیماً از آب توسط ریشه جذب می‌شوند. با این حال، در آب‌های بسیار کم‌عمق، ریشه‌ها ممکن است خاک را لمس کنند و در نتیجه مواد مغذی را از آن استخراج کنند (Wagner, 1997; Pereira *et al*., 2014). طبق یافته‌های حاصل از مطالعات Rao (۱۹۳۶)، در گونه *Azolla pinnata*، ریشه‌ها با رسیدن به طول ۵۰-۴۰ میلی‌متر می‌ریزند. تارهای کشنده ریشه که در امتداد طول ریشه یافت می‌شوند، محل مناسبی برای استقرار و رشد تعداد زیادی از تک یاخته‌ها و جلبک‌ها هستند (Rao, 1936; CABI, 2022).

آزولا به‌واسطه ازدیاد طول و تکه‌تکه شدن شاخه‌های کوچک، قادر به تولیدمثل رویشی و سریع در طول سال است. در شرایط ایده‌آل، میزان رشد آلودگی این گونه گیاهی هر ۴ تا ۵ روز، دو برابر می‌شود. آزولا با برخورداری از چنین نرخ رشدی قادر است که سطوح برکه‌ها و دریاچه‌ها را در عرض چند هفته یا چند ماه به طور کامل بپوشاند. در شرایط محیطی مساعد، آزولا از طریق اسپورها تولیدمثل می‌کند (Henderson and Cilliers, 2002). این گونه می‌تواند بر روی پاها و پرهای پرندگان آبزی و بر روی پستاندارانی مانند اسب آبی و سمور دریایی نیز پخش شود. امروزه، این مسئله به‌واسطه تجارت آبزیان آکواریومی در بین کشورهای مختلف رواج یافته است.

زیستگاه

محدوده بومی پراکنش گیاه آزولا (*A. filiculoides*) شامل آمریکای جنوبی و غرب آمریکای شمالی است. این گونه گیاهی اغلب در نهرها، رودخانه‌ها، برکه‌ها و دریاچه‌هایی یافت می‌شود که با جریان آهسته آب همراه هستند (Ashton, 1992). آزولا معمولاً به‌عنوان یک گونه زینتی در استخرها و مخازن پرورش ماهی استفاده می‌شود. این گیاه از این کانون‌ها پخش می‌شود و بسیاری از پیکره‌آبی غنی‌شده با مواد مغذی را اشغال می‌کند. آزولا به‌طور کلی به‌عنوان یک گیاه هرزآبی در نظر گرفته نمی‌شود. این گونه به‌دلیل توانایی ویژه‌ای که در تثبیت نیتروژن دارد، معمولاً همراه با برنج رشد می‌کند و به‌عنوان کود سبز در مزارع کشت برنج استفاده می‌شود (Wagner, 1997).

تهاجم بیولوژیک

از آنجایی که آزولا (*A. filiculoides*) به‌عنوان یک گیاه برای استخرهای پرورش ماهی استفاده می‌شود، می‌توان گسترش بیشتر این گونه را محتمل دانست. در آفریقا و اروپا، پراکندگی این گونه آبزی بین کشورها بدون شک به دلیل جابجایی پرندگان آبزی ادامه خواهد داشت، چراکه

پرندگان قادر هستند تکه‌های گیاه را بین پیکره‌های آبی پخش کنند. به‌طور کلی، هجوم آزولا به کشورهایی ادامه خواهد داشت که در آن‌ها مجموعه‌ای از عوامل از قبیل وجود آب‌های یوتروفیک، فقدان دشمنان طبیعی و تجارت غیرقانونی به وضعیت این گونه به‌عنوان یک علف هرز و مهاجم کمک کنند (Lumpkin and Plucknett, 1982).

دخالت‌های انسان گیاه آزولا را به اروپا، شمال و جنوب صحرای آفریقا، چین، ژاپن، نیوزیلند، استرالیا، کارائیب، هاوایی و سایر نقاط جهان معرفی کرده است (شکل ۱). در سیستم های آبی یوتروفیک، آزولا به‌سرعت رشد می کند و به راحتی با پوشش گیاهی بومی رقابت می کند. پوسیدگی ریشه آزولا، همراه با عدم نفوذ نور، یک محیط بی‌هوازی ایجاد می‌کند که می‌تواند کیفیت آب آشامیدنی را به‌دلیل بوی بد، رنگ و کدورت کاهش دهد و بقای موجودات دیگر را نیز غیرممکن سازد.

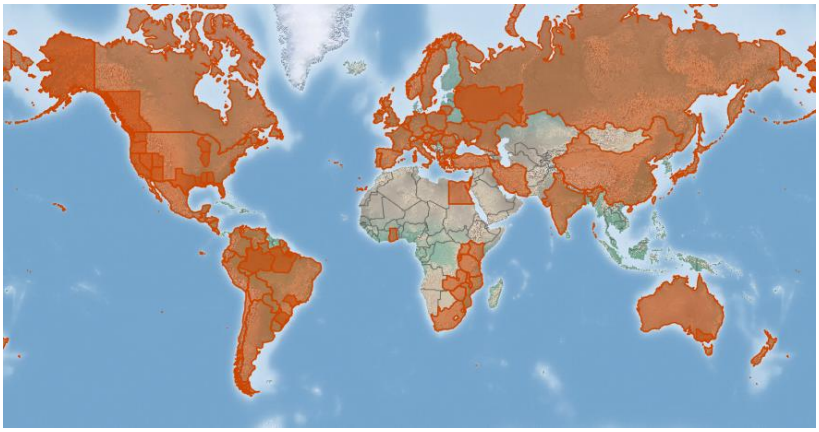
مصارف اقتصادی و غیره

آزولا به‌دلیل توانایی تثبیت نیتروژن، می‌تواند به‌منظور افزایش سرعت رشد محصولاتی که در آب رشد می‌کنند مانند برنج، مورد استفاده قرار گیرد. از طرف دیگر، این گیاه پس از برداشت از دریاچه‌ها، به‌عنوان کود سبز نیز مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد. اگرچه علاوه بر موارد ذکر شده، آزولا به‌عنوان گیاه زینتی در استخرها استفاده می‌شود، اما با این حال، این کاربردها نمی‌توانند به‌طور کلی اثرات منفی ناشی از این گیاه را جبران کنند.

رشد افسارگسیخته آزولا در تالاب انزلی

شرایط اقلیمی شالیزارها، برکه‌ها و رودخانه‌های شمال ایران بهترین زیستگاه برای زادآوری و رشد آزولا است. آزولا به‌مدت ۲۰ سال در سه استان شمالی ایران توزیع شده و رشد بسیار سریعی داشته است. مشاهدات به‌عمل آمده نشان داد که پراکندگی بالایی از آزولا در این استان‌ها وجود دارد. آزولا در گیلان بیشترین فراوانی را دارد و در تمام آب‌های آرام این استان وجود دارد (Sadeghi *et al.*, 2014a). همچنین، حضور این گونه را در سطح تمامی باتلاق‌های شالیزاری، دریاچه‌ها، برکه‌ها، تالاب‌ها و رودخانه‌های گیلان ثبت شده است. نمونه‌هایی از آب‌های غرب به شرق گیلان شامل مرداب تالاب انزلی، تالاب لنگرود، تالاب کیاشهر، تالاب امیرکالیه و تالاب سوستان لاهیجان، تالاب استار آباد و رودخانه لنگرود هستند، که حضور گیاه آزولا در این اکوسیستم‌های آبی مورد تایید قرار گرفته است (Hashemloian and Azimi, 2009). مشاهدات میدانی به‌عمل آمده در تالاب انزلی حاکی از این است که در بسیاری از حوضچه‌ها و شالیزارها، تمامی سطح آب توسط آزولا پوشانده شده است (شکل ۲).

سرخس آبی که به‌عنوان یک افزودنی برای کشت برنج در گیلان وارد شد، در نهایت، به رودخانه‌ها، تالاب‌ها، دریاچه‌ها و برکه‌های مازندران رسید (Sadeghi *et al.*, 2014b). آزولا در سطح برخی از شالیزارها و تالاب‌های سراندون و بالادون ساری، آبشار دارابکلا، آب انبار آبان، دریاچه عباس آباد، آبشار زنگات، دریاچه گل پابا، دریاچه صابون، آبشار شاهانداش در لاریجان، سواساره قرار گرفت.



شکل ۱- پراکنش جهانی آزولا در کشورهای مختلف (CABI, 2022).

شکل ۲- انتشار گسترده آزولا (*A. filiculoides*) در تالاب انزلی (Anzali Wetland, 2022)

این گونه همچنین در آبشار بلده، تالاب کندوچال، دریاچه ولشت در کلاردشت، دریاچه خزرینی در شمال نوشهر، آبشارهای آکاپل و هریجان، تالاب لاپو پلنگان در شرق نکا، در رامسر آذرک، ریشبراز، آبشار چاردار، آبشارهای کندر باسر حضور دارد. اگرچه آزولا در تمامی برکه‌ها و شالیزارهای استان مازندران یافت می‌شود، اما فراوانی آن در این استان کمتر از گیلان است (Hashemloian and Azimi, 2009). فراوانی آزولا در استان گلستان نیز تقریباً پایین بوده و اغلب در شالیزارهای برنج یافت می‌شود. بررسی وضعیت اقلیمی استان گلستان نشان می‌دهد که این استان نسبت به مازندران و گیلان از دمای هوای بالاتری برخوردار است و از طرف دیگر، شالیزارهای برنج آن نیز کمتر است. بر اساس گزارش Hashemloian و Azimi (۲۰۰۹)، آزولا در تمام محصولات برنج در استان‌های گیلان، مازندران و گلستان مشاهده شده است.

مشکلات زیست‌محیطی

آزولا (*Azolla filiculoides*) بومی قاره آمریکا، در قرن نوزدهم به بریتانیا معرفی شد و در آب‌های آرام و ساکن گسترش یافت. این گونه اغلب زیستگاه‌های ارزشمند یا در معرض تهدید را مورد هجوم قرار می‌دهند. آزولا می‌تواند تأثیرات مختلفی داشته باشد. این گونه، سطح دسترسی به نور و اکسیژن را برای گیاهان و جانوران زیر آب کاهش می‌دهد (Coetzee *et al*., 2011). علاوه بر موردی که ذکر گردید، غلبه بر گیاهان بومی، تغییر pH و سایر متغیرهای فیزیکوشیمیایی آب، جلوگیری از فعالیت‌های تفریحی مانند ماهیگیری و قایق‌سواری و از همه مهم‌تر به خطر افتادن جان دام‌ها و افراد محلی از جمله مسائل حیاتی مرتبط با انتشار گیاه آزولا در تالاب انزلی اند (Invasive-Species, 2022; Anzali Wetland, 2022).

آزولا با توانایی تثبیت نیتروژن از طریق ارتباط با سیانوباکتریوم همزیست، قادر است در آب های فقیر از نیتروژن نیز تسلط یابد. آزولا می تواند خود را به صورت رویشی تکثیر کند و در شرایط مناسب جمعیت خود را به سرعت دو برابر کند (Hill and Cilliers, 1999). کنترل دستی یا مکانیکی معمولاً گران است و منجر به ترخیص کوتاه مدت می شود و باید با بهبودی آزولا تکرار شود. کنترل شیمیایی با چالش های مشابه با خطرات اضافی برای زیستگاه آبی مواجه است. گیاه *A. filiculoides* یکی از پنج علف هرز آبزی بود که در سال ۲۰۱۴ فروش آن در بریتانیا ممنوع شد (Invasive-Species, 2022).

سرخس آبی با افزایش بار مواد مغذی بر اکوسیستم‌های شمال ایران اثرات نامطلوبی برجای گذاشته است و به یوتریفیکاسیون رودخانه‌ها، دریاچه‌ها، تالاب‌ها و برکه‌ها کمک می‌کند. توده‌های متراکم آزولا از نفوذ نور در مناطق مختلف آب جلوگیری می‌کنند و از این‌رو، موجب کاهش اکسیژن آب و به‌خطر افتادن حیات آبزیان از جمله ماهیان می‌شوند (Hashemloian and Azimi, 2009).

بر طبق مشاهدات میدانی در تالاب‌های شمال کشور، توده-های متراکم آزولا حدود ۲۵ درصد از سطح آب‌های تالاب انزلی را تشکیل داده است. آزولا در اکثر آب‌ها به‌عنوان یک گونه زینتی محسوب می‌شود، اما در آب‌های استان گیلان و مازندران با مسدود کردن ورودی پمپ‌ها و فیلترها، ورود به مخازن آب آشامیدنی و محدود کردن استفاده تفریحی از سدها و تخریب آب‌های شرب، مشکلاتی را ایجاد کرده است. بیشترین مشکلات شامل مسدود شدن سطح آب و محدود کردن گیاهان و جانوران دریایی است. این امر می‌تواند باعث تغییرات گسترده‌ای در تنوع زیستی این اکوسیستم‌های آبی شود، چراکه *A. filiculoides* می‌تواند به‌سرعت گسترش یابد و توده‌های رویشی متراکمی را در مناطقی از آب‌های ساکن تشکیل دهد. این مسئله به نوبه خود، نور موجود برای سایر گیاهان آبزی و اکسیژن موردنیاز سایر آبزیان را محدود می‌کند (Hashemloian and Azimi, 2009). توده‌های متراکم تشکیل شده می‌توانند موجب خفگی گونه‌های دیگر به‌دلیل کمبود اکسیژن شوند. آزولا در فهرست گیاهان هرزآبی و مضر ایالات متحده قرار گرفته است. در نیوزیلند، این گیاه جایگزین سرخس بومی (*Azolla rubra*) در بیشتر مناطق شمالی نیوزیلند شده است. بر طبق گزارش‌های به‌عمل آمده از اثرات زیست‌محیطی آزولا، به‌نظر می‌رسد که کنترل تکثیر این گونه در برخی از مناطق جهان مانند آفریقای جنوبی و بخش شمالی ایران (تالاب انزلی) ضروری تلقی می‌شود (Hashemloian and Azimi, 2009).

شیوه‌های کنترل و مدیریت

اقدامات مدیریتی اتخاذ شده برای هر گونه گیاهی مهاجم به عواملی مانند زمین، هزینه و در دسترس بودن نیروی کار، شدت آلودگی و وجود گونه‌های مهاجم دیگر بستگی دارد. بهترین شکل مدیریت گونه‌های مهاجم، پیشگیری است. اگر چنانچه پیشگیری دیگر امکان‌پذیر نباشد، بهتر است که هجوم علف‌های هرز را در زمانی که کوچک هستند، کنترل کرد. این مسئله لازمه تشخیص زودهنگام و پاسخ سریع به این معضل زیست‌محیطی و اقتصادی را نشان می‌دهد. مدیریت پایدار اکوسیستم‌های آبزی نیازمند ارزیابی و پایش مداوم است که این مسئله در نوع خود مشکل به‌نظر می‌رسد. در ادامه به انواع شیوه‌های کنترل گیاه آزولا که به سه دسته مکانیکی، شیمیایی و بیولوژیکی تقسیم می‌شوند، اشاره می‌شود.

کنترل مکانیکی

تجربه نشان داده است که امکان حذف علف‌های هرز و کوچک با استفاده از چنگک‌ها و شبکه‌های ریزمشبک وجود دارد. با این حال، نقطه ضعف کنترل مکانیکی این است که در شرایط ایده‌آل، توده علف هرز می‌تواند هر ۵-۴ روز، دو برابر شود (Lumpkin and Plucknett, 1982). علاوه بر این، امکان استقرار مجدد هاگ‌های ساکن در بستر پیکره آبی نیز اجتناب‌ناپذیر خواهد بود. Ashton (۱۹۹۲) پیرو بررسی‌هایی که روی حذف مکانیکی گیاه آزولا از اکوسیستم‌های آبی انجام داد، بیان داشت هنگامی که *A. filiculoides* در معرض آسیب ناشی از فعالیت‌های فیزیکی قرار می‌گیرد، قطعات جدا شده به شدت نور بسیار حساس بوده و در اثر نور مستقیم خورشید رشد می‌کنند. بنابراین، Ashton (۱۹۹۲) استفاده از همزن‌های مکانیکی را به‌منظور ایجاد تلاطم کافی برای شکستن گیاهان پیشنهاد کرد. با این حال، برآوردهای اقتصادی نشان می‌دهد که هزینه چنین رویکردی (حتی در مقیاس کوچک) بسیار زیاد خواهد بود.

کنترل شیمیایی

مواد شیمیایی پیشنهادی برای کنترل آزولا (*A. filiculoides*) شامل گلایفوسیت (Glyphosate)، پاراکوات (Paraquat) و دیکوات (Diquat) و نفت سفید مخلوط با یک سورفکتانت هستند. با این حال، استفاده از پاراکوات در حال حاضر در اتحادیه اروپا، سوئیس و تعدادی از کشورهای دیگر ممنوع است. استفاده از دیکوات در اتحادیه اروپا محدود به تیمارهای زمینی است و دیگر نمی‌توان آن را برای کنترل علف‌های هرز آبزی مجاز دانست. گلایفوسیت از جمله پرمصرف‌ترین علف‌کش‌ها در سراسر جهان است که می-تواند آب‌های سطحی را آلوده کنند. تحقیقات نشان می‌دهد که گلایفوسیت باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در ماهیان می‌شود. همچنین، این ماده ممکن است باعث سمیت تولیدمثل در سیستم پستانداران شود (Webster *et al*., 2014; Zaller *et al*., 2021). بر اساس گزارش مرکز بین‌المللی کشاورزی و علوم زیستی (CABI) در سال ۲۰۲۲، گلایفوسیت برای ماهیان و جلبک‌ها سمی است و تا

زمانی‌که این علف‌کش تجزیه نشود، نمی‌توان از آب برای مصارف آبیاری یا ذخیره‌سازی استفاده کرد.

کنترل بیولوژیکی

آفریقای جنوبی تنها کشوری است که از یک برنامه کنترل بیولوژیکی کلاسیک بر علیه *A. filiculoides* استفاده کرد (Hill and Cilliers, 1999). این کشور از چهار گونه حشره به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیکی آزولا استفاده کرد. این گونه‌ها شامل *Pseudolampsis guttata Leconte*، *P. darwinii Sherer*، *S. brunneus Hustache* و سرخرطومی (*Stenopelmus rufinasus* Gyllenhal) بودند. ارزیابی‌های انجام شده نشان داد که همه این گونه‌ها آسیب زیادی به توده‌های آزولا در کشور مبدا وارد می‌کنند. اگرچه مشخص شد که همه گونه‌های مذکور نسبتاً آسیب‌زا هستند، اما با این حال، سرخرطومی (*S. rufinasus*) به‌عنوان مناسب‌ترین گزینه از بین سایرین برای انتشار در آفریقای جنوبی انتخاب شد (شکل ۳) و تصمیمات لازم جهت معرفی آن صورت پذیرفت. این گونه پس از رهاسازی در سال ۱۹۹۷، نتایج چشم‌گیری به‌همراه داشت به‌طوری‌که موجب انقراض *A. filiculoides* در مناطق رهاسازی شد (CABI, 2022). بر اساس گزارش CABI (۲۰۲۲)، در آفریقای جنوبی از سال ۱۹۹۷ تا سال ۲۰۰۴، نزدیک به ۲۵۰۰۰ نمونه سرخرطومی در سراسر آفریقای جنوبی رهاسازی شدند و آسیب تغذیه‌ای آن‌ها منجر به انقراض *A. filiculoides* از اکثر مناطق شد. به‌طور متوسط، حدوداً ۱۰ ماه طول کشید تا یک ناحیه پس از رهاسازی سرخرطومی ها پاک شود. اگر چه در ابتدا، توانایی پراکندگی سرخرطومی ها دست کم گرفته شده بود، اما آن‌ها توانستند بدون هیچ کمکی تا ۳۵۰ کیلومتر پراکنده شوند (Hill and Cilliers, 1999).

مساحت سطح علف‌های هرز کنترل شده در مجموع ۲۰۳ هکتار و مناطق آلوده به‌طور متوسط در طی ۷ ماه (در محدوده ۳ تا ۱۱ ماه) کنترل شدند. پنج سال پس از رهاسازی سرخرطومی، *A. filiculoides* دیگر تهدیدی برای اکوسیستم های آبی در آفریقای جنوبی نبود و اثرات آن بر استفاده از منابع آب به‌طور قابل توجهی کاهش یافت. روش مذکور برای کنترل زیستی آزولا در کشورهای موزامبیک و زیمبابوه موفقیت‌آمیز بود. کنترل بیولوژیکی *A. filiculoides* در حال حاضر به‌طور گسترده به‌عنوان موفق‌ترین برنامه کنترل بیولوژیکی علیه یک گیاه بیگانه و مهاجم در آفریقای جنوبی در نظر گرفته می‌شود (Coetzee *et al.*, 2011; Madeira *et al.*, 2016). سرخرطومی (*S. rufinasus*) از زمانی که برای اولین بار توسط Janson (۱۹۲۱) در آنجا گزارش شد در بریتانیا وجود داشته است و احتمالاً همراه با گیاه به اروپا آورده شده است. تاکنون این گونه در ایرلند، فرانسه، بلژیک، هلند و اسپانیا ثبت شده است (Hussner, 2010). با توجه به موارد ذکر شده، استفاده از سرخرطومی (*S. rufinasus*) به‌عنوان یک عامل بیولوژیک می‌تواند در کنترل آلودگی آزولا بسیار موثر باشد. موید این موضوع یافته‌های حاصل از مطالعه Hussner و Lösch (۲۰۰۵) می‌باشد که روی تغذیه بالغین و لاروهای این حشره از برگ‌های آزولا تاکید می‌کنند.

شکل ۳- سرخرطومی آزولا (*Stenopelmus rufinasus*). (Bugguide, 2022)

مطالعه موردی گیاه آزولا در آفریقای جنوبی

آزولا (*A. filiculoides*) نخستین بار در سال ۱۹۴۸ از رودخانه اُرلوگ اسپورت (Oorlogspoort) واقع در استان کیپ شمالی در اَفریقای جنوبی ثبت و تا سال ۱۹۹۹ از ۱۵۲ نقطه در این منطقه گزارش شد. با توجه به اثرات نامطلوب محیطی و اقتصادی آزولا، یک برنامه کنترل بیولوژیکی با ورود یک گونه حشره تحت عنوان سرخرطومی (*Stenopelmus rufinasus*) از فلوریدا (ایالات متحده آمریکا) در سال ۱۹۹۵ آغاز شد. در آفریقای جنوبی از سال ۱۹۹۷ تا سال ۲۰۰۴، نزدیک به ۲۵۰۰۰ سرخرطومی در سراسر آفریقای جنوبی رها شدند و آسیب تغذیه‌ای آنها منجر به انقراض *A. filiculoides* از اکثر مناطقی شد که در آن زمان مورد بررسی قرار گرفتند. به‌طور متوسط ده ماه طول کشید تا یک ناحیه پس از رهاسازی سرخرطومی‌ها پاک شود. اگر چه در ابتدا، قدرت پراکندگی سرخرطومی‌ها دست کم گرفته شده بود، اما در نهایت، آن‌ها توانستند بدون هیچ کمکی تا ۳۵۰ کیلومتر پراکنده شوند.

تنها پنج سال پس از رهاسازی سرخرطومی‌ها، آزولا دیگر تهدیدی برای آب‌های آفریقای جنوبی تلقی نمی‌شد (McConnachie *et al*., 2004). این موفقیت‌ها در بین سال‌های ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۶ به دقت مورد بررسی قرار گرفت و نتایج کنترل سریع گیاه آزولا را به‌واسطه رهاسازی سرخرطومی‌ها نشان داد. بر طبق گزارش‌های به‌دست آمده، تنها چهار سال پس از مطالعات McConnachie و همکاران (۲۰۰۴)، سرخرطومی‌ها موفق شدند گیاه آزولا را در هر مکانی که رها شده بود، کنترل کنند.

با ارزیابی‌هایی که از سال ۲۰۰۸ در آفریقای جنوبی انجام گرفت، شواهد بیشتری از موفقیت این برنامه‌ها به‌دست آمد. در سال ۲۰۱۰، از ۱۰۲ ناحیه‌ای که *A. filiculoides* مورد بررسی قرار گرفت (حدود ۴۰ درصد از نواحی مورد مطالعه)، آزولا در ۱۹ ناحیه (۱۹ درصد) وجود داشت و *S. rufinasus* از ۱۴ ناحیه آلوده (حدود ۷۰ درصد از نواحی مورد مطالعه) ثبت شد. پس از ارزیابی مناطق، مشخص گردید که *A. filiculoides* دیگر معضل مهمی در آفریقای جنوبی نیست (CABI, 2022).

سرخرطومی (*Stenopelmus rufinasus*)

سرخرطومی نیمه‌آبزی متعلق به راسته قاب‌بالان یا سخت‌بال‌پوشان (Coleoptera: Curculionidae) بوده و بومی جنوب و غرب ایالات متحده است (Parys *et al*., 2015). این گونه در آغاز قرن بیستم به‌طور تصادفی از طریق مواد گیاهی از آرژانتین و پاراگوئه به اروپا منتقل است (Manzek 1927; Richerson and Grigarick, 1967). سرخرطومی در سال ۱۹۹۷ برای کنترل بیولوژیکی آزولا به آفریقای جنوبی معرفی شد و توانست این علف هرز و مهاجم آبی را با موفقیت کنترل کند (Farahpour-Haghani *et al*., 2018). این حشره به‌عنوان یکی از موفق‌ترین عوامل کنترل بیولوژیکی در سراسر جهان شناخته می‌شود. با این حال، هیچ سابقه‌ای مبنی بر حضور آن در گونه‌های آزولا در آسیا تا سال ۲۰۱۴ ثبت نشد. حضور سرخرطومی در آسیا اولین بار در اکتبر ۲۰۱۷ توسط Friedman (۲۰۱۷) گزارش شد. فرح‌پور حقانی و همکاران (۱۳۹۷) سرخرطومی (*S. rufinasus*) را به‌عنوان شایع‌ترین عامل کنترل زیستی آزولا در جهان معرفی کردند. این محققین با جمع‌آوری نمونه‌هایی از سرخرطومی از کانال‌های آبرسانی مجاور تالاب انزلی، برای نخستین بار حضور سرخرطومی در ایران را تایید کردند (فرح‌پور حقانی، ۱۳۹۸).

نتیجه‌گیری و چشم‌انداز آینده

مطالعه حاضر نشان می دهد که سرخس آبی یا آزولا به‌عنوان یکی از گونه‌های غیربومی و مهاجم در کشور، تاثیرات زیست‌محیطی قابل ملاحظه‌ای بر تالاب انزلی داشته است. با توجه به این مسئله و ضرورت کنترل این گونه مهاجم، لازم است که سازمان‌های مسئول به‌ویژه سازمان محیط‌زیست برای برطرف کردن این معضل زیست‌محیطی در کشور گام‌های مؤثری بردارند. اولین نکته قابل تامل در رابطه با این موضوع، جلوگیری از انتشار بیشتر گیاه آزولا در اکوسیستم‌های آبی کشور است. از این‌رو، اولین اقدام باید در جهت پیشگیری از معرفی و ورود آزولا به سایر اکوسیستم‌ها صورت گیرد. این مسئله می‌تواند توسط سازمان محیط‌زیست کشور و به‌طور ویژه یگان حفاظت محیط‌زیست مورد پیگیری قرار گیرد.

وجود شرایط اکولوژیکی مناسب برای رشد و گسترش آزولا و همچنین، عدم وجود دشمنان طبیعی آن در تالاب انزلی موجب شده است که این گونه به‌تدریج به یک عامل مهاجم در تالاب انزلی تبدیل شود. بر طبق گزارش‌ها و

تحقیقات به‌عمل آمده، از بین روش‌های مختلفی که برای مبارزه با گیاه آزولا در دسترس است، روش‌های مکانیکی و بیولوژیکی به‌دلیل اثرات زیست‌محیطی کمتری که روی اکوسیستم اعمال می‌کنند، بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. اگرچه به‌نظر می‌رسد که در زمینه مبارزه با انتشار گیاه آزولا در تالاب انزلی، سریع‌ترین راهکار استفاده از شیوه-های مکانیکی باشد، با این حال، این روش به‌دلیل احتمال تکه تکه شدن گیاه و رشد مجدد آن چندان مناسب و کارساز نیست. در بین روش‌های مذکور، استفاده از رویکردهای بیولوژیکی در صورتی‌که با توجه به کلیه جوانب ممکن صورت گرفته باشند، می‌تواند بسیار مفید باشد. طبق تجربیاتی که در آفریقای جنوبی حاصل شد، استفاده از حشراتی مانند سرخرطومی (*S. rufinasus*) می-تواند به عنوان یک عامل بیولوژیک برای کنترل آزولا در تالاب انزلی مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

رادخواه ع.ر.، ایگدری س، پورباقر ه. و حسینی س.و. ۱۳۹۷. مروری بر پراکنش گونه غیربومی آمورچه (*Pseudorasbora parva*) در آب‌های داخلی ایران و بررسی اثرات اکولوژیکی آن. کنفرانس حفاظت از ماهیان بومزاد اکوسیستم‌های آب‌های داخلی ایران. دانشگاه تهران (گروه شیلات دانشگاه تهران) و انجمن ماهی‌شناسی ایران. ۲۸ آذر ۱۳۹۷، کرج.

فرح‌پورحقانی آ.، توسیوسکی ا.، یعقوبی ب.، جلاییان م. و پورامیر ف. ۱۳۹۷. اولین گزارش فعالیت سرخرطومی (*Stenopelmus rufinasus* Gyllenhal, (Coleoptera:Curculionidae در ایران. نشریه گیاه پزشکی. دوره ۷، شماره ۲، صفحات ۲۴۶-۲۴۳.

فرح‌پور حقانی آ. ۱۳۹۸. کنترل بیولوژیک آزولا در ایران: چالش‌ها و ظرفیت‌های موجود. نشریه مهار زیستی در گیاه‌پزشکی. دوره ۷، شماره ۱، صفحات ۹۲-۷۱.

Anzali Wetland. 2022. Anzali Wetland Ecological Management Project - Phase 2. Invasive Alien Species Control. https://anzaliwetland.com/invasive-alien-species-control. Accessed 17 May 2022.

Ashton P.J. 1992. Azolla infestations in South Africa: history of the introduction, scope of the problem and prospects for management. Water Quality Information Sheet. Department of Water Affairs and Forestry, South Africa.

Bugguide. 2022. *Stenopelmus rufinasus* on *Azolla caroliniana* - Stenopelmus rufinasus. https://bugguide.net/node/view/2064022/bgimage. Accessed 10 May 2022.

CABI. 2022. Centre for Agriculture and Bioscience International. Invasive Species Compendium. *Azolla filiculoides* (water fern). https://www.cabi.org/isc/datasheet/8119. Accessed 10 May 2022.

Coetzee J.A., Hill M.P., Byrne M.J. and Bownes A. 2011. A review of the biological control programmes on *Eichhornia crassipes* (C. Mart.) Solms (Pontederiacaeae), *Salvinia molesta* D.S. Mitch. (Salviniaceae), *Pistia stratiotes* L. (Araceae), *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. (Haloragaceae) and *Azolla filiculoides* Lam. (Azollaceae) in South Africa. African Entomology, 19: 451-468.

Farahpour-Haghani A., Tosiveski I., Yaghoubi B., Jalaeian M. and Pouramir F. 2018. First report of the exotic weevil *Stenopelmus rufinasus* (Coleoptera: Curculionidae) occurrence in Iran. Journal of Crop Protection, 7(2): 243-246.

Friedman A.L.L. 2017. The first record of the Azolla frond weevil *Stenopelmus rufinasus* (Curculionidae: Brachycerinae: Tanysphyrini) in Israel. Israel Journal of Entomology, 47: 103-106.

Hashemloian B.D. and Azimi A.A. 2009. Alien and exotic *Azolla* in northern Iran. African Journal of Biotechnology, 8(2): 187-190.

Henderson L. and Cilliers C.J. 2002. Invasive aquatic plants-a guide to the identification of the most important and potentially dangerous invasive aquatic and wetland plants in South Africa. PPRI Handbook No. 16, Agricultural Research Council, Pretoria. 7 p. https://invasives.org.za/wp-content/uploads/SAPIA_News_17_Oct2010.pdf. Accessed 16 May 2022.

Hill M.P. and Cilliers C.J. 1999. *Azolla filiculoides* Lamarck (Pteridophyta: Azollaceae), its status in South Africa and control. Hydrobiologia, 415(13): 203-206.

Hussner A. and Lösch R. 2005. Alien aquatic plants in a thermally abnormal river and their assembly to neophyte- dominated macrophyte stands (River Erft, Northrhine-Westphalia). Limnologica, 35: 18-30.

Hussner A. 2010. NOBANIS – Invasive Alien Species Fact Sheet – *Azolla filiculoides*. Online Database of the European Network on Invasive Alien Species – NOBANIS. www.nobanis.org. Accessed 15 May 2022.

Invasive-Species. 2022. *Azolla filiculoides*. https://www.invasive-species.org/species/azolla. Accessed 15 May 2022.

Janson O.E. 1921. *Stenopelmus rufinasus* GYLL., an addition to the list of British Coleoptera. The Entomologist's Monthly Magazine, 57: 225–226.

Lumpkin T.A. and Plucknett D.L. 1982. Azolla as a green manure: use and management in crop production. Azolla as a green manure: use and management in crop production. Westview Press Boulder, Colorado, 230 p.

Madeira P.T., Hill M.P., Dray F.A.J., Coetzee J.A., Paterson I.D. and Tippinga P.W. 2016. Molecular identification of Azolla invasions in Africa: The Azolla specialist, *Stenopelmus rufinasus* proves to be an excellent taxonomist. South African Journal of Botany, 105: 299-305. DOI: 10.1016/j.sajb.2016.03.007

Manzek E. 1927. *Stcnopclmus rufinasus* Gyll., ein fur Deutschland neuer Kafer. Entomologische Blätter, 23: 189-191.

McConnachie A.J., Hill M.P. and Byrne M.J. 2004. Field assessment of a frond-feeding weevil, a successful biological control agent of red waterfern, *Azolla filiculoides*, in southern Africa. Biological Control, 29: 326-331. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2003.08.010

O'Keeffe J.H. 1986. Ecological research on South African rivers – a preliminary synthesis. South African National Scientific Programmes Report, 121: 1-121.

Parys K.A., Tewari S. and Johnson S.J. 2015. Adults of the waterfern weevil, *Stenopelmus rufinasus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae), feed on a non-host plant, *Salvinia minima* Baker, in Louisiana. The Coleopterists Bulletin, 69(2): 316-318. DOI:10.1649/0010-065X-69.2.316

Pereira A.L. and Vasconcelos V. 2014. Classification and phylogeny of the cyanobiont Anabaena azollae Strasburger: an answered question? International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64: 1830-1840. DOI 10.1099/ijs.0.059238-0

Rao H.S. 1936. The structure and Life-history of Azolla pinnata R. Brown. With remarks on the fossil history of the Hydropteridae. Proceedings of the Indian Academy of Science, 2: 175-200.

Richerson P.J. and Grigarick A.A. 1967. The Life History of *Stenopelmus rufinasus* (Coleoptera: Curculionidae). Annals of the Entomological Society of America, 60(2): 351-354. DOI:10.1093/aesa/60.2.351

Sadeghi R., Zarkami R., Sabetraftar K. and Van Damme P. 2014a. Analysis of environmental factors determining distribution pattern of *Azolla filiculoides* (Lam.) azollaceae in Anzali wetland, northern Iran. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 79(1): 199-205.

Sadeghi R., Zarkami R., Sabetraftar K. and Van Damme P. 2014b. Habitat suitability modelling in auto-ecology analysis of *Azolla filiculoides* (Lam.) azollaceae in Selkeh wildlife refuge (Iran). Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 79(1):193-198.

Wagner G.M. 1997. *Azolla*: A Review of Its Biology and Utilization. Botanical Review, 63(1): 1-26.

Webster T.M.U., Laing L.V., Florance H. and Santos E.M. 2014. Effects of Glyphosate and its Formulation, Roundup, on Reproduction in Zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Science and Technology, 48(2): 1271-1279. DOI: 10.1021/es404258h

Zaller J.G., Weber M., Maderthaner M. and Székács A. 2021. Effects of glyphosate-based herbicides and their active ingredients on earthworms, water infiltration and glyphosate leaching are influenced by soil properties. Environmental Sciences Europe, 33: 51. DOI: 10.1186/s12302-021-00492-0

Unbridled growth of water fern (*Azolla filiculoides* Lam.) in Anzali wetland; The tragedy of introducing an invasive species to one of the most important water bodies of Iran

Radkhah A.R.[1*], Eagderi S.[1], Poorbagher H.[1], Sadeghinejad Masouleh E.[2]

[1] Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R. of Iran

[2] Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Inland Waters Aquaculture Research Center, Agriculture Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar-e Anzali, I.R. of Iran

Abstract

In the present study, one of the most important environmental problems and examples of biological invasion in Iran, has been investigated. Water fern (*Azolla filiculoides*) is an exotic and invasive species that has been introduced to Anzali Wetland and has pushed the famous water body to the brink of destruction for many years. In this study, various mechanisms to control *Azolla* are discussed. Studies have shown that in addition to mechanical, chemical and biological methods, prevention is still considered as the primary approach. Among the various methods, mechanical and biological methods have been considered due to the less environmental side-effects they inflict on the ecosystem. While it seems that the fastest solution could be the use of mechanical methods to combat *Azolla* in Anzali wetland, however, this method is not very suitable due to the possibility of plant fragmentation and the possibility of plant regrowth. Among the control methods, the use of biological approaches can be helpful if it is adopted by experts and researchers considering all aspects. This is confirmed by case studies and experiences from other countries, including the biological control of *Azolla* in South Africa over the past years.

Keywords: Azolla, Anzali wetland, Biological control, Waterfern weevil, Environmental impacts

توسعه فناوری حسگرها و تکنیک‌های مولکولی شناسایی تهدیدهای زیستی

آناهیتا شریعت*

ایران، تهران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۰۷/۱۲ تاریخ پذیرش:۱۴۰۱/۰۷/۰۲

چکیده

در عصر حاضر که جهان پیچیده‌تر و غیرقابل پیش‌بینی‌تر از همیشه بوده و آلودگی‌های زیست‌محیطی، تغییرات آب و هوایی، رشد جمعیت و جنگ رو به گسترش است، تهدیدات زیستی، به‌عنوان خطری جدی برای سلامت جوامع محسوب می‌شود و گام اصلی در مقابله با چنین تهدیداتی تشخیص زودهنگام می‌باشد. روش‌های مورداستفاده در این زمینه بر اساس تکنیک‌های ژنتیکی، ایمونولوژیک و یا ترکیبی از هر دو روش (ایمونوژنتیک) است. روش‌هایی نیز بر اساس خواص فیزیکی و شیمیایی آنالیت‌ها توسعه‌یافته است. هر گروه از این سنجش‌ها را می‌توان با روش‌های متداول (مانند PCR کلاسیک، Real-time PCR و یا واکنش‌های ساده آنتی‌ژن-آنتی‌بادی) و یا فناوری‌های مدرن (مانند کاوشگرهای ژنی، تراشه‌های ژنی، حسگرهای زیستی، فناوری ریزآرایه، آپتامرها، فسفرها و غیره) اندازه‌گیری کرد. همچنین دستگاه‌های تشخیصی یکپارچه و خودکار وجود دارد که روش‌های مختلف را باهم ترکیب می‌کند و امکان نمونه‌برداری همزمان، استخراج مواد ژنتیکی و تشخیص و شناسایی آنالیت با استفاده از تکنیک‌های ژنتیکی و ایمونولوژیک را فراهم می‌آورد. نتایج این تحقیق نشان داد که در میان دستگاه‌های موجود که برای تشخیص تهدیدات زیستی استفاده می‌کردند، آن دسته از روش‌های مولکولی که کاربرد میدانی و عملیاتی دارند دارای دقت و سرعت بالایی هستند در اولویت دستیابی به فناوری‌های تشخیص بوده، می‌توانند نقش مؤثری در پدافند غیرعامل داشته باشند.

واژگان کلیدی: ایمونولوژی، تشخیص، تهدید زیستی، حسگر زیستی، ریزآرایه

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: shariat@rifr-ac.ir

مقدمه

تسلیحات بیولوژیک، یک کلاس منحصربه‌فرد از سلاح‌ها هستند که برای همه نوع تنوع زیستی ازجمله انسان، حیوان، گیاه، آب‌وهوا و ... خطراتی ایجاد می‌کنند. افزایش چنین تهدیداتی مستقیماً با پیشرفت فناوری در بیوتکنولوژی مدرن مرتبط است که متخاصمین از آن در جهت مقاصد پلید خود استفاده می‌کنند (۱). مقابله با چنین چالشی نیازمند استراتژی‌های مؤثر پدافند غیرعامل است که فناوری‌های تشخیصی، داروها و واکسن‌های موردنیاز برای مقابله با طیف وسیعی از سلاح‌های زیستی پیشرفته قرن ۲۱ را ارائه می‌دهد. به‌طورکلی عوامل بیولوژیک تهدیدکننده، دارای ویژگی‌ها و مزایایی برای متخاصمین هستند ازجمله: مدتی پس از حمله باعث ایجاد علائم می‌شوند، به این مفهوم که آسیب از این طریق، تأخیری است به‌طوری‌که زمانی از تهاجم مطلع می‌گردیم که عامل بیولوژیک توسعه‌یافته و منطقه گسترده‌ای را درگیر کرده است. از ویژگی‌های دیگر آن است که این عوامل با روش‌های طبیعی در منطقه انتشار می‌یابند و از نرخ شیوع و خسارت بالایی برخوردارند. این عوامل با تجهیزات آزمایشگاهی به میزان فراوان تکثیر و در منطقه حساس رها می‌گردند و روش انتشار به‌صورت پنهان صورت می‌گیرد و امکان شناسایی آن با هیچ ابزار شناساگری در مرحله تهاجم وجود ندارد و یا بسیار دشوار است (۲)؛ بنابراین تفکیک بین عمدی و یا طبیعی بودن شیوع یک عامل بیولوژیک بسیار دشوار است مگر در موارد استثنایی که عامل به‌هیچ‌وجه بومی آن کشور نباشد. به همین دلیل دشمنان در طراحی حملات بیوتروریسم برای پرهیز از امکان اثبات ادعای به‌کارگیری سلاح کشتارجمعی، به نحوی برنامه‌ریزی می‌کنند که ضمن آسیب‌رسانی مؤثر، از مظان اتهام بری بمانند. در اکثر تهدیدات بیولوژیک صورت گرفته، کشور موردتهاجم قادر به اثبات ادعای خود برعلیه دشمن نبوده است (۳).

تا پیش‌ازاین میکروسکوپ نقش مهمی در تشخیص عوامل بیماری‌زای باکتریایی و شمارش آن‌ها در نمونه‌های مختلف (مانند خون، ادرار، خلط، مدفوع) داشته است. استفاده از

فن رنگ‌آمیزی (به‌عنوان‌مثال رودامین، جوهر هندی) نیز تمایز و طبقه‌بندی تعدادی از سویه‌های باکتریایی را تسهیل نموده است. ویروس‌هایی نظیر روتاویروس‌ها، هپاتیت A و Norwalk نیز با استفاده از تکنیک‌های میکروسکوپی قابل‌شناسایی هستند. لازم به ذکر است که تشخیص بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی باکتری‌ها و ذرات ویروس، نیاز به مقدار زیاد نمونه دارد، به‌طور مثال در مورد ویروس‌ها، به تیتر بالای ویروسی (۱۰۵ تا ۱۰۶ ذره ویروس در میلی‌لیتر) (Virus particles per mililliter, vp/mL) نیاز است. علاوه بر این، تلفات نمونه در حین آماده‌سازی نمونه برای میکروسکوپ‌های الکترونی، به دلیل از دست دادن آب نمونه و شارژ مولکول‌های زیستی (باکتری‌ها و ویروس‌ها) بالاست که این امر باعث کاهش اختلاف میان روشن‌ترین و تیره‌ترین بخش یک تصویر و نیز کاهش عملکرد می‌شود. علاوه بر این، تکنیک‌های میکروسکوپی نیاز به تخصص و نیروی انسانی آموزش‌دیده دارد که موارد ذکرشده باعث ایجاد محدودیت در تشخیص می‌شوند. تاکنون برای تشخیص تهدیدهای زیستی روش‌های مختلفی ارائه‌شده است که عمدتاً بر اساس آزمایش‌های کشت و بیوشیمیایی هستند که نمی‌توان از آن‌ها در عرصه استفاده کرد و در صورت حمله بیوتروریستی اجازه تشخیص و شناسایی عوامل بیولوژیکی را در زمان کوتاه نمی‌دهند (۴). هدف از ارائه مقاله حاضر معرفی و مقایسه روش‌های تشخیص تهدیدات بیولوژیک است که در شش حوزه آب، دام، انسان، غذا، دارو و محیط‌زیست قابلیت کاربرد دارند.

روش تحقیق

این تحقیق ازنظر هدف کاربردی و ازنظر روش گردآوری داده‌ها توصیفی – تحلیلی و گردآوری اطلاعات با استفاده از مطالعه و بررسی اسناد و مدارک علمی پژوهشی و شبکه اینترنت صورت گرفته است. در این تحقیق، تکنولوژی‌های ژنتیکی و ایمونولوژیکی موجود در جهان بر اساس شاخصه‌های کاربرد میدانی- عملیاتی بررسی شده‌اند. جدول ۱ خلاصه‌ای از تکنیک‌های مختلف مورداستفاده در تشخیص تهدیدهای بیولوژیک است که در این مقاله موردبررسی قرارگرفته است.

سنجش‌های ایمونولوژیک

تست ایمونوکروماتوگرافی (Immunochromatographic test (ICT))

تشخیص عوامل تهدید بیولوژیک توسط آنتی‌بادی‌ها (مونوکلونال یا پلی‌کلونال) یک روش استاندارد در تشخیص بالینی محسوب می‌شود. این روش بر پایه اصل تشکیل پیوند میان آنتی‌بادی-آنتی‌ژنی بر روی سطح جامد استوار است و پس‌ازآن خوانش بصری است. این آزمایش‌های کیفی و نیمه کمّی (شدت بازخوانی رنگ)، سریع (کمتر از ۲۰ دقیقه)، مقرون‌به‌صرفه، کاربرپسند و نیاز به حداقل تنظیمات دارد؛ بنابراین، این سنجش‌ها یک ابزار مناسب در برنامه‌های نظارتی به‌حساب می‌آیند که برای تشخیص پاتوژن‌ها استفاده می‌شود. تست‌های ایمونوکروماتوگرافی که بانام Lateral flow tests نیز شناخته شده‌اند، از اواخر دهه ۱۹۸۰ وارد بازار شدند و به‌عنوان یک پلتفرم محبوب و با سرعت برای تشخیص کیفی و یا نیمه کمّی بسیاری از آنالیت‌ها ازجمله آنتی‌ژن‌ها، آنتی‌بادی‌ها و حتی محصولات اسید نوکلئیک استفاده شده‌اند. از ادرار، بزاق، سرم، پلاسما، خون، عصاره ترشحات یا مایعات بیمار می‌توان به‌عنوان نمونه استفاده کرد. روش LFIA (Lateral-Flow Immunochromatographic Assays) از دیگر روش‌های آسان و سریع است، اما حساسیت آن کمتر است و نتایج مثبت کاذب زیادی را ارائه می‌دهد. بااین‌حال ممکن است برای غربالگری اولیه سریع عوامل بیولوژیکی و تشخیص سریع نمونه‌ها مفید باشد، اگرچه، به‌طور اصولی، هر نتیجه مثبتی باید با آزمایش‌های دیگر، مانندPCR تائید شود. دستگاه‌های LFIA توسط بسیاری از شرکت‌ها برای تعداد زیادی از عوامل بیولوژیک مانند *Bacillus anthracis*، *Francisella tularensis*، *Yersinia pestis*، *Clostridium botulinum* و چندین سم مانند ریسین و انتروتوکسین استافیلوکوکی B تولید شده‌اند (۵). یک آرایه ایمونولوژیکی مبتنی بر سوسپانسیون می‌تواند پنج عامل تهدیدکننده را هم‌زمان تشخیص دهد به‌عنوان‌مثال در نمونه‌های پودری *Yersinia pestis*، سندرم حاد تنفسی کروناویروس SARS-CoV، انتروتوکسین، استافیلوکوکی B (SEB)، ریسین را به ترتیب با حد تشخیص (LOD, limit of detection) ۱۱۱ (CFU)/ml، ۲۰ CFU/ml، ۱۱۰ pg، ۵/۴ نانوگرم و ۲ نانوگرم تشخیص می‌دهد.

امروزه کیت‌های تشخیصی مختلفی برای شناسایی عوامل مختلف در محیط، غذا و آب و نمونه‌های بالینی گرفته‌شده

از بیمار عرضه‌شده است. ENVI Assay System Gold یک دستگاه آزمایشگاهی قابل‌حمل است (جدول ۲) که عوامل مختلف را در عرض ۲۰ دقیقه تشخیص می‌دهد (۶).

جدول ۱- تکنیک‌های مختلف برای تشخیص تهدیدهای بیولوژیک

روش‌ها		تکنیک‌های تشخیص
آزمایش ایمونوکروماتوگرافی	Immunochromatographic test (ICT)	سنجش های ایمونولوژیک Immunological assays
سنجش ایمونوکروماتوگرافی جریان جانبی	Lateral-Flow Immunochromatographic Assays	
تست جریان از طریق نقطه	Flow through spot test	
سنجش ایمونوسوربنت مرتبط با آنزیم	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay	
روش ایمونواسی فلورسانس زمانی	Time-Resolved Fluorescence Immunoassay (TRF)	
حسگرهای مبتنی بر آرایه دی ان ا	DNA array-based sensors	فناوری حسگرها Sensor technologies
حسگرهای مبتنی بر آرایه پروتئینی	Protein array-based sensors	
سنسورهای ایمونولوژیک	Immunological sensors	
حسگرهای زیستی مبتنی بر بافت	Tissue-based biosensors	
سنسورهای مبتنی بر ام ای پی	MIP-based sensors	
حسگرهای زیستی نانومواد	Nanomaterials biosensors	
واکنش زنجیره ای پلیمراز	Polymerase chain reaction (PCR)	تکنیک های مبتنی بر تکثیر اسید نوکلئیک Nucleic Acid-Amplification-Based Techniques
ریل تایم پی سی آر	Real-time RT-PCR	
پایروسکونسینگ	454 Pyrosequencing	توالی یابی نسل بعدی Next Generation Sequencing
توالی یابی ایلومینا	Illumina Sequencing	
تعیین توالی با بستن و تشخیص الیگونوکلئوتیدی	Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection	
بستن و تشخیص		
توالی یابی به روش یون تورنت	Ion Torren	
تقویت توالی خاص	Sequence-Specific Amplification	تقویت همدما Isothermal Amplification
تقویت با واسطه سیگنال فناوری ار ان ا	Signal Mediated Amplification of RNA Technology	
روش ذوب دوبلکس آنزیمی و اتصال پرایمر	Enzymatic Duplex Melting and Primer Annealing Method	
تقویت پلیمراز رکامبیناز	Recombinase Polymerase Amplification	
تقویت وابسته به هلیکاز	Helicase Dependent Amplification (HDA)	
تقویت حلقه چرخان	Rolling Circle Amplification	
تقویت همدما با واسطه حلقه	Loop-Mediated Isothermal Amplification	
تقویت جابجایی رشته	Strand Displacement Amplification	
طیف سنجی جرمی	Mass spectrometry	فناوری های ابزاری Instrumental technologies
تصویربرداری شیمیایی رامان	Raman chemical imaging	
		ریزآرایه هاMicroarrays
		میکروسیال Microfluidics

یک پلتفرم باقابلیت اندازه‌گیری سریع نیز توسط شرکت Response Biomedical Inc برای تشخیص ویروس‌های آنفلوانزای A (FluA) و B (FluB)، Bacillus anthracis، ویروس واریولا و سموم ریسین و بوتولینوم ارائه‌شده است این پلتفرم شامل یک دستگاه فلورسنت خوان و یک

کارتریج یک‌بارمصرف است که می‌تواند عوامل بیماری‌زای مشخصی را تشخیص دهد (جدول ۲).

تست نقطه‌ای جریان (Flow-through spot test)

این آزمایش مبتنی بر جریان سیال حاوی آنالیت، از طریق یک غشای متخلخل به یک‌لایه جاذب است. از این آزمایش‌ها می‌توان برای تشخیص آنتی‌بادی‌ها و آنتی‌ژن‌ها استفاده کرد. برای تشخیص لازم است آنالیت مربوطه بر روی غشا (در یک نقطه یا خط) متصل و بی‌حرکت شود. سپس معرف موردنظر آنالیت‌ها را در حین عبور از غشا جذب می‌کند. برای انجام آزمایش، یک نمونه بر روی غشاء گذاشته می‌شود و اجازه داده می‌شود تا با عمل مویرگی جذب و پراکنده شود. پس‌ازآن، به ترتیب، یک مرحله شستشو، افزودن معرف سیگنال و شستشو دوم برای پاک‌سازی غشاء وجود دارد. این روش آزمایش بسیار سریع (۳–۵ دقیقه) و دارای حساسیت بالا برای سنجش‌های سرولوژیکی است، اما در آزمایش‌های فاز جامد، تشخیص آنتی‌ژن‌ها اغلب نسبت به روش‌های سنجش EIA (enzyme immunoassays) حساسیت کمتری دارد. بعد از انتشار سیاه‌زخم در سال ۲۰۰۱، توجه قابل‌ملاحظه‌ای به آزمایش‌های تشخیصی دستی مبتنی بر آنتی‌بادی، مانند تست سریع SMART (Sensitive Membrane Antigen Rapid Test) و ALERT (-the Antibody based Lateral Flow Economical Recognition Ticket) ایجاد شد (۷). سیستم‌های نامبرده، از آنتی‌بادی‌ها برای تشخیص اهداف خاص، سموم، آنتی‌ژن‌ها یا سلول‌های موردنظر استفاده می‌کنند. محدودیت‌های این آزمایشات شامل اتصال غیراختصاصی آنتی‌بادی‌ها است که ممکن است منجر به نتایج مثبت کاذب شود و تجزیه آنتی‌بادی‌ها در طول زمان، که ممکن است منجر به نتایج منفی کاذب شود. به‌علاوه، این آزمایش‌ها به میزان در دسترس بودن آنتی‌بادی‌ها، محدود می‌شوند.

روش سنجش ایمنی آنزیمی یا الایزا

روش الایزا یکی از پرکاربردترین روش‌ها برای ردیابی آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی است، بدین ترتیب که یکی از این دو ماده در بستر جامد فیکس می‌شود و به‌وسیله آن، ردیابی دومی انجام می‌شود، اما اساساً برای ردیابی هر جفت ماده‌ای که مثل جفت آنتی‌ژن و آنتی‌بادی به هم گرایش داشته و قدرت اتصال مناسبی نسبت به هم دارند می‌تواند به کار گرفته شود. این تکنیک کاربرپسند، حساس، خاص و مقرون‌به‌صرفه است. در این روش کمپلکس‌های آنتی‌ژن/آنتی‌بادی در یک نمونه مشخص ازنظر کمی اندازه‌گیری می‌شود. این روش به‌عنوان یک ابزار تشخیصی آزمایشگاهی در آزمایش‌های بالینی مورداستفاده قرار می‌گیرد. انواع مختلف ELISA برای تشخیص پاتوژن مورداستفاده قرار می‌گیرد مانند ELISA مستقیم، غیرمستقیم و رقابتی که می‌توانند عوامل تهدیدکننده زیستی ازجمله: *F. tularensis*، *B. anthracis*، *Y. pestis*، *Brucella abortus*، *Burkholderia pseudomallei*، ویروس ابولا (EBOV) یا ویروس ماربورگ را تشخیص دهند (۸).

همچنین سیستم‌های نمونه‌برداری و سنجش یکپارچه برای شناسایی هشت عامل تهدیدکننده (*B. anthracis*, *F. tularensis*, *Y. pestis*, *Brucella spp.*, *B. mallei*, ricin toxin, *botulinum toxin* A/B, and SEB) در عرض ۱۵ دقیقه گزارش‌شده است. در این روش از یک نوار کد شده، حاوی آنتی‌بادی‌های بی‌حرکت، استفاده می‌شود که می‌تواند عوامل زیستی را از نمونه‌های سطحی، پودری یا مایع شناسایی کند.

(TRF) Time-Resolved Fluorescence Immunoassay

روش (TRF) شبیه به الایزا است ولی نیاز به زمان بیشتر دارد. افزایش زمان فلورسانس کمک به اندازه‌گیری بهتر سیگنال می‌کند. روش TRF می‌تواند سم بوتولینوم را در نمونه‌های بیمار در غلظت‌های پایین (0.01 pM) تشخیص دهد. پلتفرم تجاری این روش توسط شرکت پرکین–المر برای تشخیص عوامل بیماری‌زای مختلف، ساخته‌شده است. این آزمایش مشابه ELISA است به‌این‌ترتیب که یک صفحه با ۹۶ چاهک، با آنتی‌بادی نشان‌دار شده با استرپتاویدین و یوروپیوم (series Eu3+, lanthanide) پوشانده شده است. آنتی‌بادی نشان‌دار شده هنگامی‌که در معرض آنتی‌ژن قرار می‌گیرد یوروپیوم آزاد و سیگنال فلورسنت تولید می‌کند. حد تشخیص سیستم ۴ تا pg/ml ۲۰ است. دستگاه‌های مبتنی بر الایزا برای تشخیص عفونت‌های میکروبی استفاده می‌گردند. پیشرفت‌های اخیر با استفاده از فناوری Luminex xMAP، قابلیت شناسایی چندین عامل میکروبی را فراهم نموده است. سیستم سنجش MagPix بر پایه اصول ELISA مبتنی بر فناوری

میکروسفر پارامغناطیس است که می‌تواند الایزا را به یک سیستم حساس‌تر و سازگارتر با توانایی شناسایی چندین عامل تبدیل کند (۹).

جدول ۲- پلتفرم‌های مختلف تشخیص سموم و پاتوژن‌ها

	تصویر دستگاه	نام دستگاه	شرکت تولیدکننده	پاتوژن‌ها و سموم قابل‌شناسایی	مدت‌زمان انجام آزمایش
۱		NIDS® handheld biothreat assay and handheld reader	ANP technologies	*Bacillus anthracis*, vaccinia virus, Brucellae, Venezuelan equine *encephalitis virus*, *Listeria*, SEB, *Francisella tularensis*, botulinum toxin A, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* 0157, ricin, *Coxiella burnetii*, *Yersinia pestis*, *Salmonella* sp.	۱۵ دقیقه
۲		PRO STRIPS5 Agent biowarfare threat detection kit	ADVNT Biotechnology	*B. anthracis*, ricin, botulinum toxin A and B, *Y. pestis* and SEB	تعیین نشده
۳		Zephyr	PathSensors, Inc.	*B. anthracis*, *Y. pestis*, ricin, *F. tularensis*, orthopoxviruses, *Salmonella* sp.	۱۵ دقیقه
۴		Prime Alert	GenPrime, Inc.	Ricin, botulinum toxin, SEB, *F. tularensis*, *Y. pestis*	۱۵ دقیقه
۵		ENVI Assay System Gold	Environics Oy	Ricin, botulinum toxin, SEB, orthopoxviruses, B. anthracis, *Y. pestis* and *F. tularensis*	کمتر از ۲۰ دقیقه
۶		Aegis 1000	BioDetection Instruments(BDI)	Foodborne pathogens, toxins, infectious agents, protein biomarkers, waterborne pathogens	کمتر از ۳۰ دقیقه
۷		RAMP 200 Biowarfare Detection System	Response Biomedical Corporation	*B. anthracis*, ricin, botulinum toxin, variola virus	بیشتر از ۳۰ دقیقه

حسگرهای زیستی

حسگر زیستی یک دستگاه تحلیلی است که از اجزای فعال بیولوژیکی، گیرنده‌های زیستی و مبدل‌ها تشکیل‌شده است و می‌تواند آنالیت‌ها را در یک نمونه مشخص، تشخیص دهد. گیرنده‌های زیستی ممکن است آنزیم‌ها، آنتی‌بادی‌ها، DNAهای تک‌رشته‌ای (ssDNA)، پروتئین‌های آپتامر یا سلول‌ها باشند. روش‌های تشخیص پاتوژن و یا سموم با استفاده از حسگرهای زیستی، سریع، حساس و مقرون‌به‌صرفه است. حسگرهای زیستی مبتنی بر سنجش ایمنی، آنتی‌ژن‌های خاصی را در نمونه بیمار تشخیص می‌دهند و یا نشانگرهای زیستی را برای مطالعه ایمنی میزبان در طول دوره عفونت شناسایی می‌کنند. دانشمندانی که از حسگرهای زیستی استفاده می‌کنند ممکن است برای تشخیص تجزیه‌وتحلیل از روش‌های بدون نشان (برچسب) یا از روش‌های نشان‌دار استفاده کنند. در سنجش بدون نشان، حضور آنالیت، مستقیماً از طریق مبدل که می‌تواند نوری، الکتریکی یا مکانیکی باشد، تشخیص داده می‌شود. در مقابل، در روش‌های نشان‌دار برای تشخیص آنالیت از آشکارساز دوم استفاده می‌شود که با آنزیم، فلوروفور یا رادیوایزوتوپ جفت شده است (۱۰). ایمونوسنسور الکتروشیمیایی با روش نشان‌دار نمودن غیرمستقیم می‌تواند عفونت *F. tularensis* را با حد تشخیص 1000 CFU/ml در عرض ۲۵ دقیقه تشخیص دهد. علاوه بر این، یک ایمونوسنسور پیزوالکتریک *F. tularensis* را با حد تشخیص 105 CFU/ml در عرض ۵ دقیقه شناسایی می‌کند. تشخیص حسگر زیستی گلیکوپروتئین EBOV glycoprotein ($GP_{1,2}$) بر اساس سطح رزونانس پلاسمون است. این بستر مقرون‌به‌صرفه، سریع و حساس است و می‌تواند در صنعت، تحقیقات و برنامه‌های دفاع زیستی مورداستفاده قرار گیرد (۱۱). یک حسگر زیستی مبتنی بر سلول به نام CANARY (تجزیه‌وتحلیل سلولی و اطلاع‌رسانی از خطرات و بازدهی آنتی‌ژن) که در انستیتوی فناوری ماساچوست ساخته‌شده است، عوامل بیماری‌زای نوظهور یا عوامل تهدیدکننده زیستی مربوط به بخش‌هایی مانند دفاع زیستی، کشاورزی و ایمنی غذا را شناسایی می‌کند. در داخل حسگر زیستی CANARY، سلول‌های لنفوسیت B مهندسی‌شده وجود دارد که پروتئین بیولومینسنت وابسته به کلسیم را بیان می‌کند که نام آن aequorin است که با آنتی‌بادی متصل به غشاء آنتی‌ژن خاصی جفت می‌شود. اتصال آنتی‌ژن- آنتی‌بادی یک کانال یونی کلسیم درون‌سلولی را فعال می‌کند و آکوورین نور ساطع می‌کند. فناوری CANARY برای غربالگری نمونه‌های مایع و پودر برای عوامل تهدیدکننده بیولوژیکی و سموم در سطح تجاری عرضه‌شده است. حسگر زیستی یک دستگاه مستقل و مدرن است که می‌تواند برای برنامه‌های داخلی و خارجی با حد تشخیص کمتر از ۱۰۰ CFU/ml به ترتیب در مدت ۵ دقیقه و ۲ تا ۱۵ دقیقه استفاده شود. انواع مختلف حسگرهای زیستی پیشرفته و کاربردهای آن‌ها در تشخیص عوامل جنگ زیستی و عوامل بیماری‌زا به‌طور گسترده درجاهای دیگر موردبررسی قرارگرفته است (۱۲). انواع مختلف حسگرهای زیستی مورداستفاده برای تشخیص عوامل زیست درمانی در جدول ۳ فهرست شده است.

روش‌های تشخیص مولکولی

روش‌های تشخیص مولکولی منحصراً بر پایه اسید نوکلئیک DNA/RNA عامل بیولوژیکی هستند. این روش‌ها نسبت به روش‌های تشخیص مبتنی بر آنتی‌بادی حساس‌تر هستند به‌گونه‌ای که با روش real-time PCR تنها با داشتن تعداد ۱۰ میکروارگانیسم یا کمتر امکان شناسایی وجود دارد (۱۳). محدودیت عمده PCR ناتوانی در تفکیک عوامل زنده از مرده و عوامل چندتایی (به‌طور مثال ۴-۶ تایی) است. تشخیص سطوح بالاتری از عوامل چندتایی با روش endpoint PCR و با استفاده از سیستم لومینکس وجود دارد، اما حساسیت، اختصاصی بودن و محدوده دینامیکی کمّی کاهش می‌یابد. همچنین تعدادی روش بر اساس هم‌دما و غیر هم‌دما نیز وجود دارد که در حال حاضر به‌طور گسترده‌ای، برای تکثیر ژن‌ها مورداستفاده قرار می‌گیرند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

PCR همچنان رایج‌ترین و پرکاربردترین فناوری محسوب می‌شود. مزیت اصلی این سیستم مبتنی بر اسید نوکلئیک، به دلیل ویژگی منحصربه‌فرد بودن ژنوم در موجودات زنده است. طراحی دقیق آغازگرها و کاوشگرها، تشخیص موجودات را امکان‌پذیر می‌کند. همچنین بالاترین حساسیت را به دلیل تکثیر نمایی نسخه ژنومی ارائه

می‌دهد. در طول PCR، یک قطعه کوتاه از ژنوم عامل تهدیدکننده زیستی تکثیر می‌شود و میلیون‌ها نسخه در مدت‌زمان کوتاهی به دست می‌آید. آماده‌سازی نمونه یکی از مهم‌ترین مراحل، برای تحقق سیستم‌های تکثیر اسید نوکلئیک است. نتایج PCR بسته به وجود مهارکننده‌ها در نمونه بسیار متفاوت و در صورت وجود ماتریس‌های پیچیده محیطی، نیاز به پردازش نمونه است. تغییراتی در PCRمعمولی انجام‌شده است که تشخیص هم‌زمان چندین عامل تهدیدکننده را امکان‌پذیر می‌کند. PCRهای چندتایی (multiplex PCR) هزینه و زمان را به میزان قابل‌توجهی کاهش می‌دهد (۱۴).

Real-time RT-PCR

تکنیک Real Time PCR بسیار شبیه به روشPCR است. در این تکنیک نیز همانند PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، یک توالی تکثیر می‌گردد اما تفاوت آن با PCR معمولی در سنجش کمّی توالی تکثیرشده، است. در روش Real Time PCR با به کار گرفتن یک نشانگر فلورسنت در واکنش، میزان تکثیر محصول ردیابی می‌گردد. این نشانگرهای فلورسنت به‌گونه‌ای طراحی می‌شوند که در صورت تکثیر DNA، یا اتصال آن‌ها به DNA نور تولید می‌شود بنابراین نور بیشتر برابر است با تکثیر محصول و افزایش شدت نور ثبت‌شده در دستگاه با میزان محصول به‌دست‌آمده نسبت مستقیم دارد. در RT-PCR غیراختصاصی، از یک رنگ عمومی مانند SYBR Green استفاده می‌شود که هنگام اتصال به DNA فلورسانس (نور) ساطع می‌کند. افزایش فلورسانس نشان‌دهنده هیبریداسیون کاوشگر به DNA هدف است که منجر به جداسازی فیزیکی مواد شیمیایی فلورسنت‌دار می‌شود (۱۵). برخلاف فرمت غیراختصاصی SYBR Green، سنجش‌های مبتنی بر کاوشگر از طریق استفاده از رنگ‌های مختلف فلورسنت، قابلیت چندگانه را ارائه می‌دهند. کاوشگرهای TaqMan با موفقیت برای تشخیص عوامل متعدد تهدیدات بیولوژیک ازجمله *Bacillus anthracis*، *Yersinia pestis*، *Coxiella burneti*، عوامل ویروسی Cat A ازجمله آبله، ابولا و سایر ویروس‌های هموراژیک (hemor- rhagic) استفاده می‌شود.

توالی‌یابی نسل بعدی (Next-generation sequencing; NGS)

توالی‌یابی DNA در سال ۱۹۷۷ توسط سنگر و گیلبرت معرفی شد. آن‌ها توالی DNA را با افزودن یک فسفات نوکلئوتیدی دی‌اکسید پایانی (ddNTPs) نشان‌دار شده با رنگ فلورسنت و DNA پلیمراز برای خاتمه دادن به واکنش، رمزگشایی کردند. بعدها، اسید نوکلئیک انتهایی با روش الکتروفورز مویی شناسایی و مقدار تحریک لیزر توسط دوربین CCD ثبت شد.

جدول ۳- حسگرهای زیستی برای تشخیص عوامل تهدیدات بیولوژیک

ردیف	مبدل	عامل تهدید	حد تشخیص	زمان	نمونه‌های تست‌شده
۱	حسگر زیستی الکتروشیمیایی با نانوذرات طلا	*Botulinum neurotoxin* type E	۱۰ pg/ml to ۱۰ ng/ml	۶۵ min	آب پرتقال و شیر
۲	بیوسنسور ایمپدومتریک با نانوذرات طلا	*Brucella melitensis*	۴ * ۱۰۵ CFU/ml	۱/۵ h	شیر
۳	حسگر زیستی الکتروشیمیایی با نانوذرات فلزی طلا و پالادیوم بر روی نانو ورقه های نیتریت بور	*B. anthracis* surface array proteins	۵ pg/ml to۱۰۰ ng/ml	۱ h	کشت سلولی
۴	طیف سنج رزونانس پلاسمون سطحی و امپدانس الکتروشیمیایی	*Brucella abortus*	۰/۰۵ pM	۱۰ min	کشت سلولی
۵	رزونانس پلاسمون سطحی با آنتی بادی علیه آنتی ژن F1	*Y. pestis*	۱۰۶ CFU/ml	۱ h	نمونه های محیطی
۶	رزونانس پلاسمون سطحی همراه با طیف‌سنج امپدانس الکتروشیمیایی	*Botulinum neurotoxin* A	۰/۰۴۵ fM		کشت سلولی
۷	ایمونوسنسور پیزوالکتریک همراه با میکروبالانس *F. tularensis* و آنتی ژن (QCM) کریستال کوارتز	*F. tularensis*	۵ * ۱۰۶ cells/ml	۳۵ min	کشت سلولی
۸	میکروبالانس کریستال کوارتز	staphylococcal enterotoxin A (SEA)	۰/۰۲ mg/L	۲۵ min	شیر

معایب سیستم، شامل خوانش اشتباه، تشکیل ساختارهای ثانویه DNA و محدود شدن طول کوتاه توالی‌های DNA است (۱۶). توالی‌یابی نسل بعدی افق‌های جدیدی را برای تشخیص مولکولی باز کرد، اما به دلیل نیاز به کارکنان آموزش‌دیده، مدت‌زمان طولانی و تنظیمات پیچیده، هنوز در تشخیص بالینی کاربرد محدودی دارد. از این تکنیک می‌توان برای تشخیص هموپلیمر یا توالی‌های تکراری استفاده کرد. از NGS برای شناسایی ژنوم‌های بیماری‌زا، جهش‌های ژنتیکی، الگوهای مقاومت دارویی و کشف پاتوژن جدید استفاده می‌شود. کاربرد NGS برای آنالیز کامل ژنوم، ترنسکریپتوم، توالی کل exome و توالی‌های متیله شده و یا توالی ژن کاندید است. یکی دیگر از کاربردهای مهم NGS شامل تعیین توالی متاژنومی است که میکروارگانیسم‌های متعدد را در نمونه‌های همگن یا ناهمگن به‌طور هم‌زمان تشخیص می‌دهد حتی اگر مقدار میکروارگانیسم‌ها خیلی کم باشد. علاوه بر این، NGS را می‌توان برای میکروارگانیسم‌های غیرقابل کشت نیز استفاده کرد. نسل بعدی NGS نوید پتانسیل بالایی برای توسعه داروهای اختصاصی و ساخت کتابخانه‌های cDNA می‌دهد (۱۷).

ریزآرایه (Microarray)

فناوری ریزآرایه در سال ۱۹۹۵، هنگامی‌که دو محقق از cDNA به‌عنوان یک کاوشگر برای تعیین الگوی بیان ژن در *Arabidopsis* استفاده می‌کردند، ابداع شد. ریزآرایه‌ها دستگاه‌های آزمایشگاهی هستند که روی تراشه میناتوری از جنس شیشه یا سیلیکون ساخته‌شده‌اند و حاوی ۲۵ تا ۷۰ کاوشگر الیگونوکلئوتیدی هستند که از طریق رسوب مکانیکی، چاپ جوهرافشان یا از طریق فوتولیتوگرافی روی اسلاید مشاهده می‌شوند. هر نقطه روی یک ریزتراشه حاوی چندین برابر کپی‌های اولیگونوکلئوتیدی (۱۰ نانومتر تا ۱۰۰ پی پی م DNA) است. بسته به نیاز، یک ریزآرایه ممکن است دارای چندین کاوشگر برای میکروارگانیسم‌های مختلف یا یک ژنوم کامل از یک میکروارگانیسم واحد باشد. ریزتراشه‌های تجاری Affymetrix و Illumina برای تشخیص بیش از ۲۰۰۰۰ تا چند میلیون ژن استفاده شده است. انواع مختلف ریزآرایه‌ها (پروتئین، پپتید، کربوهیدرات، چربی، بافت، فاز معکوس یا ریزآرایه‌های آنتی‌بادی) در دسترس هستند. پروتکل‌های ریزآرایه شامل مراحل آماده‌سازی نمونه، برچسب‌گذاری کاوشگرها بارنگ‌های فلورسنت، هیبریداسیون نمونه روی تراشه، شستشو و به دست آوردن تصویر، نرمال‌سازی داده‌ها، تجزیه‌وتحلیل و تفسیر است. در تحقیقی، میکرو آرایه چند طیفی با طیف وسیع (TessArray® RPM-TEI 1.0, TessArae LLC, Potomac Falls, VA)، ۸۴ عامل بیماری‌زا و ۱۳ سم، از گروه پاتوژن‌های A، B و C با حد تشخیص ۱۰۴ در هر آزمایش، تشخیص و از یکدیگر تفکیک نمود. این آزمایش‌ها بسیار حساس هستند و می‌توانند بین EBOV، ویروس ماچوپو و ویروس Lassa تمایز قائل شوند. یک آرایه نیز برای شناسایی ویروس‌ها به نام ViroChip ساخته‌شده است. کاوشگرهای الیگونوکلئوتیدی ۷۰تایی (70-mer oligonucleotide)، مناطق حفاظت‌شده (۱۶۰۰ کاوشگر) از ۱۴۰ ژنوم ویروسی را تشخیص می‌دهند و می‌توانند برای تشخیص ویروس‌هایی نظیر تب‌خال انسانی ۸، ویروس سینسیتیال تنفسی انسان، ویروس پاراآنفلوانزا نوع ۳، آدنوویروس‌ها و سروتیپ‌های رینوویروس‌ها استفاده شوند (۱۸).

در طول شیوع SARS در سال ۲۰۰۳، از ریزتراشه DNA برای شناسایی و تعیین توالی کرونا ویروس جداشده از بیماران SARS استفاده شد. نسخه‌های جدید و به‌روز ViroChipمی‌توانند ویروس‌های ۵۳ خانواده و ۲۱۴ جنس را با استفاده از ژنوم‌های کامل ویروسی تشخیص دهند. علاوه بر این، ViroChipبرای تشخیص عفونت حاد دستگاه تنفسی در کودکان نیز استفاده شد. به‌طور مشابه، آرایه دیگری به نام GreeneChipPm برای تشخیص سریع باکتری‌ها در نمونه‌های مختلف تولیدشده است. این پلتفرم شامل الیگونوکلئوتیدهای خالص (۲۹۴۹۵) از پایگاه داده GreeneChipVr v1.0است و برای تشخیص پاتوژن‌های باکتریایی، قارچی و تک‌یاخته‌ای، ۱۱۴۷۹ rRNA 16s و توالی rRNA 18s استفاده‌شده است. همچنین ریزآرایه الیگونوکلئوتیدی با چگالی پایین می‌تواند ویروس‌های نوروتروپیک (منتژیت و انسفالیت) را از نمونه‌های مایع مغزی نخاعی و مایع غیر مغزی نخاعی تشخیص دهد. همچنین امکان تشخیص اکوویروس‌ها، ویروس تب‌خال انسانی (HHV-2, -4, -5, -6BA,-6B, and -7)، ویروس هندی *Vesicular stomatitis* و polyoma- virus JC1 (۱۹) وجود دارد. در شیر و نمونه‌های مختلف دیگر موفقیت ریزآرایه به حساسیت سیستم برای تشخیص عوامل بیماری‌زا در یک نمونه بستگی دارد.

تکثیر هم‌دما

تکثیر هم‌دما یک تکنیک قوی برای تکثیر نمایی اسیدهای نوکلئیک در دمای واحد است. این تکنیک برای تکثیر یک توالی مشخص بدون نیاز به ترموسیکلر (Thermocycler) است، درنتیجه هزینه تجهیزات را کاهش داده و به‌راحتی برای پلتفرم‌های POC (point-of-care) قابل‌استفاده است. مراحل پردازش در تکثیر هم‌دما را می‌توان به سه دسته تقسیم کرد: (۱) تکثیر توالی مشخص، (۲) ذوب دوطرفه آنزیمی و اتصال آغازگر و (۳) جابجایی رشته با استفاده از چندین آغازگر PCR و یا جابجایی رشته با استفاده از یک جفت «آغازگر حلقه‌ای» اضافی که می‌تواند منجر به تسریع در واکنش شود (۲۰).

میکروسیالات (Microfluidics)

فناوری میکروسیالی یکی از فناوری‌های نوین است که توانسته است با بهره‌گیری از خواص ویژه‌ی سیالات در مقیاس میکرو و نانولیتر، کاربردهای گسترده‌ای را به خود اختصاص دهد. یک دستگاه میکروسیالی، تراشه‌ای از جنس سیلیکون، شیشه یا الاستومر است که لوله‌هایی با ابعاد میکرونی در آن تعبیه‌شده و سیالات درون این لوله‌ها جریان پیدا می‌کنند. بر اساس نیاز می‌توان تراشه‌هایی طراحی کرد که عملیات موردنظر در آزمایش‌های معمول زیستی و پزشکی را در ابعاد کوچک انجام دهد. اصل اساسی در فناوری میکروسیال ایجاد یک جریان آرام بین کانال‌ها است. جریان سیال را می‌توان با پمپ‌های فشار مانند پمپ‌های سرنگ یا پمپ‌های الکتروکینتیک تنظیم کرد. پمپ‌های الکتروکینتیک، الکترواسمز را از طریق دیواره‌ها ایجاد می‌کنند تا فشار و جریان سیال را ایجاد کنند. میکروسیالات کاربردهای متعددی در زمینه زیست‌شناسی مولکولی، سینتیک آنزیم‌ها، الکتروفورز مویرگی، سنجش ایمنی، فلوسایتومتری، دست‌کاری سلولی، تقویتPCR ، تجزیه‌وتحلیل DNA و تشخیص بالینی ارائه می‌دهند. تراشه‌های میکروسیالی نیاز به مقادیر کمی از نمونه و معرف در مجاری خود برای جداسازی آسان، تشخیص و تجزیه‌وتحلیل داده‌ها دارند. به دلیل کوچک‌سازی سیستم، قابل‌حمل است، هزینه را کاهش می‌دهد و نیازی به نیروی ماهر ندارد؛ بنابراین، میکروسیالات می‌توانند طیف وسیعی از نیازهای آزمایشگاهی را در یک تراشه واحد ارائه دهند و می‌توانند به‌عنوان دستگاه POC در تنظیمات بالینی مورداستفاده قرار گیرند. پلتفرم سری BV M (BioVeris Corp. Gaithersburg, MD) آنتی‌ژن را از طریق الکتروشیمیایی و ELISA تشخیص می‌دهد. این دستگاه قادر به تشخیص *E. coli* (O157)، *S. Typhimurium* *Yersinia* sp. و سموم است. تراشه‌های میکروسیالی با استفاده از شیشه، سیلیکون یا پلی دی متیل سیلوکسان طراحی‌شده‌اند که با مقادیر کمی از نمونه و معرف، تشخیص و تجزیه‌وتحلیل داده‌ها را انجام می‌دهد. به دلیل کوچک بودن سیستم، قابل‌حمل است و از مزایای دیگر آن کاهش هزینه و عدم نیاز به نیروی ماهر است. بنابراین، میکروسیالات می‌توانند طیف وسیعی از نیازهای آزمایشگاهی را در یک تراشه واحد ارائه دهند و می‌توانند به‌عنوان دستگاه POC در تنظیمات بالینی مورداستفاده قرار گیرند. پلتفرم میکروسیالی می‌تواند با روش‌هایی مانند PCR، تکثیر ایزوترمال و ریزآرایه‌ها ادغام‌شده و به‌سرعت عوامل بیماری‌زا را تشخیص دهد (۲۱).

نتیجه‌گیری

در عصر حاضر تکنیک‌های مولکولی نقشی بزرگ در تشخیص تهدیدات بیولوژیک ایفا نموده‌اند و کیت‌ها و دستگاه‌های مختلفی برای تشخیص سریع تعدادی از عوامل تهدید بیولوژیک و تقویت برنامه آمادگی دفاع زیستی در سطح تجاری تولیدشده است که دارای تأییدیه سازمان غذا و داروی آمریکا نیز هستند. همچنین تکنیک‌های مختلفی مانند ریزآرایه‌ها نیز می‌توانند انقلابی در تشخیص عوامل تهدیدات زیستی ایجاد کنند، اما وقت‌گیر بوده و مقدار زیادی داده تولید می‌کنند که برای تفسیر به کارکنان ماهر نیاز دارد؛ بنابراین، دستگاه‌ها یا پلتفرم‌هایی باید طراحی شوند که علاوه بر قدرت تشخیص، طیف وسیعی از عوامل تهدیدکننده را پوشش داده، ساده، کاربرپسند، کم‌هزینه، کم جا و قابل‌استفاده در برنامه‌های مختلف نظارتی باشند. توسعه فناوری‌های بومی برای تشخیص عوامل تهدید بیولوژیک در آب، دام، انسان، غذا، دارو و محیط‌زیست از مهم‌ترین گام‌های ارتقای سطح امنیت ملی است که برای دستیابی به این هدف، تقویت و حمایت از تحقیقات در حوزه تشخیص تهدیدات زیستی، شناسایی و مهندسی فناوری‌های برتر دنیا در کشور ضروری است.

منابع

1- Prockop, L.D., 2006. Weapons of mass destruction: overview of the CBRNEs (chemical, bio- logical, radiological, nuclear, and explosives). J. Neurol. Sci. 249, 4–50.

2- Shariat, A., 2021. The role of passive defense against agroterrorism attacks in the field of natural resources (case study of fungal agents). Passive Defense Quarterly 13(1):65-77 [Farsi].

3- Karami, A., 2012. Passive Defense in New Warfare, Impact of Novel Technologies. Journal of nurse and physician whithin war, 37, 22-42.

4- Huang, Y., Wei, H., Shi, Y.Z., Raoul, H., Yuan, Z., 2012. Rapid detection of filoviruses by real-time TaqMan polymerase chain reaction assays. Virol. Sin. 27, 273–812.

5- Cox, C.R., Jensen, K.R., Mondesire, R.R., Voorhees, K.J., 2015. Rapid detection of Bacillus anthracis by γ phage amplification and lateral flow immunochromatography. J. Microbiol. Methods 118, 6–51.

6- Environics Oy., 2018. ENVI assay system; biodefence tests. Environics Oy. https://www. environics.fi/product/envi-assay-system/. Accessed 20 Jun 2018.

7- Bravata, D.M., Sundaram, V., McDonald, K.M., Smith, W.M., Szeto, H., Schleinitz, M.D., Owens, D.K., 2004. Evaluating detection and diagnostic decision support systems for bio-terrorism response. Emerg. Infect. Dis. (1), 100–108.

8- Pal, V., Sharma, M.K., Sharma, S.K., Goel, A.K., 2016. Biological warfare agents and their detection and monitoring techniques. Def Sci J. 66:13.

9- McHugh, S., Burnell, S., Shenhav, S., Svarovsky, S., Manneh, V., 2010. Novel time resolved fluorescence platform for near patient diagnostics. Oak Ridge Conference, Capturing Innovation: The Impact of Emerging Diagnostic Technologies; April 22–23; San Jose, CA.

10- Sin, M.L.Y., Mach, K.E., Wong, P.K., Liao, J.C., 2014. Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases. Expert Rev Mol Diagn, 14:225–44.

11- Pardee, K., Green, A.A., Ferrante, T., Cameron, D.E., DaleyKeyser, A., Yin, P., Collins, J.J., 2014. Paper-based synthetic gene networks. Cell, 159:940–54.

12- Vidic, J., Manzano, M., Chang, C.M., Jaffrezic-Renault, N., 2018. Advanced biosensors for detection of pathogens related to livestock and poultry. Vet Res, 48:11.

13- Drosten, C., Göttig, S., Schilling, S., Asper, M., Panning, M., Schmitz, H., Günther, S., 2002. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and viruses, Lassa virus, Crimean- Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. J. Clin. Microbiol. (7), 2323–2330.

14- Mourya, D.T., Yadav, P.D., Mehla, R., Barde, P.V., Yergolkar, P.N., Kumar, S.R., 2012. Diagnosis of Kyasanur forest disease by nested RT-PCR, real-time RT-PCR and IgM cap- ture ELISA. J. Virol. Methods (2), 49–54.

15- Shariat, A., Karimzadeh, G., Assareh, M.H., Hadian, J., 2018. Metabolite profiling and molecular responses in a drought-tolerant savory, *Satureja rechingeri* exposed to water deficit. 3 Biotech, 8(11), 477.

16- Barzon, L., Lavezzo, E., Militello, V., Toppo, S., Palu, G., 2011. Applications of next-generation sequenc- ing technologies to diagnostic virology. Int J Mol Sci, 12:7861–84.

17- Kuroda, M., Sekizuka, T., Shinya, F., Takeuchi, F., Kanno, T., Sata, T., Asano, S., 2012. Detection of a possible bioterrorism agent, Francisella sp., in a clinical specimen by use of next-generation direct DNA sequencing. J Clin Microbiol, 50:1810–2.

18- Wang, C.H., Lien, K.Y., Wu, J.J., Lee, G.B., 2011. A magnetic bead-based assay for the rapid detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by using a microfluidic system with integrated loop-mediated isothermal amplification. Lab Chip, 11:1521–31.

19- Boriskin, Y.S., Rice, P.S., Stabler, R.A., Hinds, J., Al-Ghusein, H., Vass, K., Butcher, P.D., 2004. DNA microarrays for virus detection in cases of central nervous system infection. J Clin Microbiol. 42:5811–8.

20- Compton, J., 1991. Nucleic acid sequence-based amplification. Nature, 350:91–2.

21- Ong, S.E., Zhang, S., Du, H., Fu, Y., 2008. Fundamental principles and applications of microfluidic systems. Front Biosci, 13:2757–73.

Development of Sensor Technologies and Molecular Techniques for Detecting Biothreat Agents

Shariat A.

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

Abstract

In an age where the world is more complex and unpredictable than ever before, and environmental pollution, climate change, population growth, and war are on the rise, biothreats are considered a serious threat to the health of communities. The main step in dealing with such threats is early detection. The methods used in this field are mainly divided into three groups: genetic techniques, immunological, or a combination of two techniques (immunogenetic). There are also techniques based on the physicochemical properties of the analytes. Each of these assays can be performed by conventional methods (such as classical PCR, real-time PCR, or simple antigen-antibody reactions) or modern technologies (such as gene probes, microarray technology, gene chips, biosensors, aptamers, phosphors). There are also integrated and automated diagnostic systems that combine different methods to enable sampling, easy extraction of genetic material, and rapid analysis and detection of analytes using genetic and immunological techniques. The results of this study showed that among the existing devices for detecting biothreat agents, those molecular methods that have field and operational applications with high accuracy and speed have the priority for detecting biothreat agents and play an effective role in passive defense.

Keywords: Biothreat, Biosensor, Diagnostic, Imonology, Microarrey

معرفی ترکیب نشانگرهای مولکولی جدید در تعیین جنسیت ماهیان خاویاری به منظور تشخیص جنسیت در سنین مختلف

امید جعفری[1*]، حامد پاکنژاد[2] و مریم نصراله پورمقدم[3]

[1] **ایران، رشت، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری**

[2] **ایران، گرگان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده شیلات و محیط زیست**

[3] **ایران، کرج، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۱۲

چکیده

تعیین جنسیت ماهیان خاویاری یکی از مهم‌ترین و جذاب‌ترین موضوعات پیش روی محققین شیلاتی و همچنین آبزی‌پروران این حوزه بوده است. تعیین جنسیت مولکولی این ماهیان با استفاده از روش‌های سنتی مرسوم تا کنون نتایج مثبتی را در بر نداشته است در صورتیکه با بوجود آمدن تکنیک‌های جدید توالی یابی موسوم به (NGS) Next generation sequencing، امکان ردیابی و کشف نواحی ژنومی تمایز دهنده جنسیت فراهم گردیده است. پیش از این در دو مطالعه پیشین با استفاده از روش توالی یابی کل ژنوم، نواحی ژنتیکی مرتبط با جنسیت را شناسایی شده و سیستم تعیین جنسیت ZZ/ZW را در این ماهیان مورد تأیید قرار داده شده است. وجود توالی‌های مختلف اختصاصی تعیین جنسیت در ماهیان خاویاری بیانگر وجود نواحی ژنومی متفاوت اختصاصی تعیین جنسیت در گونه‌های ماهیان خاویاری است. مطالعه حاضر ضمن مروری بر تحقیقات انجام شده روی تعیین جنسیت ماهیان خاویاری، فهرست نشانگرهای قابل استفاده در تعیین جنسیت گونه‌های مختلف این ماهیان را جهت استفاده بهره‌برداران و ارتقای صنعت آبزی‌پروری ماهیان خاویاری در اختیار قرار می‌دهد. همچنین با توجه به نتایج دقیق و صحت بالای آزمایشات مولکولی و از سویی عدم آسیب رسانی به ماهی هنگام نمونه برداری، پیشنهاد می‌گردد از نشانگرهای ژنتیکی عمومی AllWsex2 و SM4 در تشخیص جنسیت این ماهیان به عنوان روش جدید و جایگزین روش‌های مرسوم مانند اولتراسونوگرافی و لاپراسکوپی، استفاده گردد.

کلیدواژگان: تعیین جنسیت، ژنومیکس کاربردی، کروموزوم جنسی، ماهیان خاویاری، نشانگر مولکولی.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: Jaafari.omid@yahoo.com

مقدمه

تعیین جنسیت در گیاهان و جانوران عموماً به دو دسته تعیین جنسیت ژنتیکی (سیستم های XY و ZW) و یا تعیین جنسیت محیطی (مانند تعیین جنسیت وابسته به دما) تقسیم‌بندی شده و مکانیزم‌های مولکولی مؤثر بر این دو نوع سیستم تعیین جنسیت به شدت متغیر بوده و مانع از مطالعات تکاملی تعیین جنسیت می‌شود (۱، ۱۴، ۱۸). درک و شناخت مبنای ژنتیکی تعیین جنسیت بطور کلی نیازمند شناخت کروموزوم‌های جنسی، نواحی تعیین کننده جنسیت و یا ژن‌های کلیدی تعیین کننده جنسیت است. با این حال، در ارگانیسم‌های با ژنوم‌های پیچیده و نواحی محافظت شده کوچک و یا کم در کروموزوم‌های جنسی، کشف و معرفی نواحی مرتبط با جنسیت با روش‌هایی مانند RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)، RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)، AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) و SSR (Simple Sequence Repeats) می‌تواند بسیار مشکل باشد، چرا که برخی از این روش‌های قدیمی برای شناسایی چند شکلی‌های DNA وابسته به اندونوکلئازهای محدود کننده کمی هستند که اطلاعات محدودی از نواحی ژنومی فراهم می‌آورند (۲۰).

ماهیان خاویاری (*Acipenseridae*) گونه‌های پلی‌پلوئیدی هستند که تحت فرایندهای کاهشی عملکردی کپی ژنوم

قرار دارند (۷، ۱۶، ۲۶). در حال حاضر مطالعات سیتوژنتیکی هیچ گونه وجود کروموزوم هتروموروفیک جنسی را در ماهیان خاویاری نشان نداده است (۱۰). همچنین هیچ گونه نشانگر DNA و یا توالی اختصاصی جنسیت با استفاده از روش‌های AFLP، RAPD، ISSR و یا روش‌های جدیدتر مانند RAD-seq در بسیاری از ماهیان خاویاری مانند تاس ماهی سیبری (*Acipenser baeri*)، تاس‌ماهی آدریاتیک (*Acipenser naccarii*)، چالباش(*Acipenser gueldenstaedtii*)، استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) (۴، ۲۳)، فیل‌ماهی (*Huso huso*) (۱۱)، تاس‌ماهی دریاچه‌ای (*Acipenser fulvescens*) (۱۷)، قره برون (*Acipenser persicus*) (۲۵)، تاس‌ماهی آمور (*Acipenser schrenckii*) (۲۴) و چینی (*Acipenser sinensis*) (۱۵) شناسایی نشده است. با این حال سیستم تعیین جنسیت ژنتیکی هتروگامتی (ZW/ZZ) در تاس‌ماهی سفید (*Acipenser transmontanus*) (۲۱)، بستر (*H. huso* ♀ × *A. ruthenus* ♂) (۱۹)، تاس‌ماهی دماغ کوتاه (*Acipenser brevirostrum*) (۶)، تاس ماهی سیبری (*Acipenser baerii*) (۸) و شیپ (*Acipenser nudiventris*) (۹) بر اساس ماده-زایی میتوزی گزارش گردیدشده است. بنابراین، این نتایج پیشنهاد کردند که باید برخی تغییرات DNA و یا قطعات کروموزومی بین جنس نر و ماده به لحاظ تئوری وجود داشته باشد. با شتاب سریع در علم ژنومیکس مقایسه‌ای هم اکنون تشخیص نواحی مرتبط با جنسیت در گونه‌های غیر مدل با ژنوم پیچیده بیش از پیش می‌تواند با استفاده از داده‌های ژنومی ردیابی و شناسایی شود.

علاوه بر این، به دلیل عدم وجود نشانه ثانویه جنسی قبل از بلوغ، جنسیت ماهیان خاویاری نمی‌تواند بطور مستقیم به‌وسیله ظاهر و شکل ماهی تشخیص داده شود و در نتیجه برخی روش‌ها مانند اولتراسونیک (۳)، اندوسکوپی (۲۲)، سطوح هورمون های استروئیدی (۵) و تکنیک‌های جراحی (۲) به منظور تشخیص جنسیت ایجاد شدند. با این حال، توسعه یک روش ساده، قابل اعتماد و بدون آسیب مانند روش‌های مولکولی برای تعیین جنسیت ماهیان خاویاری به منظور مدیریت تکثیر این ماهیان کماکان دارای اهمیت است. بنابراین ایجاد روش‌های ژنتیکی جدید به منظور تعیین جنسیت ماهیان خاویاری با همه سختی‌های ناشی از پلوئیدی بودن ژنوم کاملا احساس می‌شود (۴، ۱۲).

امروزه با تکیه بر پیشرفت‌های چشمگیر در علوم ژنومیکس و توالی یابی، امکان توالی یابی ژنوم همه موجودات مدل و غیر مدل فراهم گردیده است. این موضوع زمینه را بیش از گذشته جهت پیدا کردن نشانگرهای اختصاصی و اقتصادی در آبزیان نیز در اختیار محققین قرار داده است؛ به طوری که اخیرا طی دو پروژه مجزا با استفاده از داده‌های حاصل از توالی یابی کل ژنوم، نواحی ژنومی اختصاصی مرتبط با جنسیت در ماهیان خاویاری شناسایی و معرفی شدند. Kuhl و همکاران (۲۰۲۱) در مقاله خود ناحیه ژنتیکی مرتبط با جنسیت را در شش گونه از ماهیان خاویاری شامل فیل‌ماهی، چالباش، تاس‌ماهی سیبری، *Acipenser stuiro*، *Acipenser oxyrinchus* و استرلیاد معرفی کردند (۱۳). این قطعه دارای طولی حدود ۱۰۰ جفت باز بوده و با موفقیت نیز تمایز جنسیت را در شش گونه ذکر شده انجام داده و همچنین وراثت پذیری آن مورد تأیید قرار گرفت. مقاله دیگری که اخیرا در کشور چین نیز بروی هشت گونه از ماهیان خاویاری و یک هیبرید انجام پذیرفت، شش جفت نشانگر حاصل از توالی یابی کل ژنوم را به عنوان نشانگرهای کاندید در تعیین جنسیت معرفی نمودند که از بین این شش جفت نشانگر، دو جفت SM4 و SM6 به عنوان نشانگرهای عمومی (universal) معرفی گردید (۲۰). گونه های مورد مطالعه در مقاله اخیر شامل فیل ماهی، تاس‌ماهی سیبری، چالباش، اوزون برون، استرلیاد، تاس ماهی چینی، تاس‌ماهی یانگتسه و هیبرید (*Acipenser baerii*♀ × *Acipenser schrenckii*♂) بود. توالی نشانگرهای اختصاصی موجود در تعیین جنسیت ماهیان خاویاری در جدول ۱ ارایه گردیده است. از اینرو مقاله حاضر با هدف معرفی و ترویج نشانگرهای ژنتیکی قابل استفاده در تعیین جنسیت ماهیان خاویاری به تحریر درآمده است.

مراحل اجرایی تعیین جنسیت مولکولی

اولین مرحله در تعیین جنسیت ماهیان خاویاری به روش مولکولی استخراج DNA ژنومی با کمیت و کیفیت مناسب می‌باشد. به منظور استخراج DNA ژنومی می‌توان از کیت-های استخراج DNA و یا روش‌هایی مانند روش فنول-کلرفرم استفاده کرد. از اینرو ابتدا مقدار کمی بافت باله ماهی را جدا کرده و در اتانول مطلق فیکس می‌گردد. سپس از روش فنول-کلرفرم به منظور استخراج DNA ژنومی

استفاده می‌شود. پس از آنکه DNA استخراج شد، با استفاده از دستگاه نانودراپ و همچنین ژل آگارز ۱ درصد کمیت و کیفیت DNAهای استخراجی مورد بررسی قرار می‌گیرد.

جدول ۱- لیست نشانگرهای اختصاصی در تعیین جنسیت برخی از گونه‌های ماهیان خاویاری (۱۳، ۲۰)

نام نشانگر	توالی پرایمر	دمای نقطه اتصال (°C)	طول قطعه تولیدی (bp)	گونه	کروموزوم و یا کد کانتیگ (Contig ID)
SSM1	F: ATAACATAGTTCATTAATAATGCCT R: CGCCAACAGTGAATACGTT	56	204	*Acipenser schrenckii*	C10735
SSM2	F: GCCATAACTGTACATATATAGAAC R: CTTTCGATTATGCCGGACA	54	261	*Acipenser schrenckii*	C10907
SSM3	F: TGTGGATCACTCCCAGCAACTCA R: CCAGCACTGTGTTTGTTAACTGCAT	58	158	*Acipenser schrenckii*	C11103
SSM4	F: TCGGTATCTTAAACTGAACCAA R: AGATGGAGAATTCATTGCCTA	56	415	*Acipenser schrenckii, Acipenser sinensis, Acipenser dabryanus, Acipenser baerii, Acipenser gueldenstaedtii, Acipenser ruthenus, Acipenser stellatus, Huso huso*	C11427
SSM5	F: TACCCTTGTAAAGTTTGCCT R: GGCACCTCCTTATATACCCAA	54	199	*Acipenser schrenckii*	C12175
SSM6	F: TAATCAATTGTAAGTCGCCAAG R: ATTTTATTACGGTGAGTATACGAA	52	917	*Acipenser schrenckii, Acipenser sinensis, Acipenser dabryanus, Acipenser baerii, Acipenser gueldenstaedtii, Acipenser stellatus, Huso dauricus,*	C12265
AllWSex2	F: TGATCAACCTCTTCAGCAATGTC R: TGAGAGCCACTGTACTAACACA	56	100	*Huso huso, Acipenser ruthenus, Acipenser sturio, Acipenser oxyrinchus, Acipenser baerii, Acipenser gueldenstaedtii*	Chr 4

دومین مرحله از مراحل تشخیص جنسیت مولکولی ماهیان خاویاری انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از نشانگر معرفی شده می‌باشد. شرایط واکنش زنجیره ای پلیمراز با در نظر گرفتن ۲۵ میکرولیتر حجم واکنش بصورت زیر می‌باشد: ۳۰ الی ۱۰۰ نانوگرم DNA، 10x PCR buffer به میزان ۲/۵ میکرولیتر، DNTP (10 mμ) به میزان ۱ میکرولیتر، پرایمرهای رفت و برگشت هر کدام به میزان ۱ میکرولیتر (10 mμ)، آنزیم Tag DNA polymerase به میزان ۰/۲ میکرولیتر و آب مقطر دوبار تقطیر تا رسیدن به حجم ۲۵ میکرولیتر. مراحل انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بصورت واسرشت سازی (Denaturation) اولیه در دمای ۹۵ دجه سلسیوس به مدت ۳ الی ۵ دقیقه، سپس ۲۵ تا ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، اتصال دو رشته DNA بر اساس دمای بهینه (جدول ۱) به مدت ۳۰ ثانیه و بسط اولیه به مدت ۴۰ ثانیه و در نهایت پس از اتمام چرخه‌ها مرحله بسط نهایی به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد می‌باشد.

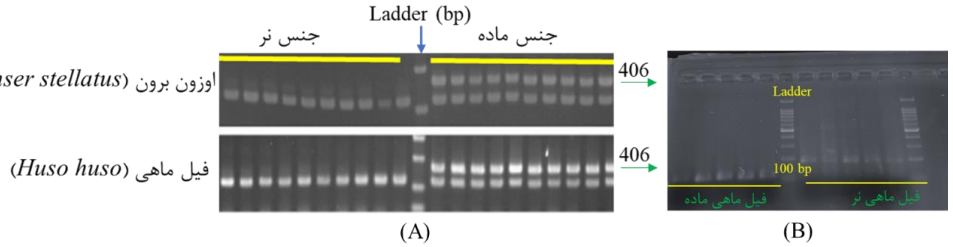
نتایج تعیین جنسیت بر روی ژل آگارز ۱ درصد

به منظور مصورسازی محصول PCR و تشخیص جنسیت نمونه‌های مورد بررسی از ژل آگارز ۱/۵ درصد و با استفاده از روش PCR معمولی استفاده می‌گردد. بر این اساس در نمونه‌های ماده باند DNA بطور مشخص در دامنه وزنی ذکر شده در جدول ۱ تشکیل می گردد و در جنس نر هیچ گونه باند DNA در محدوده مد نظر وجود ندارد (شکل ۱). همانگونه که در شکل ۱ (A) نشان داده شده است جنس ماده فیل ماهی و اوزون برون در دامنه وزنی ۴۰۰ جفت باز (bp) دارای باند واضح بوده درصورتیکه با استفاده از نشانگر AllWSex2 (شکل B) بانده اختصاصی جنس ماده فیل‌ماهی در محدوده ۱۰۰ جفت باز تشکیل شده است.

جمع بندی و ارایه راهکار ترویجی و پژوهشی

تعیین جنسیت ماهیان خاویاری یکی از مهم‌ترین چالش-های پیش روی آبزی‌پروران برای مدت طولانی بوده است چراکه تعیین جنسیت این ماهیان زمان‌بر بوده و در شرایط پرورشی بین ۲ تا ۳ سال زمان نیاز دارد. عمده پرورش دهندگان به دلیل ارزش ذاتی بالای خاویار، تمایل به پرورش جنس ماده این ماهیان دارند در حالیکه عدم اطلاع از جنسیت این ماهیان هزینه‌های هنگفتی را جهت نگهداری و تغذیه این ماهیان بر پرورش دهندگان تحمیل می‌نماید.

از آنجاییکه تعیین جنسیت ماهیان خاویاری به روش‌های سنتی و عمدتا تهاجمی در کشور انجام می‌پذیرد، پیشنهاد می‌شود از روش‌های غیر تهاجمی، آسان و قابل اعتماد مولکولی در این خصوص استفاده شود. از سویی جنسیت این ماهیان در طول زمان ثابت است لذا با تعیین جنسیت این ماهیان در سنین کمتر می‌توان از هدر رفت سرمایه جلوگیری و با تدوین استراتژی‌های مدیریتی و تغذیه‌ای در تولید خاویار با کیفیت بیشتر و سایز بالاتر اقدام نمود. شکل‌گیری مزارع اختصاصی پرورش گوشتی ماهیان خاویاری را می‌توان به عنوان یکی دیگر از مزایای تعیین جنسیت زودهنگام این ماهیان اشاره کرد که اثرات اقتصادی مربوط به خود را نیز در پی دارد. از بین هفت جفت نشانگر مولکولی معرفی شده در این مقاله، نشانگر AllWSex2 و SM4 از خاصیت عمومیت پذیری بیشتری برخوردار بوده و به خصوص در گونه فیل ماهی که به عنوان گونه اصلی ماهی خاویاری پرورشی در ایران می-باشد، پیشنهاد می‌گردد جهت اطمینان کامل از ترکیب هر دو نشانگر ذکر شده در تعیین جنسیت این ماهیان استفاده گردد. کاربرد سواب‌های پنبه‌ای پوستی به جای برش قسمتی از باله به عنوان منبعی از DNA ماهی در آینده می-تواند حتی میزان استرس را در تعیین جنسیت مولکولی ماهیان خاویاری بیش از پیش کاهش دهد. این روش همچنین با کاهش زمان و تلاش مورد نیاز برای پرورش ماهیان به منظور مولدسازی در برنامه‌های فیلدی (ex-situ)، باعث کاهش هزیه‌ها و ارتقای انتخاب مولدین بانک ژن زنده نه تنها بر اساس آلل های نادر بلکه بر اساس جنسیت می‌گردد. در این حالت، ماهی‌هایی که برای ایجاد مولدین انتخاب نشده‌اند، می‌توانند در سن پایین و در چارچوب برنامه‌های بازسازی رهاسازی شوند. از آنجاییکه در حال حاضر تجهیزات مولکولی در مزارع تکثیر و پرورش ماهیان در کشور وجود ندارد، لذا آینده پژوهشی در خصوص کشف متابولیت‌های اولیه و یا ثانویه تولیدی توسط مکان-های ژنتیکی مربوط به جنسیت می‌تواند باعث تولید کیت-های اختصاصی تعیین جنسیت در ماهیان خاویاری شود که به راحتی توسط مزرعه داران و بدون نیاز به تجهیزات خاصی قابل استفاده باشد. همچنین نشانگرهای ژنتیکی اختصاصی کشف شده در جنس ماده ماهیان خاویاری می-توانند نقش مهمی را در مطالعه تکامل کروموزوم جنسی و فرایندهای تعیین جنسیت و حفاظت بیولوژیکی این ماهیان ایفا کند. نسبت جنسیت جمعیت از اهمیت بالایی در جوامع اکولوژیست و حافظان محیط زیست برخوردار است، چراکه تغییرات نسبت جنسیت در جمعیت‌های وحشی دارای اثرات قابل توجهی در سازگاری، پویایی جمعیت و حفاظت تنوع زیستی دارد. پایش نسبت جنسی بطور ویژه از اهمیت بالایی در ارزیابی و مدیریت جمعیت-های وحشی ماهیان خاویاری که علیرغم ممنوعیت صید همچنان سایز جمعیت خود را احیا نکرده‌اند، برخوردار است. از اینرو نواحی ژنومیکی مربوط به جنسیت می‌توانند از کارایی بالایی در مباحث آبزی‌پروری و همچنین ارزیابی و مدیریت ذخایر ماهیان خاویاری برخوردار باشند.



شکل ۱- شناسایی جنس ماده در فیل ماهی و اوزون برون با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی اختصاصی تعیین جنسیت (شکل A: نشانگر SM4 در اوزون برون و فیل ماهی؛ شکل B: نشانگر AllWSex2 در فیل ماهی)

منابع

1. Bachtrog, D., Mank, J.E., Peichel, C.L., Kirkpatrick, M., Otto, S.P., Ashman, T.L., Hahn, M.W., Kitano, J., Mayrose, I., Ming, R. and Perrin, N., 2014. Sex determination: why so many ways of doing it? PLoS Biol. 12(7): p.e1001899. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001899.

2. Chen, X.H., Wei, Q.W., Zhu, Y.J., Yang, D.G., Luo, G. and Liu, Y., 2004. Surgical techniques of sex determination in young *Acipenser sinensis*. Shuichan Xuebao. 11(4): 371-374.

3. Du, H., Zhang, X., Leng, X., Zhang, S., Luo, J., Liu, Z., Qiao, X., Kynard, B. and Wei, Q., 2017. Gender and gonadal maturity stage identification of captive Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*, using ultrasound imagery and sex steroids. Gen. Comp. Endocrinol. 245: 36-43. DOI: 10.1016/j.ygcen.2016.08.004.

4. Du, K., Stöck, M., Kneitz, S., Klopp, C., Woltering, J.M., Adolfi, M.C., Feron, R., Prokopov, D., Makunin, A., Kichigin, I. and Schmidt, C., 2020. The sterlet sturgeon genome sequence and the mechanisms of segmental rediploidization. Nat. Ecol. Evol. 4(6): 841-852. https://doi.org/10.1038/s41559-020-1166-x.

5. Feist, G., Van Eenennaam, J.P., Doroshov, S.I., Schreck, C.B., Schneider, R.P. and Fitzpatrick, M.S., 2004. Early identification of sex in cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*, using plasma steroid levels. Aquaculture. 232(1-4):581-590. https://doi.org/10.1016/S0044-8486 (03)00486-1.

6. Flynn, S.R., Matsuoka, M., Reith, M., Martin-Robichaud, D.J. and Benfey, T.J., 2006. Gynogenesis and sex determination in shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* Lesuere. Aquaculture. 253(1-4): 721-727. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.09.016.

7. Fontana, F., Tagliavini, J., Congiu, L., Lanfredi, M., Chicca, M., Laurente, C. and Rossi, R., 1998. Karyotypic characterization of the great sturgeon, *Huso huso*, by multiple staining techniques and fluorescent in situ hybridization. Mar. Biol. 132(3): 495-501. https://doi.org/10.1007/s002270050415.

8. Fopp-Bayat, D., 2010. Meiotic gynogenesis revealed not homogametic female sex determination system in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt). Aquaculture. 305(1-4): 174-177. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.04.011.

9. Hassanzadeh Saber, M. and Hallajian, A., 2014. Study of sex determination system in ship sturgeon, *Acipenser nudiventris* using meiotic gynogenesis. Aquac Int. 22(1): 273-279. https://doi.org/10.1007/s10499-013-9676-z.

10. Havelka, M., Kašpar, V., Hulák, M. and Flajšhans, M., 2011. Sturgeon genetics and cytogenetics: a review related to ploidy levels and interspecific hybridization. J. Vertebr. Biol. 60(2): 93-103. https://doi.org/10.25225/fozo.v60.i2.a3.2011.

11. Keyvanshokooh, S., Pourkazemi, M. and Kalbassi, M.R., 2007. The RAPD technique failed to identify sex-specific sequences in beluga (*Huso huso*). J. Appl. Ichthyol. *23*(1): 1-2. https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00798.x.

12. Keyvanshokooh, S. and Gharaei, A., 2010. A review of sex determination and searches for sex-specific markers in sturgeon. Aquaculture research, 41(9): 1-7. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02463.x

13. Kuhl, H., Guiguen, Y., Höhne, C., Kreuz, E., Du, K., Klopp, C., Lopez-Roques, C., Yebra-Pimentel, E.S., Ciorpac, M., Gessner, J. and Holostenco, D., 2021. A 180 Myr-old female-specific genome region in sturgeon reveals the oldest known vertebrate sex determining system with undifferentiated sex chromosomes. Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B. 376(1832), p.20200089. https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0089.

14. Li, X.Y. and Gui, J.F., 2018. Diverse and variable sex determination mechanisms in vertebrates. Sci. China Life Sci. 61(12): 1503-1514. DOI: 10.1007/s11427-018-9415-7.

15. Liu, X.Q., Li, S., Xiao, K., Zhao, X., Guo, B., Chen, L. and Du, H., 2015. Screening of sex-specific markers in *Acipenser sinensis* using AFLP. Sichuan Journal of Zoology. 34(5): 714-718. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.11.012.

16. Ludwig, A., Belfiore, N.M., Pitra, C., Svirsky, V. and Jenneckens, I., 2001. Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (Acipenser, *Huso* and *Scaphirhynchus*). Genetics. 158(3): 1203-1215. DOI: 10.1093/genetics/158.3.1203.

17. McCormick, C.R., Bos, D.H. and DeWoody, J.A., 2008. Multiple molecular approaches yield no evidence for sex-determining genes in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). J. Appl. Ichthyol. 24(6): 643-645. https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2008.01156.x.

18. Mei, J. and Gui, J.F., 2015. Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish. Sci. China Life Sci. 58(2):124-136. DOI: 10.1007/s11427-014-4797-9.

19. Omoto, N., Maebayashi, M., Adachi, S., Arai, K. and Yamauchi, K., 2005. Sex ratios of triploids and gynogenetic diploids induced in the hybrid sturgeon, the bester (*Huso huso* female× *Acipenser ruthenus* male). Aquaculture. 245(1-4): 39-47. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.12.004.

20. Ruan, R., Feng, T., Li, Y., Yue, H., Ye, H., Du, H., Liu, Q., Ruan, J., Li, C. and Wei, Q., 2021.

Extensive screening of sturgeon genomes by techniques revealed no sex-specific random screening marker. Aquaculture. 258(1-4): 685-688. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.042.

24. Xiao, T.Q., Lu, C.Y., Li, C., Cheng, L., Cao, D.C. and Sun, X.W., 2014. An AFLP-based approach for the identification of sex-linked markers in Amur sturgeon *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869. J. Appl. Ichthyol. 30(6): 1282-1285. https://doi.org/10.1111/jai.12553.

25. Yarmohammadi, M., Pourkazemi, M., Chakmehdouz, F. and Kazemi, R., 2011. Comparative study of male and female gonads in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) employing DNA-AFLP and CDNA-AFLP analysis. J. Appl. Ichthyol. 27(2): 510-513. https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01661.x.

26. Zhou, L. and Gui, J., 2017. Natural and artificial polyploids in aquaculture. Aquacult. Fish. 2(3):103-111. https://doi.org/10.1016/j.aaf.2017.04.003.

Screening and identification of female-specific DNA sequences in octaploid sturgeon using comparative genomics with high-throughput sequencing. Genomics. 113(6): 4237-4244. DOI: 10.1016/j.ygeno.2021.11.012.

21. Van Eenennaam, A.L., Van Eenennaam, J.P., Medrano, J.F. and Doroshov, S.I., 1999. Brief communication. Evidence of female heterogametic genetic sex determination in white sturgeon. J. Hered. 90(1): 231-233. DOI:10.1093/jhered/90.1.231.

22. Wildhaber, M.L., Papoulias, D.M., DeLonay, A.J., Tillitt, D.E., Bryan, J.L., Annis, M.L. and Allert, J.A., 2005. Gender identification of shovelnose sturgeon using ultrasonic and endoscopic imagery and the application of the method to the pallid sturgeon. J. Fish Biol. 67(1): 114-132. https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2005.00719.x.

23. Wuertz, S., Gaillard, S., Barbisan, F., Carle, S., Congiu, L., Forlani, A., Aubert, J., Kirschbaum, F., Tosi, E., Zane, L. and Grillasca, J.P., 2006.

Report on the new set of sturgeons' sex determination molecular markers to identify sex in different age classes

Jafari O.[1*], Paknejad H.[2] and Nasrolahpourmoghadam M.[3]

[1] International Sturgeon Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Rasht, Iran

[2] Faculty of fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

[3] Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

[*]Jaafari.omid@yahoo.com

Abstract

Sex determination of sturgeons is one of the most appealing subjects towards both fisheries researchers and fish farmers. Molecular sex identification of these fishes using traditional methods have not had positive results, while due to the new advanced genome sequencing approaches known as NGS, it is now possible to detect and track the sexually divergent regions. Hence, based on the whole genome sequencing approach in two distinct studies, genomic regions harboring sex information in sturgeons were characterized and confirmed the ZZ/ZW sex-determination system in sturgeons. The presence of different sex-specific sequences in sturgeons indicates the presence of different sex-specific genomic regions for sturgeons. In the present paper, in addition to review the conducted studies on sturgeon's sex identification, an applicable list of newly found genetic markers in sex determination of sturgeons are presented towards the beneficiaries and to improve the aquaculture industry of sturgeons. Furthermore, considering the high-quality results obtained by molecular tools in one hand and non-invasive feature of this method during sampling on the other hand, the usage of new universal markers namely AllWsex2 and SM4 is highly suggested as a novel technique in sturgeons' sex determination in replace of traditional approaches such as ultrasonography and laparoscopy.

Keywords: Functional genomics, Molecular marker, Sex determination, Sex chromosome, Sturgeons.

تکنولوژی CRISPR-CAS و کاربرد آن در مرحله پس از برداشت گیاهان باغبانی

محمد فضلی*

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۱۴

چکیده

امروزه توجه به مرحله پس از برداشت گیاهان باغبانی مورد توجه است. اصلاح ژنتیکی از مهم‌ترین روش‌های کنترل این مرحله می‌باشد که می‌تواند ضایعات پس از برداشت را در محصولات باغبانی به صورت چشمگیری کاهش دهد. روش CRISPR-Cas یک روش ویرایش ژنوم است که از سیستم پروکاریوتی الگوبرداری شده است. این فناوری از مهم‌ترین و جدیدترین روش‌های اصلاح ژنتیک گیاهی است که می‌تواند در فناوری پس از برداشت کاربرد گسترده ای داشته باشد. از مهم‌ترین ویژگی این روش، عدم تاریخت کردن محصول است که اقبال بیشتری برای بازاریابی خواهد داشت. این فناوری امروزه در گستره‌ای از گیاهان باغبانی و زراعی و به‌ویژه سبزیجات با اهداف خاص مورد استفاده قرار گرفته است. اولین مطالعات این فناوری در گیاهان باغبانی، بر روی گوجه‌فرنگی انجام پذیرفت که تا به امروز نیز بیشترین مطالعات آن در گیاهان باغبانی، در همین گیاه بوده است. تا به امروز مهم‌ترین کاربردهای این روش در گوجه‌فرنگی، دستکاری ژن‌های مربوط به انواع مقاومت‌ها و همچنین افزایش عمر پس از برداشت آن بوده است.

واژه های کلیدی: اصلاح گیاهان، کریسپر، گیاهان باغبانی، ویرایش ژنوم

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: fazlimd@hotmail.com

مقدمه

افزایش ضایعات پس از برداشت پایداری محیط زیست را تهدید می‌کند؛ مخصوصا اینکه دو پدیده مهم در جهان درحال وقوع است؛ تغییرات آب و هوایی و رشد جمعیت. وجود این ضایعات به معنی استفاده ناکارآمد از سرمایه‌گذاری‌ها در بخش باغبانی است. اینگونه بیان می-شود که در ایالات متحده، ۷٪ از ضایعات پس از برداشت در میوه ها و سبزیجات، در مزرعه ایجاد می‌شود. همچنین ۱۷٪ آن در حین توزیع و ۱۸٪ آن در دست مصرف کننده تلف می‌شود (Shipman et al., 2021).

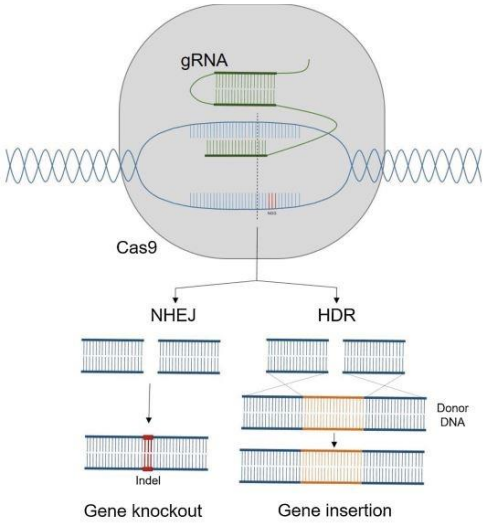
یکی از روش‌های کاهش ضایعات و بهبود ویژگی‌های پس از برداشت محصولات، اصلاح ژنتیکی آن‌هاست. این فرایند اصلاح می‌تواند توسط روش‌های مختلفی انجام شود که یکی از این روش‌ها، ویرایش ژنوم است (Genome editing). تکنولوژی ویرایش ژن می‌تواند بزرگ ترین نوآوری در اصلاح گیاهان پس از انقلاب سبز باشد (Shipman et al., 2021). سه روش کلی ویرایش ژن وجود دارد: ZFNs (zinc-finger nucleases)، TALENs (transcription activator-like effector nucleases) و CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats- CRISPR asistant). از بین این روش‌ها CRISPR-Cas اخیرا مورد توجه زیادی قرار گرفته است. از دلایل آن می‌توان به حساسیت و دقت زیاد در ویرایش ژن هدف، هزینه‌های پایین و سادگی طراحی اشاره نمود (Xu et al., 2019). اما مهم‌ترین ویژگی های تکنولوژی CRISPR-Cas، این است که این سیستم محصولاتی تولید می‌کند که GMO (Genetically modified organism) محسوب نمی-شوند و درنتیجه استفاده از آن‌ها نسبت به محصولات GMO، مورد اقبال بیشتری قرار دارد (Sánchez-León et al., 2018).

تکنولوژی CRISPR-Cas

جدیدترین ابزار ویرایش ژن، تکنولوژی CRISPR-Cas است. CRISPR یک سیستم پروکاریوتی است که موجود را در مقابل حمله ویروسی محافظت می‌کند. دانشمندان با الگوبرداری از این مکانیسم طبیعی باکتری، به دنبال حذف نوکلئوتیدهای نامطلوب و یا قرار دادن نوکلئوتید جدید و مطلوب هستند تا صفات مورد نظر را در موجود ایجاد کنند (Shipman et al., 2021). این سیستم به ۳ دسته کلی نوع۱،

نوع ۲ و نوع۳ تقسیم می‌شود. CRISPR نوع ۲، به CRISPR-CAS9 معروف است. سیستم CRISPR-CAS9 شامل سه بخش می باشد: رشته crRNA، رشته tracrRNA و پروتئین اندونوکلئاز Cas9. توالی crRNA بخشی از توالی ژنوم مهاجم است که در آرایه های تکراری جایگاه ژنی CRISPR در باکتری‌ها ذخیره می‌شود. زمانی که باکتری مجدداً در معرض عنصر مهاجم قرار می‌گیرد، این قطعه بیان شده و با اتصال به رشته مکملش در ژنوم مهاجم و در ادامه با هیبرید شدن tracrRNA با crRNA موجب فراخوانی Cas9 به جایگاه هدف می‌شود. در نهایت Cas9 با ایجاد برش دو رشته ای در ژنوم عنصر مهاجم، موجب غیرفعال شدن آن می‌شود. در تحقیقات مهندسی ژنوم، دو قطعه crRNA و tracrRNA به هم متصل شده اند و مولکول حاصل تحت عنوان sgRNA یا به صورت خلاصه gRNA جایگزین این دو قطعه شده است. تغییرات ساده توالی مولکول sgRNA کافیست تا اندونوکلئاز Cas9 را برای هدف قرار دادن هر بخش از ژنوم مستعد سازد. توالی هایی که نقش اندونوکلئاز Cas را ایفا می‌کنند، نیازمند به یک توالی به نام PAM (Protospacer-Adjacent Motif) برای اتصال می‌باشد. PAM که یک توالی کوتاه DNA است که بلافاصله پایین دست ناحیه ′3 عنصر protospacer واقع شده است (Sánchez-León et al., 2018).

در این سیستم مولکول دو رشته ای DNA در محل هدف در بالادست توالی PAM در داخل ژنوم، توسط پروتئین CAS می‌شکند. این فرایند توسط توالی gRNA مدیریت می‌شود. پس از تولید مولکول دورشته ای شکافته شده توسط پروتئین CAS، این قطعه ترمیم می‌شود که معمولا با توالی قبلی متفاوت است و درنتیجه ممکن است جهش هایی ایجاد گردد. مکانیسم ترمیم شامل HR (homologous recombination) و یا NHEJ (non-homologous end-joining) است. مکانیسم HR موجب بازسازی دقیق تری می‌شود؛ به شرطی که توالی همولوگ غیرآسیب دیده و یا الگوی DNA خارجی برای ترمیم دو رشته، وجود داشته باشد. مکانیسم NHEJ بدون نیاز به رشته الگو، رشته DNA را ترمیم می-کند. در سلول های یوکاریوت رشته DNA شکسته شده ترجیحا با استفاده از NHEJ ترمیم می‌شود (Xu et al., 2019). در NHEJ مولکول های DNA با انتهای صاف به هم متصل می‌شوند و معمولا با ارور و خطا همراه است و نتیجه آن اتصال و یا حذف جفت باز می‌باشد و منجر به indels شدن (insertion or deletion of bases) و جهش frame shift می‌شود (جهشی که موجب تغییر قالب خوانش ۳ نوکلئوتیدی می‌شود). این جهش می‌تواند موجب حذف ژن موردنظر شود (Rodgers and Mcvey, 2016) (شکل ۱).



شکل ۱- مکانیسم های ترمیم مولکول DNA در تکنولوژی CRISPR-Cas

کاربردهای CRISPR-Cas در گیاهان

اخیرا تکنولوژی CRISPR به عنوان یک ابزار ویرایش ژن در مهندسی ژنتیک محصولات باغبانی به خوبی کارایی خود را نشان داده است. تاثیر این تکنولوژی برای اولین بار در گیاهان مدل *Arabidopsis* و *Nicotiana benthamiana* مشاهده گردید (Li et al., 2013).

درمیان محصولات باغبانی، گوجه‌فرنگی اولین گیاهی است که با تکنولوژی CRISPR-Cas مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی برگ های این گیاه دستخوش تغییراتی شده بود (Brooks et al., 2014). در بازه زمانی کوتاه از پیدایش تکنولوژی CRISPR-Cas تا به امروز، مطالعات زیای بر روی کاربردهای آن در گیاهان انجام شده است؛ کلم یکی از گیاهان باغبانی است که توسط این تکنولوژی مورد مطالعه قرار گرفته است و ضمن مطالعه آن، ویرایش ژن هدف *BoIC.GA4.a* موجب پیدایش فنوتیپ پاکوتاه گردید (Lawrenson et al., 2015). در هویج، ژن *DcF3H* (Flavanone-3-hydroxylase) مورد بررسی قرار گرفت که نتیجه آن بلاک شدن بیوسنتز آنتوسیانین در هویج بنفش رنگ بود (Klimek-Chodacka et al., 2018). در خیار ژن

eIF4E (Eukaryotic translation initiation factor 4E) بررسی شده است که نتیجه آن ایجاد مقاومت در برابر دامنه ای از ویروس ها مثل موزاییک Potyviruses Zucchini بود (Chandrasekaran et al., 2016). در توت فرنگی، ویرایش ژن‌های دخیل در هورمون اکسین (Auxin Response Factor 8 و Auxin biosynthesis gene) موجب افزایش بیوسنتز اکسین شده و رشد سریع در نهال را نشان داده است (Zhou et al., 2018). در جدول ۱ به برخی دیگر از این مطالعات اشاره شده است (Wang et al., 2019).

جدول ۱- برخی مطالعات انجام شده در محصولات مختلف باغبانی توسط تکنولوژی CRISPR-Cas

گیاه	ژن هدف	ویژگی هدف
گوجه‌فرنگی	*DMR6*	مقاومت به سفیدک درونی
گوجه‌فرنگی	*MLO1*	مقاومت به سفیدک پودری
گوجه‌فرنگی	*MAPK3*	حساسیت به بیماری پوسیدگی خاکستری
موز	*ORF region of virus*	مقاومت به ویروس streak موز
انگور	*MLO7*	مقاومت به سفیدک پودری
انگور	*WRKY52*	مقاومت به بیماری پوسیدگی خاکستری
سیب	*DIPM1, 2, 4*	مقاومت به بیماری آتشک
گوجه‌فرنگی	*PL*	افزایش عمر پس از برداشت
گوجه‌فرنگی	*ALC*	افزایش عمر پس از برداشت
گوجه‌فرنگی	*SGR1, LCY-E, Blc, LCY-B1, LCY-B2*	افزایش مقدار لیکوپن
گوجه‌فرنگی	*AGL6*	تولید میوه پارتنوکارپ
گوجه‌فرنگی	*IAA9*	تولید میوه پارتنوکارپ
گوجه‌فرنگی	*BOP1, BOP2, BOP3*	گلدهی زودرس با گل آذین ساده شده
گوجه‌فرنگی	*SP, SP5G, CLV3, WUS, GGP1*	معرفی صفات مرتبط با مورفولوژی، تعداد گل، اندازه و تعداد گوجه‌فرنگی و سنتز لیکوپن
گوجه‌فرنگی	*SP5G*	تولید گوجه‌فرنگی روز خنثی
خیار	*WIP1*	تولید گیاه ماده
کیوی	*CEN4, CEN*	تولید گیاه پاکوتاه با گل انتهایی رشد سریع
هندوانه	*ALS*	مقاومت به علف کش
گوجه‌فرنگی	*MAPK3*	کاهش تحمل به تنش خشکی
گوجه‌فرنگی	*CBF1*	کاهش تحمل به تنش یخ زدگی

تکنولوژی CRISPR-Cas در پس از برداشت

گوجه‌فرنگی یکی از مهم‌ترین محصولات باغبانی در دنیا است که ارزش اقتصادی زیادی در صنعت مواد غذایی دارد و عمر کوتاه پس از برداشت یکی از مهم‌ترین ویژگی های این محصول است. پکتین ها نقش مهمی در دیواره سلول و ویژگی های فیزیکی محصول دارند که بیشترین حضور آن‌ها در دیواره اولیه و تیغه میانی است. ژن‌های مرتبط با آنزیم‌های تخریب کننده پکتین در گوجه‌فرنگی شامل *pectate lyase* (*PL*)، *polygalacturonase 2a* (*PG2a*) و *β-galactanase* (*TBG4*) می‌باشد. برای بررسی جداگانه نقش هرکدام از این ژن‌ها در گوجه‌فرنگی، مطالعه ای با کمک تکنولوژی CRISPR-Cas انجام شد. نتیجه این مطالعه این بود که هرکدام از این ژن‌ها، در دامنه ای خاص از دیواره سلولی فعالیت خود را انجام می‌دهند؛ جهش در ژن *PL* منجر به تولید میوه‌های با قوام بیشتر گردید؛ در حالی که جهش در *PG2a* و *TBG4* در رنگ و وزن میوه موثر بود (Wang et al., 2019).

با وجود اهمیت فراوان و ارزش اقتصادی بالای گیاهان زینتی، گفته می‌شود تکنولوژی CRISPR-Cas تاکنون کاربرد اندکی در این گیاهان داشته است (Xu et al., 2020). یکی از

اندک مطالعات، بر روی پتونیا می‌باشد. یکی از آنزیم‌های دخیل در تولید اتیلن و پیری اندام ها، ACC اکسیداز (1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase-) می‌باشد. گل-های پتونیا حساسیت زیادی به اتیلن نشان می‌دهند. در پتونیا ژن‌هایی که در تولید این آنزیم نقش دارند شامل *PhACO1*، *PhACO3*، *PhACO4* هستند. این ژن‌ها در گلبرگ و مادگی پتونیا بیان می‌شود. اخیرا ژن *PhACO1* در گیاه پتونیا توسط فناوری CRISPR-Cas9 ویرایش شده است. موتانت‌های ویرایش شده، تولید اتیلن کمتری داشته و عمر گلجای و کیفیت گل‌ها افزایش یافته بود (Xu et al., 2020).

در جدول ۲ برخی دیگر از کاربردهای تکنولوژی CRISPR-Cas در پس از برداشت محصولات باغبانی اشاره شده است (Shipman et al., 2021).

جدول ۲- برخی مطالعات انجام شده در پس از برداشت گیاهان باغبانی توسط تکنولوژی CRISPR-Cas

گیاه	ویژگی	ژن هدف	تغییر	فنوتیپ
گوجه‌فرنگی	عمر پس از برداشت	*SlALC*	↓	افزایش عمر پس از برداشت
گوجه‌فرنگی	رسیدگی	*SlPL*	↓	افزایش قوام، عدم تغییر رنگ، رسیدگی کندتر
گوجه‌فرنگی	رسیدگی	*RIN*	↓	رسیدگی کندتر
پتونیا	حساسیت/ عمر گلجای	*PhACO1*	↓	افزایش عمر گلجای به مقدار ۵۰٪
سیب‌زمینی	افزایش فیبر	*StSBEI, II*	↓	افزایش مقاومت نشاسته
سیب‌زمینی	ظاهری	*StPPO2*	↓	کاهش Browning

توصیه ترویجی

با توجه به پتانسیل بالای کاربرد تکنولوژی CRISPR-Cas در محصولات مختلف و همچنین امکان کاربرد آن با اهداف گوناگون، گسترش این فناوری در محصولات مختلف و مخصوصا سبزیجات توصیه می‌گردد. این روش می‌تواند ضایعات پس از برداشت در محصولات مختلف را کاهش داده و در بهبود بازار رسانی موثر باشد. با توجه به وضعیت آبی کشور و خشکسالی‌های اخیر، کاهش ضایعات پس از برداشت یک راه موثر در کاهش مصرف آب خواهد بود.

منابع

Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z.B., Van Eck, J., (2014). Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated9 system. Plant Physiol. 166, 12921297.

Chandrasekaran, J., Brumin, M., Wolf, D., Leibman, D., Klap, C., Pearlsman, M., Sherman, A., Arazi, T., Galon, A. (2016). Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPRCas9 technology. Molecular Plant Pathology 17: 1140-1153.

Klimek-chodacka, M., Oleszkiewicz, T., Lowder, Lg., Qi, Y., Baranski, R. (2018). Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing in carrot cells. Plant Cell Reports 37: 575-586.

Lawrenson, T., Shorinola, O., Stacey, N., Li, C., Østergaard, L., Patron, N., Uauy, C., Harwood, W. (2015). Induction of targeted, heritable mutations in barley and Brassica oleracea using RNA guided Cas9 nuclease.Genome Biology 6: 258.

Li, J.F., Norville, J.E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J., et al. (2013). Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9. *Nat. Biotechnol*. 31, 688-691

Rodgers, K., Mcvey, M. (2016). Error-prone repair of DNA double-strand breaks. *J. Cell. Physiol*. 231, 15–24

Sánchez-León, S., Gil-Humanes, J., Ozuna, C.V., Giménez, M.J., Sousa, C., Voytas, D. F., et al. (2018). Low-gluten, nontransgenic wheat

engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol. J*. 16 (4), 902-910

Shipman, E.N., Yu, J., Zhou, J., Albornoz, K., Beckles, D.M. (2021). Can gene editing reduce postharvest waste and loss of fruit , vegetables , and ornamentals ? *Hortic. Res.* 1–21.

Wang, D., Samsulrizal, N.H., Yan, C., Allcock, N.S., Craigon, J., Blanco-Ulate, B., Ortega-Salazar, I., Marcus, S.E., Bagheri, H.M., Perez-Fons, L., Fraser, P.D., Foster, T., Fray, R., Paul Knox, J., Seymour, G.B. (2019). Characterization of CRISPR mutants targeting genes modulating pectin degradation in ripening tomato 1[OPEN]. *Plant Physiol*. 179, 544–557.

Xu, J., Kang, B., Naing, A.H., Kim, C.K., Bae, S., Kim, J., Kim, H. (2020). CRISPR / Cas9-mediated editing of 1-aminocyclopropane-1- carboxylate oxidase1 enhances Petunia flower longevity. *Plant Biotechnol. J.* 18, 287–297.

Zhou, J., Wang, G., Liu, Z. (2018). Efficient genome-editing of wild strawberry genes, vector development, and validation. Plant Biotechnology Journal 12922.

CRISPR-CAS technology and its application in post-harvest of horticultural plants

Fazli M.

Dept. of Biological Science., Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Nowadays, post-harvest stage of horticultural plants is under spotlight. Genetic modification is one of the most important methods of controlling this stage, which can significantly reduce post-harvest waste in horticultural crops. The CRISPR-Cas is a genome editing method modeled on the prokaryotic systems. This technology is one of the most important and newest methods of plant genetic modification that can be widely used in post-harvest technology. One of the most important features of this method is that it does not result in GMO, and therefore, will be more successful for marketing. This technology is now widely used in horticultural and agricultural plants, especially vegetables, for different purposes. Tomatoes were among the first and most frequent subjects of CRISPR-Cas technology in horticulture to date. Up until now, the most important applications of this method in tomatoes were the manipulation of genes related to various types of resistance, as well as increasing its postharvest life.

Keywords: Plants breeding, Crisper, Horticultural plants, Genome editing

جدال ملکولی ویروس‌های بیمارگرگیاهی با گیاهان میزبان

مهرداد صالح‌زاده[1]* و سعیده دهقانپور فراشاه[2]

[1] **شیراز، دانشگاه شیراز، مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی.**

[2] **تهران، دانشگاه پیام نور، گروه کشاورزی.**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۱۱

چکیده

ویروس‌های گیاهی پارازیت‌های اجباری درون‌سلولی هستند که برای تکمیل چرخه‌ی آلودگی خود مانند بیان اطلاعات ژنومی، همانندسازی ژنوم، حرکت بین‌سلولی منحصراً وابسته‌به سلول میزبان هستند. طی آلودگی، شبکه‌ای گسترده و رقابتی از برهمکنش‌های پروتئین- پروتئین و پروتئین - نوکلئیک اسید بین ویروس و گیاه ایجاد می‌شود. عموماً این شبکه بر هم‌کنشی شامل مکانیسم‌هایی است که از طریق آن‌ها گیاه پاسخ‌های ضد ویروسی را ایجاد می‌کند و ویروس نیز فاکتورهای میزبانی را برای تکثیر و غلبه بر پاسخ‌های ضدویروسی میزبان به کار می‌گیرد. فهم این شبکه تعاملی بین گیاه و ویروس یکی از اهداف کلیدی ویروس‌شناسی برای مقابله‌ی بهتر و ایمن با ویروس‌های گیاهی می‌باشد. ویروس‌های گیاهی راهبردهای متنوعی جهت سرکوب و حتی بهره‌برداری از سیستم دفاعی میزبان برای تضمین و اطمینان از بقاء خود کسب کرده‌اند. داشتن درک و فهم بهتر از دفاع و عمل متقابل (ضددفاع) گیاهان و ویروس‌ها، به‌وضوح برای بهبود و توسعه مقاومت کارآمد با طیف گسترده دربرابر ویروس‌ها، برای کشاورزی پایدار مفید خواهد بود. در این مقاله، خلاصه‌ای از آخرین دستاوردهای علمی مربوط‌به دفاع و ضددفاع بین ویروس‌ها و گیاهان ارائه می‌شود.

کلیدواژگان: ویروس‌های گیاهی، سیستم‌های دفاعی، ویروس‌شناسی، مقاومت.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: Mehrdadsalehzadeh@gmail.com

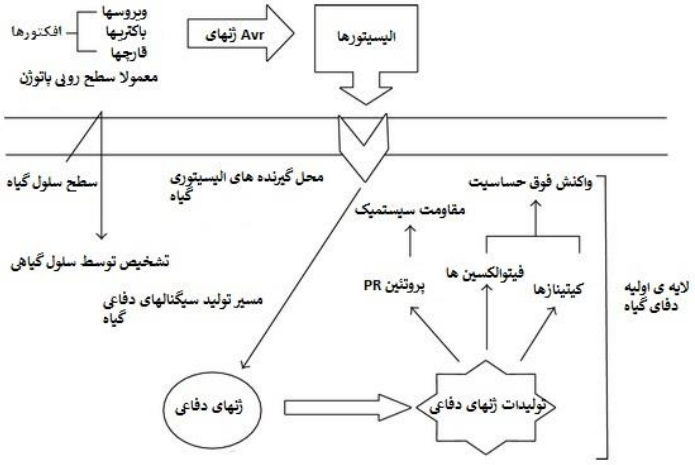
دفاع ضدویروسی گیاه

گیاهان توسط عوامل بیماری‌زای مختلفی مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، نماتدها و ویروس‌ها آلوده می‌شوند. آن‌ها برعکس جانوران که دارای سلول‌های اختصاصی دفاع هستند، وابسته‌به ظرفیت و استعداد هر سلول برای درک و دفاع در برابر مهاجمان بیماری‌زا می‌باشند. طی میلیون‌ها سال تکامل همراه با عوامل بیماری‌زا، گیاهان چندین لایه دفاعی در برابر پاتوژن‌هایی که آن‌ها را مورد حمله قرار می‌دهند به‌وجود آورده‌اند. ایمنی ذاتی، خاموشی RNA، سرکوب ترجمه، تخریب و تجزیه پروتئینی به‌واسطه اتوفاژی (خودخواری) و یوبی کوئیتینه شدن از اصلی‌ترین مکانیسم‌های دفاعی گیاهان دربرابر ویروس‌ها هستند (۲۱). همچنین کشف ژن‌های غالب مقاومت منجربه شناسایی پروتئین‌های ضدویروسی شده است که ازطریق برهمکنش مستقیم با پروتئین‌های ویروسی و مهار عملکرد آن‌ها تکثیر و همانندسازی ویروس را محدود می‌کنند (شکل ۱).

ایمنی ذاتی ضدویروسی

دو لایه از پاسخ‌های ایمنی گیاهی دربرابر بیمارگرها وجود دارد. ابتدا گیاهان، میکروارگانیسم‌های سطح سلول را از-طریق شناسایی الگوهای مولکولی همراه‌با بیمارگر (PAMPs) که به‌صورت حفاظت‌شده هستند و به‌وسیله گیرنده شناسایی الگوهای سطح خارج سلولی (PRR[2]) آغاز می‌شوند و دراصطلاح، ایمنی برانگیخته توسط PAMP یا PTI[3] خوانده می‌شوند را شناسایی می‌کنند. PRRهای گیاهی به دو دسته‌ی گیرنده‌های کینازی واقع در غشای پلاسمایی (RK[4]) و پروتئین‌های شبه‌گیرنده (RLPs[5]) تقسیم می‌شوند.

1 Pathogen-associated molecular patterns
[2] Pattern recognition receptor
[3] PAMP-triggered immunity
[4] Receptor kinases
[5] Receptor-like proteins



شکل ۱. الگوی شماتیک خلاصه شده از مسیر برهمکنش ویروس – گیاه.

پس از درک موفقیت‌آمیز الگوهای مولکولی مرتبط‌با بیمارگرها، رسپتورهای گیرنده‌ی افکتورهای بیمارگر در میزبان (PRR) به‌سرعت حالت تاخوردگی پیدا می‌کنند و ازطریق ارتباط با کوفاکتورهایی مانند کینازهای شبه‌گیرنده سوماتیکی (SERKs[1])، پروتئین‌های سرکوب‌کننده BIR1-1 (SOBIR1[2]) و یک‌سری اتفاقات پیام‌رسانی درون‌سلولی پایین دست، اکسیداتیوهای پشت‌سرهم و جریانات یونی و افزاینده‌های بیوسنتز هورمون‌های دفاعی و همچنین پروتئین کینازهای فعال‌شده با میتوژن (MAPKs[3]) می‌شوند.

درنهایت این رخدادها منجربه پاسخ‌های دفاعی مانند بیان ژن‌های مرتبط‌با بیماری‌زایی (PRs[4])، سنتز و نشست کالوز در پلاسمودسماتا و افزایش ضخامت دیواره سلولی می‌شوند. گاهی فعالیت PTI منجربه واکنش فوق‌حساسیت (HR[5]) می‌شود که نوع ویژه‌ای از مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (PCD[6]) است که موجب ایجاد لکه‌های نکروتیک می‌گردد. در حال‌حاضر تعداد زیادی از PRRهای گیاهی و PAMPهای وابسته شناسایی و توصیف شده‌اند (۲۸). در ارابیدوپسیس جهش‌یافته کورسپتورهای کینازی SERK3 (برانوسینواستروئید غیرحساس مرتبط‌با گیرنده کیناز BAK1)[1]) و SERK4 (BAK1-LIKE و یا BKK1) افزایش حساسیت به ویروس‌های مختلف RNAدار وجود دارد. به‌طورمشابه سرکوب بیان CaLecRK-S.5 (گیرنده‌ی افکتورهای بیماری‌زا و شبه کینازی) در فلفل (*Capsicum annuum* L.) که یک گیرنده کیناز غشاگذر[7] حاوی یک دومین لکتین نوع L در انتهای آمینی خود است، منجربه افزایش حساسیت فلفل نسبت به چند بیمارگر غیرمرتبط از جمله دو ویروس گیاهی موزائیک توتون (TMV, Tobamovirus) و ویروس پیسک خفیف فلفل (PMMoV, Tobamovirus) و نیز باکتری *Xanthomonas campestris* pv. (*Vesicatoria*) و اوومیست (*Phytophthora capsici*) می‌شود (۱۷). پیش‌تیمار با بتا–آمینو بوتریک اسید (BABA) که به عنوان یک محرک شیمیایی ایمنی اولیه معروف است، توانسته مقاومت به بیماری را در گیاهانی که در آن‌ها CaLecRK-S.5 خاموش‌شده است را بازگرداند (۲). کاربرد RNA دورشته‌ای (dsRNA) خارجی که یک PAMP شناخته شده در سیستم ایمنی ضدویروسی جانوری است، باعث تحریک پاسخ ویژه PTI در ارابیدوپسیس شده که این فرآیند وابسته به کورسپتورSERK1 و مستقل از مسیر خاموشی RNA است. پروتئین پوششی ویروس‌های موزاییک توتون و ویروس X سیب زمینی (PVX, Potexvirus) نیز می‌تواند پاسخ‌های شبه PTI را به‌ترتیب در توتون و ارابیدوپسیس به‌راه اندازد. پروتئین پوششی (CP) خارجی‌ترین جزء همه ویروس‌های بدون غشاء است که

[1] Somatic embryogenesis receptor-like kinase
[2] Suppressor of BIR1-1
[3] Mitogen-activated protein kinases
[4] Pathogenesis-related
[5] Hypersensitive response
[6] Programmed cell death
[7] Transmembrane

باید طی حمله ویروس به گیاه با سطح سلول‌های گیاهی تماس برقرار کند. بنابراین امکان دارد پاسخ‌های شبه PTI توسط PAMPهای ناشناخته مشتق‌شده از پروتئین‌های پوششی TMV و PVX برانگیخته شود. مطابق این فرضیه، جایگاه حفاظت‌شده یا تاخوردگی سه‌بعدی سراسری در پوشش پروتئینی ویروس‌هایی با ساختارمشابه، مانند ویروس‌های رشته‌ای و میله‌ای یافت شدند (۲۱). پاتوژن-های سازگار با میزبان می‌توانند پروتئین‌های اختصاصی (Effectors) را به درون سلول گیاهی انتقال دهند تا با دفاع حاصل از PTI میزبان سازگار شوند. برای مقابله با افکتورها، گیاهان یک سیستم نظارتی اضافی دیگری، که وابسته‌به گیرنده‌های درون‌سلولی ویژه‌ای تحت‌عنوان پروتئین‌های R هستند، را تکامل داده‌اند که به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم افکتورهای میکروبی که برای فروپاشی و بی-اثر کردن سیستم PTI استفاده شده‌اند را شناسایی می‌کنند و سیستم دفاعی دیگری به‌نام سیستم برانگیخته توسط افکتور (ETI[1]) را فعال می‌کنند (۲۳). طی تحقیقات مختلف، تعداد زیادی از ژن‌های Rکه مقاومت دربرابر تعداد زیادی از ویروس‌های گیاهی را ایجاد می‌کنند، کلون شده‌اند. پروتئین‌های R عملکردی معمولا در انتهای آمینی دارای یک دومین گیرنده مشابه گیرنده تول- اینترلوکین ۱ (TIR[2]) و یا یک دومین پیچ –مارپیچ (CC[3])، یک دومین مرکز اتصال‌به نوکلئوتید (NB[4]) و یک دومین توالی غنی از تکرار لوسین (Leucine-rich) در انتهای کربوکسیلی خود هستند. این دومین‌های غیرمتعارف در بعضی از پروتئین‌های R گیاهی نیز شناسایی شده‌اند. دومین غیرمتعارف NB-LRR نقش اساسی در تشخیص پاتوژن و یا در افزایش شناسایی آن دارد (۱۷). همانند PTI درک موفقیت‌آمیز یک افکتور توسط یک پروتئین R یک‌سری از سیگنال‌های پایین‌دست را به‌راه می‌اندازد که منجربه پاسخ‌های مقاومت می‌شوند. نتیجه مستقیم دفاع در بیشتر پاسخ‌های مقاومتی ایجادشده توسط پروتئین‌های R، واکنش فوق‌حساسیت است (۲). با-این‌حال بعضی از ژن‌های R مانند ژن Rx1 در سیب‌زمینی ایمنی بالایی را که ارتباطی با واکنش فوق‌حساسیت ندارد، به گیاه می‌بخشد. ژن Rx1 درواقع پروتئین پوششی ویروس PVX را ازطریق دومین توالی غنی از تکرار لوسین، شناسایی و سیگنال حاصل از آن توسط RanGAP2 RAN GTPase-Activating protein 2 به هسته منتقل می‌کند تا مقاومت علیه PVX فعال شود که احتمالا این عمل را از-طریق فاکتور رونویسی شبه‌گلدن ۲ (NbGlk1[5]) انجام می دهد (۲۸).

ترکیبات موردنیاز برای ایجاد مقاومت به‌واسطه R علیه آلودگی‌های ویروس به‌طور گسترده‌ای با همان ترکیب موردنیاز برای دیگر پاتوژن‌ها همپوشانی دارد که نشان-دهنده همگرایی ETI گیاهی است(۱۴). به‌عنوان مثال سرکوب‌کننده الل G2 مربوطبه SKP1 (SGT1[6])، REQUIRED FOR MLA12 RESISTANCE1 (RAR1) و پروتئین شوک حرارتی ۹۰ (HSP90[7])، کمپلکس SGT1/RAR1/HSP90 را تشکیل می‌دهند که برای مقاومت باواسطه N و Rx به‌ترتیب علیه ویروس‌های TMV و PVXضروری هستند. همچنین این کمپلکس برای پاسخ ایمنی علیه آلودگی باکتریایی نیز موردنیاز است. کمپلکس تشکیل شده با EDS1، PAD4 و SAG101، مقاومت را به-واسطه واکنش HR به آلودگی TCV در برابر ویروس چروکیدگی شلغم (TCV)، باکتری ، قارچ و حتی تنش سرما تنظیم می‌کند (۸).

خاموشی RNA (RNA Silencing)

خاموشی RNA که به تداخل RNA نیز معروف است، یک مکانسیم تکاملی حفاظت شده و اختصاصی برای تنظیم بیان ژن‌های داخلی و مبارزه با نوکلئیک اسیدهای خارجی مانند عناصر قابل انتقال (ترانسپوزون‌ها) و ویروس ها است. RNAهای دورشته‌ای مشتق از ویروس (dsRNA) که یک محرک کلیدی در خاموشی RNA ضدویروسی هستند، توسط اندوریبونوکلئاز گیاهی نوع III یعنی پروتئین شبه-دایسر (DCL[8]) شناسایی و پردازش می‌شوند و به RNA دورشته‌ای ۲۰ تا ۲۴ نوکلئوتیدی تبدیل می‌شوند که اصطلاحا به آن‌ها RNA کوچک مداخله‌گر مشتق‌شده از ویروس (vsiRNA) می‌گویند. این vsiRNAها به پروتئین-های آرگونات (AGO) متصل می‌شوند و جزء اصلی کمپلکس خاموشی القاشده توسط RNA یعنی RISC را تشکیل می‌دهند که قادر است به‌طور مستقیم RNA

[1] Effector-triggered immunity
[2] Toll/Interleukin-1 receptor
[3] Coiled-coil
[4] Nucleotide-binding
[5] Golden2-like
[6] Suppressor of the g2 allele of skp1
[7] Heat shock protein90
[8] Dicer-like

ویروسی همولوگ را برش دهد و یا ترجمه پروتئین‌های ویروسی را سرکوب و مهار کند (۲۶).

خاموشی RNA به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های اصلی و عمده مقابله با ویروس‌ها در تعاملات سازگاری گیاه –ویروس شناخته شده است. فرم جهش‌یافته (موتانت) ویروس موزاییک شلغم (TuMV, Potyvirus) که فاقد VSR اصلی خود (HcPro) است نمی‌تواند تیپ وحشی ارابیدوپسیس را آلوده کند، اگرچه توانایی آلودگی گیاهانی که مسیر خاموشی RNA آن‌ها معیوب شده است را دارد. علاوه‌براین پدیده بهبود علائم دقیقاً مرتبطبه افزایش اثر سیستم خاموشی RNA و اختلال در فعالیت VSR است. درحقیقت اعتقادبراین است که تقریبا همه ویروس‌های گیاهی یک یا چند پروتئین تکامل‌یافته دارند که قادر به مختل کردن سیستم خاموشی RNA هستند. خاموشی RNA همچنین می‌تواند برهمکنش ناسازگاری بین گیاه و ویروس را تعیین کند. به‌عنوان مثال ارابیدوپسیس به‌طور عادی به‌عنوان یک غیرمیزبان برای PVX شناخته می‌شود بااین‌حال، PVX می‌تواند ارابیدوپسیس را در حضور ویروس لکه قرمز فلفل (PepRSV, a *Potyvirus*) و یا با همکاری سیستم VSR این ویروس (PepRSV) آلوده کند. پژوهش‌های متعددی نشان می‌دهد که مهار همانندسازی PVX در ارابیدوپسیس به‌طور عمده‌ای وابسته‌به DCL2، DCL4 و مشارکت فعالیت AGO2 و AGO5 است (۲۶).

سرکوب ترجمه (Translation Repression)

بیوسنتز سلولی پروتئین‌ها به‌شدت در پاسخ به فقر غذایی و یا تنش‌ها تنظیم می‌شود. بررسی‌ها نشان می‌دهد که پروتئین GCN2[1] یک سرین ترئونین کیناز می‌باشد که تنظیم‌کننده کلیدی بیوسنتز پروتئین‌ها در گیاهان است. GCN2 ازطریق هدف‌گذاری و فسفریلاسیون فاکتور آغاز-کننده ترجمه یوکاریوتی 2α (eIF2α) عمل می‌کند که این فاکتور به Met-tRNA متصل شده و آن را به زیرواحد 40s ریبوزوم منتقل می‌کند تا سنتز پروتئین پس از اتصال یک GTP آغاز شود. فسفریلاسیون eIF2α در سرین ۵۲، بازیابی GDP متصل‌به eIF2α به GTP را مهار و درنتیجه سنتز پروتئین را سرکوب می‌کند. فعالیت GCN2 توسط پروتئینی از خانواده کاست متصل‌شونده به ATP (ABC) تنظیم می‌شود که GCN1 نام دارد. مسیر GCN1–GCN2–eIF2α در بسیاری از پاسخ‌های گیاهی به تنش‌های زنده و غیرزنده مانند تنش‌هایی نظیر سرما، زخم و غیره درگیر است. هنوز نقش مستقیمی برای سرکوب ترجمه پروتئین توسط GCN2 در دفاع ضدویروسی گزارش نشده است و آلودگی تیپ وحشی ارابیدوپسیس یا جهش‌یافته آن در GCN2 توسط ویروس موزاییک زرد شلغم (TYMV, a *tymovirus*) و یا TCV علائمی از فسفریلاسیون eIF2α نشان نداده است. این داده‌ها نشان می‌دهد که یا GCN2 نقشی در پاسخ گیاه به آلودگی ویروسی ایفا نمی‌کند و یا اگر هم نقشی دارد این نقش با این دو ویروس سازگار شده است. (۲۵).

پروتئین‌های غیرفعال‌کننده ریبوزوم (RIP)، خانواده پروتئینی را تشکیل می‌دهند که به‌صورت فراگیر در گیاهان، قارچ‌ها و باکتری‌ها وجود دارند و می‌توانند سنتز پروتئین را ازطریق اختلال در لوپ Sacrin/ricin مربوطبه rRNA مهار کنند. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که بسیاری از RIPها دارای فعالیت‌های قدرتمند ضدویروسی، ضدقارچی و حشره‌کشی هستند. شناخته شده‌ترین RIP با فعالیت ضد-ویروسی پروتئین ضدویروس Pokeweed (PAP) می‌باشد که در گیاه سرخاب یا Pokeweed (*Phytolacca americana*) یافت شده و مشخص شده که قادر به کاهش تکثیر و ازدیاد بسیاری از ویروس‌های گیاهی مانند ویروس موزاییک خیار (CMV, a *Cucumovirus*)، PVX، *Tobacco Potato Virus* Y (PVY, a *Etch Virus* (TEV, a *Potyvirus*) ،*Potyvirus*) ،*Alfalfa Mosaic Virus* (AMV, an *Alfamovirus*) ،*African Cassava Mosaic Virus* (ACMV, a *Begomovirus*) ،*Cauliflower Mosaic Virus* (Camv, A *Caulimovirus*) ،*Brome Mosaic Virus* (BMV, a *Bromovirus*) و نیز بسیاری از ویروس‌های جانوری است (۴). علاوه‌براین بیان RIP در گیاهان تحت شرایط تنش مانند حمله ویروسی افزایش می‌یابد که نشان می‌دهد آن‌ها قسمتی از مکانیسم دفاعی گیاه دربرابر ویروس ازطریق سرکوب کلی ترجمه هستند (۸).

اخیراً مکانیسم ضدویروسی دیگری که ازطریق سرکوب سنتز سراسری پروتئین سلولی عمل می‌کند، کشف شده است (۲۵). پروتئین شاتل هسته‌ای (NSP) مرتبط با کیناز ۱(NIK1) که بخش کلیدی این ماشین ضدویروسی می-باشد، ابتدا در فاکتورهای میزبانی برهمکنش‌کننده با NSP جیمنی‌ویروسی شناسایی شد (۲۶). درواقع NIK1 یک

[1] General control non-derepressible-2

پروتئین LRR لنگری غشای پلاسمایی است که حاوی دومین عملکرد سرین –ترئونین کیناز می‌باشد که مانند PRR گیرنده کمکیBAK1 است (۲۴). دو همولوگ دیگر (NIK3 و NIK4) در ارابیدوپسیس شناسایی شدند که با NIK1 یک خوشه جداگانه متعلق‌به گروه ۱ بالاخانواده LRR-RK را تشکیل می‌دهند (۱۴). برخلاف مقاومت به‌واسطه BAK1، پاسخ‌های ضدویروسی توسط NIK1 با واکنش‌های ویژه ایمنی ذاتی مانند بیان ژن‌های PR القا نمی‌شوند. در مقابل، NIK1 پروتئین ۱۰ ریبوزومی (RPL10) سیتوپلاسمی را فسفریله می‌کند که منجربه انتقال این پروتئین (RPL10) از سیتوپلاسم به هسته می‌شود (۲۴). این پروتئین در هسته با یک گیرنده رونویسی حاوی دومین MYB[1] یعنی پروتئین حاوی دومین MYB برهمکنش‌کننده با L10 (LIMYB[2])، برهمکنش می‌دهد تا بیان ژن‌های مربوطبه پروتئین ریبوزومی را سرکوب کند و درنهایت منجربه خاموشی سراسری پروتئین ویروسی و سلولی شود (۲۵).

مقاومت غالب غیرمعمول ویروسی (Atypical Dominant Viral Resistances)

کشف مقاومت ویروسی منجربه کشف ژن‌های غالب مقاومت شد که عملکرد آن‌ها مستقل از مسیر پیام‌رسانی ایمنی ذاتی است. محصولات این ژن‌های غالب مقاومت از نظر ساختاری متفاوت از یکدیگر و حتی متفاوت از پروتئین‌های ویژه R هستند. بنابراین نمی‌توانند درون سیستم ایمنی ذاتی گیاه تقسیم‌بندی شوند. براساس بررسی‌های انجام شده، احتمالا اغلب این ژن‌های غالب مقاومت، عمل خود را ازطریق برهمکنش مستقیم با پروتئین‌های ویروسی برای مهار فعالیت انجام می‌دهند. ازاین‌رو به محصولات این ژن‌های غالب مقاومت، پروتئین‌های غالب مقاومت غیرمعمول ویروسی (ADVRP) گفته می‌شود. بخش عمده‌ای از ADVRPها که تاکنون کشف شده‌اند، اعضای خانواده پروتئینی لکتین (Lectin) هستند. لکتین‌ها که به‌عنوان آگلوتینین یا جاکالین‌ها شناخته می‌شوند، گروهی از پروتئین‌های دارای دومین متصل‌شونده به کربوهیدرات (CBD) هستند که به‌طور برگشت‌پذیری به مونوساکاریدها یا الیگوساکاریدهای ویژه‌ای متصل می‌شوند. علاوه‌بر CBD تعدادی از لکتین‌ها یک دومین کاتالیتیکی اضافی نیز مانند گلوکوناز، گلیکوزیداز، کیناز و همچنین RIP دارند. بعضی از لکتین‌های دارای دومین شبه‌کیناز مانند DORN1[3] و LORE[4] در ارابیدوپسیس و I-3 در گوجه‌فرنگی، به‌عنوان گیرنده PRR در PTI عمل می‌کنند که محدودکننده حرکت TEV (RTM۱) پروتئین شبه‌لکتینی در ارابیدوپسیس می‌باشند و به‌طور اختصاصی مقاومت به بسیاری از پوتی ویروس‌ها مانند TEV، ویروس موزاییک کاهو (LMV) و ویروس ساقه آبله‌ای آلو (PPV) را با محدود کردن حرکت دور برد (در مسافت طولانی) به گیاه اعطا می کنند. مقاومت به‌واسطه RTM1، مستقل از HR و نامرتبط با SA بوده و SAR را القا نمی‌کند اما گمان می‌رود که مجموعه‌ای را با حداقل دو پروتئین دیگر در آوند چوبی تشکیل می‌دهد. RTM2 (یک پروتئین کوچک شوک حرارتی) و RTM3 (یک میرین با دومین همولوگ با فاکتور مرتبط با گیرنده فاکتور نکروزیس تومور (TRAF)) و دیگر فاکتورهای میزبان، به‌عنوان محصولات ژن‌های RTM5 و RTM4، فقط به‌طور ژنتیکی شناخته و توصیف شده‌اند (۱۵). ازدست‌رفتن عملکرد هرکدام از اعضای این کمپلکس منجربه از بین رفتن مقاومت می‌شود که نشان می‌دهد مقاومت مربوطبه RTM1 وابسته‌به کمپلکس پروتئینی می‌باشد (۲۳). این کمپلکس پروتئینی احتمالاً با هدف قرار دادن پیکره‌های پوتی‌ویروس‌ها یا کمپلکس نوکلئوپورتئینی حاوی CP در آوند آبکشی، عمل خود را انجام می‌دهد زیرا CP درگیر شکست مقاومت ایجاد شده توسط RTM است. JAK1 (لکتین نوع جاکالین موردنیاز برای مقاومت به پوتکس‌ویروس‌ها) یکی دیگر از ADVRP شبه‌لکتین در ارابیدوپسیس است که مقاومت گسترده‌ای را نسبت به Potexviruses در مرحله اول آلودگی ازطریق شناسایی RNA پلی‌مراز وابسته‌به RNA و مهار فعالیت آن به گیاه اعطا می‌کند (۱). مثال‌های دیگر شامل یک پروتئین شبه‌لکتین (CIP29) جداسازی شده از *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) است که قادر به ایجاد مقاومت دربرابر ویروس *Sunn-hemp mosaic virus* (SHMV, a *tobamovirus*) در توتون خواهد بود و یک لکتین از *Musa paradisiaca* (BanLec-1) که به CP ویروسTMV متصل و از آلودگی ویروس جلوگیری می‌کند (۱۵).

[1] Myeloblastosis
[2] L10-Interacting Myb Domain-Containing Protein
[3] Does not respond to nucleotides 1
[4] Lipooligosaccharide-specific reduced elicitation

تخریب و تجزیه پروتئین‌ها ازطریق اتوفاژی و یوبی-کوئیتیناسیون

تجزیه پروتئین‌ها توسط یوبی‌کوئیتیناسیون ماشین اصلی تغییر و تبدیلات پروتئینی در گیاه است. یوبی‌کوئیتیناسیون، واکنش چند مرحله‌ای آنزیمی است که قادربه ایجاد پیوند کووالانسی یوبی‌کوئیتین (Ub) در پروتئین هدف است. ابتدا Ub پیش‌رو به‌وسیله آنزیم فعال کننده Ub پروتئولیزه می-شود و E1-Ub حدواسط را تشکیل می‌دهد که درآن گلایسین موجود در انتهای کربوکسیلی Ub با یک پیوند تیواستر به سیستئین موجود در E1 باند می‌شود. در مرحله بعد Ub فعال‌شده با آنزیم E2 ترکیب می‌شود. درنهایت، Ub از E2-Ub حدواسط به پروتئین‌های هدف با کمک Ub لیگاز تحویل داده می‌شود. سپس پروتئین‌های یوبی-کوئیتینه‌شده جهت تجزیه به کمپلکس پروتئازوم 26s فرستاده می‌شوند. تجزیه پروتئینی توسط یوبی‌کوئیتیناسیون برای هموستازی پروتئین سلولی ضروری است وتقریباً درگیر در همه فرایندهای سلولی است، بنابراین جای تعجب نیست که این فرآیند تقریبا در همه مکانیسم‌های دفاعی ضدویروسی گیاهی درگیر است. برای مثال، القای کامل بیان ژن‌های PR در ایمنی ذاتی گیاه، دربرگیرنده تغییر و تبدیلات پروتئازوم واسطه مربوطبه کواکتیوتور رونویسی NPR1 است. علاوه‌براین فراوانی گیرنده کیتینی LYK5 به-وسیله یوبی‌کوئیتین E3 لیگاز PUB13[1] در ارابیدوپسیس تنظیم می‌شود. پروتئین‌های تانخورده مربوطبه پاسخ و تنش‌های شبکه آندوپلاسمی، که یک مجموعه پیام‌رسان چندبعدی درون‌سلولی می‌باشند و برای بازسازی هموستازی شبکه آندوپلاسمی ضروری هستند، مجموعه دیگری از پاسخ گیاه به آلودگی ویروسی را تشکیل می-دهند که ازطریق تخریب پروتئین به‌واسطه Ub تنظیم می-شوند. NtRFP1 یک ژن جدید در توتون از گروه لیگاز E3 است که با پروتئین βC1 رمزشده توسط بتاستلایت (Betasatellite) وابسته‌به ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی که یک فاکتور بیماریزایی ویروسی و VSR است، برهمکنش دارد تا یوبی‌کوئیتیناسیون و تخریب آن‌را برای کاهش تکثیر ویروس سبب شود. علاوه‌براین، تخریب پروتئینی به‌واسطه یوبی‌کوئیتیناسیون درمقابله با RdRp ویروس TYMV در ارابیدوپسیس نیز مشاهده شده است (۵).

اتوفاژی یک سیستم حفاظت‌شده جهت انتقال تجمعات پروتئین‌های بد تاخورده یا ناخواسته و یا اندامک‌های آسیب‌دیده به واکوئل برای تخریب و بازیافت می‌باشد. حفظ هموستازی طبیعی سلول و مقاومت دربرابر تنش‌های زنده و غیرزنده در گیاهان ضروری است. همانند یوبی-کوئیتیناسیون، اتوفاژی نیز تقریباً با همه ابعاد فرآیندهای فیزیولوژیکی سلول مرتبط است که شامل ایمنی گیاهی نیز می‌شود. اتوفاژی از راه‌های متفاوتی درگیر در ایمنی گیاهی است. ژن ۶ مرتبط با اتوفاژی (ATG6)، که BECLIN1 نامیده می‌شود و هسته اصلی اتوفاژی است، با پروتئین B اینکلوژن هسته‌ای (NIb)، که RdRp مربوطبه TuMV است، برای مهار تکثیر ویروس برهمکنش دارد. ژن ۸ مرتبط با اتوفاژی (ATG8) به‌طور اختصاصی با βC1 وابسته‌به ویروس پیچیدگی برگ کتان (CLCuMuV)، برهمکنش دارد و از همانندسازی ویروس ممانعت می‌کند (۱۶). گیرنده کارگو (محموله پروتئینی) اتوفاژی، یعنی NBR1[2]، هم CP مونتاژ نشده و اجزای ویروسی CaMV را هدف قرار می-دهد تا باعث تخریب آن‌ها توسط اتوفاژی شود و درنتیجه ایجاد آلودگی توسط CaMV را محدود کند (۱۱). علاوه‌بر-این NBR1، تجمع TuMV را ازطریق هدف قرار دادن HcPro سرکوب می‌کند که بنظر می‌رسد مرتبط با گرانول‌های RNA القاشده توسط ویروس باشد (۴).

تداخل[3] بین سدهای دفاعی مختلف ضدویروسی

مکانیسم‌های ضدویروسی گیاهی جدا از هم عمل نمی‌کنند و یک برهمکنش قدرتمندی بین برنامه‌های دفاعی مختلف وجود دارد. به‌طور کلی سه نوع برهمکنش وجود دارد. اول این‌که، جزئی از یک مسیر ضدویروسی معمولاً توسط مسیرهای دیگر تنظیم می‌شود. برای مثال ترانویسی ژن‌های R با miRNAهایی مانند miR472 تنظیم می‌شود و مورد عمل متقابل siRNA هم قرار خواهد گرفت یا تکثیر siRNAها به‌وسیله آنزیم RdRp6 گیاه و همچنین بیان اجزای مسیر خاموشی RNA که به‌وسیله پاسخ‌های ایمنی ذاتی تنظیم می‌شود. دوم اینکه، یک مکانیسم نیازمند عمل مسیرهای دیگر می‌باشد. به‌عنوان مثال، HR مربوطبه پاسخ-

[1] PLANT U-BOX13

[2] Neighbor of BRCA1

[3] Cross-Talking

های ایمنی ذاتی توسط اتوفاژی و تنش‌های شبکه آندوپلاسمی تنظیم می‌شود (۱۰). سرانجام مهمتر از همه، انواع مختلفی از مکانیسم‌ها با هم، جهت مقابله با ویروس-های گیاهی مشارکت می‌کنند. به‌عنوان مثال، ایجاد SAR شامل ایمنی ذاتی القا شده به‌واسطه SA، خاموشی RNA و حتی مسیر ترشح پروتئین می‌باشد (۱۹). همچنین SA درگیر در تنظیم رشد گیاهی به‌وسیله کنترل بیوسنتز جیبرلیک اسید ازطریق RNAهای کوچک گیاه در پاسخ ضدویروسی به پوتی‌ویروس‌ها است (۷). یک پروتئین شبه‌کالمودلین تنظیم‌کننده خاموشی ژن (rgs-CaM)، پاسخ متقابلی به VSRهای درون‌سلولی را از طریق اتصال به دومین‌های متصل‌شونده به dsRNA می‌دهد که ازاین‌طریق تخریب آن‌ها را از طریق مسیر اتوفاژی میانجی‌گری و همچنین پاسخ‌های ضدویروسی وابسته‌به SA را آغاز می-کند. تداخل پیچیده و پویا بین انواع مکانیسم‌های دفاعی، این امکان را به گیاه می‌هد که پاسخی سریع و کارآمد به آلودگی‌های ویروسی داشته باشد و مبادله بین مکانیسم‌های دفاعی و نمو عادی را به حداقل برساند (۲۷).

پاسخ متقابل ویروس به دفاع گیاهی

جهش؛ یک مکانیسم اصلی جهت فرار از سیستم ضدویروسی میزبان

ویروس‌های RNAدار گیاهی و جانوری به‌دلیل خاصیت عدم ویرایش[1] RdRpهای ویروسی با درجه جهش بالایی نسبت به میزبانی دارند که به وسیله DNA پلی‌مراز همانند-سازی می‌کنند (۱۱). ویروس‌های DNAدار هم مانند جیمنی‌ویروس‌ها و نانوویروس‌ها می‌توانند به‌همان سرعت همتایان RNAدار خود، تکامل یابند (۴). همانطور که در بخش قبلی بیان شده مکانیسم های ضدویروسی گیاهی شامل PTI و ETI و مقاومت مرتبط با ADVRP به‌طورتقریبا منحصربفردی با شناسایی یک توالی کوتاه ویژه‌ای میان پروتئین ویروسی به‌وسیله PRRها، R پروتئین‌ها یا ADVRPبرانگیخته می‌شوند. درنتیجه برای ویروس‌های گیاهی تغییر آمینواسیدهای مسئول شناسایی میزبان برای فرار از پاسخ ایمنی میزبان آسان است که این پدیده شکست مقاومت نامیده می‌شود. به‌طور مثال می‌توان به تغییر یک آمینواسید در پروتئین ویروسی متصل‌به ژنوم (VPg) مربوط‌به ویروس پیسک زرد زنگ برنج (RYMV, a *Sobemovirus*) اشاره کرد که منجربه ازدست‌رفتن مقاومت لاین *Oryza glaberrima* Tog7291 شده است که یک ژن مقاومت RYMV2 را حمل می‌کند (۱۰). همچنین می‌توان به شکست مقاومت نیشکر به‌واسطه Rz1 ایجاد شده علیه آلودگی ویروس *Beet necrotic yellow vein* virus (BNYVV, a *Benyvirus*) که ناشی‌از یک جهش تکی در p25 توالی کد-کننده آن است، اشاره کرد. (۷).

مهار ایمنی ذاتی

اخیرا پروتئین‌های متعددی مانند CP مربوط‌بهPPV، MP متعلق‌به CMV و P6 جداشده از TMV توانایی تداخل با مسیر پیام‌رسانی PTI گیاهی که شامل تولید ROS و تجمع SA و درنهایت حساسیت میزبان به دیگر پاتوژن‌ها است را از خود نشان داده‌اند. بااین‌حال، هدف درون‌سلولی این پروتئین‌های ویروسی و اینکه چگونه آن‌ها PTI را سرکوب می‌کنند هنوز مبهم است. اخیراً مشخص شده است که پروتئین NIb مربوط‌به TuMV می‌تواند پاسخ‌های ایمنی میزبان را سرکوب کند. علاوه‌براین نقش آن در پردازش یک فاکتور میزبانی که تعدیل‌کننده کوچک شبه‌یوبی‌کوئیتین ۳ (SUMO3) است، مشخص شده است. Nlb می‌تواند با SUMO3 برهمکنش داده و آن‌را ازطریق موتیف برهمکنش‌کننده SIM[2] در انتهای کربوکسیلی مربوط‌به پروتئین ویروسی سوموئیله کند. به‌طور قابل‌توجهی، سرکوب پاسخ‌های ایمنی میزبان به‌وسیله NIb وابسته به سومودیله شدن باواسطه SUMO3 است (۲۰).

سرکوب و بهره‌برداری از سیستم خاموشی RNA میزبان

خاموشی RNA ضدویروسی عمدتاً در سیتوپلاسم جایی‌که همانندسازی اکثر ویروس‌های RNAدار گیاهی اتفاق می افتد، انجام می‌گیرد. برای مقابله با خاموشی RNA میزبان، همانندسازی اکثر ویروس‌های RNAدار مثبت تک‌رشته‌ای (ssRNA+) در اجسام غشایی اینکلوژن (اینکلوژن بادی، اجسام کریستالی)، وزیکول‌ها، اجسام چندحفره‌ای (چند-وزیکولی) و یا اسفرول‌ها انجام می‌شود. این مکان‌های همانندسازی ویروس که توسط غشا محافظت می‌شوند، امکان ظاهر شدن و دیده شدن dsRNA، که به‌وسیله RdRp ویروسی تولید شده است، را به حداقل می‌رسانند و اجازه

[1] Proofreading

[2] SUMO-interacting motif

هدف‌گذاری آن توسط پروتئین‌های DCL برای برانگیختن سیستم خاموشی RNA را نمی‌دهند. ویروس لکه قرمز ایتالیایی میخک (CIRV) و ویروس کوتولگی کپه‌ای گوجه-فرنگی (TBSV) که از یک جنس می‌باشند و ساختار ژنومی بسیار یکسان و استراتژی همانندسازی و نیز اجزای همسان دارند، بااین‌حال این دو ویروس به‌ترتیب از غشای میتوکندریایی و پراکسی‌زومی برای تکثیر خود استفاده می-کنند (۲۰). درضمن ویروس‌های TuMV (*Potyviridae*) و BMV (*Bromoviridae*) و TMV (*Virgaviridae*) برای همانندسازی، وزیکول‌ها یا ساختارهای شبه‌اندامک مشتق-شده از شبکه اندوپلاسمی را به کار می‌گیرند. درنتیجه غشای داخلی به‌طور کاملا تصادفی توسط ویروس برای فرار از فشار تکاملی ایجاد شده توسط خاموشی RNA میزبان انتخاب می‌شود. اختلال و آشفتگی در غشاهای درونی گیاه به‌خصوص غشای شبکه اندوپلاسمی (ER) توسط ویروس، معمولا پاسخ‌های تنش ER را به‌راه می-اندازد که همچنین این پاسخ‌ها در واکنش گیاه به دیگر تنش‌های زنده و غیرزنده و نمو عادی، درگیر هستند (۳). همچنین مطالعات انجام شده نشان داده است که پاسخ‌های تنش ER درواقع تکثیر ویروس را افزایش می‌دهند که نشان می‌دهد مسیر سیگنال تنش ER توسط ویروس‌های گیاهی جهت منافع خودشان مورد سوءاستفاده قرار می‌گیرد (۲۰).

جایگاه‌های غشایی تکثیر ویروس جهت تضمین همانندسازی قدرتمند ویروس کافی نیست، زیرا میزان زیاد و غیرعادی RNA ویروسی در سلول گیاهی می‌تواند خاموشی RNA را در سلول گیاهی از طریق سنتز de novo، RNA دورشته‌ای توسط RdRp میزبان به راه اندازد که به-نوبه خود مانع از سنتز پروتئین و مونتاژ اجزای ویروسی می‌شود. برای مثال، موتانت CMV که فاقد پروتئین سرکوب‌کننده خاموشی RNA (2b) است، فقط می‌تواند همانندسازی کند ولی آلودگی فراگیر آن، راندمان بسیار پایینی دارد (۱۲). به‌طور قابل‌توجهی بیشتر ویروس‌های گیاهی شامل ویروس‌های RNAدار و DNAدار، یک یا تعداد بیشتری VSR را تکامل و بهبود داده‌اند تا به‌طور مستقیم، مکانیسم خاموشی RNA میزبان را مسدود کنند. تعداد زیادی از VSRهای تولید شده توسط ویروس‌های گیاهی مختلف، شناسایی و توصیف شده‌اند. VSRهایی که توسط ویروس‌های مختلف کد می‌شوند هیچ شباهت ساختاری یا توالی آمینواسیدی را نشان نداده‌اند که نشان می‌دهد آن‌ها منشا مستقلی دارند. بااین‌حال VSRها می-توانند براساس مکانیسم عملشان به دو گروه تقسیم شوند. گروه اول شامل VSRهایی هستند که ازطریق تک‌رشته‌ای کردن RNAهای دورشته‌ای ویروسی و یا vsiRNA و اختلال در پیدایش آن‌ها عمل کنند که از این گروه می‌توان به p19 مربوط‌به *Tombusviruses* وNS3 از *Enuiviruses* اشاره کرد. گروه دوم شامل آن‌هایی هستند که ازطریق فروپاشی و تخریب اجزای سیستم خاموشی RNA عمل می‌کنند که این گروه VPg مربوط‌به *Potyviruses* و یا TGBp1 (p25) متعلق‌به *Potexviruses* را دربر می‌گیرند. البته بعضی از VSRها مانند HcPro متعلق‌به *Potyviruses* می-توانند هم vsiRNA/dsRNA را متوقف و هم در اجزای خاموشی RNA اختلال ایجاد کنند. ویروس‌های گیاهی، سیستم خاموشی RNA میزبان را از دو طریق جهت ارتقای همانندسازی خود مورد بهره‌برداری و سوءاستفاده قرار می-دهند. این موارد شامل تنظیم بیان miRNA داخلی و سرکوب بیان ژن داخلی به‌واسطه vsiRNAهای مداخله‌گر کوچک مشتق‌شده از ویروس است. یک مثال از این موارد آلودگی، ویروس لکه قرمز ارکیده (CymRSV, a *Tombusvirus*) است که دارای VSR (p19) می‌باشد و می-تواند به‌طور اختصاصی بیان miR168 را جهت کاهش رونوشت‌های AGO1 که هدف miR168 است را افزایش بیان دهد (۱۳).

جلوگیری از سرکوب ترجمه

ویروس‌های گیاهی همچنین استراتژی‌های غیرمتعارف متنوعی را تکامل و توسعه داده‌اند که هم وابسته و هم مستقل از CAP می‌باشند تا بتوانند ماشین ترجمه میزبان برای سنتز کارآمد پروتئین‌های خود را به خدمت بگیرند (۹). پروتئین NSP یک پروتئین غشایی کدشده توسط جیمنی‌ویروس‌ها می‌باشد که سرکوب ترجمه سیله NIK1 را خنثی و بی‌اثر می‌کند (۱۱). این NSP به‌طور مستقیم به دومین کیناز NIK1 متصل و از فعالیت آن جلوگیری می‌کند و متعاقبا مسیر پیام‌رسانی پایین‌دست را با ایجاد اختلال در فسفریلاسیون باقی‌مانده ترئونین کلیدی واقع در موقعیت ۴۷۴ متوقف می‌کند (۲۱). برهمکنش NSP-NIK درمیان همولوگ‌های NIK و NSP جیمنی‌ویروس‌ها از میزبان‌های

مختلف حفاظت‌شده است که نشان می‌دهد سرکوب ترجمه به‌واسطه NIK یک دفاع ضدویروسی عمومی گیاهی است که به‌طور موفقیت‌آمیزی بر جیمنی‌ویروس‌ها غلبه می‌کند. بنابراین NIK می‌تواند یک کاندید ممتاز برای بهبود و توسعه مقاومت گسترده درمقابل جیمنی‌ویروس‌ها باشد (۷).

پیشگیری و استفاده از مسیرهای اتوفاژی و یوبی‌کوئیتیناسیون میزبان

ویروس‌های گیاهی، استژاتژی‌های متعددی جهت فروپاشی و انهدام ماشین ضدویروسی به‌واسطه اتوفاژی و یوبی-کوئیتیناسیون، مانند کدکردن دیوبی‌کوئیتینازهایی که پروتئین‌های درونی و ویروسی مختلف را هدف قرار می-دهند، را دارند. برای مثال، تخریب باواسطه یوبی‌کوئیتینه شدن p66، TYMV می‌تواند با برهمکنش با 98k RdRp ویروسی که یک آنزیم دیوبی‌کوئیتین کننده نیز می باشد، خنثی و بی‌اثر شود. ازطرف دیگر، پروتئین βC1 مسیر یوبی‌کوئیتیناسیون گیاهی را با برهمکنش با SPK1 مختل می‌کند و آلودگی جیمنی‌ویروس را ازطریق جلوگیری از یوبی‌کوئیتیناسیون خود به‌واسطه NtRFP، افزایش می‌دهد. بااین‌حال، NBR آلودگی TuMV را به‌وسیله هدف قراردادن پروتئین HcPro، سرکوب می‌کند. اگرچه، تخریب HcPro به‌واسطه NBR1 می‌تواند به‌وسیله دیگر پروتئین‌های ویروسی مانند VPsو 6k2 نیز سرکوب شود. پروتئین P6 به عنوان فاکتور اصلی بیماری‌زایی CaMV اتوفاژی وابسته‌به SA را سرکوب می‌کند. این موضوع نشان‌دهنده محدودیت تکثیر CaMV ازطریق اتوفاژی است که می‌تواند توسط P6 کاهش یابد (۱۹). پروتئین P0 مربوطبه ویروس-های *Poleroviruses* و*Enamoviruses*، یک پروتئین حاوی دومین F-box و PVX TGBp1 می‌باشد که پروتئین‌های AGO را برای تخریب ازطریق مسیرهای اتوفاژی و پروتئازوم وابسته‌به یوبی‌کوئیتین را هدف قرار می‌دهد (۱۲). پروتئین VPg مربوطبه Potyviruses، سرکوب‌کننده خاموشی ژن ۳ (SGS3) را برای تخریب به‌واسطه مسیرهای اتوفاژی و یوبی‌کوئیتیناسیون به‌کار می‌برد (۳). اخیراً یانگ و همکاران نشان دادند که پروتئین γb که توسط ویروس موزاییک نواری جو (BSMV, a *Hordeivirus*) کد می‌شود می‌تواند اتوفاژی میزبان را ازطریق اختلال در برهمکنش بین ATG7 وATG8 که دو تنظیم‌کننده کلیدی این فرآیند هستند از بین ببرد تا آلودگی ویروسی افزایش یابد (۲۲).

نتیجه گیری و چشم‌انداز

دفاع گیاه دربرابر ویروس‌ها درمقایسه با دفاع آن‌ها درمقابل پاتوژن‌های سلولی مانند باکتری‌ها و قارچ‌ها پیچیده‌تر است که ظاهراً به‌دلیل این است که ویروس‌های گیاهی پارازیت-های درون‌سلولی هستند که همه مواد ژنتیکی آن‌ها به‌طور مستقیم با فاکتورهای درون‌سلولی گیاه در ارتباط می‌باشند. اگرچه این برهمکنش مستقیم، به گیاهان این امکان را می-دهد که مکانیسم‌های دفاعی جدیدی را توسعه دهند که فاکتورهای ویروسی را هدف قرار دهند، اما کمک می‌کند که ویروس‌های گیاهی نیز از مزایای این برهمکنش جهت کشف نقاط ضعف سدهای دفاعی ضدویروسی گیاه سود ببرد و از پلی‌مرازهای فاقد ویرایش خود و پروتئین‌های چندعملکردی برای فرار سریع از سدهای دفاعی میزبان استفاده و بهره‌برداری کند و برنده این مسابقه تسلیحاتی و نبرد شود (۱۷). ظهور ویروس های جدید نیز مشکلات مبارزه با ویروسها را توسط گیاه پیچیده تر و مشکل تر می‌کند (۱۸). همچنین آلودگی مخلوط گیاه توسط چندین ویروس نیز سیستم دفاعی گیاهی را بیشتر تضعیف می‌کند (۱۶). هدف نهایی پژوهش‌ها در راستای شناخت برهمکنش‌های ویروس– گیاه و اتخاذ استراتژی‌هایی جهت مقاومت ویروسی پایدار جهت تضمین امنیت غذایی برای جمعیت روبه رشد انسانی می‌باشد. در این راستا، موفقیت-های قابل‌توجه و مهمی در مدیریت بیماری‌های ویروسی بسیاری از محصولات کشاورزی بدست آمده است (۶).

منابع

1. Allan, A. C., Lapidot, M., Culver, J. N., & Fluhr, R. (2001). An early *Tobacco mosaic virus*-induced oxidative burst in tobacco indicates extracellular perception of the virus coat protein. *Plant Physiology*, *126*(1), 97-108.

2. Boutrot, F., & Zipfel, C. (2017). Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annual review of phytopathology*, *55*, 257-286.

3. Brosseau, C., & Moffett, P. (2015). Functional and genetic analysis identify a role for *Arabidopsis* ARGONAUTE5 in antiviral RNA silencing. *The Plant Cell*, *27*(6), 1742-1754

4. Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, *124*(4), 803-814.

5. Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, *11*(8), 539-548.

6. Görschen, E., Dunaeva, M., Hause, B., Reeh, I., Wasternack, C., & Parthier, B. (1997). Expression of the ribosome-inactivating protein JIP60 from barley in transgenic tobacco leads to an abnormal phenotype and alterations on the level of translation. *Planta*, *202*(4), 470-478.

7. Gouveia, B. C., Calil, I. P., Machado, J. P. B., Santos, A. A., & Fontes, E. P. (2017). Immune receptors and co-receptors in antiviral innate immunity in plants. *Frontiers in microbiology*, *7*, 2139.

8. Kørner, C. J., Klauser, D., Niehl, A., Domínguez-Ferreras, A., Chinchilla, D., Boller, T., ... & Hann, D. R. (2013). The immunity regulator BAK1 contributes to resistance against diverse RNA viruses. *Molecular plant-microbe interactions*, *26*(11), 1271-1280.

9. Lageix, S., Lanet, E., Pouch-Pélissier, M. N., Espagnol, M. C., Robaglia, C., Deragon, J. M., & Pélissier, T. (2008). Arabidopsis eIF2α kinase GCN2 is essential for growth in stress conditions and is activated by

10. Li, J., Huang, H., Zhu, M., Huang, S., Zhang, W., Dinesh-Kumar, S. P., & Tao, X. (2019). A plant immune receptor adopts a two-step recognition mechanism to enhance viral effector perception. *Molecular plant*, *12*(2), 248-262.

11. Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., & Dinesh-Kumar, S. P. (2002). Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to *Tobacco mosaic virus*. *The Plant Journal*, *30*(4), 415-429.

12. Molnar, A., Melnyk, C. W., Bassett, A., Hardcastle, T. J., Dunn, R., & Baulcombe, D. C. (2010). Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *science*, *328*(5980), 872-875.

13. Nakahara, K. S., & Masuta, C. (2014). Interaction between viral RNA silencing suppressors and host factors in plant immunity. *Current opinion in plant biology*, *20*, 88-95.

14. Niehl, A., Wyrsch, I., Boller, T., & Heinlein, M. (2016). Double-stranded RNA s induce a pattern-triggered immune signaling pathway in plants. *New Phytologist*, *211*(3), 1008-1019.

15. Perraki, A., Gronnier, J., Gouguet, P., Boudsocq, M., Deroubaix, A. F., Simon, V., ... & Germain, V. (2018). REM1. 3's phospho-status defines its plasma membrane nanodomain organization and activity in restricting PVX cell-to-cell movement. *PLoS pathogens*, *14*(11), e1007378.

16. Salehzadeh, M. (2018). Survey on presence of Cucumber mosaic virus (CMV) in single and mixed infections with potyviruses in North-West of Iran. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, *7*(2), 163-173.

17. Salehzadeh, M., & Dehghanpour Farashah, S. (2019). Pathogenic Effectors in Plant-Pathogenic Fungi and Viruses. *Journal of Biosafety*, *11*(3), 55-70.

18. Salehzadeh, M., Afsharifar, A., Dehghanpour Farashah, S., & Rezaei, M. (2022). The first report of the Chilli leaf curl virus and its beta satellite from bell peppers and tomatoes from the central provinces of Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, *57*(4), 337-341.

19. Sarris, P. F., Cevik, V., Dagdas, G., Jones, J. D., & Krasileva, K. V. (2016). Comparative analysis of plant immune receptor architectures uncovers host proteins likely targeted by pathogens. *BMC biology*, *14*(1), 8.

20. Shirasu, K. (2009). The HSP90-SGT1 chaperone complex for NLR immune sensors. *Annual review of plant biology*, *60*, 139-164.

21. Soosaar, J. L., Burch-Smith, T. M., & Dinesh-Kumar, S. P. (2005). Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 789-798.

22. Stirpe, F., & Gilabert-Oriol, R. (2015). Ribosome-inactivating proteins: an overview. *Gopalakrishnakone P, Carlini CR, Ligabue-braun R. Plant Toxins. Dordrecht*, 1-29.

23. Tang, D., Wang, G., & Zhou, J. M. (2017). Receptor kinases in plant-pathogen interactions: more than pattern recognition. *The Plant Cell*, *29*(4), 618-637.

24. Woo, J. Y., Jeong, K. J., Kim, Y. J., & Paek, K. H. (2016). CaLecRK-S. 5, a pepper L-type lectin receptor kinase gene, confers broad-spectrum resistance by activating priming. *Journal of experimental botany*, *67*(19), 5725-5741.

25. Wu, C. C., Singh, P., Chen, M. C., & Zimmerli, L. (2010). L-Glutamine inhibits beta-aminobutyric acid-induced stress resistance and priming in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, *61*(4), 995-1002.

26. Yang, H., Gou, X., He, K., Xi, D., Du, J., Lin, H., & Li, J. (2010). BAK1 and BKK1 in Arabidopsis thaliana confer reduced susceptibility to turnip crinkle virus. *European journal of plant pathology*, *127*(1), 149-156.

27. Zamora, M., Méndez-López, E., Agirrezabala, X., Cuesta, R., Lavín, J. L., Sánchez-Pina, M. A., & Valle, M. (2017). Potyvirus virion structure shows conserved protein fold and RNA binding site in ssRNA viruses. *Science advances*, *3*(9), eaao2182.

28. Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends in immunology*, *35*(7), 345-351.

Molecular conflict of plant pathogens with host plants

Mehrdad salehzadeh[1*], Saeedeh dehghanpour farashah[2]

[1] Plant Virology Research Center, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, I.R. of Iran.

[2] Dept. of Agriculture, Payame Noor University, Thehran, I.R. of Iran.

Abstract

Plant viruses are obligate intracellular parasites that depend exclusively on the host cell to complete their infection cycle, such as the expression of genomic information, genome replication, and intercellular movement. During the infection, a wide and competitive network of protein-protein and protein-nucleic acid interactions is created between the virus and the plant. Generally, this interaction network includes mechanisms through which the plant creates antiviral responses and the virus uses host factors to multiply and overcome the host's antiviral responses. Takes understanding this interactive network between plant and virus is one of the key goals of virology to better and safely deal with plant viruses. Plant viruses have acquired various strategies to suppress and even exploit the host's defense system to guarantee and ensure their survival. Having a better understanding of the defense and interaction (anti-defense) of plants and viruses will clearly be useful for improving and developing effective broad-spectrum resistance against viruses for sustainable agriculture. In this article, a summary of the latest scientific achievements related to defense and anti-defense between viruses and plants is presented.

Keywords: Plant viruses, Defense systems, Virology, Resistance.

تحقیق در زمینه یک بیماری همه‌گیر

حورا بحرالعلوم، ساقی نورایی، سعید امین زاده*

تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، گروه مهندسی زیست فرایند

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۱۱

چکیده

برای حرکت روبه‌جلو در درمان بیماری کرونا ویروس ۲۰۱۹ (Covid-19) و بهبود نتایج بالینی بیماران، به مطالعات بیشتری مانند ارزیابی تصادفی درمانCOVID-19 (RECOVERY) نیاز است. این روش برای ارزیابی اثرات درمان‌های بالقوه دگزامتازون در بیماران بستری در بیمارستان Covid-19 توسط گروه همکاری‌های Recovery طراحی‌شده است .اصل زیربنایی چنین آزمایشاتی این امکان را فراهم می‌کند که با ثبت‌نام سریع جمعیت و جمع‌آوری حداقل داده‌ها برای پاسخگویی به بیش از یک سؤال، طرح‌های کارآمد و ارزان‌تری انجام شود .این‌ها اصول معقولی هستند و در صورت موفقیت، به آزمایشاتی منجر می‌شوند که پاسخ روشن، به‌موقع و کارآمد برای چندین سال ارائه می‌دهند.

کلیدوازگان: کرونا وریروس، بیماری همه گیر

* مترجم مسئول، پست الکترونیکی: aminzade@nigeb.ac.ir

ادبیات فعلی، در مورد درمان بیماری کرونا ویروس (Covid-19) پرشده است از گزارش‌هایی از موفقیت‌های درمانی در آزمایشات بالینی با تعداد کم بیماران و مطالعات مشاهده‌ای کوهورت (جامع) که مدعی بر تأثیرگذاری آن هستند، اما اثرات مخدوش‌کننده‌های ناشناخته کمتر قابل‌توجه است. برای پیشرفت در این زمینه و بهبود نتایج بیماران، لازم است مطالعات کوچک یا بی‌نتیجه کمتری انجام شود و مطالعات بیشتری مانند آزمایش دگزامتازون که اکنون توسط گروه همکاری RECOVERY در ژورنال گزارش‌شده است؛ وجود داشته باشد.

در آزمایشRECOVERY، مزیت گلوکوکورتیکوئید دگزامتازون برای بیماران مبتلا به Covid-19 که در زمان تصادفی سازی تهویه مکانیکی(اکسیژن) دریافت می‌کردند، به‌وضوح نشان داده شد. مرگ‌ومیر ۲۸ روزه در ۲۲/۳ ٪ بیماران در گروه دگزامتازون در مقایسه با ۴۱/۴ ٪ در گروه مراقبت معمول گزارش‌شده است. در مقابل، هیچ مزیتی برای دگزامتازون در بیمارانی که در زمان تصادفی سازی نیاز به اکسیژن نداشتند، با مرگ‌ومیر ۲۸ روزه در ۱۷/۸٪ و ۱۴٪/۰ برای گروه دگزامتازون و گروه مراقبت معمول دیده نشد. برای گروه ناهمگن بیمارانی که اکسیژن را بدون تهویه مکانیکی تهاجمی دریافت می‌کردند، میزان مرگ‌ومیر در گروه دگزامتازون ۲۳/۳ ٪ و در گروه مراقبت معمول ۲۶/۲ ٪ بوده است. این یافته‌ها، اگرچه فقط به بیماران مبتلا به Covid-19 محدود می‌شود، اما به‌وضوح زمینه‌ای را برای بحث و کنکاش درزمینه درمان فراهم می‌کند و احتمالاً منجر به نجات جان موارد بیشتری خواهد شد. استفاده از دگزامتازون قبلاً توسط چندین پنل راهنمای درمان، ازجمله آن‌هایی که توسط انستیتوهای ملی بهداشت ایالات‌متحده تشکیل‌شده بود تأیید شده است.

آزمایش RECOVERY و آزمایش تصادفی و کنترل شده داروی remdesivir که اخیراً منتشرشده است، راهنمایی روشنی در مورد استراتژی‌های درمانی Covid-19 همراه با بینش در مورد پاتوژنز بیماری ارائه می‌دهد.Remdesivir یک داروی ضد ویروسی مستقیماً عمل‌کننده، مطلوب‌ترین اثر را در بیماران Covid-19 بستری‌شده در بیمارستان و مبتلا به بیماری ریوی متوسط دارد. این اثر احتمالاً مربوط به زمانی در عفونت است که همانندسازی ویروسی فرآیند بیماری‌زایی را پیش می‌برد. در مقابل، دگزامتازون ضد التهاب و سرکوب‌کننده سیستم ایمنی بیش‌ترین اثر درمانی خود را در بیمارانی دارد که بیماری پیشرفته‌تری دارند؛ زمانی که اثرات بیماری‌زا ممکن است توسط پاسخ‌های ایمنی و التهابی ایجاد شود.

آزمایش RECOVERY با ثبت‌نام تعداد زیادی از بیماران در یک آزمایش ساده در مقایسه تعداد کمتری از بیماران در یک مطالعه پیچیده‌تر و سخت‌تر، رویکردی برای تحقیقات بالینی دارد که در زمینه بیماری‌های قلبی عروقی رایج شده

است.[۴] هر دو رویکرد نقاط قوت و ضعف دارند. آزمایش‌های ساده بزرگ به ویژه برای پرداختن به سؤالاتی از جمله اینکه یک داروی مورداستفاده مجدد یا یک روش استاندارد دارای ارزش باشد بسیار مفید است، درحالی‌که رویکرد اخیر بیشتر مناسب مطالعه عوامل جدیدی است که ممکن است مکانیسم اثر درمانی آن‌ها نامشخص باشد. علاوه بر این، آزمایش RECOVERY از یک پلتفرم یا یک رویکرد پروتکل اصلی استفاده می‌کند که با ظهور داده‌ها از آزمایش یا با در دسترس قرار گرفتن عوامل جدید، عوامل می‌توانند از تصادفی سازی اضافه یا کم شوند. علاوه بر گزارش فعلی اثر دگزامتازون، محققان RECOVERY عدم اثربخشی هیدروکسی کلروکوین و لوپیناویر–ریتوناویر را گزارش کرده‌اند و همچنان به مطالعه نقش دگزامتازون در کودکان و همچنین نقش آزیترومایسین، توسیلیزوماب و پلاسما درمانی می‌پردازند.[۱] کلید موفقیت در دوره آزمایشی RECOVERYسرعت ثبت‌نام در آن بوده است. توانایی ثبت‌نام سریع هزاران بیمار در این آزمایش بدون شک توسط سرویس بهداشت ملی در انگلستان و این واقعیت که این آزمایش برای کل جمعیت بیمار کشور در دسترس بود، تسهیل شد. همان‌طور که توسط نویسندگان ذکرشده است، ۱۵٪ از کل بیمارانی که با Covid-19 در انگلستان بستری‌شده بودند؛ در این آزمایش ثبت‌نام شدند.

یک‌بار به‌طور گسترده‌ای تصدیق شد که محل شیوع، یک مکان مناسب برای انجام تحقیقات دقیق بالینی نیست، زیرا وقتی افراد می‌میرند باید به هر روش درمانی احتمالی "فرصتی داده شود" تا از راه‌های دقیق تری مطالعه شوند. در مورد شیوع ابولا در آفریقای غربی، زمانی که بسیاری از مطالعات کوچک آغاز شد و تعداد آن‌ها کم بود، نتایج قطعی ارائه داند. بررسی کامل آن وضعیت توسط آکادمی‌های ملی علوم، مهندسی و پزشکی ایالات‌متحده به این نتیجه رسید که "آزمایشات تصادفی و کنترل شده مطمئن‌ترین راه برای شناسایی مزایا و خطرات نسبی محصولات تحقیقاتی و غیره هستند و باید تلاش شود تا آن‌ها را در جریان همه‌گیری‌ها پیاده کنیم."[۵] این یافته‌ها توسط جامعه تحقیقات جهانی تأیید شد و منجر به یک آزمایش کاملاً تصادفی شده، کنترل شده در طی شیوع ابولا در جمهوری دموکراتیک کنگو شد که دو روش درمان مؤثر را مشخص کرد.[۶]

علی‌رغم کاهش مرگ و عوارضی که احتمالاً درنتیجه درمان مناسب بیماران مبتلا با رمدسیور و دگزامتازون است؛ تعداد زیادی از افراد مبتلا به Covid-19 خواهند مرد. این مسئولیت ما در جامعه تحقیقات پزشکی جهانی است که به سرعت، امیدوارکننده‌ترین عوامل درمانی و واکسن‌ها را علیه این بیماری طراحی، اجرا و کامل کنیم. این عوامل شامل آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، عوامل سرکوب‌کننده سیستم ایمنی با اختصاصیت بیشتر و واکسن‌های ساخته‌شده روی پلتفرم‌هایی از اسیدهای نوکلئیک گرفته تا پروتئین‌ها تا ویروس‌های نوترکیب هستند. چنین تلاش‌هایی از هماهنگی ملی و جهانی و مشارکت‌های عمومی و خصوصی، ازجمله تسریع در مداخلات درمانی و واکسن‌های Covid-19 در ایالات‌متحده (ACTIV)[۷]، پلتفرم ACCORD (تسریع در تحقیق و پیشرفت در Covid-19) در انگلستان[۸] و تلاش همبستگی توسط سازمان جهانی بهداشت[۹] بهره‌مند می‌شود.

تحقیقات بالینی از نظر علمی قوی و از نظر اخلاقی سریع‌ترین و کارآمدترین راه برای درمان و پیشگیری از استراتژی‌های مؤثر برای بیماران مبتلا به Covid-19 است.

فرم‌های ارائه‌شده توسط نویسندگان با متن کامل این سرمقاله در NEJM.orgموجود است.

از بخش تحقیقات بالینی، انستیتوی ملی آلرژی و بیماری‌های عفونی (NIAID) (H.C.L.) و دفتر مدیر، NIAID (A.S.F.)، انستیتوهای ملی بهداشت، بتسدا، MD.

این سرمقاله در ۱۷ ژوئیه سال ۲۰۲۰، در NEJM.org منتشر شد.

این مقاله ترجمه ای است از:

Research in the Context of a Pandemic. The New England Journal of Medicine, nejm.org on July 18, 2020

منابع

1. The RECOVERY Collaborative Group. Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19 —preliminary report. N Engl J Med. DOI: 10.1056/NEJMoa2021436.

2. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) treatment guidelines. Bethesda, MD: National Institutes of Health (https://www .covid19treatmentguidelines.nih.gov).

3. Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, et al. Remdesivir for the treatment of Covid-19 — preliminary report. N Engl J Med. DOI: 10.1056/NEJMoa2007764.

4. Peto R, Collins R, Gray R. Large-scale randomized evidence: large, simple trials and overviews of trials. J Clin Epidemiol 1995; 48: 23-40.

5. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. Integrating clinical research into epidemic response: the Ebola experience. Washington, DC: National Academies Press, 2017.

6. Mulangu S, Dodd LE, Davey RT Jr, et al. A randomized, controlled trial of Ebola virus disease therapeutics. N Engl J Med 2019; 381:2293-303.

7. Collins FS, Stoffels P. Accelerating COVID-19 therapeutic interventions and vaccines (ACTIV): an unprecedented partnership for unprecedented times. JAMA 2020; 323: 2455-7.

8. COVID-19 treatments could be fast-tracked through new national clinical trial initiative. Press release of the U.K. Department of Health and Social Care, April 29, 2020 (https://www.gov .uk/government/ news/covid-19-treatments-could-be-fast -tracked-through-new-national-clinical-trial- initiative).

9. "Solidarity" clinical trial for COVID-19 treatments. Geneva: World Health Organization, 2020 (https://www .who .int/ emergencies/ diseases/ novel - coronavirus - 2019/ global - research - on - novel - coronavirus - 2019 - ncov/ solidarity - clinical - trial - for- covid - 19 - treatments).

DOI: 10.1056/NEJMe2024638

Research in the Context of a Pandemic

Translated by Bahrol Olom H., Noraee S. and Aminzdeh S.*

National Institute of Genetic Engineering, and Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

To move forward in the treatment of the 2019 coronavirus disease (Covid-19) and to improve the clinical outcomes of patients, more studies such as the randomized evaluation of the treatment of COVID-19 are needed. This method was designed to evaluate the effects of potential dexamethasone treatments in hospitalized Covid-19 patients by the Recovery Collaborative Group. These are reasonable principles and, if successful, will lead to experiments that provide clear, timely, and efficient answers for many years.

Key words: Coronavirus, Pandemic

مروری بر خواص پروبیوتیک جلبک اسپرولینا

بهاره نوروزی*

ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم و فناوری های همگرا، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۲۶

چکیده

اسپیرولینا یک ریز جلبک از شاخه سیانوفیت‌ها، منبع غنی از مواد مغذی آلی است. از این ریز جلبک به‌عنوان پروبیوتیک و مکمل غذایی فراسودمند که موجب افزایش رشد باکتری‌های پروبیوتیکی روده می‌شود، در صنایع غذایی استفاده‌های بسیاری می‌شود. در نتیجه هدف از این مقاله، مروری بر خواص پروبیوتیک *اسپیرولینا* در سلامت انسان است. *اسپیرولینا* شامل بیش از ۷۸ درصد پروتئین، ویتامین، ۴ تا ۷ درصد چربی، مواد معدنی، کربوهیدرات و ریزمغذی‌های بسیار است که در درمان بیماری‌هایی مانند سرطان، فشارخون، دیابت، کم‌خونی و غیره بسیار شفابخش عمل کرده است. *اسپیرولینا* با تولید اگزوپلی ساکاریدهای خارج سلولی نه‌تنها موجب افزایش تعداد و رشد باکتری‌هایی مانند *Lactobacillus bulgaricus*، *Streptococcus thermophilus*، *Lactococcus lactis*، *Lactobacillus acidophilus* و *Lactobacillus casei* می‌شود، بلکه با افزایش زنده ماندن باکتری‌های پروبیوتیک در مدت تولید و ذخیره‌سازی محصولات لبنی تخمیر شده نقش سودمندی را در صنایع غذایی ایفا می‌کند. ترکیب ریز جلبکها و پروبیوتیک ها منجر به تولید محصولات لبنی تخمیر شده ای می شود که نه تنها باعث افزایش کیفیت مواد غذایی می شود، بلکه با افزایش تعداد و زمان ماندگاری باکتری های پروبیوتیک، ارزش غذایی آنها را برای مصرف کنندگان بالا می برند.

کلیدواژگان: پری بیوتیک، پروبیوتیک، *اسپیرولینا*، سلامت انسان، ریزجلبک

* نویسنده مسئول: پست الکترونیکی: bahare77biol@yahoo.com

مقدمه

میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، مکمل غذایی زنده میکروبی هستند که با بهبود تعادل میکروبی نقش بسیار مهمی در سلامت انسان‌ها دارند. این سطح، بسته به سویه‌های استفاده‌شده و تأثیر سلامتی موردنیاز، معمولاً بین 10^8 تا 10^{11} Cfu / ml است. ماست و سایر شیرهای تخمیر شده با مواد مغذی طبیعی به‌سلامتی کمک کرده و فلور روده را با باکتری‌های اسیدلاکتیک غنی می‌کنند (۱). بنابراین، با فرض مصرف روزانه لبنیات حاوی ۱۰۰ گرم، آن‌ها باید در زمان مصرف بین 10^6 تا 10^9 Cfu / ml از این باکتری‌های زنده داشته باشند. برخی از سویه‌ها متابولیت های تقویت‌کننده سلامتی خاصی ازجمله پروتئین‌ها و اسیدهای چرب را تولید می‌کنند که ازنظر تغذیه‌ای و یا فیزیولوژیکی مطلوب هستند (۲). بااین‌حال باید تأکید کرد که بلع موجودات پروبیوتیک احتمال تولید این متابولیت های سلامتی را نیز در داخل بدن ممکن می‌کند. اثر پروبیوتیکی این میکروارگانیسم‌ها شامل جلوگیری از یبوست در افراد مسن، جلوگیری از اسهال، تحریک سیستم ایمنی، بهبود تحمل لاکتوز، کاهش سطح کلسترول در خون و پیشگیری از سرطان می‌باشد. به‌غیراز این مزایای درمانی، پروبیوتیک‌ها همچنین انسان را از بسیاری از عوامل بیماری زا محافظت می کند. برای مشاهده تأثیری مثبت پروبیوتیک‌ها بر سلامتی، یک‌میزان حداقلی از میکروارگانیسم‌های زنده ضروری است.این میزان بستگی به نژادها (سویه‌های) استفاده‌شده دارد و محدوده تأثیر بر سلامتی که ضروری می‌باشد، بین 10^8 تا 10^{11} Cfu /ml می‌باشد. آن‌ها خواص اصلاح‌کننده علیه بیماری‌های مختلفی مانند سرطان دارند.

پری بیوتیک ها غذاهایی برای باکتری‌های پروبیوتیکی هستند، آن‌ها به‌عنوان مواد غذایی غیرقابل‌هضم یا دیرهضم تلقی می‌شوند که به‌طور انتخابی باعث تحریک رشد یا فعالیت یک یا تعدادمحدودی از باکتری‌های پروبیوتیکی در پس‌روده یا کلون (colon) می‌شوند. این عمل توسط کربوهیدرات‌های قابل تخمیر که غیرقابل‌هضم یا دیرهضم هستند در روده کوچک انجام می‌شود و ترجیحاً باعث تحریک رشد یا فعالیت *bifidobacteria* و برخی باکتری‌های وابسته به باکتری گرم مثبت پروبیوتیکی می‌شوند که

مصرف آنها به انسان‌ها تجویز می‌شوند (۳). کربوهیدرات‌ها از روده کوچک به روده پایینی حرکت کرده، جایی که برای تعدادی از باکتری‌های کولون (روده بزرگ) در دسترس هستند، اما برای اکثریت باکتری‌های حاضر در کلون استفاده نمی‌شوند. لاکتولوز، گالاکتوالیگوساکاریدها، فروکتوزالیگوساکاریدها، اینولین و هیدرولیزهای آن، مالتوالیگوساکاریدها و نشاسته مقاوم، پری بیوتیک‌هایی هستند که معمولاً در تغذیه انسان استفاده می‌شوند. محصولات نهایی اصلی خارج‌شده از سوخت‌وساز کربوهیدرات، اسیدهای چرب زنجیره کوتاه برای مثال استات، بوتیرات و پروپیونات هستند که بیشتر توسط ارگانیسم میزبان به‌عنوان منبع انرژی از آن‌ها استفاده می‌شود. معروف‌ترین الیگوساکاریدها اینولین و هیدرولیزهایش و الیگوفراکتون ها (oligofructans) هستند. آن‌ها را می‌توان در سیب‌زمینی، پیاز، سیر، مارچوبه، کنگر فرنگی، تره‌فرنگی، موز، گوجه و بسیاری دیگر از گیاهان یافت (۳).

الیگوساکاریدهای پری بیوتیکی به سه روش مختلف می‌توانند ساخته شوند. با استفاده از عصاره گیری از مواد گیاهی، سنتز (oligofructans) میکروبیوژیکی یا سنتز آنزیمی و هیدرولیز کردن آنزیمی پلی‌ساکاریدها. در عمل اغلب از ترکیبات مخلوط شده‌ی پری بیوتیک‌ها به‌این‌علت که اثرات هم‌افزایی‌شان را به محصولات غذایی منتقل می‌کنند، استفاده‌شده و بدین سبب به چنین ترکیباتی سینوبیوتیک (synbiotics) گفته می‌شود. تولید پری بیوتیک‌ها در مقیاس صنعتی با چالش‌های مختلفی مواجه می‌شود، چالش‌هایی شامل استفاده از فن‌های جدید و منابع اقتصادی و تولید قیمت پایین. اغلب الیگوساکاریدها با وضعیت پری بیوتیکی، معمولاً با روش‌های آنزیمی از طریق مواد خام ارزانی چون ساکارز، لاکتوز و مشتقات گیاهی به دست می‌آیند. میزان و طبیعت الیگوساکاریدها شکل داده‌شده به ویژگی‌های مختلفی همچون منبع آنزیم و شرایط واکنش‌ها بستگی دارد. با این اوصاف فرایندهای جاری که باعث استخراج الیگوساکاریدها می‌شوند، بازده بسیار کمی دارند، بدین ترتیب پروبیوتیک‌هایی که وابسته به آب دریا و جلبک‌های وابسته به آب شیرین هستند، منابع جایگزین جذابی برای ارتقای رشد *lactobscillus* و *bifidobacterium* spp می‌باشند.

-معرفی سیانوباکتری *اسپیرولینا*

اسپیرولینا یک میکروارگانیسم فوتواتوتروفیک است که به دلیل داشتن مواد مغذی، به‌طور گسترده در طبیعت وجود دارد و توسط انسان‌ها به‌عنوان مکمل غذایی مصرف می‌شوند (۴). زیست‌توده‌ی خشک باکتری *اسپیرولینا* تقریباً حاوی ۳ تا ۷ درصد رطوبت، ۵۵ تا ۶۰ درصد پروتئین ،۶ تا ۸ درصد لیپید، ۱۲ تا ۲۰ درصد کربوهیدرات، ۷ تا ۱۰ درصد خاکستر، ۸ تا ۱۰ درصد فیبر، ۱ تا ۱۵ درصد کلروفیل و طیف وسیعی از ویتامین‌ها می‌باشد. *اسپیرولینا* سرشار از انواع پروتئین‌ها است. پروتئین‌هایی که ازنظر اقتصادی اهمیت بالایی دارند و شامل بیلی پروتئین‌ها هستند که به‌عنوان‌مثال به فیکوسیانین C و آلو فیکوسیانین که رنگ‌دانه‌های آبی این دو پروتئین محلول در آب است می‌توان اشاره کرد (۵). بخش پروتئینی ممکن است دارای۲۰ درصد فیکوسیانین باشد (۶). ترکیب اسیدهای چرب تا حد زیادی تحت تأثیر شرایط محیطی است. ۴۵ تا ۵۰ درصد از چربی های اسپرولینا را اسیدهای چرب اشباع شده و ۵۰ تا ۵۵ درصد از چربی های آن را اسیدهای چرب غیراشباع تشکیل می دهد. حداکثر ۳۰ درصد اسیدهای چرب اسپیرولینا را اسید گاما لینولنیک (Gamma-Linolenic acid) تشکیل می دهد که یک اسید چرب اشباع‌نشده نادر است. از اواخر دهه ۱۹۷۰ ، *اسپیرولینا* به‌عنوان یک ماده غذایی بی‌خطر برای انسان به بازار عرضه و مصرف می‌شود و توسط بسیاری از دولت‌ها، شرکت‌های بهداشتی و انجمن‌های حدود ۸۰ کشور ازجمله ایالات‌متحده و مجارستان برای تغذیه انسان تأییدشده است. *اسپیرولینا* دارای اثرات ضدویروسی، ضدالتهابی و ضد توموری است همچنین باعث کاهش چربی خون، قند خون، وزن بدن و زمان‌ترمیم زخم‌ها در بدن می‌شود. با همه‌ی این خواص، این سیانوباکتری به‌عنوان ماده غذایی و غذایی کاربردی شناخته می‌شوند (۶).

اسپیرولینا در دیواره سلولی خود سلولز ندارد به همین دلیل است یک ماده غذایی مناسب برای بیمارانی است که جذب روده کمی دارند. همچنین برای تغذیه بیماران سالمند مناسب و مهم است. یک پلی ساکارید با وزن مولکولی بالا و با تحریک فعالیت ایمنی از *اسپیرولینا* جداشده و املین (Emmeline) نامیده می‌شود که پلی ساکاریدی باقابلیت انحلال بسیار زیاد در آب است (۶). وزن این ماده خشک

را بین ۰/۵ تا ۲ درصد W/W اندازه‌گیری کرده‌اند. *اسپیرولینا* از گلیکوژن به‌عنوان منبع انرژی اولیه و ذخیره کربن، استفاده می‌کند. *اسپیرولینا* همچنین حاوی مقادیر زیادی از ویتامین‌ها، موادمعدنی (خصوصاً آهن)، اسیدهای چرب ضروری (به‌ویژه اسید گاما لینولئیک)، کاروتنوئیدها و کلروفیل و تعدادی از ترکیبات فعال زیستی کشف نشده است (۷). *اسپیرولینا* چربی خون را کاهش می‌دهد، فشارخون را کاهش می‌دهد، از نارسایی کلیه محافظت می‌کند، باعث رشد لاکتوباسیل روده می‌شود و سطح گلوکز سرم را کاهش می‌دهد (۶). ثابت‌شده است که مصرف *اسپیرولینا* به دلیل ترکیب شیمیایی آن شامل ترکیباتی مانند اسیدهای آمینه ضروری، ویتامین‌ها، رنگ‌دانه‌های طبیعی و اسیدهای چرب، حاوی اسید گاما لینولنیک، هورمون‌های پروستاگلاندین در بدن برای سلامتی مفید است. همچنین گزارش‌شده که *اسپیرولینا* دارای فعالیت ضدمیکروبی است اما باعث رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک در شیر تخمیر شده می‌شود (۶).

استفاده از گونه‌های مختلف *اسپیرولینا*، مانند *S. platensis* و *S. maxima* در غذاهایی مانند ماست، اشترودل، ماست پروبیوتیک کاربرد زیادی دارند (۸). *اسپیرولینا* شامل بیشتر از ۱۸ مورد از اسیدهای آمینه، پروتئین‌های باکیفیت بالا، کلسیم زیاد در مقایسه با شیر، ویتامین B_{12} بیشتر در مقایسه با کبد گاو، ویتامینه‌ای E، B_6، B_2، A و K و همچنین مواد معدنی و آنزیم‌ها است (جدول ۱). اسیدهای آمینه با کمیت محدود در *اسپیرولینا* شامل متیونین و سیستئین اند؛ با این حال مقدار آن‌ها بالاتر از غلات ،دانه‌ها، سبزی‌ها و حبوبات و لیزین آن بالاتر از همه سبزی‌ها به‌جز حبوبات است. *اسپیرولینا* اگر بافاصله چند ساعت از غذاهای دیگر خورده شود، مکمل پروتئینی گیاهی است و کیفیت اسیدآمینه را افزایش می‌دهد (۶)

تقریباً همه نیازهای اسیدآمینه‌ای ضروری روزانه، برای یک مرد بزرگ‌سال معمولی، فقط با استفاده از ۳۶ گرم *اسپیرولینا* در حدود چهار قاشق غذاخوری تأمین می‌شود. آهن شایع‌ترین کمبود مواد معدنی در سراسر جهان است؛ به‌ویژه برای زنان، کودکان و افراد مسن. خانم‌هایی که رژیم‌های لاغری می‌گیرند، به‌طورمعمول آهن کافی دریافت نمی‌کنند و دچار کم‌خونی (آنمی) می‌شوند. این عنصر معدنی برای تولید گلبول‌های قرمز خون و سیستم ایمنی سالم ضروری است. *اسپیرولینا* یک ماده غذایی غنی از آهن است که به‌راحتی توسط بدن انسان جذب می‌شود. رنگ‌دانه آبی فیکوسیانین، مولکول‌های محلولی را با آهن و سایر مواد معدنی در حین هضم تشکیل می‌دهد که باعث می‌شود این عنصر راحت‌تر در دسترس قرار گیرد (۵). بنابراین، آهن موجود در *اسپیرولینا* بیش از دو برابر آهن موجود در سبزی‌ها قابل‌جذب است؛ *اسپیرولینا* همچنین منبع غنی از کاروتنوئیدها است و شامل پرو ویتامین A است (۹). در کشورهای درحال‌توسعه مانند هند، سوءتغذیه و کمبود ویتامین A در بین کودکان پیش‌دبستانی هنوز یک چالش عمده بهداشت عمومی است. مسئله مهم دیگری که بر سلامت تغذیه‌ای کودکان پیش‌دبستانی تأثیر می‌گذارد، اسهال در اکثر مناطق روستایی هند است. گزارش‌شده است که ماست یک محصول غذایی مهم است که می‌تواند در مقابله با بروز اسهال در کودکان پیش‌دبستانی کمک کند. ماست *اسپیرولینا* ترکیبی منحصربه‌فرد از مزایای پروبیوتیک و افزایش کاروتنوئیدها برای مبارزه با اسهال و کاهش ویتامین A در کودکان پیش‌دبستانی، به‌ویژه در مناطق روستایی است (۸).

جدول ۱- جدول اثرات درمان‌کنندگی و مواد مغذی موجود در *اسپیرولینا* را نشان می‌دهد (۶).

مواد مغذی	اثرات درمانی
آنتی‌اکسیدان، محلول در چربی	کاهش کلسترول خون
کاروتنوئیدها، و محلول در آب	کاهش قند خون و کنترل بیماری دیابت
ویتامینه‌ای k،E،A،B_{12}،B_8،B_6،B_2	کاهش چربی خون
مواد معدنی مثل Fe و Ca	کاهش نارسایی قلبی
سطح بالای باارزش آمینواسیدها و پروتئین‌ها	کاهش کم‌خونی
کربوهیدرات‌ها	کاهش فشارخون
فیبرها	اثرات ضد توموری
اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع	اثرات ضدویروس

-محصولات لبنی غنی‌شده با *اسپیرولینا*

امروزه استفاده از محصولات شیر تخمیر شده یا ماست، ازنظر پروبیوتیک‌هایی که به‌عنوان میکروارگانیسم‌های زنده، باکتری‌ها یا مخمرهایی که مزایای سلامتی (خواص

درمانی) را برای میزبان فراهم می‌کند، در اولویت قرار دارند (۷). پروبیوتیک‌ها، قابلیت هضم مواد غذایی و استفاده در سوخت‌وساز بدن را بهبود می‌بخشند و با تولید اسیدهای چرب فرار به‌طور غیرمستقیم، ریز پرزهای روده را اصلاح می‌کنند (۸).

برخی از جلبک‌ها، به دلیل در دسترس بودن و ارزش غذایی بالا، بستر مناسبی برای تولید غذاهای تخمیر شده محسوب می‌شوند. بسیاری از محصولات تخمیرشده و متنوع شامل پودرها و نوشیدنی‌ها، با استفاده از جلبک‌های دریایی و ریز جلبک‌هایی مانند *Chlorella* و *Dunaliella* و Spirulina و گونه‌های مختلف *Arthrospira* ساخته می‌شوند (۴). در مقایسه با مطالعات متعددی که در مورد نقش جلبک‌ها در تخمیر صورت گرفته است، افراد کمتری در مورد سیانوباکتری‌ها کار می‌کنند (۱۰).

محصولات لبنی تخمیر شده دارای میکروارگانیسم‌های مفید پروبیوتیک هستند و پروبیوتیک‌ها، روده انسان را تقویت می‌کند. حداقل مقدار باکتری‌های پروبیوتیک در زمان مصرف 10^6–10^5 Cfu/ml است و 10^8 –10^6 Cfu/ml مقدار کافی در زمان مصرف است. مواردی که بر زنده‌بودن و افزایش تعداد پروبیوتیک‌ها در شیرهای تخمیری تأثیر می‌گذارد شامل اکسیژن، مواد مغذی، فاکتورهای رشد، مواد افزودنی خوراکی، استفاده از فناوری‌های جدید مانند میکروکپسولاسیون و فرمولاسیون است (Microencapsulation and formulation) (۱۰).

ماست، ماده غذایی غنی، از رایج‌ترین ماده‌های غذایی و محبوب‌ترین خوراک تهیه‌شده از شیر تخمیر شده در سراسر جهان است. ماست از طریق تخمیر شیر تازه یا شیر تولیدشده از شیر خشک، با باکتری‌های اسیدلاکتیک به دست می‌آید و به دلیل اثرات آن در بهبود محیط روده، سیستم گوارش و تقویت ایمنی بدن، توسط مشتریان ترجیح داده می‌شود (۱۱). افزودن باکتری‌های پروبیوتیک به ماست، عملکرد و فواید آن را برای سلامتی بهبود می‌بخشد و فلور روده را با باکتری‌های اسیدلاکتیک غنی می‌کنند. بنابراین، با فرض مصرف روزانه ۱۰۰ گرم از محصولات لبنی تخمیری، آن‌ها باید این کار را انجام دهند. محصولات تخمیری باید حاوی 10^6 تا 10^9 Cfu/ml از این باکتری‌های زنده در زمان مصرف باشند (۸).

در ارگانیسم‌های مختلف پروبیوتیک، جنس بیفیدوباکتریوم به‌طور گسترده در محصولات لبنی تخمیر شده موردمطالعه قرارگرفته و فواید سلامتی ناشی از مصرف بیفیدوباکتریوم به‌خوبی اثبات‌شده است (۳). تعدادی از مطالعات نشان داده که زنده ماندن بیفیدوباکتریوم های گنجانیده شده در ماست اغلب ضعیف است. درمجموع ۵۸ محصول پروبیوتیک به‌دست‌آمده در سراسر جهان وجود دارد، که ادعا می‌کردند حاوی سویه‌های بیفیدوباکتریوم هستند. نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که بیفیدوباکتریوم لاکتیس بیشترین گونه یافت شده بود. محققان، سطح، گونه و مقاومت در برابر اسیدیته و استرس اکسیداتیو بیفیدوباکتریوم را بررسی کردند. آن‌ها گزارش کردند که بیفیدوباکتریوم لاکتیس، تنها گونه بیفیدوباکتریوم موجود در ماست‌های سنتی است که در برابر اسیدیته و استرس اکسیداتیو بسیار مقاوم است (۱۰). برخی از این سویه‌ها متابولیت‌های تقویت‌کننده خاصی ازجمله پروتئین‌ها و اسیدهای چرب را تولید می‌کنند که ازنظر تغذیه‌ای و یا فیزیولوژیکی مطلوب هستند و احتمال تولید متابولیک‌های باارزش را در بدن انسان افزایش می دهد. درواقع ماست و به‌ویژه ماست‌های پروبیوتیک با تأمین مواد مغذی طبیعی و غنی‌سازی میکروبیوتای روده به‌سلامت کمک می‌کنند. این ماده غذایی منجر به مقاومت بیشتر در برابر عفونت‌ها، تحریک سیستم ایمنی بدن و جذب بهتر مواد معدنی و لاکتوز می‌شود. فعالیت پروبیوتیک برخی از سویه‌ها با توانایی کلون سازی (Colonize) در تقویت اپیتلیوم روده برای ایجاد ثبات در میکرو فلور روده، به‌ویژه پس از درمان با آنتی‌بیوتیک، به اثبات رسیده است (۱۱)، تحقیقات بسیاری بر پروبیوتیک‌ها در سال‌های اخیر با افزودن *Lactobacillus acidophilus, bifidobacteria*، *Lactobacillus casei, Lactobacillus rhamnosus* و *Lactobacillus reuteri* به محصولات لبنی تخمیر شده مانند ماست انجام‌شده است. پس از مصرف، اعتقاد بر این است که این محیط‌های کشت پروبیوتیک نقش مهمی در سیستم روده در برابر برخی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مانند *Helicobacter pylori, Salmonella typhi, Yersinia enterocolitica* دارند (۱۲).

مصرف عمومی محصولات لبنی و به‌ویژه محصولات لبنی پروبیوتیک طی سال‌های گذشته به دلیل تأثیرات مطلوب بر سلامتی انسان‌ها که توسط متخصصان تغذیه و پزشکان

گواهی‌شده است، به بعد جدیدی رسیده است (۴). محصولات غذایی حاوی پروبیوتیک را می‌توان به‌عنوان غذاهای عملکردی دسته‌بندی کرد و این مواد همراه با پری بیوتیک‌ها بزرگ‌ترین بخش بازار مواد غذایی کاربردی در اروپا، ژاپن و استرالیا را تشکیل می‌دهند (۱۳).

محققان، نقش زیست‌توده *اسپیرولینا* را در کشت‌های مختلف بررسی کردند. آن‌ها زیست‌توده *اسپیرولینا* را به کشت‌های *Lactobacillus* و *Streptococcus* اضافه کردند و درنهایت حدود ۱۰ ساعت پس از انجام تخمیرهای طبیعی، افزایش تعداد باکتری‌ها را که منجر به افزایش غلظت زیست‌توده شد را مشاهده کردند. در آزمایشی دیگر ماده جداسازی شده از کشت *اسپیرولینا* را به کشت‌های مختلف اسیدلاکتیک که به مدت ۲۴ ساعت تخمیر می‌شدند اضافه کردند، درنهایت اضافه شدن این ماده باعث رشد انواع باکتری‌ها در این کشت‌ها شد. سپس محققان، زیست‌توده *اسپیرولینا* را در غلظت‌های مختلف، به شیر اضافه کرد و سپس سوسپانسیون حاصل از آن را، با ترکیبی از لاکتیک اسید باکتری‌ها تخمیر کردند. چندین محقق دیگر، اثر زیست‌توده *اسپیرولینا* را بر محصولاتی مانند ماست پنیر و شیر تخمیر شده آزمایش کرده‌اند که نتایج آن مثبت بود. نتایج آزمایش شامل افزایش باکتری‌های اسیدلاکتیک و بهبود در کیفیت تغذیه‌ای، در محصول تخمیر شده در طول مدت ذخیره‌سازی بود (۱۴). به‌عنوان‌مثال، پارادا و همکاران، اثرات *اسپیرولینا* را بر روی باکتری‌های اسیدلاکتیک در محیط آزمایشگاه موردمطالعه قراردادند و آشکار کردند که *اسپیرولینا* به‌عنوان یک محرک رشد آزمایشگاهی عمل می‌کند (۱۵). همچنین محققان *اسپیرولینا* را به فرمولاسیون ماست اضافه کردند و زیست پذیری باکتری‌های پروبیوتیک را در طول تخمیر و نگهداری مطالعه کردند. آن‌ها گزارش دادند که *اسپیرولینا* می‌تواند جمعیت *Lactobacillus acidophilus* (باسیل سازنده اسیدلاکتیک از شیر) و *Bifidobacteria* را افزایش دهد (۱۶). علاوه بر این، محققان اثر پودر *اسپیرولینا* را در پنیر پروبیوتیک فتا برای ارزیابی تعداد باکتری‌های لاکتیک بررسی کردند (۱۷). جمعیت *Lactobacillus acidophilus* و همچنین خصوصیات تغذیه‌ای پنیر در طی نگهداری در یخچال موردبررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که محتوای آهن و پروتئین پودر *اسپیرولینا* موجب افزایش زمان زنده ماندن *Lactobacillus acidophilus* گردید (۱۲).

علاوه بر آن محققان در سال ۲۰۱۰ اثر زیست‌توده خشک را بر روی پروبیوتیک‌های ماست و شیر اسیدی مطالعه کردند (۱۸). انگیزه اصلی این مطالعه بررسی تأثیر *اسپیرولینا* خشک بر ماست ساده و ماست حاوی لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس در زمان نگهداری در یخچال بود. همه نمونه‌ها در شرایط استریل در آزمایشگاه تهیه شدند. مقدار پودر *اسپیرولینا* به ترتیب ۰/۵ و ۱ درصد وزنی/ حجمی گرفته شد. pHو اسیدیته نمونه در ۴ درجه سانتی‌گراد ذخیره‌سازی و کنترل شد. توانایی زنده ماندن نمونه‌ها در ۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ روز در ذخیره‌سازی بررسی شد و درنهایت میزان ماندگاری ماست ساده و ماست حاوی *Lactobacillus delbrueckii* بررسی شد. درنهایت نمونه‌های بدون *اسپیرولینا* ماندگاری کمتری را نشان دادند؛ اما هیچ اختلاف معناداری در نمونه‌های یک درصد غلظت پودر *اسپیرولینا با* نمونه‌های بدون *اسپیرولینا* مشاهده نشد، درحالی‌که تفاوت آشکاری در زنده ماندن باکتری‌ها بین نمونه‌های حاوی *اسپیرولینا* و بدون *اسپیرولینا* وجود داشت. به‌غیراز این تفاوت، تفاوت عمده‌ای بین نمونه‌های غنی‌شده با پودر *اسپیرولینا* وزنی/ حجمی ۰/۵ و ۱ درصد مشاهده نشد (۱۲).

در تحقیقی تأثیر پودر *اسپیرولینا* را روی باکتری‌های شیر تخمیر شده بررسی کردند. ابتدا شیر غنی‌شده و غیر غنی‌شده حاوی *Acidophilus-bifidus-thermophilus* تخمیر شده توسط کشت‌های استارتر دارای *Lactobacillus acidophilus*, bifidobacteria و *Streptococcus thermophilus* تولید شد. نمونه‌ها به مدت ۶ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در گرم‌خانه نگهداری شدند. نتایج نشان داد که پودر *اسپیرولینا* تأثیر مفیدی در بقای کشت استارتر (ABT) *Acidophilusbifidus thermophiles* داشت (۱۹)؛ به دلیل افزودن زیست‌توده سیانوباکتری اسیدآمینه، ویتامینه‌ای ضروری و اسیدهای چرب موجود در شیر بهبود یافت (۷).

محققان در مطالعه ای از سه گرم پودر *اسپیرولینا* را در تولید اسید و رشد باکتری *Lactobacillus plantarum* و *Enterococcus faecium starins* مطالعه کردند. نتایج، تحریک در تولید اسید و افزایش میزان رشد *E.plantarum* و *E.faecium* را نشان داد ($p<۰/۵$). درواقع نتایج نشان داد که

این ماده برای تولید مقرون‌به‌صرفه غذاهای تخمیر شده مناسب است و تولید سریع اسید از رشد میکروارگانیسم‌های نامطلوب جلوگیری می‌کند. در این مطالعه، ثابت شد که *L. plantarum* کمی اسیدی‌تر *از E. faecium* است زیرا pH محصولات بین 5/15، 5/34 و 4/62 کنترل می‌شد (۴).

مطالعه دیگری توسط موکانو و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام شد که هدف آن بررسی تأثیر زیست‌توده *اسپیرولینا* بر ریزفلور محصولات تخمیر شده بود. شیرها با استفاده شیر خشک و کشت باکتری استارتر *Bifidobacterium animalis* ssp *lactia* و *Lactobacillus acidophilus*تولید شدند و حدود 0/5 و ۱ درصد پودر *اسپیرولینا* به این محصولات اضافه شد. محصولات نهایی به مدت ۱۵ روز در دمای ۵± ۱ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس اسیدیته، pH، سینرزیس (Syneresis)، میزان ظرفیت نگهداری آب و میزان ویسکوزیته نمونه‌ها اندازه‌گیری گردید. با توجه به تخمیر لاکتوز، اسیدیته در طی دوره انکوباسیون به‌سرعت در حال افزایش بود. بیشترین میزان تیتراسیون اسیدیته در ریز جلبک ۱ درصد به همراه *Bifidobacterium animalis ssp lactia* به دست آمد (۲۰). علاوه بر آن در تمام مواردی که به آن‌ها ریز جلبک اضافه‌شده بود، میزان نگهداری آب در پایان ذخیره‌سازی به 13/39درصد کاهش یافت و حداکثر تعداد زنده *Bifidobacterium animalis ssp lactia* در دوره نگهداری $۱۰^۷$ × ۳۳ Cfu / ml اندازه‌گیری گردید (۲۱).

در مطالعه (۱)، اثر *اسپیرولینا* در غلظت در ماست پروبیوتیک مطالعه شد و پارامترهای مختلف مانند pH، اسیدیته قابل تیتراسیون و پتانسیل اکسایش و کاهش زنده ماندن باکتری‌ها در طول تخمیر و ذخیره‌سازی باکتری‌های پروبیوتیک در ۲۸ روز در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد ارزیابی گردید. ترکیب باکتری‌های پروبیوتیک ماست، *Lactobacillus acidophilus LA-6* و *Bifidobacterium lactis BB-12* و *Lactobacillus delbrueekii ssp* بود. مطالعه نمونه‌های تیمار شده با *اسپیرولینا* نشان داد کاهش pH کندتر، افزایش اسیدیته سریع‌تر، زمان کم‌آبی طولانی‌تر و اسیدیته نهایی بیشتر می‌شود. غنی‌سازی یک‌درصدی زیست‌توده جلبکی، نتایج بهتری را در نمونه‌های تلقیح شده از هر دو میکروارگانیسم پروبیوتیک نشان داد. علاوه بر آن نشان داده شد که تا پایان ذخیره‌سازی در نمونه غنی‌شده ۰/۵ درصد، تعداد باکتری بیش از $۱۰^۷$ Cfu در هر میلی‌لیتراست. نتایج حاصل از ارزیابی ارگانولپتیک، نشان داد که افراد طعم را نامطلوب حس می‌کنند، علتِ این مقدار کم به دلیل اکسیداسیون اسید چرب اشباع‌نشده و وجود مواد معدنی به‌عنوان پراکسیدانت است. تغییر رنگ از سبز به آبی و مشاهده دانه‌های ایجادشده توسط ذرات جلبک نامحلول یکی دیگر از دلایل بود. بنابراین، کمترین امتیاز را برای احساس بافت دردهان گزارش کردند. تحقیقی برای استفاده از زیست‌توده *S. platensis* غنی‌شده با عناصر کمیاب برای تولید شیرهای تخمیرشده و تحریک تولید اسید و سرعت رشد لاکتیک اسید باکتری‌ها (LAB) Lactic acid bacteria انجام شد. محیط کشت‌ها با میکروارگانیسم‌های ssp *delbrueckii* و *bulgaricus CH2* و *L. acidophilus La-5* و *Bifidobacteria bifidum B12* و *CH1 thermophiles* تهیه شدند، سپس اثر ۳ گرم بر لیتر *اسپیرولینا* را در شیر همراه با عناصر کمیاب مشاهده و بررسی شد. اجزای زیست‌توده سیانوباکتری حاوی ید، زینک، سلنیوم، ویتامینه‌ای (B کمپلکس، C، A و E) بود. در آزمایش میزان تلقیح باکتری *Bifidobacteria bifidum B12*برابر ۱درصد (v/v) بود. *Streptococcus thermophilus* و *L. bulgaricus* در دمای ۴۲/۵ درجه سانتی‌گراد تلقیح شدند، درحالی‌که *L. acidophilus* و *Bifidobacteria* در ۳۷/۶ درجه سانتی‌گراد تلقیح شدند. pH بافاصله ۱ ساعت بررسی شد و ترکیبات نیتروژن دار (پپتون، آدنین، هیپوگزانتین) آزمایش شدند. نتایج نشان داد که ریز جلبک‌ها تأثیر مثبتی بر روی چهار سویه کشت آغازگر دارند (۲۰). اثر *اسپیرولینا* بر روی *Streptococcus thermophilus* طی ۲-۶ ساعت تخمیر بررسی شد و نتیجه‌گیری شد که به دلیل وجود عنصر کمیاب و اجزای نیتروژن دار (ازت) همراه با ویتامین‌ها، تأثیر زیادی روی *L. bulgaricus* دارد. در مورد *L. acidophilus*، پپتون و ویتامین‌ها از همه مواد مؤثرتر بودند؛ ویتامین E و سلنیوم تولید اسید را مهار می‌کنند، اما در باکتری *Bifidobacteria bifidum B12* فقط پپتون، تولید اسید را به سطح رضایت‌بخشی افزایش می‌دهد. نتایج نشان داد وقتی‌که *L.bulgaricus* یا *L. acidophilus* با *Bifidobacteria bifidum* مخلوط شد، موجب افزایش در رشد لاکتوباسیل های میله‌ای می‌شود.

در مطالعه دیگری، تغییرات تولید اسید توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک مزوفیل رشد یافته در شیر موردمطالعه قرار گرفت (۱۶). نمونه‌های شیر غنی‌شده با *اسپیرولینا* در غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۸ درصد) به میزان ۱ درصد با سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک مزوفیل مورد آزمایش قرار گرفتند. pH در فواصل منظم بررسی شد. نتیجه مطالعه نشان داد که غلظت *اسپیرولینا* برافزایش اسیدیته لاکتوکوک ها مؤثر است. زیست‌توده سیانوباکتری مورداستفاده در غلظت ۰/۸ درصد به‌طور قابل‌توجهی ($p<0/05$) اسیدیته را توسط لاکتوکوک بین ساعت ششم و دوازدهم از فرآیند تخمیر افزایش داد. درنهایت خواص ارگانولپتیک مطلوب در فرمولاسیون محصول تهیه‌شده با کشت مخلوط *L. lactic ssp. lactic NCAIM B.*2128 و *L. lactic* ssp *cremoris ATCC* 19257 و همراه باده درصد ساکارز، زیست‌توده *اسپیرولینا* ۰/۳ درصد و پوره توت فرنگی-کیوی ۱/۵ درصد به دست آمد.

در مطالعه دیگری، اثر تحریک‌کننده افزودن *اسپیرولینا* بر رشد باکتری‌های شکل کوکوس موردمطالعه قرار گرفت. این اتفاق به دلیل وجود محصولات خارج سلولی در فاز تأخیری *اسپیرولینا* رخ داد؛ بنابراین پیشنهاد شد که محصولات خارج سلولی که از فاز تأخیری کشت *اسپیرولینا* به دست می‌آید، باعث تحریک زنده ماندن لاکتیک باکتری‌ها می‌شوند (۲۲). در این تحقیق، *اسپیرولینا* به محیط کشت MRS آگار اضافه شد و به‌وسیله آن رشد باکتریایی تمام سویه‌ها افزایش یافت. نتایج نشان داد که اسپیرولینا به‌عنوان یک میکروارگانیسم فوتواتوتروفیک عمل می‌کند که نیتروژن را از محیط کشت مصرف می‌کند و اگزوپلی ساکارید و سایر ترکیبات را که می‌توانند اثر تحریک‌کننده بر LABداشته باشند، آزاد می‌کند. در تحقیق دیگری نتایج نشان داد که افزودن *اسپیرولینا* باعث کاهش pH نمونه ماست می‌شود (۱۲). علت این کاهش اثر *اسپیرولینا* بر *L. bulgaricuss* بود. در تحقیق دیگری، تولید ماست منجمد کم‌چرب و حاوی پروتئین همراه با تفاله پاپایا و *اسپیرولینا* را گزارش کردند. هدف از این مطالعه به دست آوردن ماست منجمد باکیفیت بهتر با غلظت مطلوب *اسپیرولینا* بود. ماست یخزده با ۶٪ *اسپیرولینا* و ۱۰٪ تفاله پاپایا با امتیاز ۶/۸ در ویژگی‌های حسی در بین تمام عملکردها، بهترین نتیجه را یافت. درواقع درنهایت مشخص شد که سطح بالاتر *اسپیرولینا* به‌شدت بر خصوصیات ارگانولپتیک ماست منجمد تأثیر می‌گذارد (۲۱).

-تأثیرات غنی‌سازی ریزجلبک‌ها بر خواص حسی محصولات لبنی تخمیر شده

افزودن ریز جلبک‌ها به شیرهای تخمیر شده می‌تواند خواص حسی نامطلوب را تغییر دهد. محققان گزارش کردند که تیمارهایی که مقادیر بالاتری از *اسپیرولینا* رادارند، دارای خواص حسی ضعیف‌تری نسبت به گروه کنترل‌شده هستند. *اسپیرولینا* در مقایسه با *کلرلا* عطروطعم نامطلوبی از خود نشان داد (۲۳). افزودن ریز جلبک‌ها به ماست بر اساس نوع و غلظت ریز جلبک‌های اضافه‌شده، رنگ ماست را به سبز یا مایل به آبی تغییر داد، که این‌یک ویژگی ظاهری نامناسب بود، که توسط *اسپیرولینا* ایجاد شد. در تیمارهایی دارای ۱ درصد ریز جلبک نامحلول، حالت دانه‌دانه‌ای به وجود آمد. ازنظر بافت تفاوت قابل‌توجهی بین تیمارها وجود نداشت، بااین‌حال، تفاوت ازنظر بافت خوراکی قابل‌توجه بود. به‌طورکلی، تیمارهای کلرلا خواص حسی بهتری نسبت به *اسپیرولینا* داشتند (۲). تفاوت زیادی بین تیمارهای حاوی هر دو ریز جلبک به میزان ۰/۵ تا ۰/۲۵ درصد وجود نداشت. محققان همچنین تهیه‌ی ماست منجمد کم‌چرب و پروپروتئین غنی‌شده با پالپ های میوه پاپایا و *اسپیرولینا* را باهدف یافتن سطح مطلوبی از *اسپیرولینا* که می‌تواند برای به دست آوردن ماست منجمد باکیفیت استفاده شود، مطالعه کردند. ماست منجمد تهیه‌شده با *اسپیرولینا* (۶ درصد) و پالپ پاپایا (۱۰ درصد)، دارای خواص حسی بهتری در مقایسه با سایر تیمارهایی موردمطالعه بود. سطوح بالاتر *اسپیرولینا* بر ویژگی‌های حسی ماست منجمد، تأثیر منفی گذاشت. علاوه بر آن محققان تأثیر افزودن کلرلا را بر خواص حسی پنیر فرآوری شده بررسی کردند (۱۴). بنابراین پنیرهای فرآوری شده با کلرلا و بدون کلرلا تهیه شدند. پنیرها در دمای ۱۰°C، نگهداری شدند. در مقایسه با گروه کنترل، نمرات توصیفی برای رنگ و ویژگی خوراکی پنیر فرآوری شده با کلرلا، بیشتر بود. به‌منظور تهیه‌ی ماست‌های آشامیدنی، انواع جدیدی از ماست‌های نوشیدنی توسط محققان از شیر بدون چربی تهیه شد، که حاوی ۲۵ درصد پودر عصاره‌ی کلرلا و ۲/۵ تا ۱۰ درصد عصاره کلرلا

به‌صورت مایع بود و سپس خواص حسی محصول مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج ارزیابی خواص حسی ماست‌های نوشیدنی حاوی عصاره کلرلا نشان داد که رنگ، طعم، مزه و پذیرش کلی در تیمارهای بدون افزودن عصاره کلرلا نسبت به بقیه نمونه‌ها مقبولیت بیشتری دارد. همچنین امتیازات ماست حاوی ۲۰ درصد الیگوساکارید، ازنظر طعم و خواص حسی، به‌طور معناداری بیشتر از سایر گروه‌ها بود (۲۳).

-اثرات درمانی تغذیه با محصولات پروبیوتیک

میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک نقشی اساسی در رژیم غذایی مدرن انسان دارند (جدول ۲)؛ بنابراین اکنون محققان برای افزایش کیفیت، از ریز جلبک‌ها در محصولات لبنی تخمیر شده استفاده می‌کنند. به‌عنوان‌مثال محققان آزمایشی را برای مشاهده تحریک رشد سه باکتری اسیدلاکتیک *L. acidophilus MTCC447* ،*L. Casei MTCC1423* و *Streptococcus thermophilus MTCC1938* با افزودن زیست‌توده *اسپیرولینا* در مقادیر مختلف، ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر انجام دادند. متوجه شدند که این میکروارگانیسم‌ها در pH=۶/۲، بیشترین میزان رشد رادارند. علاوه بر آن حداکثر رشد در غلظت ۱۰mg/ml *اسپیرولینا* تا ۱۰ ساعت به میزان ۱۴۵/۹۰، ۱۷۱/۶۷ و ۱۸۵/۸۴ درصد به ترتیب در میکروارگانیسم‌های *L. Casei* و *L. acidophilus* و *S. thermophilus* مشاهده شد (۲۲).

محققان پیش‌بینی کردند که هرچه تعداد *Bifidobacterial* و *اسپیرولینا* در طی نگهداری و دوره ورود به سیستم بیشتر باشد، باعث کنترل بیشتر محصولات می‌شود. یکی از دلایل وجود *اسپیرولینا* این است که باعث تحریک تولید اسید در نمونه‌ها می‌شود؛ بنابراین، مقدار pH در آن نمونه کمتر می‌شود. نتایج مشابهی نیز در مطالعات قبلی به دست آمد و حداقل رشد در *S. thermophilus* در ۱۰ mg/ml نمونه *اسپیرولینا* غنی‌شده در مقایسه با سایر باکتری‌های اسیدلاکتیک را نشان داد (۱۵).

مطالعه مشابه در سال ۲۰۱۳ انجام شد. در این مطالعه با افزودن اسفناج در ماست غنی‌شده با *اسپیرولینا* تفاوت را با بقیه نمونه‌ها مشاهده کردند. آن‌ها این اثر را بر تعداد محصولات *L. bulgaricus* و *S. thermophilus* مشاهده کردند. آن‌ها ۰/۳، ۰/۵ و ۸۰ درصد وزنی وزنی *اسپیرولینا* را آماده کردند و آن را به نمونه‌های ماست اضافه کردند. آن‌ها از اسفناج به میزان ۱۰ و ۱۳ درصد وزنی بر وزنی در محصولات غنی‌شده با *اسپیرولینا* استفاده کردند. نمونه‌های ماست در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و در مدت‌زمان ذخیره‌سازی در طی ۱، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز ارزیابی شدند. نتایج تعداد قابل‌قبول باکتری‌های اسیدلاکتیک را در تمام محصولات مکمل *اسپیرولینا* تا پایان زمان ذخیره‌سازی به بیش از ۶ log Cfu/ml ($p\leq0.01$) گزارش کرد. علاوه بر آن نمونه حاوی ۰/۵ درصد وزنی وزنی *اسپیرولینا* و ۱۰ درصد اسفناج به‌عنوان مهم‌ترین عامل دوام *S. thermophilus* نشان داده شد و ماست با ۰/۸ درصد *اسپیرولینا* حداکثر تأثیر را در تعداد باکتری‌های زنده داشت. بر اساس استانداردهای فدراسیون بین‌المللی لبنیات با افزودن دو غلظت اسفناج می‌توان باعث افزایش ۰/۵ درصد *اسپیرولینا* شد و در ارزیابی حسی نمونه‌ها مؤثر بود (۲۱).

در مطالعاتی در سال ۲۰۱۲، محققان در مورد تأثیر *اسپیرولینا* در رشد و تولید اسید (pH) در بسیاری از سویه‌های *lactococcus* و *Leuconostoe* در شیر کارکردند. با بررسی شیر حاوی *اسپیرولینا* کشت‌شده و بررسی تأثیر آن بر میزان زنده ماندن لاکتوکوکوس و سپس با خنک کردن آن دریافتند که استفاده از زیست‌توده *اسپیرولینا* ۰/۳ درصد برای بسیاری از سویه‌های LAB مزوفیل مؤثر بود (۱). ازآنجایی‌که اغلب تعداد *Bifidobacterium* در فراورده‌های لبنی تخمیر شده کم است، محققان اثر اولیگوفروکتوز (Oligofructose)، انسولین، عسل و پودر *اسپیرولینا* را بر روی باکتری‌های پروبیوتیک موجود در شیر در طی تخمیر و هم در یخچال مخصوصاً در میکروارگانیسم *Bifidobacterium* spp بررسی کردند. نتایج نشان داد که زیست‌توده سیانوباکتریایی اثر تحریک‌کننده‌ای بر روی *Bifidobacterium animalism* ssp دارد. درواقع *Bifidobacterium lactis BB-12* با کاهش pH زیست‌توده جلبکی در شیر با نسبت مشابه در مقایسه با شاهد و نمونه کشت، مؤثر گزارش گردید. بااین‌وجود، در مقایسه با شاهد، تغییر قابل‌توجهی در تعداد میکروارگانیسم زنده در شیر گزارش گردید (۵).

جدول ۲- کاربردهای صنعتی بالقوه ریز جلبک‌ها در غذاهای کاربردی بر اساس نوع محصول و ترکیب زیست فعال (۲۴).

جنس / گونه‌ها	تولید - محصول	ارزیابی حسی	فرم تجاری	ترکیب زیست فعال	مزیت سلامتی
Sprirulina sp.	شیر	عطروطعم بهبودیافته است	پودر یا مایع	پروتئین، PUFA، EPA و DHA	کاهش خطر کم‌خونی
Sprirulina sp.	ماست	بافت و ویسکوزیته بهبودیافته	عصاره	فیکوسیانین	ضد سرطان آنتی‌اکسیدان و ضدالتهاب
Sprirulina sp.	پنیر	بافت بهبودیافته	پودر	پروتئین، کربوهیدرات، PUFA	ضد سرطان، کاهش خطر زخم معده، یبوست، کم‌خونی، فشارخون بالا، دیابت، بهبود سو تغذیه نوزاد و اختلالات روانی
Spirulina sp.	نوشیدنی بدون الکل	رنگ و طعم ترش بهبودیافته	پودر یا مایع	پروتئین، کلروفیل، فیکوسیانین	سیستم ایمنی و لنفاوی بهبودیافته، محافظت در برابر سرطان و زخم
Sprirulina sp.	دسرها	بهبود رنگ و ثبات	پودر یا آرد	پروتئین، ویتامین‌ها، مواد معدنی	فعالیت آنتی‌اکسیدانی، جلوگیری از یبوست
Sprirulina sp.	کلوچه و بیسکویت	رنگ، ثبات و بافت بهبودیافته	پودر یا آرد	پروتئین، PUFA، EPA، DHA و آستاگزانتین	فعالیت آنتی‌اکسیدانی
Sprirulina sp.	نان و کلوچه	عطروطعم، بافت و ظاهر بهبودیافته	پودر یا آرد	پروتئین، ویتامین‌ها، مواد معدنی	سطح چربی و کلسترول را کاهش می‌دهد، باعث سیری می‌شود
Spirulina sp.	میسو (miso)	کمی طعم جلبک دریایی است	پودر	پروتئین، ویتامین‌ها، مواد معدنی	فعالیت آنتی‌اکسیدانی
Sprirulina sp.	کوجی (koji)	بدون عطروطعم و بو	پودر	n.a.	بهبود ایمنی و فشارخون
Sprirulina sp.	ژل‌های غذایی گیاهی (Vegetarian food gels)	بهبود رنگ و استحکام	ژل‌ها	PUFA، EPA، DHA، GLA کاروتنوئیدها	فعالیت آنتی‌اکسیدانی
Sprirulina sp.	n.a	n.a	روغن	کاروتنوئیدها	فعالیت‌های ضدمیکروبی و ضدویروسی

n.a. – اطلاعات موجود نیست. EPA: ایکوزاپنتانوئیک اسید، DHA: دوکوزاهگزانوئیک اسید، GLA: گاما لینولنیک اسید، ARA: اسیدآراشیدونیک اسید

بحث و نتیجه‌گیری

در آینده‌ای نزدیک، محصولات مکمل پروبیوتیک جلبکی با هزینه کمتر و احتمال آلودگی کمتر، به‌طور وسیع تولید می‌شود؛ ریزجلبکها منبع غنی از ویتامین، اسیدآمینه و باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌باشند و برای حفظ سلامت روده همواره توصیه می شوند. درواقع مصرف منظم *اسپیرولینا* نه‌تنها باکتری‌های اسیدلاکتیک روده را بهبود می‌بخشد، بلکه از رشد بیماری‌های مضر انسانی نیز جلوگیری می‌کند و درنهایت منجر به بهبود جذب روده می‌شود. ترکیب *اسپیرولینا* و باکتری‌های اسیدلاکتیک فرصت جدیدی در رابطه با ارزیابی حسی برای تولیدکننده ایجاد می‌کند. ترکیب این دو با سایر منابع غذایی مانند میوه‌ها و سبزی‌ها می‌تواند غذاهای سالم و خوش‌طعم جدیدی ایجاد کند و علاوه بر ایجاد طعم، رنگ، عطر، بافت و بالا بردن کیفیت برخی از غذاهای تخمیر شده سنتی، این فرصت را برای برخی غذاهای تخمیر شده جدید نیز با همان هزینه به وجود می‌آورد. حتی می‌توان با کشت هم‌زمان جلبک‌ها با میکروارگانیسم‌های تخمیری (غیر از باکتری‌های لاکتیک اسید)، به‌عنوان‌مثال *Saccharomyces cerevisiae* و *Aspergillus niger* مواد غذایی مطلوب‌تری را برای مصرف‌کنندگان ازنظر سلامتی ایجاد کرد.

ملاحظات اخلاقی: کلیه ملاحظات اخلاقی مربوط به نگارش مقالات مروری رعایت گردید.

محدودیت ها: محدودیت اصلی این مطالعه عدم دسترسی به فایل کامل برخی از مقالات بود.

پیشنهادات

این مقاله مروری با تلاش و کوشش نویسندگان در جهت تامین منابع فارسی برای دانشجویان و محققان انجام شده است. پیشنهاد می شود با مطالعه دقیق این مقاله، برای انتخاب موضوع پایان نامه ها و رساله های خود نهایت بهره را ببرند. بدیهی است که تجاری سازی استفاده از ریز جلبکها، افق تازه ای جهت بهبود سلامت مصرف کنندگان مواد غذایی پروبیوتیک در آینده خواهد بود.

میزان مشارکت نویسندگان

مطالعه، تحقیق، تدوین و ترجمه به صورت مساوی توسط نویسندگان انجام شده است.

تضاد منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

حمایت مالی: ندارد

منابع

1. Beheshtipour H, Mortazavian AM, Haratian P, Darani KK. Effects of Chlorella vulgaris and Arthrospira platensis addition on viability of probiotic bacteria in yogurt and its biochemical properties. European Food Research and Technology. 2012;235(4):719-28.
2. Malcata F, Macedo Â, Camacho F. Potential industrial applications and commercialization of microalgae in the functional food and feed industries: a short review. 2019.
3. Martelli F, Cirlini M, Lazzi C, Neviani E, Bernini V. Solid-state fermentation of Arthrospira platensis to implement new food products: evaluation of stabilization treatments and bacterial growth on the volatile fraction. Foods. 2021;10(1):67.
4. Pina-Pérez MC, Brück W, Brück T, Beyrer M. Microalgae as healthy ingredients for functional foods. The role of alternative and innovative food ingredients and products in consumer wellness: Elsevier; 2019. p. 103-37.
5. Nowruzi B, Sarvari G, Blanco S. Applications of cyanobacteria in biomedicine. Handbook of Algal Science, Technology and Medicine: Elsevier; 2020. p. 441-53.
6. Anvara AA, Nowruzib B. Bioactive Properties of Spirulina: A Review.
7. Gupta S, Gupta C, Garg A, Prakash D. Prebiotic efficiency of blue green algae on probiotics microorganisms. J Microbiol Exp. 2017;4(4):00120.
8. Akalin A, Unal G, Dalay M. Influence of Spirulina platensis biomass on microbiological viability in traditional and probiotic yogurts during refrigerated storage. Italian Journal of Food Science. 2009;21(3):357-64.
9. Patel P, Jethani H, Radha C, Vijayendra S, Mudliar SN, Sarada R, et al. Development of a carotenoid enriched probiotic yogurt from fresh biomass of Spirulina and its characterization. Journal of food science and technology. 2019;56(8):3721-31.
10. Kavimandan A. Incorporation of Spirulina platensis into probiotic fermented dairy products. Int J Dairy Sci. 2015;10:1-11.
11. Pan-utai W, Atkonghan J, Onsamark T, Imthalay W. Effect of Arthrospira Microalga Fortification on Physicochemical Properties of Yogurt. Current Research in Nutrition and Food Science Journal. 2020;8(2):531-40.
12. Alizadeh Khaledabad M, Ghasempour Z, Moghaddas Kia E, Rezazad Bari M, Zarrin R. Probiotic yoghurt functionalised with microalgae and Zedo gum: chemical, microbiological, rheological and sensory characteristics. International Journal of Dairy Technology. 2020;73(1):67-75.
13. Camacho F, Macedo A, Malcata F. Potential industrial applications and commercialization of microalgae in the functional food and feed industries: A short review. Marine drugs. 2019;17(6):312.
14. Golmakani M-T, Soleimanian-Zad S, Alavi N, Nazari E, Eskandari MH. Effect of Spirulina (Arthrospira platensis) powder on probiotic bacteriologically acidified feta-type cheese. Journal of Applied Phycology. 2019;31(2):1085-94.
15. Parada JL, de Caire GZ, de Mulé MaCZ, de Cano MMS. Lactic acid bacteria growth promoters from Spirulina platensis. International journal of food microbiology. 1998;45(3):225-8.
16. de Caire GZ, Parada JL, Zaccaro MC, de Cano MMS. Effect of Spirulina platensis biomass on the growth of lactic acid bacteria in milk. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2000;16(6):563-5.
17. Mazinani S, Fadaei V, Khosravi-Darani K. Impact of Spirulina platensis on physicochemical properties and viability of Lactobacillus acidophilus of probiotic UF feta cheese. Journal of Food Processing and Preservation. 2016;40(6):1318-24.
18. Güldaş M, Irkin R. Influence of Spirulina platensis powder on the microflora of yoghurt and acidophilus milk. 2010.
19. Varga L, Szigeti J, Kovács R, Földes T, Buti S. Influence of a Spirulina platensis biomass on the microflora of fermented ABT milks during storage (R1). Journal of Dairy Science. 2002;85(5):1031-8.

20. Mocanu G, Botez E, Nistor OV, Andronoiu D, Vlăsceanu G. Influence of Spirulina platensis biomass over some starter culture of lactic bacteria. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies. 2013;19(4):474-9.

21. Fadaei V, Mohamadi-Alasti F, Khosravi-Darani K. Influence of Spirulina platensis powder on the starter culture viability in probiotic yoghurt containing spinach during cold storage. European Journal of Experimental Biology. 2013;3(3):389-93.

22. Niccolai A, Shannon E, Abu-Ghannam N, Biondi N, Rodolfi L, Tredici MR. Lactic acid fermentation of Arthrospira platensis (spirulina) biomass for probiotic-based products. Journal of Applied Phycology. 2019;31(2):1077-83.

23. Beheshtipour H, Mortazavian AM, Mohammadi R, Sohrabvandi S, Khosravi-Darani K. Supplementation of Spirulina platensis and Chlorella vulgaris algae into probiotic fermented milks. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2013;12(2):144-54.

24. Nowruzi B, Sarvari G, Blanco S. The cosmetic application of cyanobacterial secondary metabolites. Algal Research. 2020;49:101959.

Probiotic properties of *Spirulina*, a review

Norouzi B.

Dept. of Biotechnology, Faculty of Converging Sciences and Technologies, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Spirulina is a microalgae of the cyanophyte division, a rich source of organic nutrients. This microalgae is widely used in the food industry as a probiotic and a beneficial food supplement that increases the growth of intestinal probiotic bacteria. Therefore, the purpose of this article is to review the probiotic properties of *spirulina* in human healthcare. *Spirulina* contains proteins (more than 78 percent), vitamins, fat (4-7 percent), minerals, carbohydrates and many micronutrients that have been very healing in the treatment of diseases such as cancer, hypertension, diabetes, anemia, etc. By producing extracellular exopolysaccharides, *Spirulina* not only increases the number and growth of bacteria such as *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*, but also increases bacterial viability and survival in bacteria. Fermented dairy products play a beneficial role in the food industry. The combination of microalgae and probiotics leads to the production of fermented dairy products that not only increase the quality of food, but also increase their nutritional value for consumers by increasing the number and shelf life of probiotic bacteria.

Keywords: prebiotic, probiotic, *Spirulina*, human health, microalgae