نشریه تحقیقات علوم زراعی در مناطق خشک ـــــــ

## مقدمه

گیاه دارویی زنیان با نام علمی *Carum copticum* L. متعلق به تیره چتریان (Apiaceae) و دارای اسانس روغنی است که حاوی تیمول، پارا-سیمن، آلفا-پینن و کارواکرول است (Davazdah Imami and Majnoun Hosseini, 2008) که برای آنها مصارف دارویی، بهداشتی و صنعتی ذکر شده است (Chevaller, 1997). از اسانس زنیان در دفع برخی آفات هم استفاده می شود (Sahaf *et al*., 2004). در طب مدرن به عنوان ضدعفونی کننده قوی، تقویت جهاز هاضمه و در مصرف خارجی به منظور درمان رماتیسم به کار می رود (Momeni and Shahrokhi. 1991; Mirzavand Boroujeni, 1992). روش های متعددی برای افزایش تولید متابولیت های ثانویه وجود دارد. الیسیتورها ترکیباتی با منشأ زیستی یا غیر زیستی هستند که از طریق القای سیستم دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت های ثانویه می شوند (Zhao *et al*., 2005). کیتوزان از ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه های قارچی است. کیتوزان یک پلی ساکارید پلی کاتیونی، به عنوان الیسیتور زیستی کارآمد برای افزایش تولید متابولیت های ثانویه گیاهان دارویی زیادی تأیید شده است (Cheng *et al*., 2006). یک پاسخ مهم در برابر الیسیتورهای زیستی توسط سلول‌های گیاهی، تولید گونه های اکسیژن واکنشگر (ROS) مانند رادیکال سوپر اکسید (-O20)، هیدروژن پراکسید (H2O2)، رادیکال هیدروکسیل (OH0) و اکسیژن یکتایی (1O2) می باشد که سمی هستند (Breusegem *et al*., 2001). ROSهای تولید شده در سلول های گیاهی به وسیله سیستم های آنتی اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی کنترل می شوند (Vranova and Breusegem, 2002). کنترل سطح آنتی اکسیدان ها توسط سیستم های آنتی‌اکسیدانی حاصل می‌شود که شامل متابولیت هایی چون گلوتاتیون، آسکوربات، آلفاتوکوفرول، هیدروکوئینون ها، بتا کاروتن، فلاونوئیدها و آنزیم های روبندگی اکسیژن واکنشگر (ROS) مانند پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز می باشد (Vangronsveld and Clijsters, 1994). این آنزیم ها نقش بسیار مهمی در غیر فعال کردن رادیکال های آزاد اکسیژن در سلول گیاهان دارند، بسته به گونه گیاهی و شدت تنش میزان فعالیت آنها در گیاهان تغییر می کند (Alscher *et al*., 2002). در صورتیکه سمیت زدایی از اکسیژن های واکنشگر (ROS) صورت نپذیرد آسیب جدی به کلروفیل ها، پروتئین ها، لیپیدهای غشایی و اسیدهای هسته ای وارد می شود (Alscher *et al*., 2002). کیتوزان اخیراً بدلیل فعالیت های آنتی اکسیدانی توجه زیادی را به خود جلب کرده است (Guo *et al*., 2005). گیاهان در مقابله با تنش مکانیسم های حفاظتی متفاوتی را در پیش می گیرند که از آن جمله می توان به تجمع اسمولیت هایی مثل پرولین (Delauney and Verma, 1993; Nayyar, 2003) و قندهای محلول (Morgan, 1992; Hanson and Hitz, 1982; Jones and Turner, 1980) اشاره کرد. کربوهیدرات ها ترکیباتی هستند که با فتوسنتز مرتبط بوده و در تنظیم اسمزی سلول، نقش مهمی ایفاء می‌کنند. برخی از گزارشات حاکی از تجزیه کربوهیدرات‌های مرکب به کربوهیدرات های ساده در طی بروز تنش در اکثر گیاهان زراعی است (Sanchez *et al*., 1998). با توجه به به اهمیت کربوهیدرات های محلول در فرآیند تنظیم اسمزی، افزایش غلظت کربوهیدرات های محلول در برگ ممکن است به دلیل ساز و کار تنظیم اسمزی در گیاه باشد که خود نیاز به تحقیق بیشتری دارد. تغییرات غلظت

کربوهیدرات ها در القای ساز و کارهای تحمل در برابر تنش؛ بسیار مهم است، زیرا این ترکیبات به طور مستقیم با واکنش های فیزیولوژیکی مانند فتوسنتز، انتقال مواد فتوسنتز و تنفس در ارتباط هستند (Mckersie and Leshem, 1994). پرولین در تمام اعضای گیاه در مدت تنش وجود دارد، اگرچه تجمع در برگ‌ها سریعتر و بیشتر از نقاط دیگر صورت می‌گیرد، بیشتر فرضیه‌ها حاکی از آن است که محل تجمع پرولین در سیتوپلاسم سلول می‌باشد (Pal-leg and Aspinall,1981). تجمع پرولین در شرایط تنش، بیش از سایر اسیدهای آمینه صورت می‌گیرد که می‌تواند درتنظیم اسمزی و احتمالاً حفظ فعالیت آنزیمی گیاه نقش داشته باشد (Ashraf, 2004). نقش ترکیبات فنلی مربوط به خواص اکسیداسیون احیاء آنهاست که نقش مهمی در جذب و خنثی سازی رادیکال های آزاد، فرونشانی اکسیژن های فعال و یا پراکسیدازهای تجزیه کننده دارند (Javanmardi *et al*., 2002). مطالعات اخیر نشان داده است کیتوزان باعث افزایش میزان ترکیبات فنلی می شود (Esmailzadeh Bahabadi *et al*., 2012). در این مطالعه به منظور بررسی اثر کیتوزان بر مالون دی آلدئید (MDA)، میزان فعالیت برخی آنزیم های آنتی اکسیدان از جمله کاتالاز (CAT) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و آسکوربات پراکسیداز (APX)، میزان ترکیبات فنل، کلروفیل a، b، میزان کربوهیدرات محلول و پرولین می باشد.

## مواد و روش ها

این تحقیق در سال ۱۳۹۲ در پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی دانشگاه زابل اجرا گردید. آزمایش با ۳ تکرار در قالب طرح بلوک کامل تصادفی انجام گرفت.

### *کشت و آماده سازی زنیان*

برای انجام این پژوهش بذرهای زنیان از مرکز تحقیقات کشاورزی زابل تهیه و در گلدان ها در خاک تقریباً سبک از مخلوط مساوی ماسه الک شده، رس، گیاخاک و کود حیوانی کشت شد. پس از کشت، گلدان ها به گلخانه منتقل شدند و در شرایط یکسان در دمای روزانه ۲۵ تا ۳۰ و شبانه ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی گراد رشد کردند. ۳۰ عدد بذر در هر گلدان کشت شدند، بعد از سبز شدن بذرها، بوته ها در طی چند مرحله تنک گردیده و نهایتا در داخل هر گلدان ۸ بوته نگهداری شد. گلدان ها روزانه آبیاری شدند و هفته ای ۲ بار به آنها مقدار ۵۰ میلی لیتر محلول غذایی هوگلند داده شد (Hogland and Arnon, 1950).

### *تیمار با کیتوزان*

برای تهیه محلول کیتوزان (شرکت Sigma-Aldrich آمریکا)، با وزن مولکولی پایین، از روش (Khan *et al*., 2003) استفاده شد. برای این منظور ابتدا محلول استیک اسید یک درصد تهیه، سپس محلول کیتوزان در اسید ذکر شده تهیه گردید. اعمال محلول کیتوزان در غلظت های ۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ ppm به صورت محلول پاشی روی سطح برگ و در طی سه روز متوالی در مرحله ۴ برگی انجام شد. سپس اندام های هوایی گیاه پس از تیمار کیتوزان به منظور مطالعات بعدی، در مرحله ۴ برگی برداشت شدند. به این منظور بخش هوایی گیاهان از خاک جدا گردید و برای بررسی فعالیت آنزیم ها و دیگر شاخص های فیزیولوژیک، نمونه ها ابتدا در نیتروژن مایع منجمد گردید و سپس در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

### سنجش مالون دی آلدئید (MDA)

برای سنجش مالون دی آلدئید به عنوان شاخص لیپید پراکسیداسیون غشای سلولی از روش هیس و پاکر (Heath and Packer, 1969) استفاده شد. به منظور اندازه گیری MDA میزان ۲۰۰mg از بافت گیاهی منجمد شده با۳ mL تری کلرو استیک اسید (TCA)۱۰% سائیده شد. نمونه‌ها پس از همگن سازی، سانتریفوژ (۱۲۰۰۰rpm، به مدت ۱۵ دقیقه) شدند. به ۱ml از نمونه‌های صاف شده، ۱ml تیو باربیتوریک اسید (TBA)۰/۲۵درصد اضافه گردید و به مدت نیم ساعت در دمای ۱۰۰°C قرار داده شدند. میزان MDA با اندازه گیری جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Bju۱۱۱۰۰۲۰) در طول موج های ۵۳۲nm و ۶۰۰nm با استفاده از ضریب ثابت (ε=۱۵۵ mM-1 cm-1) محاسبه گردید.

### اندازه گیری آنزیم های آنتی اکسیدانت

جهت اندازه گیری آنزیم ها، ۰/۲ گرم از بافت سبز برگ فریز شده برداشت و با ۴cc بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی-مولار (pH=۷) و محلول EDTA ۰/۱mM در هاون سرد کاملاً ساییده، به صورت همگن در آورده شدند. مخلوط همگن از کاغذ صافی عبور و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۶۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. سپس فاز بالایی به عنوان عصاره پروتئینی برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد. همه این عملیات ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام گرفت. در نهایت برای اندازه-گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) از روش بیرز و سایزر (Beers and Sizer, 1952) در طول موج ۲۴۰ نانومتر، آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) از روش گیانوپولیتیس و رایس (Gian-nopolitis and Ries, 1977) در طول موج ۵۶۰ نانومتر و آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) از روش ناکانو و آساد (Nakano and Asad, 1981) در طول موج ۲۹۰ نانومتر استفاده شدند.

### تعیین میزان فنل کل

میزان ترکیبات فنلی کل بر اساس روش رنگ سنجی فولین – سیو کالتیو (Singleton and Rossi,1965) و بر حسب منحنی استاندارد گالیک اسید در طول موج ۷۲۵ نانومتر اندازه گیری شد. ابتدا ۰/۱ گرم از اندام گیاهی را در ۵ml اتانول ۹۵ درصد سائیده و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شد. سپس به ۱ml محلول رویی ۱ml اتانول ۹۵ درصد اضافه گردید و با آب مقطر دو بار تقطیر حجم محلول به ۵ml رسانده شد. سپس ۰/۵ ml معرف فولین ۱۰ درصد و ۱ml کربنات سدیم ۵ درصد به آن اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۱ ساعت در تاریکی نگهداری شد و این عصاره برای سنجش فنل کل با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل Bju1110020) بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر استفاده شد.

### اندازه گیری مقدار رنگیزه های فتوسنتزی

برای اندازه گیری کلروفیل a، b و کارتنوئید از روش لیچنتلر (Lichtenthaler, 1987) استفاده شد. بدین ترتیب که ۰/۳ گرم برگ تر گیاه وزن و سپس به تدریج با استون ۸۰ درصد سائیده شد. عمل استخراج تا حصول یک محلول سبز رنگ ادامه یافت. سپس حجم محلول با استون به ۲۵ میلی لیتر رسید. پس از سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ده دقیقه، جذب نوری در طول موج های

۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر بوسیله اسپکتروفتومتر (مدل Bju1110020) اندازه گیری شد سپس غلظت آنها بر اساس روابط زیر محاسبه گردید.

Chl.a=(۱۲/۲۵A۶۶۳/۲-۲/۷۹A۶۴۸/۸)

Chl.b=(۲۱/۲۱A۶۴۶/۸-۵/۱A۶۶۳/۲)

### *اندازه گیری مقدارکل کربوهیدرات های محلول*

میزان کربوهیدرات های محلول به روش اسچلگل (Schlegel, 1956) اندازه گیری شد. در این روش ۰/۲ گرم از بافت سبز برگ به همراه ml۱۰ اتانول ۹۵ درصد در لوله آزمایش دربسته قرار داده، به مدت یک ساعت در حمام بن ماری و در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شدند. پس از سرد شدن ۱ میلی لیتر از این نمونه ها برداشته شد و به آن ml۱ فنل ۰/۵ درصد و cc۵ اسید سولفوریک ۹۸ درصد اضافه شد. در نهایت میزان نور جذبی در ۴۸۳ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Bju1110020) قرائت شد، میزان کربوهیدرات های استخراجی بر اساس میکرو گرم گلوکز در گرم وزن ترمحاسبه گردید.

### *اندازه گیری پرولین*

برای اندازه گیری پرولین از روش بتز و همکاران (Bates *et al*., 1973) استفاده شد. ابتدا ۰/۵ گرم از اندام هوایی و ریشه توسط ml۱۰ میلی لیتر اسید سولفوریک ۳ درصد در هاون چینی کاملا ساییده و در نهایت با کاغذ صافی صاف گردید. به ml۲ از محلول حاصل، ml۲ معرف ناین هیدرین اضافه و پس از قرارگیری در حمام آب جوش به مدت یک ساعت، لوله های محتوی محلول حاصل در یخ قرار گرفت تا سرد شدند. بعد از این مرحله، ml۴ تولوئن اضافه گردید. از فاز رویی برای اندازه گیری میزان پرولین در طول موج ۵۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Bju1110020) استفاده شد. با استفاده از منحنی استاندارد، مقدار پرولین برحسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه شد.

در پایان داده ها با استفاده از نسخه ۹/۲ نرم افزار SAS موردتجزیه واریانس قرار گرفت و میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه گردید.

## نتایج و بحث

### *تأثیر کیتوزان بر میزان مالون دی آلدئید (MDA) اندام هوایی*

نتایج واریانس مشاهدات نشان داد که کیتوزان تاثیر معنی داری بر میزان مالون دی آلدئید (MDA) داشت (جدول ۱). مقایسه میانگین نتایج حاصل از تأثیر کیتوزان بر میزان مالون دی آلدئید (MDA) اندام هوایی نشان داد با افزایش غلظت کیتوزان از صفر (نمونه شاهد) تا ppm۲۰۰ میزان مالون دی آلدئید (MDA) از یک روند افزایشی پیروی می کند. به طوری که غلظت های مختلف (ppm۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰) کیتوزان نسبت به شاهد ۳۴/۲۳، ۶۲/۵۸ و ۹۶/۷۲ درصد به ترتیب باعث افزایش معنی داری میزان مالون دی آلدئید (MDA) شد (شکل ۱).

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) از یک روند افزایشی پیروی می کند. به طوری که غلظت های مختلف (ppm۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰) کیتوزان نسبت به شاهد۳۵/۳۳، ۷۲/۴۸ و ۹۱/۲۲ درصد باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) شد (شکل a۲). نتایج حاصل از آنالیز واریانس مشاهدات مربوط

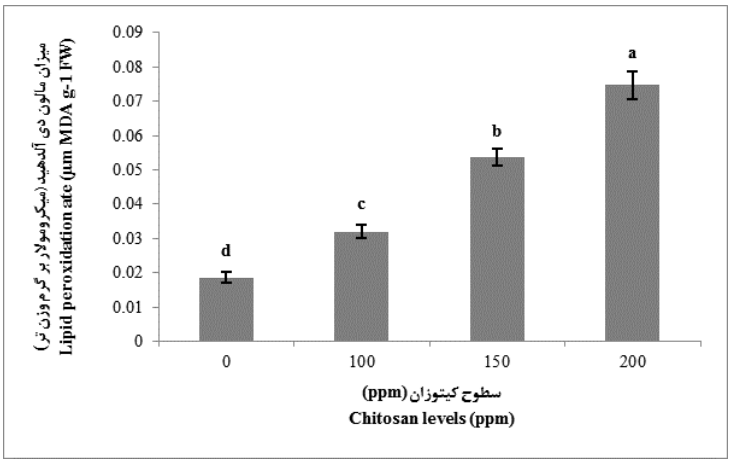
جدول ۱- تجزیه واریانس تاثیر کیتوزان بر صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه زنیان.

**Table 1- Variance analysis of the effect of chitosan on physiological and biochemical characterization in *Carum copticum* L.**

| منابع تغییر S.O.V | درجه آزادی D.F | میانگین مربعات Mean of Squares | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | کاتالاز Catalase | سوپر اکسید دیسموتاز Superoxide dismutase | آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase | مالون دی آلدئید Malondialdehyde | ترکیبات فنل کل Phenol compounds | کلروفیل b Chlorophyll b | کلروفیل a Chlorophyll a | پرولین Proline | کربوهیدرات Carbohydrat |
| تکرار Replication | 2 | 246.79$^{n.s}$ | 138.261$^{n.s}$ | 13.82$^{n.s}$ | 0.0045$^{n.s}$ | 23.57$^{n.s}$ | 0.002$^{n.s}$ | 0.0004$^{n.s}$ | 0.004$^{n.s}$ | 0.0023$^{n.s}$ |
| کیتوزان Chitosan | 3 | 162.56$^{**}$ | 176.668$^{**}$ | 1383.04$^{**}$ | 0.005$^{**}$ | 131.26$^{**}$ | 0.004$^{**}$ | 0.0017$^{**}$ | 0.0016$^{**}$ | 0.0019$^{**}$ |
| خطا Error | 6 | 4567.80 | 684.005 | 2.53 | 0.0007 | 3.31 | 0.0009 | 0.002 | 0.0025 | 0.0025 |
| ضریب تغییرات C.V% | - | 1.5 | 1.6 | 1.8 | 7.1 | 5.3 | 5.6 | 5.7 | 4.2 | 4.4 |

$^{*}$ and $^{**}$ are significant at 0.05 and 0.01 probability levels, and ns is not significant.

$^{*}$ و $^{**}$ به ترتیب معنی دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns، معنی دار نیست.




شکل ۱-تاثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر میزان مالون دی آلدئید (MDA).حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری در سطح ۵ درصد می‌باشد.

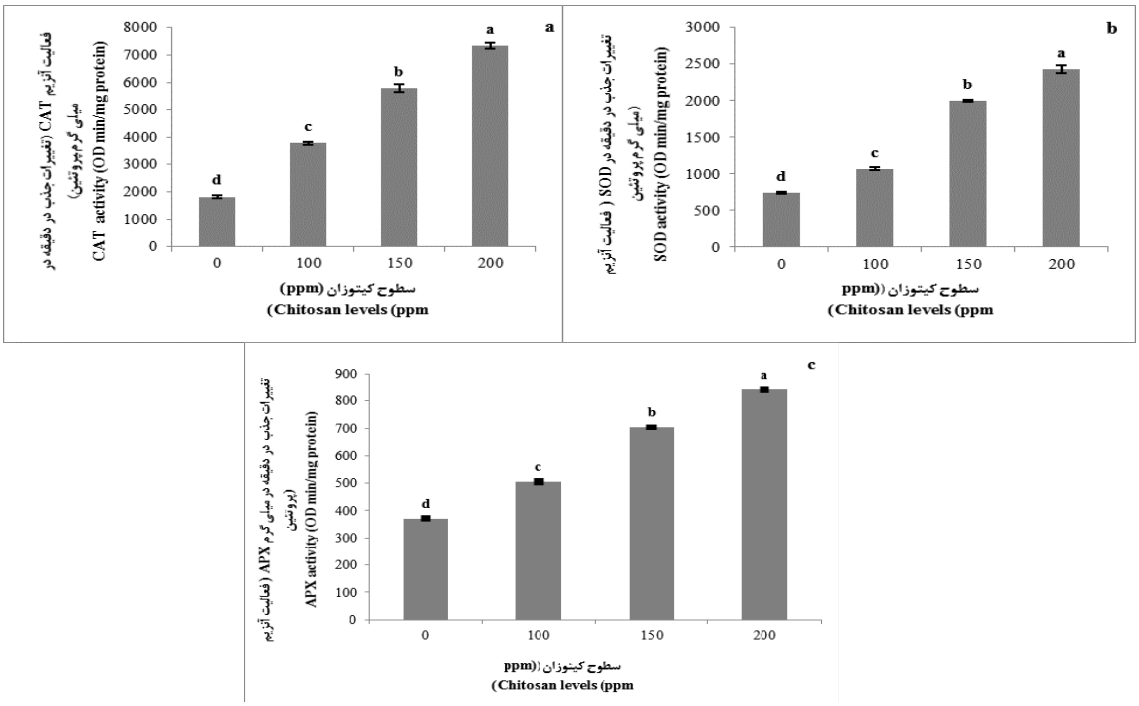
**Figure 1- Effect of different concentrations of chitosan on malondialdehyde content.common letters demonstrate not significant at 0.05 probability levels.**

به میزان فعالیت آنزیم آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) نشان داد، کیتوزان باعث افزایش این صفت به طور معنی‌داری شده است (جدول ۱). بررسی میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) اندام هوایی تحت تأثیر کیتوزان نشان داد بیشترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در غلظت ppm ۲۰۰ کیتوزان مشاهده شد که نسبت به شاهد ۹۱/۷۴ درصد افزایش داشت (شکل b۲).

نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که کیتوزان تاثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) اندام هوایی داشت (جدول۱). نتایج حاصل از میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) اندام هوایی تحت تأثیر کیتوزان نشان داد کیتوزان نسبت به شاهد

باعث افزایش معنی داری میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) گردید به طوری که غلظت های مختلف (۱۰۰ppm، ۱۵۰ و ۲۰۰) کیتوزان نسبت به شاهد ۴۶/۱۸، ۷۱/۸۹ و ۹۲/۶۱ درصد باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) شد (شکل c۲).

در شرایط عادی رشد، بسیاری از فرآیندهای متابولیکی در گیاهان باعث تولید گونه های فعال اکسیژن می شوند، اما گیاهان مکانیسم های آنتی اکسیدانی کارآمدی برای از بین بردن گونه های فعال اکسیژن دارند (Iturbe-ormaetxe *et al*., 1998). تحت شرایط تنش این تعادل به هم خورده و مقدار گونه های فعال اکسیژن افزایش می یابند. حضور این گونه های فعال برای گیاه مضر بوده و موجب آسیب به ساختارهای سلولی مثل غشاء، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک می شوند (Laspina *et al*., 2005). اندازه گیری محصولات پراکسیداسیون لیپید یکی از معمول ترین و قابل قبول ترین روش های اندازه گیری صدمات اکسیداتیو به غشاء است (Shu-laev and Oliver, 2006). بر اساس نظر مکرسی و لیشم (Mckersie and Leshem, 1994) آنزیم های آنتی اکسیدان در پراکسیزوم، سیتوزول و میتوکندری وجود دارند و سبب تبدیل H2O2 به H2O و O2 می شود. مطالعات متعدد نشان داده است که کیتوزان به عنوان یک الیسیتور زیستی ممکن است دارای پتانسیلی برای از بین بردن رادیکال های آزاد باشد (Kim and Thomas, 2007; Yen *et al*., 2008). فعالیت آنتی اکسیدانی کیتوزان توسط چندین مکانیسم توصیف شده است (Muzzarelli and Terbojerich, 1997; Park and Kim, 2004).




**شکل ۲-تاثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (a)، آنزیم سوپراکسید دیسموتاز(b) و آنزیم آسکوربات پراکسیداز (c). حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری در سطح ۵ درصد می‌باشد.**

**Figure 2- Effect of different concentrations of chitosan on catalase (a), superoxide dismutase (b) and ascorbate peroxidase (c) enzymes activity. common letters demonstrate not significant at 0.05 probability levels.**

کیتوزان می تواند رادیکال های آزاد OH و O2- را از بین ببرد و گفته شده است خاصیت محافظت از DNA را دارد (Harish Prashanth *et al*., 2007). طبق تحقیقات انجام شده تیمار کیتوزان باعث افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و ترکیبات فنلی در گوجه فرنگی شده است (Liu *et al*., 2007). همچنین طبق بررسی های صورت گرفته فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان کاتالاز و پلی فنل اکسیداز در ریشه بادمجان تحت تیمار با الیسیتور کیتوزان افزایش یافته-است (Mandal, 2010). کیتوزان فعالیت آنزیم های پراکسیداز و کاتالاز را در دو گونه ذرت افزایش داده است (Guan *et al*., 2009). تحقیقات نشان داد میزان پرولین و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی کاتالاز و پراکسیداز تحت تأثیر تیمار کیتوزان در گیاهچه های گلرنگ افزایش یافت (Mahdavi *et al*., 2012). همچنین طی بررسی های انجام شده کیتوزان باعث افزایش فعالیت آنزیم های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز گردید (Naderi *et al*., 2014)، که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد میزان فعالیت هر سه آنزیم در طی تیمار با کیتوزان افزایش می یابد، این امر بیان میکند در گیاه زنیان تحت تیمار با کیتوزان همکاری آنزیم های حفاظتی مانند کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز توانست اکسیژن واکنشگر (ROS) را حذف کند و باعث بالانس همواستاتیک بین تولید و حذف اکسیژن واکنشگر (ROS) گردد و مقدار رادیکال های آزاد را کاهش دهد، در واقع هر سه آنزیم آنتی اکسیدان با هم فعال شده و سبب کاهش اثرات سوء تنش اکسیداتیو می شوند. آنتی اکسیدان ها بر اساس عملکردشان به دو گروه اصلی تقسیم می شوند: آنتی اکسیدان های اولیه و ثانویه (Mahdavi *et al*., 1995).

### *تأثیر کیتوزان بر میزان ترکیبات فنل کل*

نتایج تجزیه واریانس میزان ترکیبات فنل کل نشان داد، اثر کیتوزان بر این صفت معنی داری بود (جدول ۱). بررسی میزان ترکیبات فنل کل اندام هوایی تحت تأثیر کیتوزان نشان داد بیشترین میزان فعالیت ترکیبات فنل کل درغلظت ppm ۲۰۰ نسبت به شاهد ۸۶/۳۵ درصد افزایش داشت (شکل ۳). آنتی اکسیدان های اولیه الکترون یا هیدروژن خود را به رادیکال های آزاد می دهند در حالیکه آنتی اکسیدان های ثانوی به عنوان همیار عمل کلاته کننده نقش خود را ایفا می نمایند (Gordon, 1990). فنل ها معمولا به عنوان جاروب کننده رادیکال های آزاد عمل می کنند (Pietta, 2000; Prakash *et al*., 2007). گروه های OH فنلی از ارجح ترین گروه ها برای از دست دادن پروتون از اشکال اکسید شده تک الکترونی هستند. پایداری رادیکال های فنوکسیل منتج از آنها باعث افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی و توانایی بیشتر ترکیب های دارای گروه های هیدروکسیل متعدد برای جاروب کردن رادیکال های آزاد اکسید شده می گردد، همچنین از تشکیل رادیکال های آزاد ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها جلوگیری به عمل می آورد (Alavi *et al*., 2010).

ترکیبات فنلی مهار کننده قوی برای تنش اکسایشی هستند و در همکاری با پراکسیدازها در جمع آوری یا حذف پراکسید هیدروژن شرکت می کنند (Kovacik *et al*., 2009).

گیاهان ترکیبات فنلی را در پاسخ به برخی ترکیبات پیام رسان آزاد می سازند که نقش دفاعی مهمی دارند (Bais *et al*., 2004).

در این بررسی مشاهده شد تیمار کیتوزان باعث افزایش معنی داری ترکیبات فنلی شده

است. بنابراین افزایش مقدار این ترکیبات احتمالا به دلیل نقش آنتی اکسیدانی آنها در برابر ROS ها ست. بررسی ها نشان داد کیتوزان باعث افزایش ترکیبات فنلی در کتان سفید (Linum album) گردید (Esmailzadeh Bahabadi *et al*., 2012) که با نتایج این آزمایش مطابقت نشان داد.

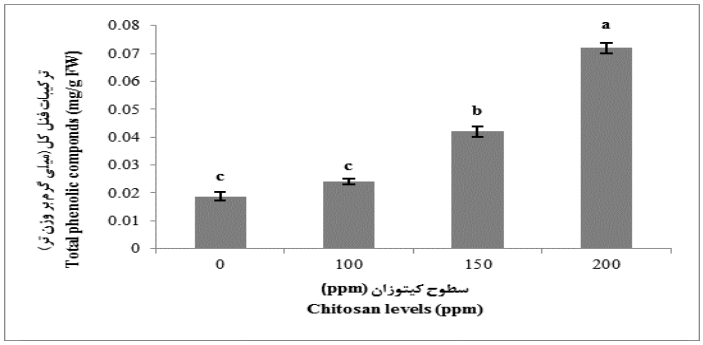
### *تأثیر کیتوزان بر میزان کلروفیل a و b*

نتایج حاصل از آنالیز واریانس کلروفیل a و b تحت تاثیر کیتوزان نشان داد، که کیتوزان اثر معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد داشت (جدول ۱). نتایج حاصل از مقایسه میانگین میزان کلروفیل a و b اندام هوایی تحت تأثیرکیتوزان نشان داد میزان کلروفیل a و b در غلظت های مختلف (۱۰۰ppm، ۱۵۰ و ۲۰۰) کیتوزان نسبت به شاهد باعث افزایش در میزان کلروفیل a و b شدند (شکل ۴a و ۴b).

در این تحقیق تحت تأثیر کیتوزان میزان رنگیزه های کلروفیلی و کارتنوئید تحت تأثیر کیتوزان افزایش نشان داد. بررسی تاثیر کیتوزان بر روی گیاه زنیان نشان داد که کیتوزان باعث افزایش معنی‌داری میزان کلروفیل a،b و کاروتنوئید در این گیاه شده است که با نتایج حاضر مطابقت دارد (Khajeh and Naderi, 2014). در مطالعات انجام شده دیگر در سویا و بادام زمینی و قهوه نیز کیتوزان منجر به افزایش مقدار کلروفیل و کاروتنوئید شده است که با نتایج این آزمایش مطابقت داشت (Dzung and Thang, 2004, 2011).

### *تأثیر کیتوزان بر میزان کربوهیدرات و پرولین*

نتایج حاصل از آنالیز واریانس مشاهدات نشان داد که کیتوزان تاثیر معنی داری بر میزان کربوهیدرات در سطح احتمال ۱ درصد داشت (جدول ۱). مقایسه میانگین نتایج بررسی میزان کربوهیدرات اندام هوایی تحت تأثیر کیتوزان نشان داد با افزایش غلظت کیتوزان از صفر (نمونه شاهد) تا ۲۰۰ppm میزان کربوهیدرات از یک روند افزایشی پیروی می کند. به طوری که غلظت های مختلف (۱۰۰ppm، ۱۵۰ و ۲۰۰) کیتوزان نسبت به شاهد ۴۳/۵، ۶۲/۱ و۹۴/۶ درصد به ترتیب باعث افزایش معنی داری میزان کربوهیدرات شد (شکل a۵). در گیاه زنیان تحت تیمار کیتوزان میزان قندهای محلول در غلظت های بالاتر نسبت به شاهد افزایش می یابد. بررسی ها نشان داد در گیاه بادرنجبویه نیز




شکل ۳-تاثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر میزان ترکیبات فنل کل.حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری در سطح ۵ درصد می‌باشد.

**Figure 3- Effect of different concentrations of chitosan on total phenol compounds. common letters demonstrate not significant at 0.05 probability levels.**

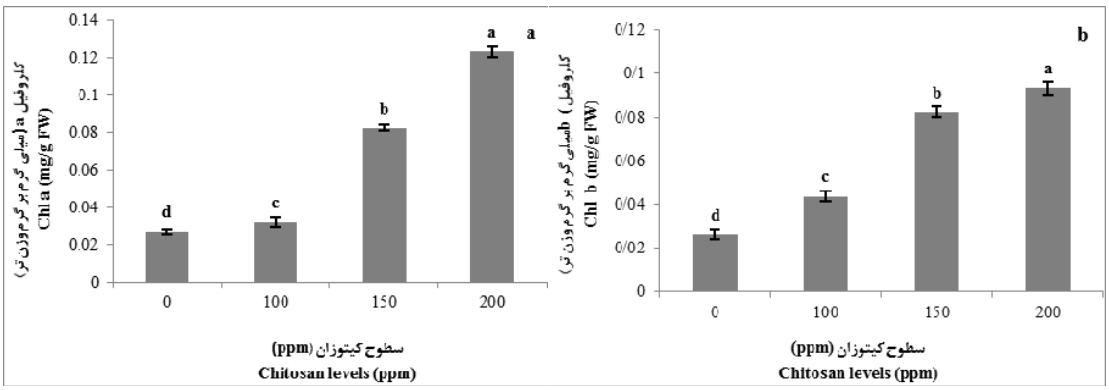
با افزایش غلظت کیتوزان میزان کربوهیدرات افزایش یافت (Khajeh and Naderi, 2014).

در واقع با افزایش غلظت کیتوزان، تغییرات فرا ساختاری در اندامک های سلولی از قبیل تونوپلاست و آنزیم های مسیر متابولیسم قندها ایجاد می شود. در واقع این یک نوع مکانیسم تطابقی و سازگار یافته برای حفظ و نگهداری پتانسیل اسمزی تحت تیمار کیتوزان می باشد. در این بررسی افزایش محتوای قندهای محلول تحت تیمار کیتوزان مشاهده شد که احتمالاً به دلیل هیدرولیز نشاسته است (Kovacik *et al*., 2009). مکانیزم دفاعی گیاه در برابر تنش نیاز به نوعی سازش اسمزی دارد. این سازش اسمزی می تواند از طریق سنتز ترکیبات محلول درون سلولی تامین گردد (Serrano *et al*., 1999). تحقیقات نشان داد میزان قندهای محلول تحت تأثیر تیمار کیتوزان در گیاهچه های گلرنگ افزایش یافت که با نتایج این آزمایش مطابقت داشت (Mahdavi *et al*., 2012).

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که کیتوزان تأثیر معنی‌داری بر میزان پرولین در سطح احتمال ۱ درصد داشت (جدول ۱). مقایسه میانگین نتایج حاصل از تأثیر کیتوزان بر میزان پرولین اندام هوایی نشان داد با افزایش غلظت کیتوزان از صفر (نمونه شاهد) تا ۲۰۰ ppm میزان پرولین از یک روند افزایشی پیروی می کند. به طوری که غلظت های مختلف (۱۰۰ppm، ۱۵۰ و ۲۰۰) کیتوزان نسبت به شاهد ۴۹/۰۸، ۷۱/۷ و ۹۱/۴ درصد به ترتیب باعث افزایش معنی داری میزان پرولین شد (شکل b۵).

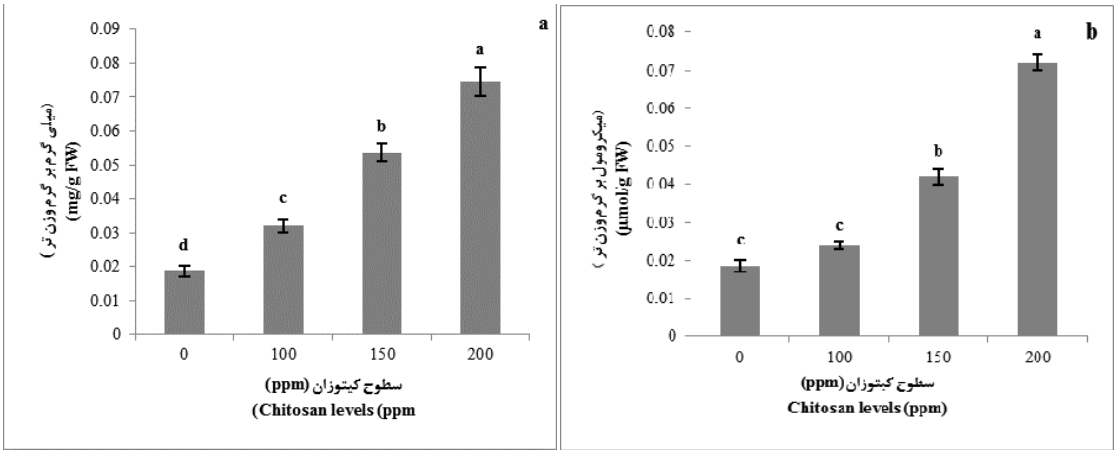
پرولین می تواند ترکیباتی نظیر پروتئین های ساختاری را از طریق حفظ ثبات ساختمانی حمایت کند (Bates *et al*., 1973). همچنین پرولین تجمع یافته در گیاهان، باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی و خنثی سازی رادیکال های آزاد هیدروکسیل می گردد (Synerri *et al*., 1993).

تحقیقات نشان داد میزان پرولین تحت تأثیر تیمار کیتوزان در گیاهچه های گلرنگ افزایش یافت که با نتایج این آزمایش مطابقت داشت (Mahdavi *et al*., 2012). خواجه و نادری (Khajeh and Naderi, 2014) طی آزمایشی در گیاه بادرنجبویه نشان دادند کیتوزان باعث افزایش میزان




شکل ۴- تاثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر میزان کلروفیل a (a) و کلروفیل b (b). حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری در سطح ۵ درصد می‌باشد.

**Figure 4- Effect of different concentrations of chitosan on chlorophyll a (a) and chlorophyll b (b) content. common letters demonstrate not. significant at 0.05 probability levels.**




شکل ۵-تاثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر میزان کربوهیدرات(a) و میزان پرولین (b). حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری در سطح ۵ درصد می‌باشد.

**Figure 5- Effect of different concentrations of chitosan on carbohydrate (a) and proline (b) content.common letters demonstrate not significant at 0.05 probability levels.**

پرولین شد که با تحقیق حاضر مطابقت نشان داد. در این بررسی مشاهده شد که کیتوزان در غلظت های بالا باعث افزایش میزان پرولین شد.

## نتیجه گیری کلی

نتایج این آزمایش تاثیر کیتوزان بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاه زنیان را مورد بررسی قرار داد. نتایج نشان داد تحت تاثیر کیتوزان میزان مالون دی آلدئید (MDA)، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت، ترکیبات فنلی، کلروفیل a،b، کربوهیدرات و پرولین نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری یافته که حداکثر میزان در غلظت ۲۰۰ppm بود. بر اساس نتایج حاصل به نظر می رسد که استفاده از کیتوزان با غلظت های مناسب (۱۵۰ تا ۲۰۰ppm ) از طریق افزایش آنزیم های آنتی اکسیدان و تنظیم اسمزی با افزایش برخی ترکیبات شیمیایی می تواند به عنوان الیسیتور زیستی کارآمد در سیستم دفاعی و تولید متابولیت های ثانویه در گیاهان داروئی تأثیر گذار باشد.

## سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات و همکاری صمیمانه آقای محسن نادری و پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی دانشگاه زابل تقدیر و تشکر می گردد.

## REFERENCES

**Alavi, L., Barzegar, M., Jabbari, A. and Naghdi Badi, H.** 2010. Effect of heat treatment on chemical composition and antioxidant property of *Thymus daenensis* essential oil. *Journal of Medicinal Plants*, 9(35): 129-138. (In Persian)

**Alscher, R.G., Erturk, N. and Heath, L.S.** 2002. Role of superoxide dismutase (SOD) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany,* 53: 1331-1341.

**Ashraf, M.** 2004. Some important physiological criteria for salt tolerance in plants. Flora, 199: 361-376.

**Bais, H.P., Park, S.W., Weir, T.L., Callaway, R.M. and Vivanco, J.M.** 2004. How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in Plant Science,* 9: 26-32.

**Bates, L.S., Waldren, S.P. and Teare, I.D.** 1973. Rapid determination of free proline for water-

stress studies. *Plant soil*, 39: 205-207.

**Beers, G.R. and Sizer, I.W.** 1952. Aspectrophotometric method for measuring the breakdown to hydrogen peroxide by catalase. *Biology.Chemistry*, 195: 133-140.

**Breusegem, F.V., James, F., Dat, D. and Inze, D.** 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*, 161:423-431.

**Cheng, X., Zhou, U. and Cui, X.** 2006. Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in Cistanchedeserticolacell suspension cultures by chitosan elicitor. *Journal of Biotechnology*,121: 253-260.

**ChevallerMonimh, A.** 1997.The Encyclopedia of Medicinal Plants. Borling Kindersley, London, PP: 335.

**Davazdah Imami, S. and Majnoun Hosseini, N.** 2008. Farming and producing medical plants. Tehran University Press, PP: 300.

**Delauney, A.J. and Verma, D.P.S.** 1993. Proline biosynthesis and degradation in plants. *Journal of Plant Physiology*, 4: 215-223.

**Esmaeilzadeh Bahabadi, S., Sharifi, M., Safaie, N. and Behmanesh, M.** 2012. Enhancement of lignin and phenylpropanoid compounds production by chitosan in *Linum album* cell culthure. *Journal of Plant Biology,* 11: 13-26. (In Persian)

**Giannopolitis. C.N. and Ries, S.K.** 1977. Superoxide dismutase. 1. Occurrence in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 59: 309-314.

**Gordon, M.H.** 1990. The mechanism of antioxidant action in vitro: 1-18. In: Hudson, B.J.F. (eds). Food Antioxidant, Elsevier Applied Science. New York: NY, USA, PP: 329.

**Guan, Y.J.J., Hu, X., Wang, J. and Shao, C.X.** 2009. Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. *Plant Science*, B10:427-433.

**Guo, Z.Y., Xing, R.E., Liu, S., Yu, H.H., Wang, P.B., Li, C.P. and Li. P.C.** 2005.The synthesis and antioxidant activity of the Schiff bases of chitosan and carboxymethyl chitosan. *Journal of Medicinal. Chemictry*, 15:4,600-4,603.

**Hanson, A.D. and Hitz, W.D.** 1982. Metabolic responses of plant water deficit. *Journal of Plant Physiology*, 23: 163-203.

**Harish Prashanth, K.V., Dharmesh, K.S. Jagannatha, R. and Tharanathan, R.N.** 2007. Free radical-induced chitosan depolymerized products protect calf thymus DNA from oxidative damage. *Carbohydrat*, 342: 190-195.

**Heath, R.L. and Packer, L.** 1969. Photoperoxidation in isolated chloroplast, l. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Journal of Biochemictry Biophysical*, 125: 189-198.

**Hoagland, D.R and Arnon, D.I.** 1950. The water culture method for growing plant without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*, 347:32-33.

**Iturbe-ormaetxe, I., Escuredo, P.R., Arrese-Igor, C. and Becana, M.** 1998. Oxidative damage in pea plant exposed to water deficit or paraquat. *Journal of Plant Physiology*, 116: 173-181.

**Javanmardi, J., Khalighi, A., Kashi, A., Bais, H.P. and Vivanco, J.M.** 2002. Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5878-5883.

**Jones, M.M. and Turner, N.C.** 1980. Osmotic adjustment in expanding and fully expanded leaves of sunflower in response to water deficits. *Journal of Plant Physiology*, 7:181-192.

**Kang, S.M., Jung, H.Y., Kang, Y.M., Yun, D.J., Bahk, J.D., Yang, J.K. and Choi, M.S.** 2004. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of Scopoliaparviflora. *Plant Science*, 166: 745-751.

**Khajeh. H. and Naderi. S.** 2014. The effect of chitosan on some antioxidant enzymes activity and biochemictry characterization in Melissa (*Melissa officinalis*). *Research Journal of Crop Science in Arid Area*, 1: 100-116.(In Persian)

**Khan, W., Prithiviraj, B. and Smith, D.L.** 2003. Chitosan and chitinoligomers increase phenylalanine ammonia-lyaseand tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *Journal of Plant Physiology*, 160: 859-63.

**Kim, K.W. and Thomas, R.L.** 2007. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. *Journal of Food Chemistry*, 101:308-313.

**Kovacik, J., Backor, M., Strnad, M. and Repcak, M.** 2009. Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. *Plant Cell Report*, 28: 135-143.

**Laspina, N.V., Groppa, M.D., Tomaro, M.L. and Benavides, M.P.** 2005. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. *Plant Science*, 169: 323-330.

**Lichtenthaler, H.K.** 1987. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology, 148: 350-382.

**Liu, J., Tian, S., Meng, X. and Xu, Y.** 2007. Effects of chitosan on control of postharvest diseases

and physiological responses of tomato fruit. *Journal of Postharvest Biology. Technology*, 44: 300-306.

**Loza-Tavera H.** 1999. Monoterpenes in essential oils.Biosynthesis and properties. *Advance Experimental Medicine and Biology*, 464: 49-62.

**Madhavi, D.L., Singhal, R.S. and Kulkarni, P.R.** 1995. Technological aspects of food antioxidants: 158-266. In: Madhavi, D.L., Deshpande, S.S. and Salunkhe, D.K. (eds.). Food Antioxidants Technological, Toxicological, and Health Perspectives.Marcel Dekker, Inc., New York, PP: 512.

**Mahdavi, B., ModarresSanavy, S.A.M., Aghaalikhani, M. and Sharifi, M.** 2011.Effect of water stress and chitosan on Germination and proline of seedling in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Journal of Crop Improvement*, 25:728-741.

**Mandal, S.** 2010. Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. *Journal of Biotechnology*, 9:8038-8047.

**Mckersie, D.B. and Leshem, Y.** 1994. Stress and Coping in Cultivated Plants. Kluwer Acad. Pub, London.

**Mirzavand Boroujerdi, S.** 1992. The study and comparision of microscopical and phytochemical characteristics of Enison's, *carum copticum*. Medicine. Ph.D thesis, Medicine Faculty, Esfahan Medical Sciences University, PP: 52.

**Momeni, T. and Shahrokhi, N.** 1991. Plant essential oils and their medical effect. Tehran University, PP: 127.

**Morgan, J.M.** 1992. Osmotic components and properties associated with genotypic differences in osmoregulation in wheat. *Journal of Plant Physiology*, 19: 67-76.

**Muzzarelli, R.A.A., Muzzarelli, C.M. and Terbojerich, M.** 1997. Chitin chemistry, upgrading a renewable source.*Carbohydrate*, 19:10-17.

**Naderi, S., Fakheri, B. and Esmailzadeh Bahabadi. S.** 2014. Increasing of Chavicol o-Methyl Transfrase Gene Expression nd Catalase and Ascorbate Peroxidase Enzymes Activity of *Ocimum basilicum* by Chitosan. *Journal of Crop Biotechnology*, 6: 1-9. (In Persian)

**Nayyar, H.** 2003. Acclimation of osmolytes and osmotic adjastmant in water-stressed wheat and maiz as affected by calcium and its antagonists. *Journal of Experimental Botany*, 50: 253-264.

**Nakano, Y. and Asada, K.** 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidaes in spinach Cell Environment, 16: 15-24.

**Palleg, L.G. and Aspinall, D.** 1981. The physiology and biochemistry of drought resistance in plants. Academic press, PP: 205-241.

**Park, P.J., Je, J.Y. and Kim, S.K.** 2004. Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. Carbohydrate, 55:17-22.

**Pietta, P.G.** 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7): 1035-1042.

**Prakash, D., Suri, S., Upadhyay, G. and Singh, B.N.** 2007. Total phenol, antioxidant, and free radical scavenging activities of some medicinal plants. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 58: 18-28.

**Pu, G.B., Dong-Ming, M., Chen, J.L. Ma, L.Q. Wang, H. and Li, G.F.** 2009. Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in Artemisia annual. *Plant Cell Report*, 28: 1127-1135.

**Sahaf, Z., Moharami Pour, S., Negahban, M. and Sahar Khiz, M.J.** 2004. Effect of C*arum copticum* essential oil on *Tribolium castaneum* Herbest. *Second Medical Plants Conference*. Shahed University, PP: 115: 7-8. (In Persian)

**Sanchez, F.J., Manzanares, M., Andres, E.F., Tenorio J.L. Ayerbe, L. and Andres, E.F.** 1998. Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble suger and prolin accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. *Field Crops Research*, 59: 225-235.

**Schlegel, H.G.** 1956. Die verwertung organis chersauren durch chlorella in lincht. *Planta*, 47: 510-516.

**Shulaev, V. and Oliver, D.J.** 2006. Metabolic and proteomic markers for oxidative stress.New tools for reactive oxygen species research. *Journal of Plant Physiology*, 141: 367-372.

**Singleton, V.L. and Rossi, J.R.** 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungestic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.

**Vangronsveld, J. and Clijsters, H**. 1994. Toxic effects of metals. In: Plants and the Chemical Elements: Biochemistry, Uptake, Tolerance and Toxicity. Edited by M.E. Farago, Wienheim.

**Vranova, E., Inze, D. and Breusegem, V.F.** 2002. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1227-1236.

**Yen, M.T., Yang, J.H. and Mau, J.L.** 2008. Antioxidant properties of chitosan from crab shells. Carbohydrat, 74: 840-844.

**Zhao, J., Davis, L.C. and Verpoorte, R.** 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Journal of Biotechnology Advances*, 23: 283-333.

# The effect of chitosan on some physiological and biochemical characteristics of Ajowan (*Carum copticum* L.)

***Salehe Naderi[1]*, Barat Ali Fakheri[2], Mojtaba Seraji[3]***

*1- Ph.D. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology and Research Center of Biotechnology, University of Zabol, Zabol, Iran*

*2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology and Research Center of Biotechnology, University of Zabol, Zabol, Iran*

*3- Former MSc. student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran*

*Corresponding Author Email: *salehe.naderi@gmail.com*

Receive: July 1, 2016; Revise: August 27, 2016; Accept: November 24, 2016

## ABSTRACT

Chitosan is a glucosamine polysaccharide deacetylated form of chitin species and could be used as a biotic elicitor to improve secondary metabolites. In order to study the effect of chitosan on malondialdehyde (MDA), antioxidant enzymes activity such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX), phenol compounds, chlorophyl a, b, carbohydrate and proline in ajowan, this study was conducted as a randomized complete block design (RCBD) with three replications at Biocenter of University of Zabol. Chitosan had four levels (0, 100, 150 and 200 ppm). In comparison with the control, the results showed that malondialdehyde (MDA), antioxidant enzymes activity such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX), phenol compounds, chlorophyl a, b, carbohydrate and proline increased to 72.96, 92.22, 91.74, 92.61, 86.35, 73.52, 81.16, 94.6 and 91.4% respectively, while increasing the amount of chitosan to 200 ppm. It seems that in concentrations higher than 100 ppm, chitosan, as a biotic elicitor, increases antioxidant enzyme activity and secondary metabolites production in four stages of ajowan.

***Keywords:*** *Antioxidative Enzymes Activity, Carum Copticum, Chitosan, Phenol Compounds, Malondialdehyde*

**How to cite this article**

*Naderi S, Fakheri BA, Seraji A. The effect of chitosan on some physiological and biochemical characteristics of Ajowan (Carum copticum L.) . J Crop Sci Res Arid Reg, 2017; 1(1):51-64. DOI: 10.22034/csrar.01.01.05*

**COPYRIGHTS**

Copyrights for this article are retained by the author(s) with publishing rights granted to the JCSRAR Journal.
The content of this article is distributed under JCSRAR open access policy and the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0) License. For more information, please visit http://cropscience.uoz.ac.ir/?lang=en.