نشریه علمی ـ پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی، جلد دهم، شماره ۴(۴۰)، زمستان ۱۳۹۵، صفحه ۸۹۰-۸۷۵

پاسخ برخی خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی گاوزبان (*Borago officinalis* L.) به محلول‌پاشی نانو ذرات تیتانیوم

روفیا حیدری رمی[۱*]، پیام معاونی[۲]، حسین حسین‌پور درویشی[۲] و مهدی عارف‌راد[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۷/۱۵ تاریخ بازنگری: ۱۳۹۴/۱۰/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۶/۲۳

چکیده

گیاه گاوزبان از نظر دارویی از اهمیت خاصی برخوردار است. بنابراین، اثر تیمارهای متفاوت نانو ذرات تیتانیوم (۰/۰۱، ۰/۰۳ و ۰/۰۵٪) و تیتانیوم غیرنانو در مراحل مختلف رشد گیاه بر روی ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی گاوزبان در مراحل ۵-۴ برگی، گلدهی و ۱۵ روز پس از گلدهی، طی یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در سال زراعی ۱۳۹۱ در مزرعه کشاورزی روستای رمنت، شهرستان بابل از استان مازنداران اجرا گردید. نتـایج این مطالعه اختلاف معنی‌داری را برای صفات مورد مطالعه در تیمارهای مختلف تیتانیوم، زمان مصرف و اثرات متقابل بین آنها نشان داد. صفات وزن تر برگ، وزن خشک برگ و وزن تر ساقه در سطح احتمال ۱٪ و صفات ارتفاع بوته، وزن خشک ساقه، وزن تر بوته و وزن خشک بوته در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری را در اثرات متقابل تیمارهای تیتانیوم و زمان مصرف آنها نشان دادند. بیشترین ارتفاع بوته، وزن خشک برگ و وزن تر و خشک کل بوته از تیمارهای مربوط به نانو ذرات تیتانیوم و در زمان پس از گلدهی و بیشترین وزن تر برگ، وزن تر ساقه و وزن تر کل بوته در تیمار مربوط به تیتانیوم غیرنانو و در زمان گلدهی حاصل شدند. آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز کمترین میزان را در تیمار نانو تیتانیوم ۰/۰۱٪ و در زمان ۱۵ روز بعد از گلدهی نشان داد. به‌طورکلی نتـایج این مطالعه نشـان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای تیتانیوم غیرنانو و نانو ذرات تیتانیوم، خصوصاً در زمان اعمال آنها در گاوزبان، وجود دارد. تیمارهای مورد استفاده تیتانیوم غیرنانو در زمان گلدهی و نانو ذرات تیتانیوم در زمان بعـد از گلدهی می‌توانند در افزایش عملکرد سرشاخه‌های گلدار گاوزبان مؤثر باشند.

واژگان کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، صفات مورفولوژیک، گاوزبان، مالون‌دی‌آلدئید (MAD)، نانو ذرات تیتانیوم.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرقدس، ایران
(* نگارنده‌ی مسئول) Roufia_heidary@yahoo.com
۲- استادیار گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرقدس، ایران
۳- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

مقدمه

امروزه به‌دلیل مشخص شدن عوارض جانبی داروهای شیمیایی، رویکرد عمومی به مصرف داروهای گیاهی در حال افزایش است. گیاهان دارویی با منابع غنی از متابولیت‌های ثانویه مواد مؤثره اساسی بسیاری از داروها را تامین می‌کنند (Hecl and Sustrikova, 2006). گیاه گاوزبان با نام علمی *Borago officinalis* از تیره Boraginaceae بوده که خواص دارویی آن از دیرباز مورد توجه مردم ایران و جهان می‌باشد (Beaubaire and Simon, 1987). گاوزبان گیاهی یک‌ساله، روز بلند و بسیار مقاوم به سرما است (Yazdani *et al.*, 2004) که قادر می‌باشد در هر نوع خاک و دامنه pH بین ۴/۵ تا ۸/۲ رشد کند (Dawon, 1996). خاستگاه اصلی این گیاه نواحی غربی مدیترانه، اسپانیا و آفریقای شمالی می‌باشد (Naghdibady *et al.*, 2011). سرشاخه‌های گل‌دار این گیاه جنبه دارویی داشته و به علت دارا بودن ترکیبات مختلف از جمله گام، موسیلاژ و غیره در طب سنتی استفاده فراوانی دارد، از برگ این گیاه به‌عنوان یک ماده معرق، آرام کننده و تصفیه کننده خون استفاده می‌شود (Wettasinghe and Shahidi, 2005; Zargari, 1989). امروزه با توجه به نیاز روز افزون بشر به استفاده از گیاهان دارویی در سطح جهانی، تولید این گیاهان بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (Akbarinia *et al.*, 2003). در نتیجه سیستم تغذیه‌ای در گیاهان دارویی حایز اهمیت است تا بتوان برداشت اقتصادی‌تری را در واحد سطح داشت (Astaraei, 2006). از طرف دیگر، تحقیقات نشان داده است که بیشترین خسارتی که در گیاهان از طریق محیط اعمال می‌شود در ارتباط با تنش اکسیداتیو می‌باشد (Allen, 1995). گیاهان برای مقابله با خسارات اکسیداتیو دارای سیستم دفاعی با کارایی بالایی هستند که می‌تواند رادیکال‌های آزاد حاصل از این تنش‌های محیطی را از بین برده و یا خنثی کنند. این سیستم دفاعی شامل آنزیم‌های آنتی اکسیدان مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز است (Blokhina *et al.*, 2003). تحقیقات حاکی از آن است که یک ارتباط قوی بین تحمل به خسارات اکسیداتیو با افزایش آنزیم‌های آنتی اکسیدان در گیاهان وجود دارد (Sairam and Srivastava, 2002). از طرف دیگر، میزان مالون دی‌آلدهید که ناشی از پراکسیداسیون چربی‌ها است نشان‌دهنده میزان خسارات اکسیداتیو در گیاهان می‌باشد (Zhang *et al.*, 2006). در این راستا بولور (Bolwer, 1992) گزارش کرد که آنزیم‌های آنتی اکسیدان و غلظت مالون دی‌آلدئید در گیاهان می‌تواند معیارهای مناسبی در ارزیابی مقاومت گیاهان در تنش‌های خشکی باشند. در نتیجه با اندازه‌گیری فعالیت این بیومارکرها می‌توان میزان مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی را ارزیابی نمود. مارتینز-سانچز و همکاران (Martinez-Sanchez *et al.*, 1993)، پایس (Pais, 1983) و سیمون و همکاران، (Simon *et al.*, 1990) گزارش کردند که عنصر تیتانیوم قادر است فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت را در گیاهان به‌طور معنی‌داری متاثر گرداند. همچنین، کارواجال و آلکاراز (Carvajal and Alcaraz, 1998) گزارش کردند که اگرچه تیتانیوم مشارکت اصلی در متابولیسم گیاه را ندارد، اما کاربرد آن در محلول غذایی و یا محلول‌پاشی روی برگ‌های گیاهان می‌تواند رشد گونه‌های مختلف گیاهی را افزایش دهد. از طرف دیگر گائو و همکاران (Gao *et al.*, 2008) نیز

نشان دادند که اثر کوانتومی و فعالیت فتوکاتالیستی نانو اکسید تیتانیوم بیشتر از اکسید تیتانیوم غیرنانو است. جابرزاده و همکاران (Jaberzadeh *et al.*, 2010) نیز اثرات متفاوتی را در زمان‌های مختلف مصرف تیمارهای تیتانیوم در گندم گزارش کردند.

اگرچه در سال‌های اخیر تحقیقاتی روی آثار تیتانیوم بر رشد و عملکرد گیاهان صورت گرفته است، اما هم‌چنان اثر آن بر بسیاری از گیاهان در شرایط مختلف و به دنبال آن بر جنبه‌های فیزیولوژیک گیاه مجهول است. در این آزمایش اثر تیمارهای متفاوت تیتانیوم (تیتانیوم غیرنانو و نانو اکسید تیتانیوم) در طی مراحل مختلف رشد روی گیاه گاوزبان مورد ارزیابی قرار گرفت تا تأثیر آنها بر صفات مورفولوژیک و میزان بیومارکرهای شیمیایی مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به‌صورت آزمایش فاکتوریل در زمینی به مساحت ۲۴۰۰ متر مربع در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۱ در مزرعه کشاورزی روستای رمنت شهرستان بابل از استان مازندران بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار به مورد اجرا گذاشته شد. این آزمایش شامل ۴۸ پلات بود و هر پلات نیز شش متر طول و سه متر عرض داشت. به‌طوری‌که در هر پلات شش خط به فواصل یک متـر از هم قرار گرفتند. فواصل بوته‌ها در روی خط نیز نیم متر در نظر گرفته شد. تیتانیوم و نانو ذرات تیتانیوم مورد مطالعه در این تحقیق از شرکت نانو پارسیان تهران خریداری شد. در این آزمایش فاکتور تیتانیوم در چهار سطح (تیتانیوم غیرنانو و نانو ذرات تیتانیوم ۰/۰۱، ۰/۰۳ و ۰/۰۵ درصد) و فاکتور زمان مصرف دارای سه سطح (۵-۴ برگی، گلدهی و ۱۵ روز پس از گلدهی) بود. جهت محلول‌پاشی مقادیر مورد نیاز از هر تیمار به نسبت مشخص در آب مقطر حل شد و به میزان هشت لیتر، در زمان مشخص شده برای هر پلات مورد استفاده قرار گرفت. پس از رشد کامل گیاهان خصوصیات مورفولوژیکی آنها شامل ارتفاع بوته، تعداد ساقه در هر بوته، وزن تر برگ، وزن خشک برگ، وزن تر سرشاخه، وزن خشک سرشاخه، وزن تر ساقه، وزن خشک ساقه، وزن تر بوته و وزن خشک بوته و همچنین میزان آنزیم‌های آنتی اکسیدانت سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گایاکول پراکسیداز (GPX) و میزان غلظت مالون دی‌آلدئید (MDA) گیاهان مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

استخراج آنزیم‌های آنتی اکسیدانت به روش آگراوال و همکاران (Agrawal *et al.*, 2005) انجام شد. در این روش ۰/۵ گرم از نمونه برگی با استفاده از هاون چینی کاملاً سرد و نیتروژن مایع هموژن شده و سپس به آن پنج میلی‌لیتر از بافر فسفات سرد (pH ۷/۵) محتوی ۰/۵ EDTA میلی‌مولار اضافه شد. نمونه‌ها پس از انتقال به لوله‌های آزمایش با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند (Sairam *et al.*, 2002). میزان آنزیم‌های استخراج شده به روش بردفورد (Bradford, 1976) و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA)، به عنوان استاندارد تعیین کمیت شدند. اندازه‌گیری میزان غلظت مالون دی‌آلدئید بر اساس روش استوارت و بولی (Stewart and Bewley, 1980) انجام شد. در این روش برای هر نمونه ۰/۵ گرم برگ گیاه در ۱۰ میلی لیتر از محلول ۰/۱٪ تری کلرواستیک اسید هموژن و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردیدند. دو میلی لیتر از سوپرناتات

حاصل با ۴ میلی‌لیتر از محلول ۲۰٪ تری کلرواستیک اسید محتوی ۰/۵٪ تیوباربیتوریک اسید مخلوط شد. کمپلکس حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس نگهداری و سپس به حمام آب سرد منتقل گردید. نمونه‌ها مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر ثبت گردید. میزان پراکسید شدن لیپیدها از اختلاف بین موج‌های جذبی در ضریب خاموشی $mM^{-1}\ cm^{-1}$ ۱۵۵ به‌دست آمد.

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از این آزمایش نیز با استفاده از برنامه Exell و نرم‌افزارهای آماری SAS صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها نیز به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ تعیین گردید.

نتایج و بحث

صفات مورفولوژیک

نتایج این مطالعه نشان داد که اختلاف معنی‌داری برای صفات مورفولوژیک مورد مطالعه از نظر تیمارهای مختلف تیتانیوم، زمان مصرف و اثرات متقابل بین آن‌ها وجود دارد (جدول ۱). همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود در تیمارهای متفاوت تیتانیوم برای صفات ارتفاع بوته، وزن خشک برگ و وزن خشک کل بوته اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد. بین سطوح تیتانیوم برای صفات ارتفاع بوته، وزن خشک برگ، وزن خشک سرشاخه و وزن خشک کل بوته در سطح احتمال ۱٪، و برای صفات وزن تر برگ وزن خشک ساقه و وزن تر کل بوته اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ به‌دست آمد. اثر متقابل فاکتورهای تیتانیوم با زمان مصرف آن‌ها برای صفات وزن تر برگ، وزن خشک برگ، وزن تر ساقه و وزن خشک ساقه در سطح احتمال ۱٪ و برای صفات ارتفاع بوته، وزن تر کل بوته و وزن خشک کل بوته در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری به‌دست آمد.

مقایسه میانگین‌ها برای صفات مورفولوژیک در جدول ۲ نشان می‌دهد که هرچه محلول‌پاشی نانو ذرات تیتانیوم در مراحل آخر رشد اعمال شود میزان وزن برگ بیشتر افزایش می‌یابد، در حالی‌که محلول پاشی تیتانیوم غیر نانو در مرحله گلدهی این صفت را نسبت به دیگر مراحل رشد افزایش داد، به‌طوری‌که بیشترین وزن تر برگ در تیمار تیتانیوم غیرنانو و در زمان گلدهی حاصل شد (۲۱۳/۷۳ گرم). همچنین، بیشترین میزان وزن خشک برگ نیز در تیمار تیتانیوم غیرنانو در زمان گلدهی و پس از گلدهی (به‌ترتیب ۷۴/۳۳ و ۷۹/۵۰ گرم) و در تیمار نانو ذرات تیتانیوم ۰/۰۵٪ در زمان ۱۵ روز پس از گلدهی به‌دست آمد (۷۷/۵۰ گرم)، این درحالی است که تیمارهای نانو ذرات تیتانیوم (۰/۰۱، ۰/۰۳ و ۰/۰۵ ٪) در زمان گلدهی این صفت را در مقایسه با مراحل قبل و بعد از گلدهی به کمترین میزان کاهش دادند. برای وزن تر ساقه نیز بیشترین میزان در تیمار تیتانیوم غیر نانو و در زمان گلدهی به‌دست آمد (۴۶۷/۰۰ گرم)، در حالی‌که کمترین آن در تیمار نانو ذرات تیتانیوم ۰/۰۵٪ و در زمان گلدهی حاصل شد (۳۶۶/۰۰ گرم). این در حالی است که بیشترین وزن تر خشک ساقه در تیمار نانو ذرات تیتانیوم ۰/۰۵٪ و در زمان ۱۵ روز بعد از گلدهی حاصل شد (۱۸۷/۳۳ گرم). اندازه ارتفاع بوته نیز بین تیمارهای مختلف تیتانیوم نشان داد که هرچه محلول‌پاشی تیمارهای تیتانیوم در مراحل آخر رشد انجام شود این صفت بیشتر افزایش می‌یابد، به‌طوری‌که بیشترین آن در تیمار نانو ذرات

تیتانیوم ۰/۰۱٪ در زمان ۱۵ روز بعد از گلدهی حاصل شد (۵۶/۲۵ سانتیمتر)، در حالی‌که کمترین این صفت در زمان ۵-۴ برگی در تیمارهای مختلف تیتانیوم (تیتانیوم غیرنانو و نانو ذرات تیتانیوم) به‌دست آمد. ارزیابی وزن بوته نیز نشان داد که هرچه محلول پاشی نانو ذرات تیتانیوم در مراحل آخر رشد اعمال شود این صفت بیشتر افزایش می‌یابد، اما تیمار تیتانیوم غیرنانو توانسته بود این صفت را در مرحله گلدهی به‌طور معنی‌داری نسبت به دیگر مراحل رشد افزایش دهد، به‌طوری‌که بیشترین وزن تر بوته در تیمارهای تیتانیوم غیرنانو در زمان گلدهی و نانو ذرات تیتانیوم ۰/۰۵٪ در زمان ۱۵ روز پس از گلدهی حاصل شد (به‌ترتیب ۱۰۸۷/۵۰ و ۱۰۷۶/۲۵ گرم)، در حالی‌که کمترین آن در تیمارهای تیتانیوم غیرنانو در زمان ۱۵ روز پس از گلدهی و نانو ذرات تیتانیوم در زمان ۵-۴ برگی به‌دست آمد (به‌ترتیب ۹۵۸/۶۶ و ۹۵۳/۳۳ گرم). برای وزن خشک کل بوته بیشترین میزان در تیمار تیتانیوم غیرنانو در زمان ۱۵ روز بعد از گلدهی و تیمار نانو ذرات تیتانیوم در سطح ۰/۰۱٪ و در زمان ۱۵ روز بعداز گلدهی به‌دست آمد (به‌ترتیب ۴۰۶/۳۳ و ۴۱۴/۱۲ گرم)، درحالی‌که تیمارهای مختلف نانو ذرات تیتانیوم در مراحل ۵-۴ برگی و گلدهی این صفت را به کمترین میزان کاهش دادند.

این نتایج نشان می‌دهد که اثرات متفاوتی بین محلول‌پاشی تیمارهای تیتانیوم غیرنانو و نانو ذرات تیتانیوم در گیاه گاوزبان وجود دارد. همچنین، نتایج نشان می‌دهد که زمان اعمال تیمارهای تیتانیوم نیز می‌تواند نقش حایز اهمیتی در صفات مورفولوژیک گاوزبان داشته باشد. همچنین، این نتایج نشان داد که محلول‌پاشی تیمارهای مختلف تیتانیوم در مراحل آخر رشد می‌توانند میزان صفات مورفولوژیک را در گاوزبان افزایش دهند، به‌طوری‌که تیمار نانو ذرات تیتانیوم در مراحل گلدهی و پس از آن و تیمار تیتانیوم غیرنانو در مرحله گلدهی صفات مورد مطالعه را به‌طور معنی‌داری افزایش دادند (جدول ۲).

در این راستا چاو و چوی (Chao and Choi, 2005) نشان دادند که عنصر تیتانیوم قادر است از طریق افـزایش فتـوسنتز میزان رشد را در گیاه به‌طور معنی‌داری افزایش دهد. از طرفی دیگر جابرزاده و همکاران (Jaberzadeh *et al.*, 2010) اختلاف معنی‌داری را بین تیمار تیتانیوم غیرنانو و نانو ذرات تیتانیوم و زمان مصرف آنها در شرایط تنش و عادی آبیاری در گندم گزارش کردند. آنها نشان دادند که تیمار نانو ذرات تیتانیوم در زمان ساقه‌دهی قادر است عملکرد دانه را در شرایط تنش نسبت به شرایط نرمال افزایش دهد. حقیقی و دانشمند (Haghighi and Daneshmand, 2013) نیز با مقایسه اثر تیتانیوم و نانو ذرات تیتانیوم بر رشد و تغییرات فتوسنتزی گوجه فرنگی در سیستم هیدروپونیک گزارش کردند که تأثیر نانو ذرات تیتانیوم بر میزان فتوسنتز بیش از تیتانیوم غیرنانو بود. آنها، همچنین گزارش کردند که تیتانیوم غیرنانو در غلظت بیشتر و نانو ذرات تیتانیوم به دلیل اندازه کوچک ذرات و امکان نفوذ راحت‌تر به ریشه، می‌توانند بر برخی ویژگی‌های رشدی و فتوسنتزی گوجه‌فرنگی مؤثر باشند.

گل‌های گیاه گاوزبان جنبه دارویی داشته و شاخه‌های گلدار در این گیاه از نظر اقتصادی حایز اهمیت می‌باشند. اگرچه در بین تیمارهای متفاوت تیتانیوم برای این صفت اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، اما زمان‌های متفاوت اعمال تیمارهای تیتانیوم اختلاف معنی‌داری را برای وزن

خشک سرشاخه‌ها در این گیاه اعمال کرد (جدول ۱). بررسی زمان مصرف تیمارهای تیتانیوم در گاوزبان نشان می‌دهد که اعمال تیمارهای تیتانیوم در مراحل بعد از گلدهی می‌تواند به‌طور معنی‌داری وزن سرشاخه‌های گلدار را در این گیاه افزایش دهد (۱۵۷/۹۳ گرم) (شکل ۱).

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و بیومارکر مالون‌دی‌آلدئید

تنش‌های محیطی یکی از موانع اصلی در تولید محصولات زراعی در بسیاری از نقاط دنیا به ویژه مناطق خشک و نیمه خشک مانند ایران محسوب می‌شوند. در این خصوص میتلر (Mittler, 2002)، موهانتی (Mohanty, 2003) و حبیبی و همکاران (Habibi *et al.*, 2004) عنوان داشتند که تنش‌های محیطی با افزایش تولید انواع اکسیژن فعال به بیومولکول‌های حیاتی سلول نظیر لیپیدها، DNA، پروتئین‌ها و برخی نقاط کلیدی آسیب وارد کرده و در نهایت متابولیسم سلول را مختل می‌نمایند. گیاهان برای مقابله با تنش‌های اکسیداتیو ایجاد شده، دارای سیستم دفاعی با کارایی بالایی هستند که می‌تواند رادیکال‌های آزاد را از بین برده و یا خنثی کنند. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه قادرند اکسیژن‌های رادیکال آزاد را حذف و یا خنثی کنند (Bayer and Fridovich, 1991). فعالیت این آنزیم‌ها در گیاه در مواجهه با تنش‌های محیطی افزایش می‌یابد و از این طریق مقاومت گیاه را به این شرایط افزایش می‌دهد (Scandalios, 1993). از طرفی دیگر رادیکال‌های آزاد اکسیژن یا واکنش‌های پراکسیداسیون لیپیدها، در غشای گیاهی به‌طور انتخابی اسیدهای چرب غیراشباع را تجزیه خواهند کرد و باعث تجمع آلدهیدها، هیدروکربن‌ها و غیره می‌شود. بنابراین، برای سنجیدن میزان آسیب وارد شده به سلول‌های گیاهی و پی بردن به دخیل بودن رادیکال‌های آزاد اکسیژن در نتیجه انواع تنش‌ها، مالون دی‌آلدهید (MDA) را نیز اندازه‌گیری می‌کنند. درنتیجه، راه‌کارهایی که بتواند میزان این آنزیم‌های آنتی اکسیدان را در گیاه افزایش دهد می‌بایست مورد توجه قرار گیرد.

نتایج تجزیه واریانس برای آنزیم‌های آنتی اکسیدان سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گایاکول پراکسیداز (GPX) و بیومارکر مالون دی‌آلدهید (MDA) در گیاه گاوزبان نشان داد که اختلاف معنی‌داری در تیمارهای متفاوت تیتانیوم برای آنزیم آنتی اکسیدان SOD در سطح احتمال ۵٪ و برای بیومارکر MDA در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد. همچنین، این نتایج نشان می‌دهد که آنزیم‌های آنتی اکسیدان و بیومارکر MDA اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال ۱٪ در زمان اعمال تیمارهای تیتانیوم داشتند. این در حالی است که بجز بیومارکر MDA، آنزیم‌های آنتی اکسیدان اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال ۱٪ برای اثر متقابل سطوح تیتانیوم و زمان مصرف آن‌ها نشان دادند (جدول ۳).

نتایج مقایسه میانگین برای آنزیم‌های آنتی اکسیدان و بیومارکر MDA در جدول ۴ نشان داده شده است. همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود محلول‌پاشی تیمارهای مختلف تیتانیوم (تیتانیوم غیرنانو و نانو ذرات تیتانیوم) در زمان گلدهی میزان SOD را در مقایسه با دیگر مراحل رشد افزایش می‌دهند، به‌طوری‌که بیشترین آن در تیمار تیتانیوم غیرنانو در زمان گلدهی (۱۵۸۰/۶۶ U/mg protein) و کمترین آن در در تیمار تیتانیوم غیر نانو در زمان ۱۵ روز بعد از گلدهی و تیمارهای نانو ذرات تیتانیوم

(۰/۰۱، ۰/۰۳ و ۰/۰۵ ٪) و در زمان ۵-۴ برگی حاصل شد. برخلاف SOD، محلول‌پاشی تیتانیوم غیرنانو در زمان گلدهی و نانو ذرات تیتانیوم در مرحله ۵-۴ برگی توانسته بودند به‌ترتیب کمترین و بیشترین میزان آنزیم آنتی‌اکسیدان CAT را در گاوزبان اعمال کنند (به‌ترتیب U/mg protein ۱۳۴/۷۲ و ۷۶/۲۵). برای آنزیم GPX نیز بیشترین میزان در تیمار نانو ذرات تیتانیوم ۰/۰۵٪ و در زمان گلدهی حاصل شد (U/mg protein ۹۵/۱۳)، درحالی‌که کمترین آن در همین تیمار ولی در مرحله ۱۵ روز پس از گلدهی به‌دست آمد (۶۴/۲۵ U/mg protein).

نتایج مقایسات میانگین برای آنزیم‌های آنتی اکسیدان و غلظت MDA نشان می‌دهد که اثرات متفاوتی برای محلول‌پاشی تیمارهای تیتانیوم غیرنانو و نانو ذرات تیتانیوم در گیاه گاوزبان وجود دارد. همچنین، نتایج نشان داد که زمان اعمال محلول‌پاشی تیمارهای مختلف تیتانیوم می‌تواند نقش حایز اهمیتی در این صفات داشته باشد. به‌طوری‌که تیمارهای مختلف تیتانیوم در مرحله گلدهی توانستند میزان آنزیم‌های آنتی اکسیدان SOD و GPX را افزایش دهد، در حالی‌که در این مرحله میزان آنزیم CAT به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۴).

در این راستا پایس (Pais, 1983)، افزایش فعالیت آنزیم‌هایی همچون پروکسیداز، کاتالاز و نیترات ردوکتاز در بافت‌های گیاهان را در اثر کاربرد تیتانیوم ثابت کردند. مارتینز-سانچز و همکاران (Martinez-Sanchez *et al*., 1993) نیز نشان دادند که تیتانیوم بر فعالیت‌های بیوشیمیایی گیاه اثر دارد و باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالار، نیترات ردکتاز و پراکسیداز می‌شود. در این خصوص داوود و همکاران (Daood *et al*., 1988)، نیز افزایش میزان MDA را در اثر اعمال تیمار تیتانیوم در گیاهان گزارش کردند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری برای تیمارهای متفاوت تیتانیوم (تیتانیوم غیرنانو و نانو ذرات تیتانیوم) خصوصا برای زمان اعمال آن‌ها در گیاه گاوزبان وجود دارد. همچنین، محلول‌پاشی تیمارهای مختلف تیتانیوم در مراحل گلدهی و بعد از آن اثرات بیشتری بر صفات مورفوفیزیولوژیک و بیوشیمیایی گل گاوزبان دارد. به‌طوری‌که، اعمال آنها در مراحل بعد از گلدهی می‌تواند به‌طور معنی‌داری وزن سرشاخه‌های گلدار را در این گیاه افزایش دهد. نتایج نشان داد که تیمار تیتانیوم غیرنانو در زمان گلدهی و نانو ذرات تیتانیوم در زمان بعد از گلدهی می‌توانند ترکیب تیماری مناسبی جهت افزایش عملکرد سرشاخه‌های گلدار گاوزبان باشد.

جدول ۱- میانگین مربعات تاثیر تیمارهای متفاوت تیتانیوم و زمان اعمال آن‌ها بر صفات مورفولوژیک گاوزبان

Table 1- Mean squares and significant levels under different titanium treatments and usage stage for morphological traits of Borago

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات (MS)				
		وزن تر سر شاخه Flowers weight	وزن خشک برگ Leaf dry weight	وزن تر برگ Leaf weight	ارتفاع بوته Plant height	وزن خشک سر شاخه Flowers dry weight
تکرار Replicate	3	727.10 ns	33.35 ns	881.18 ns	4.74 ns	487.48 ns
تیمارهای تیتانیوم Titanium treatments	3	543.50 ns	506.29 **	679.13 ns	46.59 **	470.38 ns
زمان مصرف Usage stage	2	1685.81 ns	983.15 **	1745.08 *	51.39 **	3403.74 **
اثرات متقابل Interaction	6	1147.63 ns	221.03 **	1286.44 **	13.71 *	156.69 ns
خطا Error	33	682.76	45.55	358.71	5.24	265.61
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)		6.68	11.02	10.72	4.54	11.55

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ ٪ ، ns غیرمعنی‌دار.

ns, *, **: Non significant and significant at 5% and 1% levels of probability respectively.

ادامه جدول ۱

Table 1- Continued

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات (MS)			
		وزن تر ساقه Stem weight	وزن خشک ساقه Stem dry weight	وزن تر بوته Total plant weight	وزن خشک بوته Total plant dry weight
تکرار Replicate	3	172.56 ns	576.75 ns	2783.21 ns	506.80 ns
تیمارهای تیتانیوم Titanium treatments	3	544.44 ns	700.32 ns	498.93 ns	4769.77 **
زمان مصرف Usage stage	2	1119.31 ns	1310.36 *	11959.64 *	13205.98 **
اثرات متقابل Interaction	6	5635.50 **	1065.99 *	9674.77 *	2333.19 *
خطا Error	33	540.76	331.92	3462.62	842.49
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)		5.52	11.71	5.82	8.08

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ ٪ ، ns غیر معنی‌دار.

ns, *, **: Non significant and significant at 5% and 1% levels of probability, respectively.

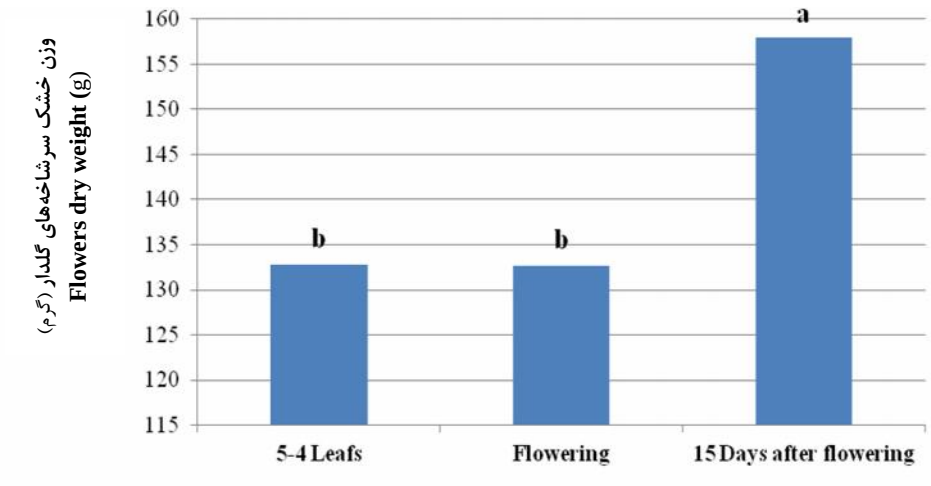
جدول ۲- مقایسه میانگین ترکیب تیمارهای مختلف تیتانیوم و زمان مصرف آنها بر خصوصیات مورفولوژیک گاوزبان

Table 2- Mean comparison interaction of different titanium treatments and usage stage for morphological traits of Borago

تیمارها Treatments	زمان مصرف Usage stage	وزن تر برگ Leaf weight (g)	وزن خشک برگ Leaf dry weight (g)	وزن تر ساقه Stem weight (g)	وزن خشک ساقه Stem dry weight (g)	ارتفاع بوته Plant height (cm)	وزن تر کل بوته Plant weight (cm)	وزن خشک کل بوته Plant dry weight (g)
تیتانیوم غیر نانو Titanium	۵-۴ برگی 4-5 leaf stage	166.25 c	55.66 bc	430.80 abc	152.80 bcd	47.50 c	993.25 abc	354.00 cd
	گلدهی Flowering	213.73 a	74.33 a	467.00 a	179.12 ab	50.00 bc	1087.50 a	402.05 ab
	۱۵ روز بعد از گلدهی 15 days after flowering	175.25 c	79.50 a	385.33 ef	152.52 bcd	53.75 ab	958.66 d	406.33 a
نانو ذرات تیتانیوم ٪۰/۰۱ Nanoparticles of titanium % 0.01	۵-۴ برگی 4-5 leaf stage	156.75 c	53.50 bc	412.50 cde	137.00 d	51.66 b	953.33 d	317.37 d
	گلدهی Flowering	172.00 c	51.33 c	392.00 def	148.66 cd	51.25 bc	1006.6 abc	325.00 d
	۱۵ روز بعد از گلدهی 15 days after flowering	207.50 ab	64.00 b	431.00 abc	175.00 abc	56.25 a	1058.25 ab	414.12 a
نانو ذرات تیتانیوم ٪۰/۰۳ Nanoparticles of titanium % 0.03	۵-۴ برگی 4-5 leaf stage	166.25 c	59.00 bc	423.75 cd	147.00 cd	47.50 c	994.00 abc	340.00 d
	گلدهی Flowering	160.00 c	49.33 c	420.00 cde	143.67 d	50.00 bc	995.66 abc	325.00 d
	۱۵ روز بعد از گلدهی 15 days after flowering	174.75 c	60.00 bc	427.00 bcd	146.00 cd	51.25 bc	1025.07 abc	358.66 cde
نانو ذرات تیتانیوم ٪۰/۰۵ Nanoparticles of titanium % 0.05	۵-۴ برگی 4-5 leaf stage	170.00 c	57.75 bc	432.50 abc	152.33 bcd	47.75 c	977.50 cd	350.00 cd
	گلدهی Flowering	175.50 c	52.50 c	366.00 f	145.00 cd	50.00 bc	1000.00 abc	325.00 d
	۱۵ روز بعد از گلدهی 15 days after flowering	181.50 bc	77.50 a	462.50 ab	187.33 a	49.50 c	1076.25 a	388.66 abc

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون مطابق آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌دار ندارند.

Difference Means followed by similar latters in each column are not significant at the 5% level of probability, According to Duncan's Multiple Range Test.



شکل ۱- میزان وزن خشک سرشاخه‌های گلدار در زمان‌های متفاوت مصرف تیتانیوم در گاوزبان

Figure 1- Flowers dry weight for different usage stage of titanium treatments of Borago

جدول ۳- میانگین مربعات تاثیر تیمارهای متفاوت تیتانیوم و زمان اعمال آنها بر آنزیم‌های آنتی اکسیدان و بیومارکر مالون دی آلدئید گاوزبان

Table 3- Mean squares and significant levels under different titanium treatments and usage stage for antioxidant enzymes and malondialdehyde content of Borago

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات (MS)			
		مالون دی آلدئید Malondialdehyde (MDA)	گایاکول پراکسیداز Guaiacol peroxidase (GPX)	کاتالاز Catalase (CAT)	سوپر اکسید دیسموتاز Superoxide dismutase (SOD)
تکرار Replicate	3	94.51 ^{ns}	11.40 ^{ns}	404.54^{ns}	7370.66 ^{ns}
تیمارهای تیتانیوم Titanium treatments	3	307.37**	55.31 ^{ns}	323.33 ^{ns}	14904.03*
زمان مصرف Usage stage	2	554.39**	631.13**	4204.61**	661110.98**
اثرات متقابل Interaction	6	69.17 ^{ns}	459.63**	956.70**	128088.29**
خطا Error	33	41.77	36.74	278.36	5038.34
ضریب تغییرات CV (%)		9.79	7.57	15.95	5.44

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ ٪ ، ns غیر معنی‌دار.

ns, *, **: non significant and significant at 5% and 1% levels of probability respectively.

جدول ۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل تأثیر تیمارهای متفاوت تیتانیوم و زمان مصرف آن‌ها بر آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و بیومارکر مالون دی آلدئید گاوزبان

Table 2- Mean comparison interaction of different titanium treatments and usage stage for antioxidant enzymes and malondialdehyde content of Borago.

تیمارها Treatments	زمان مصرف Usage stage	گایاکول پراکسیداز (جذب به ازای هر میلی‌گرم پروتئین) GPX (U/mg protein)	کاتالاز (جذب به ازای هر میلی‌گرم پروتئین) CAT (U/mg protein)	سوپر اکسید دیسموتاز (جذب به ازای هر میلی‌گرم پروتئین) SOD (U/mg protein)
تیتانیوم غیر نانو Titanium	۴-۵ برگی 4-5 leaf stage	65.40 cd	128.97 ab	1450.00 bc
	گلدهی Flowering	83.07 b	76.25 d	1580.66 a
	۱۵ روز بعد از گلدهی 15 days after flowering	86.25 ab	97.50 cd	1012.50 e
نانو ذرات تیتانیوم ٪۰/۰۱ Nanoparticles of titanium % 0.01	۴-۵ برگی 4-5 leaf stage	88.60 ab	104.37 bc	1000.00 e
	گلدهی Flowering	86.25 ab	112.15 abc	1544.00 ab
	۱۵ روز بعد از گلدهی 15 days after flowering	64.25 d	85.00 cd	1348.66 c
نانو ذرات تیتانیوم ٪۰/۰۳ Nanoparticles of titanium % 0.03	۴-۵ برگی 4-5 leaf stage	83.75 ab	125.00 ab	1071.72 e
	گلدهی Flowering	86.00 ab	112.50 abc	1500.00 ab
	۱۵ روز بعد از گلدهی 15 days after flowering	67.50 cd	97.50 cd	1346.66 c
نانو ذرات تیتانیوم ٪۰/۰۵ Nanoparticles of titanium % 0.05	۴-۵ برگی 4-5 leaf stage	73.75 c	134.72 a	1085.45 e
	گلدهی Flowering	95.13 a	85.00 cd	1512.66 ab
	۱۵ روز بعد از گلدهی 15 days after flowering	82.50 b	96.25 cd	1187.66 d

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون مطابق آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Difference means followed by similar latters in aach column are not significant at the 5% level of probability, According to Duncan's Multiple Range Test.

References منابع مورد استفاده

- Agrawal, S., R.K. Sairam, G.C. Srivasta, A. Tyagi, and R.C. Meena. 2005. Role of ABA, salicylic acid, calcium and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes induction in wheat seedling. *Plant Science*. 169: 559-570.
- Akbarinia, A., A. Ghalavand, A. Sharifi Ashorabadi, and S. Banj Shfieei, 2003. Effect of different nutrition systems on soil propertis, elemental uptake and seed yield of Ajowan (*Carum Cupticum*). *Pajouhesh and Sazandegi*. 62: 11-29. (In Persian).
- Allen, R.D. 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiology*. 57: 1049-1054.
- Astaraei, A. 2006. Effect of municipal solid waste compost and vermicompost on yield and yield components of *Plantago Ovata*. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatoc Plants*. 3: 180-187. (In Persian).
- Bayer, W.J., and I. Imlay Fridovich. 1991. Superoxide dismutase. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 40: 221-253.
- Beaubaire, N.A., and J.E. Simon. 1987. Production potential of borage (*Borago officinalis*). *Acta Horticulturae*. 208: 101-108.
- Blokhina, O., E. Virolainen, and K.V. Fagerstedt. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Annals of Botany.* 91: 179-194.
- Bolwer, C. 1992. Super oxide dismutases andstress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 43: 83-116.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein of utilizing the principle dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:680-685.
- Carvajal, M., and C.F. Alcaraz. 1998. Why is titanium a beneficial element for plants? *Journal of Plant Nutrition*. 21: 655–664.
- Chao, S.H.L., and H.S. Choi. 2005. Method for Providing Enhanced Photosynthesis. Korea Research Institute of Chemical Technology, Jeonju, South Korea, 10 pp.
- Daood, H.G., P. Biacs, M. Feher, F. Hajdu, and I. Pais. 1988. Effect of titanium on the activity of lipoxygenase. *Journal of Plant Nutrition.* 11: 505-516.
- Dawon, D. 1996. Encyclopedia of herbs and their uses. *Dorling Kindersly*. 249-250.
- Farhody, R. 2011. Assessments of salinity stress on grow antioxidant enzymes and Malondialdehyde content in canola leafs. *Iranian Journal of Field Crops Research*. 9(1): 123-130. (In Persian).
- Gao, F., F. Hong, C. Liu, L. Zheng, M. Su, X. Wu, F. Yang, C. Wu, and P. Yang. 2008. Mechanism of nano-anatase TiO_2 on promoting photosynthetic carbon reaction of Spinach. *Biological Trace Element Research.* 111: 239-253.
- Habibi, D., M. Mashdi Akbar Boojar, A. Mahmoudi, M.R. Ardakani, and D. Taleghani. 2004. Antioxidative enzyme in sunflower subjected to drought stress. 4th International Crop Science Congress, Brisbane, Australia, 26 September- 1 Octobr. 1-4 pp.

- Haghighi, M., and B. Daneshmand. 2013. Comparing the effects of titanium and nano-titanium on growth and photosynthetic changes of tomato in hydroponic culture. *Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture*. 4(13): 73-79. (In Persian).
- Hecl, J., and A. Sustrikova. 2006. Determination of heavy metals in chamomile flower drug-an assurance of quality control. Program and Abstract book of the 1st International Symposium on Chamomile Research, Development and Production. 69 pp.
- Jaberzadeh, A., P. Moaveni, H.R. Tohidi Moghadam, and O. Moradi. 2010. Assessment of particular of nano titanium in wheat agricultural characterization on the drought steers. *Journal of Crop Ecophysiology.* 2: 295-301. (In Persian).
- Martínez-Sánchez, F., M. Nunez, A. Amoros, J.L. Gimenez, and C.F. Alcaraz. 1993. Effect of titanium leaf spray treatments on ascorbic acid levels of *Capsicum annuum* (L.) fruits. *Journal of Plant Nutrition.* 16(5): 975-981.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Sci*. 9: 405-410.
- Mohamady, M., D. Habibi, M.R. Ardekani, and A. Asgharzadeh. 2010. Different levels of cadmium and application of biologic fertilizers, humic acid and superabsorbent polymer on SOD activity, MDA and chlorophyll content in annual medic (*Medicago scutellata*) on the cadmium affected. *Journal of Agriculture and Plant Breeding.* 6: 65-79. (In Persian).
- Mohanty, N. 2003. Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of flag leaf and the grain yield in two cultivars of *Triticum aestivum* (L.) exposed to warmer growth conditions. *Journal of Plant Physiology*. 160: 71-74.
- Naghdibady, H., Z. Zeinali Mobarakeh, H. Omidi, and S.h. Rezazadeh. 2011. Morphological diversity, Boago agricultural and phitochimic affected by chemical and biological fertilization. *Journal of Medicinal Plants Research*. 145-156.
- Pais, I. 1983. The biological importance of titanium. *Journal of Plant Nutrition*. 6: 123–131.
- Sairam, R.K., K.V. Rao, and G.C. Srivastava. 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*. 163: 1037-1046.
- Sairam, R.K., and G.C. Srivastava. 2002. Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. *Plant Science.* 162: 897-904.
- Scandalios, J.G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiology*. 101: 7-12.
- Simon, L., A. Balogh, F. Hajdu, and I. Pais. 1990. Effect of titanium on the carbohydrate content and phospho-fructokinase activity of tomato. In: Pais I. (ed.): New results in the research of hardly known trace elements and their importance in the international geosphere-biosphere program. University of Horticultural Food Science, Budapest: 49-84.

- Stewart, R.R.C., and J.D. Bewley. 1980. Lipid peroxidation associated aging of soybean axes. *Plant Physiology*. 65: 245-248.
- Wettasinghe, M., and F. Shahidi. 2005. Fe (III) chelation activity of extract of Borago and evening primrose meals. *Food Research International*. 35: 65-71.
- Yazdani, D., S, Shahnazi, and H. Seifi. 2004. Cultivation of medicinal plants: Applied guide for cultivation of 40 import medicinal plants in Iran. ACECR, Institute of Medicinal Plants. 38-40. (In Persian).
- Zargari, A. 1989. Medicinal plants. 4th ed. Tehran University Iran. Volume 3. (In Persian).
- Zhang, M., L. Duan, X. Tian, Z. He, J. Li, B. Wang, and Z. Li. 2006. Uniconazole-induced tolerance of soybean to water deficit stress in relation to changes in photosynthesis, hormones and antioxidant system. *Journal of Plant Physiology*. 164: 709-717.

Response of Some Morpho-physiological Characteristics of Borago (*Borago officinalis*) to Nano Particles of Titanium Spraying

Roufiya Heydary Romy[1*], Payam Moaveny[2], Hossein Hoseinpour Darvishy[2], and Mahdi Arefrad[3]

Received: October 2015, Revised: 10 January 2016, Accepted: 13 September 2016

Abstract

Brago is an important medicinal plant. This study, thus, was conducted with different levels of nano particles of titanium (0.01, 0.03 and 0.05%) and elemental titanium on its different growth stages (4-5 leaf, flowering and after flowering) with four replications in a factorial experiment based on randomized complete block design at the Agricultural Field of Rement Village of Babol, Mazandaran, Iran, in 2012. Results showed that there were a significant differences between treatments of titanium, time of treatments and between their interactions. Among the traits under study, leaf fresh weight, leaf dry weight, stem fresh weigh at 1% and plant hight, stem dry weight, total plant fresh weight and total plant dry weight at %5 levels of probabilities showed significant differences for their interaction between different treatments of titanium and different stage of development. The highest plant height, leaf dry weight and plant fresh weight and plant dry weight were produced when nano particles of titanium applied after flowering stage. Where as, the highest fresh leaf, fresh stem weight and total plant fresh weights were obtained when plants treated with titanium at flowering stage. On the other hand, dry weight of flowering branches showed significant negative correlation with GPX antioxidant enzyme. The lowest GPX antioxidant enzyme was produced when nano particles of titanium were applied after flowering stage at 0.01% probability level. As a whole, the results of this experiment suggest that there are significant differences among titanium treatments when they are applied at different growth stages of this plant. This study also showed that application of nano particles of titanium after flowering of this plant increased its flowering branches.

Key words: Antioxidant enzymes, Borago, Malondialdehyde, Morphological traits, Nano particles of titanium.

1- M.Sc. Student, Faculty of Agricultural and Plant Breeding, ShahreQods Branch, Islamic Azad University, ShahreQods, Iran
2- Assistant Prof., Faculty of Agricultural and Plant Breeding, ShahreQods Branch, Islamic Azad University, ShahreQods, Iran
3- Ph.D. Student of Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Recourses University (SANRU), Sari, Iran
**** Corresponding Author:*** *Roufia_heidary@yahoo.com*