



فصلنامه بوم‌شناسی گیاهان زراعی

جلد ۱۵، شماره ۲، صفحات ۲۴ - ۱۳

(تابستان ۱۳۹۸)

## اثر شدت، مدت و قدرت امواج فراصوت بر شاخص‌های جوانه‌زنی و رنگیزه‌های فتوسنتزی کلزا

صبا داشاب، حشمت امیدي ✉

گروه زراعت و تکنولوژی بذر، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران omidi@shahed.ac.ir ✉ (مسئول مکاتبات)

### شناسه مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ پژوهش: ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۲/۰۲

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۵/۱۴

### واژه‌های کلیدی

- ◆ امواج التراسونیک
- ◆ پرایمینگ
- ◆ پیش تیمار
- ◆ نانوپرایمینگ

**چکیده** پیش تیمار بذر با استفاده از روش‌های بیوفیزیکی از جمله امواج فراصوت، باعث تغییرات در جوانه‌زنی و برخی صفات فیزیولوژیک گیاهچه می‌گردد. بر همین اساس، به منظور تعیین تأثیر شدت و مدت زمان امواج فراصوت بر جوانه‌زنی بذر و رنگیزه‌های فتوسنتزی کلزا رقم مودنا، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار به صورت آزمایشگاهی انجام شد. عامل‌های آزمایش شامل توان‌های ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ وات امواج فراصوت با ۴۰ و ۵۹ کیلوهرتز در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۲۰ دقیقه بودند. اثر قدرت در شدت امواج در زمان پرتودهی بر شاخص‌های جوانه‌زنی شامل درصد و سرعت جوانه‌زنی، شاخص وزنی و طولی بنیه گیاهچه و محتوای کلروفیل a، b و کل و کارتنوئید معنی‌دار بود. درصد جوانه‌زنی بذر کلزا در صورت اعمال امواج فراصوت ۴۰ و ۵۹ کیلوهرتز در ۱۰۰ وات به مدت ۲ دقیقه به میزان ۱۷/۸٪ افزایش یافت. شاخص وزنی و طولی بنیه بذر در ۵۹ کیلوهرتز امواج فراصوت با قدرت ۱۰۰ وات به ترتیب ۳۳/۸ و ۲۵/۸٪ بهبود یافت. محتوای کلروفیل کل، کلروفیل a و b به ترتیب با میانگین ۶۱/۲، ۲۶/۳ و ۳۴/۹ میکروگرم بر گرم وزن تر در کاربرد امواج فراصوت ۴۰ کیلوهرتز با قدرت ۸۰ وات به مدت هشت دقیقه نسبت به تیمار شاهد برتری داشت. بر اساس پژوهش حاضر می‌توان پیش تیمار بذور با امواج فراصوت ۴۰ و ۵۹ کیلوهرتز با قدرت ۱۰۰ وات برای بهبود شاخص‌های جوانه‌زنی بذور و افزایش مقادیر رنگیزه‌های گیاهی را توصیه نمود.



این مقاله با دسترسی آزاد تحت شرایط و قوانین The Creative Commons of BY - NC - ND انتشار یافته است.

DOI: 10.22034/AEJ.2019.1873897.1107

بهبودبخش گزارش شد.<sup>[۱۸]</sup> پژوهشگران بیان داشتند که در بارهنگ سرنیزه‌ای با قرار دادن بذور در معرض فراصوت گیاهچه‌هایی با بنیه قوی تولید کرد.<sup>[۲۲]</sup>

نتایج پژوهشی نشان داده که تیمار بذر گیاه همیشه بهار<sup>۳</sup> به مدت یک تا چهار دقیقه با امواج فراصوت، تأثیر معنی‌داری بر افزایش سرعت جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و وزن خشک گیاهچه داشت.<sup>[۳۰]</sup>

یکی از گسترده‌ترین آثار غیر مخرب این امواج روی سلول‌های زنده، افزایش نفوذپذیری غشا است که جذب ترکیبات خارجی و دفع فرآورده‌های درون سلولی توسط سلول‌ها را افزایش می‌دهد. علاوه بر این، از امواج فراصوت به‌عنوان محرک واکنش‌های آنزیمی و به‌ویژه متابولیت‌های ثانویه، بیوسنتز در سلول‌ها و پروتوپلاست گیاهی استفاده شده است.<sup>[۱۴]</sup> بنابراین، با توجه به این که یکی از آثار امواج فراصوت در سلول‌ها افزایش نفوذپذیری غشا است، بنابراین می‌توان با تعیین دامنه‌ای از امواج که توانایی ایجاد حفره‌های آبی و یا اعمال شوک با کمترین آسیب به سلول را داشته باشد، برای انتقال ماکرومولکول‌ها و افزایش متابولیت‌های ثانویه در سلول استفاده کرد.<sup>[۱۴]</sup>

امواج فراصوت، سبب افزایش سرعت جوانه‌زنی و درصد جوانه‌زنی می‌گردد

**مقدمه** به دلیل تعیین تعداد گیاه سبز شده در واحد سطح و بهبود تولید و عملکرد، جوانه‌زنی مرحله مهمی از چرخه زندگی گیاهان می‌باشد. جوانه‌زنی سریع، یکنواخت و کامل بذرها، باعث سبز شدن مطلوب و رشد اولیه سریع گیاهان زراعی می‌شود.<sup>[۱۰]</sup>

پیش تیمار یا پرایمینگ بذر یکی از روش‌های افزایش سرعت جوانه‌زنی و بنیه بذر بوده که پیچیدگی فنی ویژه‌ای نداشته و در عین حال می‌تواند روشی بسیار کم‌هزینه باشد.<sup>[۱۹]</sup> اخیراً استفاده از امواج الکترومغناطیس یا امواج فراصوت در پرایمینگ بذر مورد استفاده قرار می‌گیرد. امواج فراصوت، امواج مکانیکی هستند که فرکانس آن‌ها بیش از ۲۰ کیلوهرتز بوده و دارای انرژی بالایی هستند که به‌عنوان یک فناوری پیشرفته، کاربرد زیادی در علوم و صنایع مختلف پیدا کرده است.<sup>[۱۱]</sup> این امواج با کاربردی ایمن و اقتصادی و برخوردار از کارایی بالا و بدون هیچ‌گونه مخاطره برای محیط‌زیست شناخته شده‌اند.<sup>[۲۸]</sup> امواج فراصوت کاربردهای فراوانی دارند به‌طوری که نه تنها در تیمار بذر و کاهش و حذف آفات و بیماری‌ها بلکه حتی این امواج در مهندسی ژنتیک و انتقال ژن دارای جایگاه مهمی می‌باشند.<sup>[۲۹]</sup> سازوکار عمل امواج فراصوت به این صورت است که ساختار و عملکرد مولکول‌ها تحت تأثیر تشعشعات امواج فراصوت تغییر پیدا می‌کند.<sup>[۳۳]</sup> بذرهایی که معرض امواج فراصوت قرار می‌گیرد، دچار تورم شده و در نتیجه فعالیت هورمون اکسین در این بذرها افزایش می‌یابد. همچنین میزان تنفس در آن‌ها افزایش یافته و دارای انرژی و فعالیت زیادتری شده که نتیجه‌ی آن جوانه‌زنی سریع‌تر و یکنواخت‌تر و ایجاد گیاهان مقاوم به تنش‌ها به‌خصوص تنش شوری است.<sup>[۱۱،۲۰]</sup> افزایش سیالیت دیواره سلولی در نتیجه حرکت عناصر غذایی موجود در آندوسپرم، احتمالاً یکی از دلایل افزایش جوانه‌زنی و افزایش فعالیت آنزیم آمیلاز می‌باشد.<sup>[۶]</sup>

استفاده از امواج فراصوت نفوذپذیری پوسته جو نسبت به آب را افزایش داده که نتیجه آن افزایش حجم دانه بوده و آب به‌راحتی و در حجم بیشتری در اختیار دانه قرار گرفت، در نهایت جوانه‌زنی بهتر سریع‌تر و بیشتر صورت گرفت.<sup>[۶، ۲۱]</sup> در پژوهشی اثر متقابل امواج فراصوت در زمان بر اکثر صفات جوانه‌زنی بذر زیره سبز

<sup>3</sup> *Calendula officinalis* L.

<sup>1</sup> seed priming

<sup>2</sup> ultrasonic

جهت آماده‌سازی بذور برای پیش‌تیمار با امواج فراصوت پیش از انتقال به آزمایشگاه بذور توسط محلول هیپوکلریت ۰/۵٪ ضدعفونی شدند. برای اعمال تیمارهای فراصوت از حمام فراصوت<sup>۳</sup> با بسامد متغیر ۴۰ و ۵۹ کیلوهرتز استفاده شد. پس از اعمال تیمارها، تمامی بذور از محلول خارج شده و در هوای آزاد آزمایشگاه به‌صورت تدریجی خشک شده و به وزن اولیه برگشتند. سپس ۳۰ عدد از بذورهای تیمار شده به ظرف پتری حاوی کاغذ صافی واتمن انتقال داده شده و در دمای ۲۲ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۷۰٪ و چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲/۱۲ ساعت نگهداری شدند. تعداد بذورهای جوانه‌زده در هر روز در ساعت مشخصی ثبت و در پایان اجرای آزمون نیز تعداد کل بذورهای جوانه‌زده یا گیاهچه‌های عادی و غیرعادی شمارش و یادداشت گردید.<sup>[۱۳]</sup> در نهایت درصد جوانه‌زنی محاسبه و طول گیاهچه اندازه‌گیری شد (رابطه‌های ۱، ۲ و ۳).<sup>[۳۱]</sup>

$$\text{MGT} = \frac{\sum DN}{\sum N} \quad \text{رابطه (۱)}$$

در این رابطه MGT: میانگین مدت جوانه‌زنی، D: تعداد روزها بعد از شروع جوانه‌زنی، N: تعداد بذورهای جوانه‌زده در روز D، G: درصد جوانه‌زنی

$$G = (n/N) \times 100 \quad \text{رابطه (۲)}$$

سازوکار تأثیر این امواج به ایجاد تغییر در غشای پلاسمایی و تسهیل ورود و خروج آب و عناصر معدنی به سلول ارتباط داده شده است. در پژوهشی اثر شدت و مدت زمان امواج فراصوت و همچنین اثر متقابل این دو بر صفات درصد و سرعت جوانه‌زنی، میانگین مدت جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، وزن خشک ریشه‌چه و ساقه‌چه اثر معنی‌داری داشت.<sup>[۱۸]</sup> *فاریابی و همکاران (۲۰۰۸)* گزارش نمودند که پرتودهی بذرها به مدت ۵۰ تا ۶۰ ثانیه باعث افزایش درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه به ترتیب به میزان ۴۰، ۳۲ و ۵۸٪ می‌گردد.<sup>[۸]</sup> تیمار بذر گیاه دارویی مورد با امواج فراصوت علاوه بر شکستن خواب، باعث افزایش سرعت جوانه‌زنی، وزن خشک ریشه‌چه و ساقه‌چه شده است.<sup>[۱]</sup> *سیدی‌فر و همکاران (۲۰۱۴)* گزارش کردند که پیش‌تیمار فراصوت باعث افزایش بتاکاروتن هویج می‌شود.<sup>[۲۷]</sup>

کلزاییکی از مهم‌ترین گیاهان روغنی یکساله از تیره شب بو است<sup>[۹]</sup> که پس از سویا دومین منبع تأمین روغن نباتی جهان به شمار می‌رود<sup>[۷]</sup> و حدود ۱۴/۷٪ کل تولید روغن نباتی جهان را به خود اختصاص داده است.<sup>[۲۶،۲۹]</sup> افزایش تقاضای روز افزون مصرف‌کنندگان برای استفاده از محصولات روغنی منجر به استفاده از تکنولوژی‌های جدید مانند امواج فراصوت شده است. رفتار زیستی بذرها، ریشه، دانه‌گرده و غنچه‌های بعضی از گیاهان در معرض امواج فراصوت تغییر می‌کند و به این دلیل مطالعه‌هایی بر اثر جانبی این امواج بر واکنش جوانه‌زنی و رشد گیاهچه و همچنین برخی صفات فیزیولوژیکی گیاهچه ضرورت دارد.

این پژوهش با هدف بهبود شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد گیاهچه و همچنین میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاهچه کلزا با به کارگیری پیش‌تیمار یا امواج فراصوت بر انجام شد.

## مواد و روش‌ها

این پژوهش روی رقم کلزا رقم مودنا به‌صورت آزمایش کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه علوم بذر دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهد تهران در سال ۱۳۹۷ اجرا شد.

تیمارهای آزمایش شامل توان‌های مختلف حمام فراصوت ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ وات، امواج فراصوت ۴۰ و ۵۹ کیلوهرتز، در پنج زمان ۲، ۴، ۶، ۸ و ۲۰ دقیقه بودند.

<sup>3</sup> Digital ultrasonic, CD 4820, Germany

<sup>1</sup> *Myrtus communis* L.

<sup>2</sup> *Brassica napus* L.

دستگاه بر سرعت جوانه‌زنی، طول گیاهچه و شاخص طولی بنیه بذر معنی‌دار به‌دست آمد. اثر متقابل سه گانه شدت و قدرت امواج فراصوت در زمان‌های مختلف بر درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، شاخص وزنی بنیه گیاهچه و شاخص طولی بنیه گیاهچه معنی‌دار بود (جدول ۱).

درصد جوانه‌زنی بذر کلزا در ترکیب تیماری استفاده از امواج فراصوت ۴۰ و ۵۹ کیلوهرتز در ۱۰۰ وات قدرت دستگاه به مدت دو دقیقه هر دو در مقایسه با تیمار شاهد افزایش ۱۷/۸٪ داشتند. در بین سطوح امواج فراصوت، موج ۵۹ کیلوهرتز در ۶۰ وات قدرت به مدت شش دقیقه موجب افزایش درصد جوانه‌زنی شد (جدول ۲).

سرعت جوانه‌زنی تحت اثر ترکیب تیماری کاربرد امواج فراصوت ۴۰ کیلوهرتزی با قدرت ۱۰۰ وات به مدت چهار دقیقه با افزایش ۴٪ مشاهده شد و در کاربرد امواج ۵۹ کیلوهرتزی با قدرت ۶۰ وات به مدت شش دقیقه با کاهش روبرو بود (جدول ۲). شاخص وزنی و طولی بنیه بذر در استفاده از ۵۹ کیلوهرتز امواج فراصوت با قدرت ۱۰۰ وات به مدت دو دقیقه به ترتیب افزایش ۳۳/۸ و ۲۵/۸٪ در مقایسه با شاهد داشتند. این دو صفت نیز در استفاده از امواج فراصوت ۵۹ کیلوهرتزی با قدرت ۱۰۰ وات به مدت ۲۰ دقیقه کاهش نشان دادند

در این رابطه G: درصد جوانه‌زنی، n: تعداد بذور جوانه‌زده، N: تعداد کل بذرهای مورد استفاده در آزمایش

$$\text{رابطه (۳)} \quad GR = (1/MGT)$$

در این رابطه GR: سرعت جوانه‌زنی و MGT: میانگین مدت جوانه‌زنی می‌باشند. جهت اندازه‌گیری محتوی کلروفیل a، b، کل و کارتنوئید بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر اندام هوایی، در مرحله دو برگچه‌ای ۰/۲ گرم از اندام هوایی به همراه ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ ساییده شد. پس از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ در دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه آن را به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسانده و پس از کالیبره کردن دستگاه اسپکتروفتومتر<sup>۱</sup> با استن ۸۰٪ (شاهد) جذب عصاره حاصل در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر قرائت گردید. با استفاده از اعداد به‌دست آمده از هر نمونه و مقدار کلروفیل a، b، کل و کارتنوئید به ترتیب با استفاده از رابطه‌های (۴)، (۵)، (۶) و (۷) محاسبه گردید.

$$\text{رابطه (۴)} \quad Chl_{a(V/W)} = 0.0127 \times OD_{(663)} - 0.000259 \times OD_{(645)}$$

$$\text{رابطه (۵)} \quad 0.0229 \times OD_{(645)} - 0.000469 \times OD_{(663)} = Chl_{b(V/W)}$$

$$\text{رابطه (۶)} \quad Chl_T(V/W) = 0.0202 \times OD_{(645)} - 0.008 \times OD_{(663)}$$

$$\text{رابطه (۷)}$$

$$Carotenoides = 100 \times OD_{(470)} - 3.27(mg Chl_a) - 104(mg Chl_b) / 227$$

در رابطه‌های بالا، Chl<sub>a</sub> محتوای کلروفیل a، Chl<sub>b</sub> محتوای کلروفیل b، Chl<sub>T</sub> محتوای کلروفیل کل، بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ، OD: میزان جذب نور در طول موج‌های مربوطه، V: حجم استن ۸۰٪ استفاده شده به میلی‌لیتر، و W: وزن تر نمونه برگ می‌باشند.

داده‌های به‌دست آمده با نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ تجزیه و تحلیل و مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ صورت گرفت.

## نتایج و بحث

### شاخص‌های جوانه‌زنی

اثر شدت امواج فراصوت بر درصد و سرعت جوانه‌زنی، وزن خشک گیاهچه، و شاخص بنیه طولی گیاهچه در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بودند. همچنین اثر قدرت

<sup>۱</sup> UV-Vis Perkin Elmer, Lambda25, Germany

### محتوای کلروفیل و کارتنوئید

محتوای رطوبت نسبی گیاهچه تحت تأثیر هیچ یک از عوامل آزمایشی تفاوت معنی‌داری نشان نداد. رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاهچه اعم از کلروفیل کل، کلروفیل a و کلروفیل b تحت تأثیر شدت و قدرت و هم‌چنین زمان تیمار و اثرات متقابل دوگانه و سه‌گانه این عوامل، تفاوت معنی‌داری نشان داد (جدول ۱). با توجه به ترکیب تیماری شدت در قدرت و زمان امواج، محتوای کلروفیل کل، کلروفیل a و کلروفیل b در کاربرد موج فراصوت ۴۰ کیلوهرتز با قدرت ۸۰ وات به مدت هشت دقیقه افزایش نشان دادند. این صفات در تیمار ۴۰ کیلوهرتز با قدرت ۱۰۰ وات به مدت چهار دقیقه با کاهش روبرو شدند (جدول ۲).

با کاربرد ۴۰ کیلوهرتز امواج فراصوت با قدرت ۸۰ وات به مدت چهار دقیقه محتوای کارتنوئید افزایش نشان داد. افزایش محتوای رنگدانه‌ها در این امواج یکسان نبوده و نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند و در تیمار ۴۰ کیلوهرتز با قدرت ۱۰۰ وات به مدت ۶ دقیقه محتوای کارتنوئید کاهش یافت (جدول ۲).

در پژوهش حاضر اثر تیمارهای مورد آزمایش بر صفات فیزیولوژیکی از جمله میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی کلروفیل a، b و کل و همچنین کارتنوئید معنی‌دار به دست آمد ولی بر میزان رطوبت نسبی گیاهچه

(جدول ۲). طول گیاهچه در اثر قدرت دستگاه، مربوط به ۱۰۰ و ۸۰ وات به ترتیب با افزایش و کاهش روبرو شد. وزن خشک گیاهچه تحت اثر موج ۵۹ کیلوهرتزی افزایش یافت و در موج ۴۰ کیلوهرتزی وزن خشک گیاهچه کم شد. اثر قدرت، شدت و مدت زمان امواج فراصوت بر شاخص‌های جوانه‌زنی اعم از درصد و سرعت جوانه‌زنی و شاخص‌های طولی و وزنی بذر معنی‌دار بودند. استفاده از برخی تیمارهای مختلف امواج فراصوت منجر به افزایش میانگین درصد و سرعت جوانه‌زنی بذر گردید. به نظر می‌رسد امواج فراصوت در دزهای مطلوب سبب بهبود جوانه‌زنی می‌گردد این مهم به دلیل تغییر توازن بارالکتریکی غشاء و ایجاد شیب پتانسیل الکتروشیمیایی ناشی از حرکت مواد غذایی حاصل از تجزیه آندوسپرم و تغییر سیالیت دیواره سلولی و افزایش نفوذپذیری غشاء سلولی می‌شود.<sup>[۲۸]</sup>

همچنین، میزان ایجاد شیار و حفره در پوسته بذرهای افزایش یافت که این امر نیز به جذب بیشتر آب و عناصر غذایی کمک می‌کند. در اثر ایجاد حفره و خراش در پوسته بذر تحت تأثیر امواج فراصوت، حباب‌های کوچکی در سطح پوسته بذر تشکیل می‌شود که با از بین رفتن این حباب‌های کوچکی در سطح پوسته بذر تشکیل می‌شود که با از بین رفتن این حباب‌ها، حرارت و فشار زیادی در سطح پوسته تولید می‌شود. بنابراین در سطح نوعی تنش و بی‌نظمی ایجاد می‌شود. در نهایت تکرار این پوسته بذر می‌شود. آب جذب شده به سلول‌های جنینی می‌رود و سبب آزادسازی جیبرلیک اسید می‌شود و آزادسازی مواد غذایی در آندوسپرم را سرعت می‌بخشد.<sup>[۱۹]</sup>

همچنین امواج فراصوت در گیاه اسطوخودوس از نظر درصد جوانه‌زنی اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد ایجاد کرد.<sup>[۲۵]</sup> امواج فراصوت با شدت زیاد برای ترکیبات زیستی مخرب بوده، غشای سلول‌ها را تخریب کرده و مولکول‌های زیستی مانند آنزیم‌ها و DNA را غیرفعال می‌سازد. از طرف دیگر نشان داده شده که امواج فراصوت با شدت و انرژی کم، طیفی از تأثیرات زیستی غیرکشنده داشته که از اهمیت بالقوه‌ای برخوردار است.<sup>[۳۲]</sup> به نظر می‌رسد به همین دلیل است که امواج با شدت بیشتر و مدت زمان بالاتر، از اثرات کمتری در مقایسه با سایر ترکیبات تیماری برخوردار بود و در برخی موارد منجر به کاهش میانگین صفات مورد بررسی شده از جمله درصد و سرعت جوانه‌زنی و سایر صفات گردید.<sup>[۱۷]</sup>

جدول ۱) تجزیه واریانس صفات جوانه زنی و محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی کلزا تحت تأثیر امواج فراصوت

Table 1) Analysis of variance of germination indices and photosynthesis pigments contents in rapeseed affected by ultrasonic wave treatments

Source of variation	df	mean of squares											
		germination percentage	germination time	germination rate	seedling length	seedling dry weight	weight seedling index	length seedling index	relative water content	chlorophyll a content	chlorophyll b content	total chlorophyll content	carotenoids content
Ultrasonic wave (UW)	1	115.7**	3.21**	2.25**	0.26**	314.6ns	2719584 **	124.29ns	0.010ns	359.7**	64.5**	728.3**	2.30ns
Power of the device (PD)	2	45.1ns	0.05**	1.38**	0.004ns	411.1*	2825042 **	331.5ns	4.84**	305.3**	105.8**	753.7**	122.9ns
Time (T)	4	68.7ns	0.04**	1.00**	0.163ns	145.1ns	1050875**	1504.5ns	1.35**	145.4**	33.2**	312.1**	148.3ns
UW × PD	2	38.5ns	0.11**	0.04ns	0.108ns	100.5ns	966672ns	1862.4ns	3.25**	272.5**	56.4**	576.7**	208.9ns
UW × T	4	114.3**	0.02**	0.125ns	0.203*	208.3ns	1849506*	3092.6**	0.60**	156.1**	88.8**	477.3**	90.1ns
PD × T	8	45.8ns	0.01**	0.276ns	0.194ns	102.8ns	668135ns	1276.1ns	1.07**	217.3**	56.8**	485.4**	52.7ns
UW × PD × T	8	95.8**	0.03**	1.245 **	0.182ns	249.8 ns	1504506**	2111.0*	1.14**	110.8**	33.7**	261.8**	171.0ns
Error	30	32.4	0.001	0.204	0.079	146.7	101899	1036.6	0.07	0.30	0.11	0.52	102.1
CV (%)	-	12.90	3.11	14.85	13.87	25.24	21.49	19.41	16.30	4.98	2.66	3.02	21.49

\* and \*\* significant at 5 and 1% probability level, and non-significant, respectively

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

جدول ۲) اثر شدت، مدت و قدرت امواج فراصوت بر شاخص‌های جوانه‌زنی و رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاهچه کلزا

Table 2) The effects of intensity, time, power of ultrasonic wave on germination indices and photosynthetic pigments of rapeseed seedling

Ultrasonic wave (kHz)	Power of the device (W)	Time (min)	Germination percentage(%)	Germination rate (seed/day)	Seedling vigor index (weight)	Seedling vigor index (length)	Chlorophyll a (µg/g FW)	Chlorophyll b (µg/g FW)	Carotenoids (µg/g FW)
40	100	2	61.6 bc	3.60 abc	166.8 c	3542 ab	15.4 fg	20.7 d	2.27 c.f
		4	73.3 ab	4.22 a	205.9 ab	4147 ab	4.7 u	1.6 p	1.02 lm
		6	68.3 ab	3.53 a.d	208.5 ab	4144 ab	12.0 kl	11.8 f	0.25 o
		8	66.6 ab	3.07 b.f	204.0 ab	2807 bc	10.6 m	4.3mno	1.98 d.i
		20	66.6 ab	2.97 b.f	191.7abc	3362 ab	14.7 gh	10.5 g	1.25 j.m
	80	2	70.0 ab	3.53 a.d	181.0 bc	2987 abc	9.5 opq	3.9 no	1.97 d.i
		4	56.6 bc	2.55 c.f	168.9 bc	3241 ab	24.8 b	34.9a	4.01 a
		6	68.3 ab	2.63 b.f	249.6 a	3186 ab	8.9 qr	4.2mno	1.48 g.l
		8	63.3 bc	3.09 b.f	195.6 ab	2875 bc	26.3 a	34.9 a	2.95 b
		20	73.3 ab	3.17 b.f	231.0 a	4209 ab	22.4 c	29.4 b	2.8 bc
	60	2	75.0 a	3.73 ab	233.3 a	3890 ab	8.0 s	4.2 mo	1.35 i-m
		4	68.3 ab	3.16 b.f	194.0 ab	3464 ab	14.4 hi	11.7 f	0.73 m-o
6		68.3 ab	3.74 ab	212.8 ab	4025 ab	10.3 mn	8.2 h	0.91 l-n	
8		65.0abc	2.64 b.f	219.4 a	2558 bc	15.7 f	14.2 e	0.31 no	
20		63.3 bc	2.83 b.f	165.3 c	2831 bc	11.6 l	7.3 hi	1.38 i.m	
59	100	2	75.0 a	3.56 a.d	252.5 a	4778 a	20.5 d	24.1 c	1.46 h.k
		4	65.0abc	3.43 a.d	213.0 ab	3853 ab	15.5 f	20.7 d	2.13d.g
		6	70.0 ab	3.26 a.e	220.5 a	4060 ab	6.5 t	3.1 o	0.99 lm
		8	71.6 ab	2.98 b.f	239.5 a	3666 ab	10.3 mn	5.7 jkl	1.72 f.j
		20	56.6 bc	2.63 b.f	163.1 c	2031 c	9.3 pq	4.3mno	1.70 g.k
	80	2	70.0 ab	3.01 b.f	236.6 a	3059 ab	13.8 ij	6.6 ij	2.59 bcd
		4	65.0abc	2.91 b.f	221.6 a	2545 bc	18.3e	20.2 d	1.05 klm
		6	55.0 bc	2.27 ef	155.9 c	2240 c	11.4 l	7.5 hi	0.91lmn
		8	65.0abc	2.49 def	166.0 c	3586 ab	10.2mno	5.3klm	1.71 f.j
		20	58.3 bc	2.48 def	182.8 bc	1976 c	9.7 nop	3.7 o	3.0 b
	60	2	63.3 bc	3.37 a.e	180.4 bc	2972 abc	11.4 l	5.0lmn	2.04 d.h
		4	71.6 ab	2.81 b.f	221.5 a	3018 ab	12.5 k	9.5 g	0.80mno
6		53.3 c	2.24 f	173.8 bc	2080 c	13.5 j	6.4 ijk	2.41 b.e	
8		68.3 ab	2.73 b.f	240.7 a	2675 bc	6.9 t	3.1 o	1.51 g.l	
20		60.0 bc	2.45 def	162.0 c	2340 bc	8.2 rs	3.1 o	1.89 e.j	

حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

Similar letters in each column shows non-significant difference according to Duncan test at 5% level

افزایش مدت زمان قرارگیری در معرض امواج فراصوت منجر به کاهش معنی دار میانگین رنگیزه‌های فتوسنتزی شد. در همین راستا، سایر پژوهشگران نیز گزارش کردند که با افزایش مدت زمان تابش امواج فراصوت میزان کلروفیل به صورت معنی داری کاسته شد. این کاهش را می توان به تنش اکسیداتیو ناشی از امواج فراصوت نسبت داد که باعث از بین رفتن ساختمان مولکول‌های درون سلولی و کلروپلاست شده و کاهش میزان کلروفیل a, b و کل را باعث شده است.<sup>[۲۳]</sup> کارتنوئیدها گروه بزرگی از مولکول‌های ایزوپرنوئید هستند که توسط اندام‌های فتوسنتزی ساخته می- شوند<sup>[۲۴]</sup> که یکی از رنگیزه‌های کلیدی و مهم سیستم آنتی‌اکسیدانی در گیاهان هستند، اما آن‌ها به تخریب اکسیداتیو بسیار حساس می‌باشد. در پژوهش حاضر نتایج نشان داد

غیر معنی دار بود. در همین راستا سایر پژوهشگران بیان داشتند که امواج فراصوت باعث افزایش محتوای کلروفیل برگ و عناصر معدنی دانه لوبیا چشم‌بلبلی شده است.<sup>[۵]</sup> این مسأله می‌تواند مربوط به نیروی برشی ایجاد شده و محتوای انرژی بالای این امواج و تأثیر آن‌ها در شکستن و متلاشی کردن دیواره‌های سلولی و افزایش احتمال رهایش محتویات آن‌ها به محیط استخراج و بهبود انتقال جرم باشد. امواج فراصوت همچنین سبب کاهش اندازه ذرات می‌شود که سطح تماس را افزایش داده و در نتیجه انتشار حلال در بافت افزایش می‌یابد. به علاوه، با افزایش شدت صوت، انتقال ناشی از فروپاشی حباب‌های کائیتاسیون در نزدیکی دیواره سلولی تشدید می‌شود که منجر به تماس بهتر بین حلال و مواد گیاهی می‌گردد.<sup>[۱۵]</sup> همچنین، در زمان فروپاشی حباب‌های کائیتاسیون یک جریان سریع از امواج فراصوت تولید می‌شود که به عنوان یک میکروپمپ برای حلال عمل کرده و می- تواند به اجبار حلال را به درون سلول رانده و ترکیبات مورد نظر را حل کند.<sup>[۱۶]</sup> پیش تیمار بذور چشم بلبلی با امواج فراصوت به مدت شش دقیقه باعث افزایش محتوای کلروفیل برگ به میزان ۳۳/۶٪ گردید<sup>[۲۵]</sup> که هم‌راستا با یافته‌های پژوهش حاضر می‌باشد. به نظر می‌رسد امواج دهی بذور لوبیا چشم‌بلبلی با فراصوت از طریق تحریک و افزایش سرعت جوانه‌زنی و استقرار سریع گیاه می‌تواند فعالیت ریشه گیاه در جذب آب و مواد غذایی را بیشتر نماید که تأثیر مستقیمی بر میزان کلروفیل و فتوسنتز گیاهچه دارد.<sup>[۲۵]</sup>

جدول ۳) همبستگی بین شاخص‌های جوانه‌زنی و رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاهچه کلزا تحت تأثیر تیمارهای امواج فراصوتی

Table 3) Correlation among germination indices and photosynthetic pigments of rapeseed affected by ultrasonic wave treatments

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	0.7**									
3	0.41*	0.52**								
4	0.21	0.04	0.31							
5	0.75**	0.40*	0.14	0.80**						
6	0.69**	0.67**	0.94**	0.01	0.49**					
7	0.30	0.06	0.09	0.04	0.06	-0.13				
8	0.19	0.27	0.25	0.23	0.29	-0.10	0.08			
9	0.07	0.11	0.32	0.16	0.18	-0.20	0.25	0.98**		
10	0.16	0.02	0.21	0.11	0.31	-0.21	0.09	0.99**	0.95**	
11	0.06	0.01	0.13	0.02	0.14	-0.23	0.13	0.43*	0.44*	0.41*

1: germination percentage; 2: germination rate; 3: seedling length; 4: seedling dry weight; 5: seedling vigor index (weight); 6: seedling vigor index (length); 7: relative water content; 8: total chlorophyll; 9: chlorophyll a; 10: chlorophyll b; 11: carotenoids

\*\* and \*: significant in 1 and 5% probability level



**نتیجه‌گیری کلی** اثر شدت، قدرت و مدت زمان فراصوت بر پارامترهای جوانه‌زنی و فیزیولوژیکی معنی‌دار بوده و از بین این سه عامل اثر مدت زمان و شدت امواج بسیار تأثیرگذار بود به طوری که افزایش زمان و یا شدت امواج منجر به افت میانگین صفات اندازه‌گیری شده گردید. در کل با توجه به بررسی تمامی صفات اندازه‌گیری شده اعمال چهار تا شش دقیقه امواج فراصوت با قدرت ۸۰ وات به منظور افزایش جوانه‌زنی نتایج مطلوب‌تری نشان داد. شاخص‌های جوانه‌زنی در مقایسه با شاخص‌های فیزیولوژیکی کم‌تر به اعمال تیمارهای فراصوت واکنش نشان دادند. به دلیل وابستگی کم‌تر گیاهچه در مرحله ابتدای رویش به فتوسنتز بیشتر وابسته به ذخایر بذر می‌باشد پیشنهاد می‌گردد در آزمایش‌های بعدی سایر پارامترهای فیزیولوژیکی از جمله میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و سایر متابولیت‌های ثانویه انجام گیرد.

که افزایش زمان و شدت منجر به کاهش این صفت گردید ولی این کاهش به شدت کلروفیل‌ها نبود. در همین راستا، گزارش شد که تابش امواج فراصوت در زمان‌های بیشتر به عنوان یک تنش اکسیداتیو برای سلول به شمار می‌رود و سلول با افزایش میزان کارتنوئید درون سلولی خود به عنوان آنتی‌اکسیدان به مقابله با تنش می‌پردازد.<sup>[۴]</sup>

در مجموع، علاوه بر شدت و قدرت امواج فراصوت که بسیار مهم است، از آن مهم‌تر مدت زمان در معرض قرار گرفتن بذر در معرض امواج فراصوت است. در پژوهشی بر بذره‌های بادمجان، فلفل، گل رعنا و خیار پس از تیمار بذرها با امواج فراصوت ۴۲-۵۹ کیلوهرتز نتایج حاکی از برتری بسیار بالای تیمارهای تحت اعمال امواج فراصوت نسبت به شاهد گزارش شده است.<sup>[۳]</sup> در پژوهش حاضر ارتباط معنی‌داری بین صفات فیزیولوژیکی و شاخص‌های جوانه‌زنی وجود نداشت. به نظر می‌رسد عدم وجود ارتباط معنی‌دار به دلیل اندازه‌گیری پارامترهای فیزیولوژیکی محدود در مرحله گیاهچه‌ای باشد که وابستگی گیاهچه به فتوسنتز در ابتدای امر بوده و بیشتر به ذخایر بذر وابسته می‌باشد.

بین شاخص‌های جوانه‌زنی اعم از درصد و سرعت جوانه‌زنی و شاخص‌های بینه بذر و شاخص‌های فیزیولوژیکی گیاهچه اعم از محتوی کلروفیل، کارتنوئید و محتوی رطوبت نسبی همبستگی معنی‌داری وجود نداشت، ولی در داخل این دو دسته صفات همبستگی مثبت زیادی مشاهده شد. به طوری که درصد جوانه‌زنی با صفات سرعت جوانه‌زنی، طول گیاهچه، شاخص وزنی و طولی بینه بذر همبستگی مثبت و معنی‌داری داشت. محتوی رطوبت نسبی با هیچ یک از صفات جوانه‌زنی و فیزیولوژیکی همبستگی معنی‌داری نشان نداد. همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ مابین کلروفیل کل و کلروفیل a و b مشاهده شد. محتوی کارتنوئید با صفات کلروفیل کل، کلروفیل a و b همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ داشت (جدول ۳).

## References

1. Alvandian S, Vahedi AS, Taghizadeh R (2013) Investigating the effect of ultrasound and chilling on germination of seeds of medicinal plant (*Myrtus communis* L.). Journal of Seed Research 3: 21-31. [in Persian with English abstract]
2. Andrew JS, Moreau H, Kuntz M, Pagny G, Lin C, Tanksley S, McCarthy J (2008) An investigation of carotenoid biosynthesis in *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. Journal of Plant Physiology 165: 1087-1106.
3. Ashnagar N, Mir Mohammoodi T, Jalilnejhad N (2019) Effects of electromagnetic field and ultrasonic waves on seed germination, seedling characteristics and essence percent of thymes (*Thymus vulgaris* L.). Journal of Crop Ecophysiology 13(1): 57-72. [in Persian with English abstract]

4. Chen B, Huang J, Wang J, Huang L (2008) Ultrasound effects on the antioxidant defense systems of *Prophyridium cruentum*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 16: 88-92.
5. Ebadi S, Gholipour M, Gholami A (2013) Effect of ultrasound and nitroxin biological fertilizer on growth, yield and yield components of cowpea (*Vigna sinensis* L.). Proceedings of the 2<sup>nd</sup> National Symposium of Sustainable Development of Agriculture and Healthy Environment. August 27-28, Hamedan, Iran. [in Persian with English abstract]
6. Esitken A, Turan M (2004) Alternating magnetic field effects on yield and plant nutrient element composition of strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. camarosa). Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil and Plant Science 54(3): 135-139.
7. FAOSTAT (2015) Brassicanapus. Available on-line as <<http://www.faostat.fao.org>> on 05 April 2017.
8. Faryabi A, Zaremansh H, Keshvarii M, Abdali N (2008) The effect of ultrasonic waves on physiologic and morphologic processes of seed germination in capsicum pepper (*Capsicum annuum*) and radish (*Rhaphanus sativus*). The 1<sup>st</sup> National Conference on Iranian Seed Science and Technology, Gorgan. [in Persian with English abstract]
9. Fathi SAA, Bozorg-Amirkalae M, Sarfaraz R (2011) Preference and performance of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) on canola cultivars. Journal of Pest Science 84(1): 41-47. [in Persian with English abstract]
10. Jaleel CA, Manivannan P, Wahid A, Farooq M, Somasundaram R, Panneerselvam R (2009) Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. International Journal of Agriculture Biology 11: 100-105.
11. Kanto U, Jutamanee K, Osotsapar Y, Chai-arree W, Jattupornpong S (2015) Promotive effect of priming with 5-aminolevulinic acid on seed germination capacity, seedling growth and antioxidant enzyme activity in rice subjected to accelerated ageing treatment. Plant Production Science 18: 443-454.
12. Karimifard S, Gholami A, Gholipour M (2017) Determination of growth characteristics and quality of *Nigella sativa* L. affected by mycorrhizal fungi symbiosis and ultrasonic waves. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 33(5): 741-753. [in Persian with English abstract]
13. Kazemi Golozani K, Dalil B (2011) Germination and seed vigor tests. Mashhad University Publisher: Mashhad. [In Persian]
14. Kohi L, Zareh N, Amani A, Sheykhzadeh Mosadegh P (2016) The effect of ultrasound on cell viability of tobacco cells. Journal of Plant Researches 29(2): 441-451. [in Persian with English abstract]
15. Kornarzyski K, Dziwulska-Hunek A, Kornarzyska-Gregorowicz A, Sujak A (2018) Effect of electromagnetic stimulation of amaranth seeds of different initial moisture on the germination parameters and photosynthetic pigments content. Nature 8: 14023 | DOI:10.1038/s41598-018-32305-5.
16. Li J, Dong ding S, Xiao-lin D (2007) Optimization of the ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from *Zizyphus jujube* cv. Jinsixiaozao. Journal of Food Engineering 80: 176-183.
17. Liu J, Wang Q, Karagic D, Liu X, Cui J, Gui J, Gu M, Gao W (2016) Effects of ultrasonication on increased germination and improved seedling growth of aged grass seeds of tall fescue and Russian wild rye. Nature 6: 22403 | DOI: 10.1038/srep22403
18. Maleki Farahani S, Rezazadeh A, Aghighi Shahverdi M (2015) Effects of electromagnetic field and ultrasonic waves on seed germination of Cumin (*Cuminum cyminum*). Iranian Journal of Seed Research 2(1): 109-118. [in Persian with English abstract]
19. Marghaeizadeh Gh, Gharineh MH, Fathi Gh, Abdali AR, Farbod M (2014) Effect of ultrasound waves and magnetic field on germination, growth and yield of *Carum copticum* (L.) C. B. Clarke in lab and field conditions. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 30(4): 539-560. [in Persian with English abstract]
20. Marinkovic B, Grujic M, Marinkovic D, Crnobarac J, Marinkovic J, Jacimovic G, Mircov DV (2008) Use of biophysical methods to improve yields and quality of agricultural productions. Journal of Agricultural Sciences 53(3): 235-242.
21. Miano AC, Forti VA; Abud HF; Gomes-Junior FG; Cicero SM; Augusto PED (2015) Effect of ultrasound technology on barley seed germination and vigour. Seed Science Technology 43: 297-302.
22. Mirshekari B, Siyami R (2015) Improvement of initial growth and medicinal indices of ribwort plantain (*Plantago lanceolata*) by physical seed priming. Agroecology Journal 11(3): 47-55. [in Persian with English abstract]

23. Mokhberi R, Rezaei A, Kordenaeej A (2016) The interaction effect of ultrasonic and salinity on growth and metabolite production in *Dunaliella salina* cells. *Journal of Plant Process and Function* 17(5): 171-191. [in Persian with English abstract]
24. Mroczek-Zdyrska M, Kornarzyński K, Pietruszewski S, Gagoś M (2017) The effects of low-frequency magnetic field exposure on the growth and biochemical parameters in lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Plant Biosystems* 151: 504-511.
25. Nasiri Dehsorkhi A, Makarian H, Gholipoor M, Abbasdokht H (2017) Investigating the effect of ultrasonic waves and seed priming on emergence and growth of cowpea under soil-applied trifluralin. *Journal of Plant Production* 31(1): 40-51. [in Persian with English abstract]
26. Saffikhani S, Desert A, Faraji A, Rahimi Karizaki A, Ghalyzadeh A (2014) The response of some cultivars of canola cultivars to nitrogen fertilizer and planting date. *Journal of Ecophysiology of Crops* 9(3): 446-429. [in Persian with English abstract]
27. Seyedifar R, Asefi N, Maghsoudlou Y (2014) Effect of ultrasound waves pretreatment on quantity and antioxidant capacity of extracted beta-carotene from carrot residue. *Journal of Food Hygiene* 4: 63-83. [in Persian with English abstract]
28. Sharifi A, Ayvaz M (2011) Application of ultrasound in food processing as non-destructive method. *Proceedings of the 20<sup>th</sup> National Congress of Food Science and Technology*, August 17-19, Tehran, Iran. [in Persian with English abstract]
29. Sobhani B, Salahi B, Roshanli M (2017) Evaluation of rapeseed cultivation potential with analytical hierarchy process model and TOPSIS in Mazandaran Province, Iran. *Agroecology Journal* 13(3): 15-24. [in Persian with English abstract]
30. Sorkhy LF (2009) Evaluating the effect of ultrasound waves and magnetic field on seeds germination in marygold (*Calendula officinalis* L.). *Proceedings of 6th Iranian Horticultural Science Congress*, July 13-16, University of Guilan, Rasht, Iran. [in Persian with English abstract]
31. Stephanie EB, Svoboda VP, Paul AT, Marc WVI (2005) Controlled drought affects morphology and anatomy of *Salvia solendens*. *Sciatica Horticulture* 130(5): 775-781.
32. Vilku K, Mawson R (2008) Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9: 161-169
33. Yaldagard M, Mortazavi SA, Tabatabaie F (2008) Application of ultrasonic waves as a priming technique for accelerating and enhancing the germination of barley seed: optimization of method by the taguchi approach. *Journal of the Institute of Brewing* 114(1): 14-21. [in Persian with English abstract]

# Effect of intensity, duration and power of ultrasonic waves on germination indices and photosynthetic pigments of canola seedling




Agroecology Journal

Vol. 15, No. 2 (13-24)  
(summer 2019)

Saba Dashab, Heshmat Omid 

Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agricultural Sciences, Shahed University, Tehran, Iran

 omidi@shahed.ac.ir (Corresponding author)

**Received:** 22 April 2019

**Accepted:** 05 August 2019

**Abstract** Seed priming using biophysical methods including ultrasonic wave causes changes in germination and some physiological traits of seedling. Accordingly, in order to investigate the effect of intensity and duration of ultrasonic wave on germination of rapeseed cv. Modena, an experiment as factorial was conducted based on a completely randomized design with three replications in Laboratory condition. Experimental factors consisted of power 60, 80, and 100 W and two ultrasonic waves 40 and 59 kHz at duration of 2, 4, 6, 8, and 20 minutes. The triple interaction of power  $\times$  irradiation intensity  $\times$  irradiation time was significant on germination indices including percentage and rate of germination, seedling vigor index of length and weight and seedling traits including chlorophyll a, b and total, and carotenoid content. Germination percentage using 40 and 59 kHz ultrasound waves at 100 W for 2 minutes was increased by 17.8%. The seedling vigor index of length and weight were improved using 59 kHz ultrasonic power with 100 W, and compared to control treatment had increasing 33.8 and 25.8%, respectively. In the application of 40 kHz ultrasound power with 80 W in 8 minutes, total chlorophyll, chlorophyll a, and chlorophyll b content than control treatment was 61.26, 26.3, and 34.9  $\mu\text{g/g}$  FW, respectively. Based on the present research, seed pre-treatment of 40 and 59 kHz ultrasound waves with 100 watts can be recommended to improve seed germination indices and increase photosynthetic pigments contents.

## Keywords

- ◆ carotenoid content
- ◆ chlorophyll content
- ◆ nanoprimering
- ◆ seed priming

This open-access article is distributed under the terms of the Creative Commons-BY-NC-ND which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

DOI: 10.22034/AEJ.2019.1873897.1107

