

تولید نانوذرات نقره به روش زیستی با استفاده از عصاره میوه بلوط و بررسی فعالیت ضد میکروبی آن بر علیه عوامل ایجاد عفونت های بیمارستانی

محمود چهاردولی^{*}، احسان خدادادی^۱

اکروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام

تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۴

تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۱۷

چکیده

مقدمه: باکتری ها از جمله عوامل ایجاد عفونت های بیمارستانی هستند که با مقاومت به آنتی بیوتیک های متداول، مشکلات زیادی را برای سلامت بشر ایجاد کرده اند. نانوذرات نقره خواص ضد میکروبی بالایی دارند و می توانند در زمینه های مختلف پزشکی و کنترل بهداشت به کار گرفته شوند. هدف این پژوهش تولید نانوذرات نقره به روش زیستی تک مرحله ای و با کاربرد عصاره میوه بلوط و بررسی فعالیت ضد باکتریایی آن می باشد.

مواد و روش ها: عصاره میوه بلوط تهیه و برای تولید نانوذرات نقره به محلول نیترات نقره اضافه شد. تولید نانوذرات در محلول با ثبت تغییر رنگ در طول آزمایش و میزان جذب در طول موج های مختلف توسط اسپکتروفوتومتر بررسی شد. فعالیت ضد میکروبی محلول نانوذرات به روش بررسی هاله محدودیت بر علیه باکتری های Escherichia PTCC Pseudomonas aeruginosa, PTCC 1112 Staphylococcus aureus, PTCC 1330coli و subtilis PTCC 1715Bacillus 1074 بررسی شد.

یافته های پژوهش: تغییر رنگ از شفاف به قهوه ای تیره در محلول مشاهده شد میزان جذب نیز افزایش یافته و در ۴۲۰ نانومتر بیشترین جذب مشاهده شد. فعالیت ضد میکروبی محلول نانوذرات نقره بر علیه تمام باکتری ها بررسی و اثبات شد.

بحث و نتیجه گیری: نانوذرات نقره در یک فرایند یک مرحله ای و در زمان کم تولید شد که فعالیت ضد میکروبی مناسبی نشان داد.

واژه های کلیدی: عفونت های بیمارستانی، نانوذرات نقره، خواص ضد میکروبی، روش زیستی، عصاره میوه بلوط

* نویسنده مسئول: گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام

Email: M.chahardooli@gmail.com

مقدمه

این پژوهش بررسی پتانسیل عصاره میوه بلوط در تولید نانوذرات نقره و هم چنین بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره تولید شده علیه عوامل ایجاد عفونت های بیمارستانی می باشد.

مواد و روش ها

تهیه عصاره میوه بلوط: در ابتدا میوه بلوط از کوه های اطراف شهر ایلام جمع آوری و با آب مقطر به خوبی شستشو داده شدند. سپس به مدت ۴ روز در دمای محیط قرار گرفته تا خشک شوند و پس از آن به تکه های کوچک تقسیم و با هاون به خوبی پودر شد. ۱/۵ گرم از پودر حاصل به ۵۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه در حمام آب قرار گرفت و محلول حاصل با کاغذ صافی فیلتر شد.

تولید نانوذرات نقره با عصاره میوه بلوط: ۱ میلی لیتر از عصاره به ۳۰ میلی لیتر محلول نیترات نقره ۵ میلی مولار اضافه شد و پس از کمی هم زدن، محلول در دمای محیط قرار گرفت. تولید نانوذرات در زمان های ۵، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ دقیقه پس از شروع آزمایش، در ابتدا با مشاهده و ثبت تغییر رنگ و سپس با تعیین میزان جذب محلول در طول موج های مختلف با دستگاه اسپکتروفوتومتر بررسی شد.

بررسی تاثیر دما: در آزمایش دیگری تاثیر افزایش دما بر سرعت تولید نانوذرات نقره با عصاره میوه بررسی شد که برای این منظور علاوه بر دمای محیط، از دماهای ۳۰، ۶۰ و ۹۰ درجه سانتی گراد در حمام آب گرم برای اعمال دما بر محلول در این آزمایش استفاده شد.

بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات تولید شده: ایزوله های باکتریایی PTCC Escherichia coli، PTCC 1112 Staphylococcus aureus، PTCC 1074 Pseudomonas aeruginosa، PTCC subtilis PTCC 1715 Bacillus های علمی و صنعتی ایران (IROST) تهیه شدند. تمامی باکتری ها بر روی محیط کشت جامد نوترینت آکار (NA) و در دمای ۴ درجه سانتی گراد (یخچال) نگهداری شدند. یک کلنسی از هر باکتری به طور جداگانه در محیط کشت مایع انکویاتور رشد داده شده و سپس کشت سانتریفیوژ شده، دو بار با محلول بافر فسفات ۱X شستشو داده شده و در آب مقطر حل شدند. به میزان ۱۰۰ میلی لیتر از محلول هر باکتری حاوی 10^4 CFU/ml در ۲۵ میلی لیتر محیط

باکتری ها از جمله عواملی هستند که باعث عفونت های بیمارستانی و بروز مشکلات بهداشتی می شوند. استفاده وسیع و بی رویه آنتی بیوتیک ها موجب افزایش روند ایجاد مقاومت در باکتری ها و سبب ایجاد مشکلاتی در درمان و تهدید سلامتی افراد بستری در بیمارستان ها شده^(۳)، و به عنوان یک مشکل جدی جهانی مطرح می باشد^(۴). یافتن جایگزین هایی برای آنتی بیوتیک ها راهکار کارآمدی برای جلوگیری از وخیم تر شدن این مشکل خواهد بود. تاکنون مطالعات زیادی پتانسیل استفاده از ترکیبات ضد میکروب گیاهان^(۵)، پروتئین و پپتیدهای ضد میکروب^(۶)، و نانوذرات برای کنترل و درمان عوامل بیماری زا را نشان داده اند. دسته ای از محصولات تولیدی نانوفناوری، نانوذرات هستند که با خصوصیات ویژه ای که دارند در گستره ای از علوم مختلف به کار برده شده اند. نانوذرات نقره به خاطر خواص ضد میکروبی در زمینه های مختلف از جمله در پزشکی، صنعت و صنایع غذایی کاربرد وسیعی دارد^(۷). روش های متداول تولید نانوذرات شامل روش های فیزیکی، شیمیایی و روش زیستی می باشد^(۸). مزایای روش زیستی مانند هزینه کمتر، سرعت بیشتر، مقیاس بالای تولید و عدم تهدید محیط زیست باعث شده که در حال حاضر توجه بیشتری به تولید نانوذرات با این روش نسبت به دو روش دیگر شود^(۹). تاکنون پتانسیل تولید نانوذرات مختلف به روش زیستی و به ویژه با استفاده از باکتری ها^(۱۰)، قارچ ها^(۱۱)، و گیاهان^(۱۲)، در تحقیقات گوناگونی به اثبات رسیده است. در ایران بلوط ترین و فراوان ترین گونه درختی موجود در غرب کشور، به ویژه در منطقه زاگرس محسوب می شود. سلسه جبال زاگرس، وسیع ترین و اصلی ترین رویشگاه گونه های مختلف بلوط در ایران بوده و به همین دلیل این منطقه از اهمیت بسیار ویژه ای برخوردار است. زاگرس جنوبی رویشگاه خاص گونه Quercus brantii بوده که شامل قسمت های وسیعی از ایران از جمله استان ایلام می باشد. کشور ایران دارای تنوع گیاهی گسترده ای است. با این وجود، تاکنون تحقیقات چندانی برای بررسی پتانسیل این گیاه در زمینه تولید نانوذرات انجام نشده است. انتظار می رود که با اجرای طرح هایی در این زمینه بتوان به نتایج قابل قبولی رسید. اثبات پتانسیل تولد نانوذرات نقره برای میوه بلوط می تواند راهکاری آسان و ارزان برای تولید نانوذرات نقره بوده و در ضمن استفاده مفیدی از محصول این درخت باشد. هدف

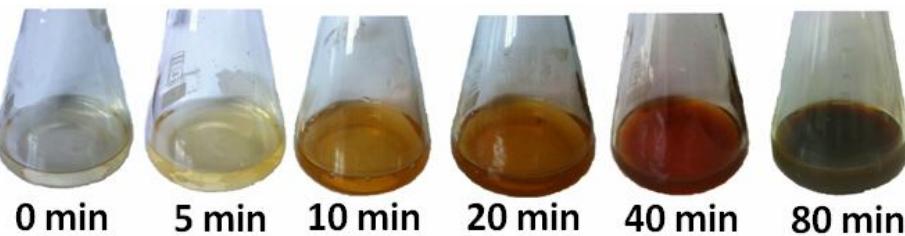
حاله محدودیت رشد باکتری بود و آنالیز داده ها با نرم افزار SPSS و رسم نمودارها با اکسل انجام شد.

یافته های پژوهش

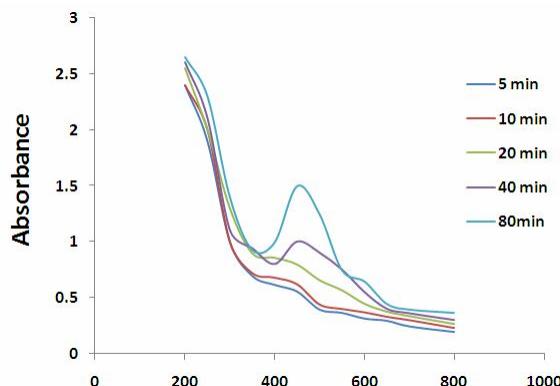
تصاویر تغییر رنگ ایجاد شده در محلول نیترات نقره نشان می دهد که تولید نانوذرات نقره بعد از ۵ دقیقه شروع شده و در زمان ۱۰ دقیقه این تغییر رنگ کاملاً محسوس است.(تصویر شماره ۱) محلول در نهایت بعد از ۸۰ دقیقه به رنگ قهوه ای تیره در می آید که نشان از تولید نانوذرات نقره در محلول است. بررسی میزان جذب در طول موج های مختلف(۲۰۰ تا ۹۰۰ نانومتر) نیز نشان از افزایش میزان جذب در طول زمان بوده که بیشترین میزان جذب تقریباً در طول موج ۴۵۰ نانومتر بوده است.(نمودار شماره ۱)

کشت نوترینت آگار مخلوط شده و در پتری دیش های ۹ سانتی متری ریخته شده و بعد از سفت شدن برای آزمایش ضد میکروبی به کار گرفته شدند.

برای بررسی فعالیت ضد میکروبی از روش بررسی هاله محدودیت با استفاده از دیسک های کاغذی استفاده شد. در این آزمایش کنترل مثبت شامل دیسک های حاوی آنتی بیوتیک جنتامايسین($10 \mu\text{g}/\text{disc}$) برای باکتری های گرم مثبت، آمپی سیلین($10 \mu\text{g}/\text{disc}$) برای باکتری های گرم منفی، شاهد، آب مقطر و تیمارهای اصلی شامل ۵۰ میلی لیتر از محلول حاوی نانوذرات نقره در زمان ۴۰ و ۸۰ دقیقه پس از آغاز واکنش می باشد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتور مورد بررسی قطر



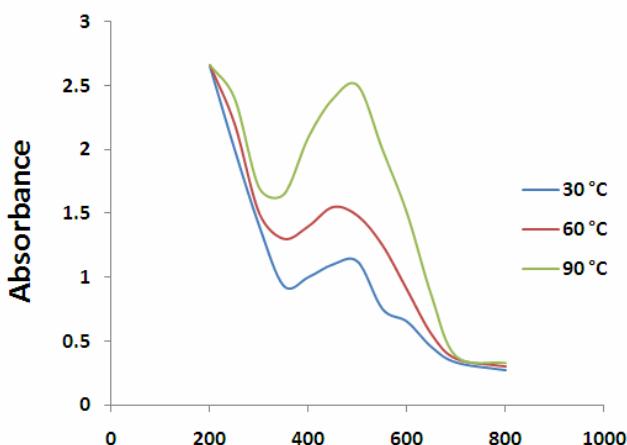
تصویر شماره ۱. تصاویر تغییر رنگ ایجاد شده در محلول نیترات نقره از شروع تا ۸۰ دقیقه



نمودار شماره ۱. میزان جذب محلول نیترات نقره در طول موج های ۲۰۰ تا ۹۰۰ نانومتر

داشته و با افزایش دما میزان جذب در طول موج های مختلف افزایش پیدا کرده است و بیشترین جذب برای هر سه دمای اعمال شده تقریباً در طول موج ۴۵۰ نانومتر است که نشان از تولید نانوذرات در محلول واکنش می باشد.

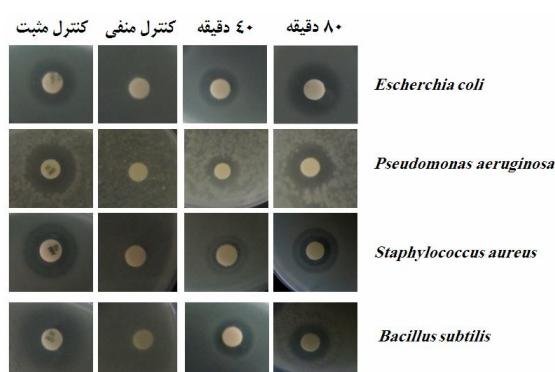
نمودار شماره ۲ تاثیر افزایش دما بر سرعت تولید نانوذرات نقره با عصاره میوه در دمایهای ۳۰، ۶۰ و ۹۰ درجه سانتی گراد در حمام آب گرم را نشان می دهد. همان طور که مشخص است دما تاثیر مثبتی بر روی تولید نانوذرات



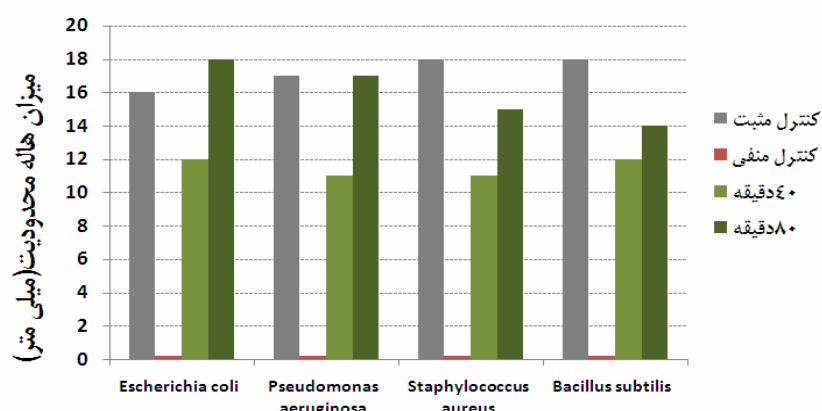
نمودار شماره ۲. بررسی تاثیر افزایش دما بر سرعت تولید نانوذرات نقره

که حاصل جلوگیری از رشد میکروب توسط نانوذرات نقره است در تیمارهای اصلی مشاهده می شود و این در حالی است که در شاهد هیچ هاله ای مشاهده نمی شود. با ادامه واکنش غلظت نانوذرات نقره در محلول افزایش یافته و در نتیجه تیمار ۸۰ دقیقه نسبت به ۴۰ دقیقه به میزان بیشتری از رشد باکتری ها جلوگیری کرده است.(نمودار شماره ۳)

فعالیت ضد میکروبی نانوذرات تولید شده نیز با مشاهده و اندازه گیری هاله محدودیت رشد باکتری در اطراف دیسک های حاوی محلول نانوذرات نقره برای تمامی میکروارگانیسم های آزمایش شده به اثبات رسید. همان طور که در تصویر شماره ۲ مشاهده می شود، محلول حاوی نانوذرات نقره دارای فعالیت ضد میکروبی بر علیه باکتری های آزمایش شده می باشد و هاله قابل تشخیص



تصویر شماره ۲. بررسی فعالیت ضد میکروبی محلول نانوذرات نقره بر علیه میکروارگانیسم های آزمایش شده



نمودار شماره ۳. داده های حاصل از بررسی فعالیت ضد میکروبی

عوامل عفونت های بیمارستانی عمدتاً باکتری ها، ویروس ها و قارچ ها هستند. باکتری های مانند *S. aureus* و *E.coli* از طریق کارکنان در بیمارستان انتشار یافته و به بیماران منتقل شوند. استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک ها نیز باعث مقاومت به دارو در این باکتری ها شده است. خاصیت ضد میکروبی نانوذرات در مطالعات زیادی بر علیه انواع مختلفی از این عوامل بررسی شده و به اثبات رسیده است. ساندی و همکاران در سال ۲۰۰۴(۱۶)، فعالیت ضد میکروبی نانوذرات را بر علیه باکتری *E.coli* نشان داده و ذکر کرده اند که این فعالیت وابسته به غلظت نانوذرات در محلول می باشد. در مطالعه دیگری کیم و همکاران در سال ۲۰۰۷(۱۷)، نیز با بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اعلام داشتند که فعالیت نانوذرات نقره بر علیه باکتری های *E.coli* نسبت به باکتری های *S. aureus* بیشتر بوده است. مطالعات دیگری توسط شریوستاوا و همکاران در سال ۲۰۰۷(۱۸)، و گوزمان و همکاران در سال ۲۰۱۲(۱۹)، بر روی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره علیه باکتری هایی *P. aeruginosa*, *E.coli* و *S. aureus* انجام شده و اعلام داشته اند که فعالیت نانوذرات نقره وابسته به غلظت بوده و برای باکتری های گرم منفی نسبت به باکتری های گرم مثبت چشمگیرتر بوده است. این مطالعات ابراز داشته اند که تفاوت بین باکتری های گرم منفی و گرم مثبت در مقابل نانوذرات نقره به ساختار دیواره سلولی آن ها مربوط می باشد. باکتری های گرم منفی دارای دیواره سلولی نازک تری هستند که استحکام کمی دارد و از طرف دیگر سطح بیرونی باکتری های گرم منفی لایه ای از لیپوپلی ساکارید وجود دارد که دارای بار منفی است. وجود بار منفی در سطح سلول باکتری بر هم کنش بین نانوذرات نقره که دارای بار مثبت ضعیف هستند را با سلول باکتری آسان تر می کند. این بر هم کنش در ابتداء باعث ایجاد سوراخ در دیواره سلولی می شود و سپس با ورود نانوذرات به درون سلول باکتری، در مسیر رشد سلولی باکتری تداخل ایجاد شده و در نهایت باعث مرگ باکتری می شود.

در این پژوهش فعالیت ضد میکروبی بر علیه چهار ایزوله بیمارستانی انجام شد. مشخص شد که نانوذرات بر علیه تمام میکرووارگانیسم ها موثر بوده و این فعالیت وابسته به میزان غلظت محلول نانوذرات به کار برده شده می باشد.

بحث و نتیجه گیری

در فناوری نانو ذراتی با اندازه های بسیار کوچک و در مقیاس انتی ساخته می شوند که به این دلیل خواص جدیدی را به نمایش می گذارند. روش های فیزیکی تولید نانوذرات نیازمند صرف انرژی بالایی بوده و روش های شیمیایی نیز معمولاً منجر به باقی ماندن مقداری از واکنشگرهای سمی و عدم استفاده از نانوذرات حاصل در کاربردهای زیستی می شود. به همین دلیل در سال های اخیر بیوسنتر نانوذرات به وسیله گیاهان و میکرووارگانیسم ها، به عنوان روش زیست سازگار و سبز مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. استفاده از عصاره برگ و میوه گیاهان می تواند جایگزینی برای روش های فیزیکی و شیمیایی تولید نانوذرات باشد و امکان تولید در مقیاس وسیع و با هزینه کمتر را فراهم کند. بلوط از گونه های غالب در غرب کشور و در استان ایلام است که هر ساله به میزان زیادی از میوه آن تولید شده و معمولاً بدون استفاده از بین می رود. بنا بر این بررسی پتانسیل عصاره میوه بلوط می تواند راهکاری برای استفاده موثر از آن و روشی ارزان و زیست سازگار برای تولید نانوذرات باشد. بررسی انجام شده در این تحقیق نشان داد که عصاره میوه بلوط پتانسیل بالایی برای تولید نانوذرات نقره دارد. تولید نانوذرات به این روش به صورت یک مرحله ای و در دمای محیط انجام گرفت و در زمان بسیار کمی فرایند تکمیل شد. تغییر شدید رنگ محلول از شفاف به قهوه ای تیره و هم چنین افزایش میزان جذب محلول به دلیل کاهش یون نفره و تجمع آن ها به صورت نانوذرات نقره است.

اندازه و مورفولوژی خاص نانوذرات نقره باعث شده که بتوانند با آسیب رساندن و تخریب غشا باکتری فعالیت ضد میکروبی بالایی از خود نشان دهند(۱۳). به واسطه همین خاصیت، نانوذرات در پزشکی و بهداشت کاربرد پیدا کرده اند. از نانوذرات می توان در ضد عفونی آب آشامیدنی برای جلوگیری از آلودگی و شیوع پاتوژن های آبزی، در فیلترهای کربنی برای از بین بردن میکروب های موجود در هوا استفاده نمود. هم چنین می توان از نانوذرات به عنوان پوشش های ضد میکروب در تجهیزات پزشکی و ارتپدیو تولید ژل های ضد میکروب در درمان سوختگی ها استفاده نمود. استفاده از نانوذرات نقره در تولید لباس های درمانگاهی برای جلوگیری از انتشار و انتقال آلودگی به بیماران می تواند موثر باشد.(۱۴,۱۵)

کمتر بود. نتایج این پژوهش با سایر مطالعات ذکر شده نیز هم خوانی دارد.

به طور کلی نتایج این آزمایش تولید موفق نانوذرات نقره را با استفاده از عصاره میوه بلوط به صورت یک روش زیستی سریع و کم هزینه نشان داده و با توجه به اثبات فعالیت ضد میکروبی این نانوذرات کاربرد آن در زمینه های مختلف برای پیشگیری از آلودگی و انتشار عوامل عفونت پیشنهاد می شود.

References

- Eriksen HM, Iversen BG, Aavitsland P. Prevalence of nosocomial infections in hospital in Norway, 2002 and 2003. *J Hosp infec* 2005; 60: 40-5.
- Zolldann D, Haefner H, Poetter C, Buzello S. Assessment of a selective surveillance method for detecting nosocomial infections in patients in the intensive care department. *AJIC* 2003; 3: 261-5.
- Unal S, Rodriguez JAG. Activity of meropeneme and comparators against *pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter*spp isolated in the MYSTIC program, 2002-2004. *Diag Microbiol Infect Dis* 2005; 53: 265-71.
- Delissalde F, Carlos F. Comparison of antibiotic susceptibility and plasmid content, between biofilm producing and non producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicr Agent* 2004, 24: 405-8.
- Wallace R J. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proc Nutr Soc* 2004; 63: 621-9.
- Kim AB. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 238-50.
- Albrecht MA, Evans CW, Raston CL. Green chemistry and the health implications of nanoparticles. *Green Chem* 2007; 8:417-32.
- Panacek A, Kvitek L, Prucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizurova N, et al. Silver colloid nano-particles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J Phys Chem B* 2006; 110:16248-53.
- Parikh RY, Singh S, Prasad BLV, Patole MS, Sastry M, Shouche YS. Extracellular synthesis of crystalline silver nanoparticles and molecular evidence of silver resistance from *Morganella* sp. towards understanding biochemical synthesis mechanism. *Chem Biochem* 2008; 9:1415-22.
- Shahverdi AR, Minaeian S, Shahverdi HR, Jamalifar H, Nohi AA. Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of Enterobacteria: a novel biological approach. *Proc Biochem* 2007; 42:919-23.
- Gajbhiye M, Kesharwani J, Ingle A, Gade A, Rai M. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. *Nanomed NBM* 2009; 5:382-6.
- Shankar SS, Rai A, Ahmad A, Sastry M. Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. *J Colloid Interface Sci* 2002; 275:496–502.
- Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2005; 16:23-46.
- Kenneth K, Wong Y, Liu X. Silver nanoparticles the real “silver bullet” in clinical medicine? *Med Chem Commun* 2010;1: 125-31.
- Tran QH, Nguyen VQ, Le AT. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Adv Nat Sci* 2013; 4: 3871-8.
- Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci* 2004;275 : 177-82.
- Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park JP, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed Nanotechnol* 2007; 3:95-101.
- Shrivastava S, Bera T, Roy A, Singh G, Ramachandrarao P, Dash D. Characterization of enhanced antibacterial effects of

محلول نانوذرات بر علیه باکتری *E.coli* بیشترین فعالیت ضد میکروبی را نشان داد و تیمار ۸۰ دقیقه از کنترل مثبت رشد باکتری را بیشتر محدود کرد. برای باکتری *P.aeruginosa* تیمار ۸۰ دقیقه توانست در حد کنترل *S. subtilis* و *B. aureus* نیز توسط محلول نانوذرات نقره محدود شده ولی فعالیت ضد میکروبی آن از کنترل مثبت

novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2007; 18 :103-18.
 19.Guzman M, Dille J, Godet S. Synthesis and antibacterial activity of silver nano-

particles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine* 2012; 8:37-45.



The Biosynthesis of Silver Nanoparticles using Oak Fruit Extract and Investigating Their Anti-microbial Activities against Nosocomial Infection Agents

Chahardooli M¹, Khodadadi E¹*

(Accepted: December 25, 2013 Received: September 8, 2013)

Abstract

Introduction: Bacteria are one of the factors causing nosocomial infection that have created many problems for human health by resisting to conventional antibiotics. Silver nanoparticles have high antimicrobial properties which can be used in various fields of medicine and public health control. The purpose of this study was to produce silver nanoparticles with single-stage biological method through applications of oak fruit extract and investigating its anti-bacterial activity.

Materials & Methods: The extract of oak fruit was prepared and was added to the silver nitrate solution. The biosynthesis of silver nanoparticles in solution was investigated through checking color change and the degree of absorption in different wavelengths by spectrophotometer. The anti-microbial activities of the silver nanoparticles in solution against *Escherichia coli* PTCC

1330, *Staphylococcus aureus* PTCC 1112, *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1074, *Bacillus subtilis* PTCC 1715 bacteria was investigated through inhibition zone method.

Findings: The colour was changed from transparent to dark brown in the solutions. The degree of absorption was also increased and the maximum absorption was observed in 420 nm. The antibacterial activity of the nanoparticles solution against all bacteria was investigated and approved.

Discussion & Conclusions: The silver nanoparticles were synthesized in a single-stage process in a short time and showed suitable antibacterial activity.

Keywords: Nosocomial infections, silver nanoparticles, antimicrobial properties, biological method, oak fruit extract

1. Dept of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran
 * (corresponding author)