

مقایسه ی آثار آنتی اکسیدانی، آنتی باکتریالی و سمیت سلولی عطرمايه و نانوامولسیون عطرمايه ی میخک

آتنا وفائی ملک‌آبادی^۱، احسان کریمی^۱، احسان اسکوئیان^۲

(۱) گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

(۲) پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۵/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۲۹

چکیده

مقدمه: گیاهان دارویی یکی از تولیدات مهم در بخش کشاورزی و دارویی است. تأثیرگذاری مفید و ارزان بودن گیاهان دارویی، سازگاری با محیط‌زیست و آثار جانبی محدود گیاهان دارویی، نرخ استفاده از گیاهان دارویی را در سال‌های اخیر افزایش داده است. از دیرباز، عصاره‌های گیاهان مانند گیاه میخک در پزشکی، عطرسازی و به‌عنوان افزودنی‌ها در آشپزی استفاده می‌شدند؛ بنابراین، هدف از مطالعه حاضر، بررسی و مقایسه آثار آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و خاصیت ضدسرطانی عطرمايه و نانوامولسیون میخک است.

مواد و روش‌ها: فعالیت آنتی‌اکسیدانی عطرمايه و نانوامولسیون میخک با روش سنجش فعالیت مهاري رادیکال‌های DPPH (۲،۲-دی‌فنیل-۱-پیکریلیدرازیل) و ABTS (۲ و ۲'-آزینو-۱-بیس-۳-اتیل بنزتیازولین-۶-سولفونیک اسید) اندازه‌گیری شد. با تهیه محیط کشت و سوسپانسیون از چهار باکتری پاتوژن از نوع گرم مثبت شامل استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس و باکتری‌های گرم منفی از جمله اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا و روش اندازه‌گیری قطر هاله مهار رشد، خواص ضدباکتریایی عطرمايه و نانوامولسیون میخک ارزیابی گردید. علاوه بر این، آثار سمیت سلولی عطرمايه و نانوامولسیون میخک با تیمار غلظت‌های متفاوت ۱۵/۶، ۳۱/۲، ۶۲/۵، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، روی سلول سرطانی MCF7 با روش رنگ‌آمیزی MTT بررسی شد.

یافته‌های پژوهش: نانوامولسیون میخک در مقایسه با عطرمايه، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی مناسبی دارد و تأثیر معناداری بر مهار رادیکال‌های آزاد داشت. میزان مهار رادیکال‌های آزاد (IC₅₀) نانوامولسیون عطرمايه میخک با روش DPPH و ABTS به ترتیب ۶۷/۲۹ و ۷۸/۳۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. عطرمايه و نانوامولسیون میخک بر روی هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و منفی آزمایش شده در این پژوهش، اثر مهاري داشت؛ همچنین تست سمیت بیانگر تأثیر بیشتر نانوامولسیون میخک در از بین بردن سلول‌های سرطانی پستان در مقایسه با عطرمايه میخک است.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه در محیط invitro نشان داد که نانوامولسیون میخک آثار آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌باکتریالی و ضدسرطانی نیرومندتری در مقایسه با عطرمايه میخک دارد که می‌تواند برای پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌های مرتبط با ایجاد گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن به‌کار رود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، آنتی‌باکتریال، آنتی‌کنسر، نانوامولسیون، عطرمايه میخک

^۱ نویسنده مسئول: گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران

Email: ehsankarimi@mshdiau.ac.ir; ehskarimi59@gmail.com

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

امروزه، داروهای گیاهی برگرفته از سیستم درمانی سنتی، نقش مهمی در نظام بهداشتی و سلامتی پیدا کرده است. در دهه‌های اخیر، گیاهان دارویی به علت عوارض جانبی محدودتر در درمان بیماری‌ها و سلامت بیشتر نسبت به داروهای سنتزی و مصنوعی، پذیرش گسترده‌تری پیدا کرده‌اند. از نظر دارویی، گیاهان گوناگون فعالیت ضدباکتری، ضدویروس و قارچ‌کش دارند. آن‌ها در ترمیم‌کننده‌ها و برای حفظ مواد غذایی استفاده می‌شوند و به‌عنوان ضد بی‌حسی، ضد میکروبی، ضد اسپاسم، آرام‌بخش و ضد درد موضعی به کار می‌روند (1). گیاهان دارویی به سبب کاربردهای بالقوه به‌عنوان ترکیبات دارویی و تغذیه، از اهمیت بسیاری برخوردار هستند. عملکردهای مختلف فیزیولوژیکی گیاهان دارویی ممکن است به وجود داروهای زیستی و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی نسبت داده شود (2). *Syzygium aromaticum* که تحت عنوان میخک نیز شناخته می‌شود، گیاهی متعلق به خانواده *Myrtaceae* و بومی جزایر مالوکو در اندونزی است؛ اما در سال‌های اخیر، در مزارع مناطق و اقلیم‌های متفاوت جهان کشت شده است (1). میخک گیاهی معطر با فواید متعدد است. رایحه میخک دلپذیر و درعین حال تند است و می‌توان از آن برای خوشبو کردن وسایل و کمد استفاده کرد؛ همچنین میخک استفاده دارویی نیز دارد و در غذاهای خاصی مانند کیک‌های معطر، طعم خوبی ایجاد می‌کند (3). این گیاه در صنایع عطرسازی از نظر تجاری استفاده می‌شود و همین‌طور یکی از چاشنی‌هایی است که ظرفیت بالایی به‌عنوان نگه‌دارنده در بسیاری از غذاها به‌ویژه در فرآوری گوشت به‌عنوان آنتی‌اکسیدان و با خاصیت ضد میکروبی جایگزین نگه‌دارنده‌های شیمیایی دارد. *Syzygium aromaticum* همچنین از دیرباز، در صنایع دخانیات، مواد غذایی و آشامیدنی استفاده می‌شد (1,4). به‌طور کلی، رایج‌ترین قسمت‌های *Syzygium aromaticum* برگ، گل و ساقه است و به‌صورت تجاری گیاهانی خشک هستند که در صنایع غذایی به‌عنوان چاشنی و در صنایع دارویی برای درمان بیماری بری‌بری، درد شکم، ناتوانی جنسی،

سرماخوردگی، سرفه، بیماری‌های چشمی، درد دندان و اختلالات گوارشی مانند نفخ استفاده می‌شوند (4,5). ترکیبات فعال بیولوژیکی موجود در گیاهان دارویی توسط علوم فیتوشیمیایی و فیتوفاژماکولوژیکی شناخته می‌گردد (6). ترکیبات فیتوشیمیایی، ترکیبات آلی استخراج‌شده از گیاهانی است که با کاهش خطرات بیماری‌های مزمن و سرطان‌ها مرتبط است. عملکردهای مختلفی برای ترکیبات فیتوشیمیایی توضیح داده شده است؛ از جمله تنظیم انکوژن و بیان‌کننده سرکوبگر تومور در سلول‌های سرطانی؛ همچنین ترکیبات فیتوشیمیایی نقش مهمی در القای بازدارندگی چرخه سلولی و آپوپتوز دارند (7). از نظر دارویی، میخک به‌عنوان منبع اصلی مولکول‌های فنولی مانند اسیدهای هیدروکسی بنزوئیک، فلاونوئیدها، هیدروکسی فنیل پروپن‌ها، اسیدهای هیدروکسی سینامیک و یوژنول ($C_{10}H_{12}O_2$) به‌شمار می‌رود که مهم‌ترین ترکیب بیولوژیک فعال در گیاه میخک - شناخته شده است و همین‌طور مشتقات گالیک‌اسید مانند تانن‌های هیدرولیزشونده که در گیاه تازه یافت می‌شود. علاوه بر این، میخک در بردارنده فلاونوئیدهایی به نام کوئرستین و کائومپرفرول و فنولیک‌اسیدهایی مانند اسیدهای فرولیک، کافئیک، الاژیک و سالیسیلیک است. گیاه میخک در بردارنده ۱۸ درصد از روغن ضروری است که شامل یوژنول، یوژنول استات و بتا- کاربوفیلینو است. روغن میخک ماده‌ای بی‌رنگ یا زرد کم‌رنگ است و از نظر بو و طعم با میخک متمایز است (1,8). تقریباً ۷۲-۹۰ درصد از عطرمایه استخراج‌شده از میخک یوژنول دارد و سایر ترکیبات اساسی روغن میخک عبارت‌اند از: وانیلین، اسید کراتوگولیک، اسید گالوتانیک و همچنین فلاونوئیدهایی مانند رامنتین و یوژنیتین و تری‌ترپنوئیدهایی مانند اولانولیک از ترکیبات میخک به‌شمار می‌آیند (3). روغن باکیفیت میخک از گیاهانی به‌دست می‌آید که در بردارنده یوژنول، بتا- کاربوفیلین و یوژنول استات به‌عنوان ترکیبات اصلی هستند. ترکیب عطرمایه ممکن است بسته به عوامل ژنتیکی، شرایط آب و هوایی و تکنیک‌های کشت متفاوت باشد (9). این ترکیبات زیستی فعال شامل

تان‌ها، فلاونوئیدها و ترپنوئیدها که از گیاهان استخراج می‌شوند، بسیار محلول در آب هستند؛ اما جذب اندک این مواد به علت سختی برای عبور از غشای لیپیدی و اندازه بزرگ مولکولی، به کاهش دسترسی زیستی و کارایی آن‌ها منجر می‌شود (6). در سال‌های اخیر، استراتژی‌های نوین درمانی بر پایه فناوری‌های نانو به‌عنوان جایگزینی برای شیمی‌درمانی ظهور پیدا کرده‌اند. از میان انواع مختلف محصولات نانو، نانومولسیون‌ها مزایای مختلفی برای داروهای ضدسرطانی دارند و به‌واسطه آن‌ها می‌توان غلظت داخل سلولی داروها را افزایش داد و بنابراین، سمیت سلولی شیمی‌درمانی کاهش می‌یابد (10). فرمولاسیون نانومولسیون‌ها برای ترکیبات محلول ضعیف، با طیف وسیعی از آثار درمانی از جمله خواص ضد تکثیر، ضد میکروبی و ضد قارچی و همچنین آنتی‌اکسیدانی به‌کار می‌رود (11). تعدادی از سامانه‌های پیشرفته انتقال دارو به‌طور گسترده در سراسر جهان بررسی شده است. به‌طور کلی، یک نانوذره به‌عنوان هر ماده‌ای با قطر ۱-۱۰۰ نانومتر تعریف می‌شود، درحالی‌که از دید دارویی انتقال دارو، از یک نانوذره به هر ماده‌ی کرووی با قطر ۱-۱۰۰۰ نانومتر یاد می‌شود. نانوذرات از نانوکریستال‌ها، نانومولسیون و نانوذرات به‌عنوان حامل مواد دارویی تشکیل شده‌اند. درواقع، نانومولسیون‌ها، امولسیون با اندازه قطرات نانو سکویی هستند که به علت ظرفیت حل شدن آن می‌توانند دسترسی زیستی دارو را بهبود بخشند (12). بر اساس اندازه و ثبات قطرات، امولسیون‌ها به دسته‌های امولسیون درشت، میکرومولسیون و نانومولسیون طبقه‌بندی می‌شوند (13). نانومولسیون‌ها یک سیستم ذرات کلونیدی در محدوده اندازه کمتر از میکرون هستند که به‌عنوان حامل مولکول‌های دارویی عمل می‌کنند. سه نوع نانومولسیون وجود دارد که می‌تواند تشکیل شود: الف. روغن در نانومولسیون آب که در آن روغن در فاز آبی مداوم پراکنده می‌شود؛ ب. آب در نانومولسیون روغن که در آن قطرات آب در فاز روغن مداوم پراکنده می‌شوند و پ. نانومولسیون پیوسته دوسویه. تفاوت اصلی میان امولسیون و نانومولسیون در اندازه و شکل ذرات پراکنده در مرحله پیوسته است (14).

فرمولاسیون نانومولسیون‌ها به استفاده از دو مایع غیرقابل‌برگشت و یک امولسیفایر نیاز دارد. یکی از مایعات غیرقابل‌برگشت باید دارای چربی و دیگری ماده‌ای طبیعی باشد که فاز پراکنده و آبی را تشکیل می‌دهد (13). ویژگی نانومولسیون‌ها شامل وضوح نوری، سازگاری زیستی، خاصیت غیر ایمونوژن بودن، زیست‌تخریب‌پذیری، کپسوله کردن دارو، انتشار پایدار و کنترل‌شده، قابل‌اندازه‌گیری نانومتری، مساحت بزرگ، سهولت تهیه و پایداری ترمودینامیکی باعث شده تا روش مناسبی در شیمی‌درمانی برای درمان سرطان به‌شمار آیند (15). بیماران مبتلا به سرطان در معرض خطر بالای عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی مقاوم به آنتی‌بیوتیک هستند. روند میان عوامل عمده و سندرم‌های بالینی همراه با عفونت گرم منفی باکتریایی مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک در بیماران مبتلا به بدخیمی، با توجه ویژه به کاربند و گسترش طیف مقاومت بتا-لاکتام در اشرشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه، اسپیتوباکتر بومانی، سودوموناس آئروژینوزا و استنوتروفوموناس مالتوفیلیا، همه تهدیدات عمده برای بیماران مبتلا به سرطان است (16). مطالعات گذشته خواص متعددی از جمله فعالیت‌های ضدویروسی، ضد میکروبی، ضدقارچی، ضدسرطان، آنتی‌اکسیدان و ضد عفونی‌کننده را برای گیاه میخک نشان داده است (1,17). فعالیت آنتی‌اکسیدانی را می‌توان با روش‌های گوناگونی از نظر آزمایشگاهی و داخل بدن تجزیه و تحلیل کرد. در میان روش‌های آزمایشگاهی، روش مبتنی بر DPPH به علت سادگی، سرعت و هزینه اندک و خاصیتش محبوب‌ترین روش است (18). در این مقاله، خاصیت‌های زیستی عطرمایه و نانومولسیون گیاه میخک مانند آثار آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و همچنین خاصیت ضدسرطانی آن بررسی و مقایسه شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه عطرمایه و نانومولسیون عطرمایه میخک: در این مطالعه، برای آماده‌سازی نانومولسیون، از ترکیب روغن میخک در آب از سورفاکتانت غیریونی و روش امولسیفیکاسیون اولتراسونیک استفاده گردید (19). عطرمایه میخک در حلال آب با حضور

سورفاکتانت غیریونی و امولسیفایر پلی‌سوربات ۸۰، به نانوامولسیون تبدیل شد. مخلوط آماده‌شده توسط دستگاه سونیکاتور پروب‌دار (Cole-Parmer Instrument, USA) ۲۰ کیلوهرتز و با توان ۷۵۰ وات، برای مدت ۳۰ دقیقه هم‌وزن‌نیز گردید. از پلی‌اتیلن گلیکول به‌عنوان کمک حلال استفاده شد. امولسیون تولیدشده برای بررسی ارزیابی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، سمیت سلولی و آنتی‌باکتریالی ارزیابی گردید (20). برای ساخت این نانوامولسیون، از عطرمايه میخک با حضور سورفاکتانت غیریونی و امولسیفایر پلی‌سوربات ۸۰ به نانوامولسیون استفاده شد و در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آزمایش گردید.

ارزیابی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی: روش‌های اسپکتروفتومتری گوناگونی برای بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مختلف به‌کار گرفته می‌شود. از میان تست‌های رایج، روش بررسی فعالیت مهاري رادیکال ABTS (۲ و ۲-آزینو- بیس -۳- اتیل بنزیتازولین-۶- سولفونیک اسید) و DPPH (۱ و ۱- دی فنیل -۲- پیکریل هیدرازیل) در این مطالعه آزمایش شد (21).

فعالیت مهار رادیکال DPPH: برای بررسی مهار رادیکال DPPH، از فعالیت کاهشی رادیکال متانولیک DPPH در حضور ماده آنتی‌اکسیدان‌دهنده هیدروژن استفاده می‌شود (22). برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عطرمايه و نانوامولسیون گیاه میخک، در مرحله اول، محلول DPPH ۰/۱ میلی‌مولار در اتانول ۹۶ درصد حل شد. در مرحله بعد، محلول آماده‌شده با نسبت یک‌به‌یک با غلظت‌های مختلف عطرمايه و نانوامولسیون (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مخلوط گردید. در مرحله بعد، محلول یادشده ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در آخر، جذب نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر (Epoch, Biotek, Winooski, VT, United Kingdom) در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. هر آزمایش با سه بار تکرار انجام گردید و به‌منظور انجام محاسبات، از مقادیر میانگین استفاده شد.

فعالیت مهار رادیکال ABTS: رادیکال‌های ABTS از طریق واکنش دادن ABTS، آب‌اکسیژنه و پراکسیداز رخ می‌دهد (21). غلظت‌های مختلف عطرمايه و نانوامولسیون (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با ABTS، آب‌اکسیژنه و پراکسیداز در آب دیونیزه به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردیدند. پس از گذشت مدت‌زمان ۱۰ دقیقه، جذب نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر (Epoch, Biotek, Winooski, VT, United Kingdom) در ۷۳۴ nm خوانده شد (23).

کشت سلولی: رده سلولی MCF7 سرطان پستان از پژوهشکده بوعلی مشهد خریداری گردید. به‌منظور کشت سلول‌ها از محیط کشت DMEM استفاده شد. سلول‌های سرطان پستان MCF7، در فلاسک با حجم ۲۵ میلی‌لیتر در شرایط ۸۰ درصد رطوبت، ۵ درصد فشار دی‌اکسید کربن، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در محیط DMEM، دربردارنده ۱۰ درصد FBS (سرم جنین گاوی) کشت گردید (24).

تست سمیت سلولی (MTT): به‌منظور بررسی اثر سمیت سلول عطرمايه و نانوامولسیون عطرمايه میخک، تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر خانه پلیت ۹۶ خانه کشت شدند. پس از گذشت مدت‌زمان ۴۸ ساعت، غلظت‌های متفاوت عطرمايه و نانوامولسیون عطرمايه میخک ۱۵/۶، ۳۱/۲، ۶۲/۵، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آماده گردید و تیمار سلول‌ها با این غلظت‌ها انجام گرفت. پس از طی این زمان، محلول یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر از پودر MTT در محیط کشت DMEM به هر چاهک اضافه شد و مجدداً پلیت‌ها انکوبه گردید. پس از گذشت ۴ ساعت، انکوباسیون محیط با DMSO جایگزین و نهایتاً جذب خانه‌ها توسط اسپکتروفتومتر (Epoch, Biotek, Winooski, VT, United Kingdom) در ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. در انتها، میزان زنده ماندن سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد توان زیستی} = 100 \times (\text{میانگین جذب نوری خانه‌های کنترل} / \text{میانگین جذب نوری خانه‌های هر غلظت})$$

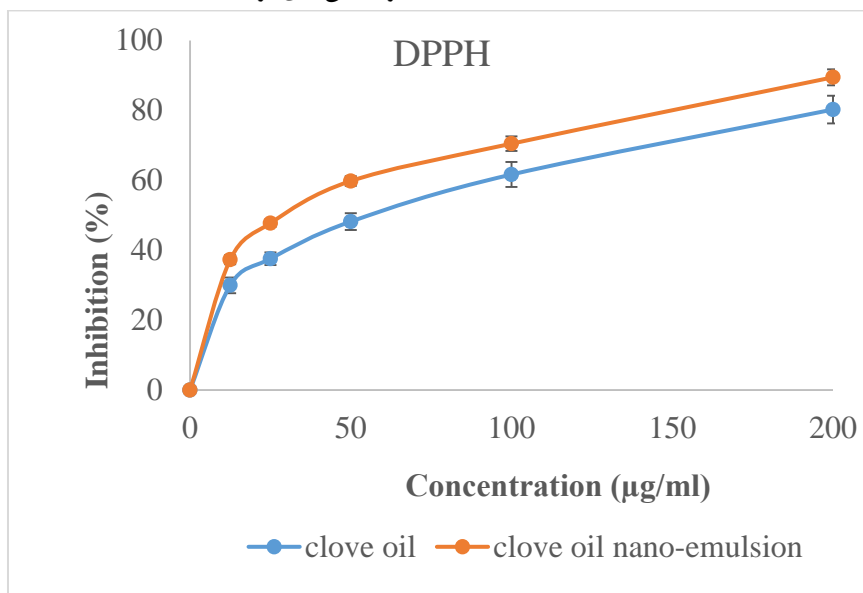
آنالیز آماری: برای ارزیابی میزان بقای سلول‌های تیمار شده و خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانومولسیون عطرمایه گیاه میخک، از نرم‌افزار SPSS vol.22 استفاده گردید. تجزیه و تحلیل واریانس و قیاس میانگین با روش LSD انجام گرفت و سطح اطمینان ۵ درصد برای محاسبات در نظر گرفته شد.

یافته‌های پژوهش

مهار رادیکال DPPH: نتایج این مطالعه نشان‌دهنده مهار رادیکال DPPH توسط عطرمایه و نانومولسیون عطرمایه میخک است. مهار رادیکال‌های DPPH توسط هر دو نمونه میخک، به صورت وابسته به غلظت است، به طوری که با افزایش غلظت، قدرت مهار عطرمایه و نانومولسیون عطرمایه میخک نیز افزایش می‌یابد که البته نتایج نشان‌دهنده قدرت بیشتر نانومولسیون عطرمایه میخک نسبت به عطرمایه آن در غلظت‌های مساوی، برای مهار رادیکال‌های DPPH است (شکل شماره ۱). میزان مهار رادیکال‌های آزاد (IC_{50}) عطرمایه و نانومولسیون عطرمایه میخک به ترتیب $56/72$ و $29/67$ میکروگرم/ میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد که نشان‌دهنده آن است که حدود ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد در این غلظت مهار گشته‌اند. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که فعالیت عطرمایه و نانومولسیون عطرمایه میخک تأثیر معناداری بر مهار رادیکال‌های آزاد DPPH داشت.

گفتنی است که آزمون MTT (۳-۴ و ۵-دی‌متیل تiazول-۲-ایل (۲-۵-دیفنیل تترازولیوم بروماید)، بر اساس تبدیل MTT به بلورهای فورمازان توسط سلول‌های زنده است که فعالیت‌های میتوکندری را تعیین می‌کند. از آنجاکه برای بیشتر جمعیت‌های سلولی، فعالیت میتوکندریایی تماماً با تعداد سلول‌های زنده مرتبط است، این آزمایش به طور گسترده‌ای برای اندازه‌گیری آثار سمیت داروها روی رده‌های سلولی یا سلول‌های اولیه بیمار استفاده می‌شود (25). هر آزمایش با سه بار تکرار انجام گردید و به منظور انجام محاسبات، از مقادیر میانگین استفاده شد.

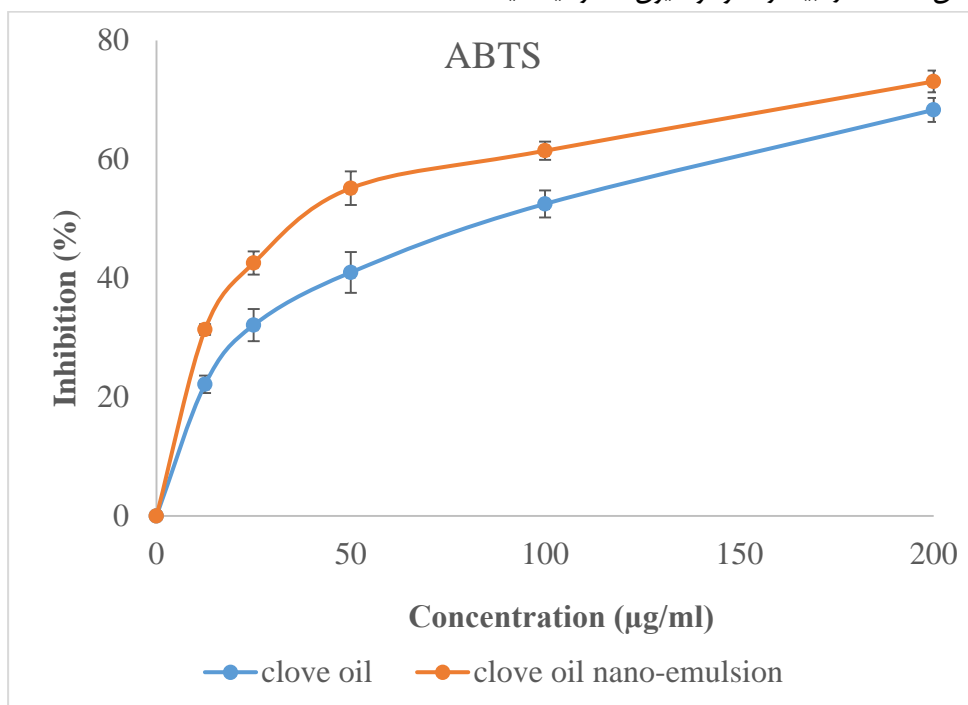
تست مهار رشد باکتری: در این مطالعه، برای بررسی اثر آنتی‌باکتریایی عطرمایه و نانومولسیون گیاه میخک، از روش تست انتشار باکتری‌ها برای بررسی اندازه‌ی هاله‌ی عدم رشد هر باکتری بهره گرفته شد. در این مطالعه، فعالیت ضد میکروبی عطرمایه و نانومولسیون عطرمایه میخک علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی بررسی گردید. با تهیه محیط کشت و سوسپانسیون از چهار باکتری پاتوژن، از نوع گرم مثبت شامل استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس و باکتری‌های گرم منفی از جمله اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا در این مطالعه بررسی شدند. هر آزمایش با سه بار تکرار انجام گردید و به منظور انجام محاسبات، از مقادیر میانگین استفاده شد.



شکل شماره ۱. مهار رادیکال DPPH توسط عطرمایه و نانومولسیون عطرمایه میخک (هر آزمایش با سه بار تکرار انجام شد و برای انجام محاسبات، از مقادیر میانگین استفاده گردید).

نسبت به عطرمایه میخک است (شکل شماره ۲). در جدول شماره ۱ نیز، مقادیر IC_{50} برای هر دو نمونه عطرمایه و نانوامولسیون عطرمایه میخک گزارش شده است که نشان‌دهنده تأثیر معناداری بر مهار رادیکال‌های آزاد ABTS داشت.

مهار رادیکال ABTS: نتایج به‌دست‌آمده از این تست نشان می‌دهد که مهار رادیکال‌های ABTS توسط عطرمایه و نانوامولسیون عطرمایه میخک وابسته به غلظت است و با افزایش غلظت، میزان مهار نیز بیشتر می‌گردد. این نمودار نیز همانند روش DPPH، نشان‌دهنده آثار بیشتر نانوامولسیون عطرمایه میخک



شکل شماره ۲. مهار رادیکال ABTS توسط عطرمایه و نانوامولسیون عطرمایه میخک (هر آزمایش با سه بار تکرار انجام شد و برای انجام محاسبات، از مقادیر میانگین استفاده گردید).

جدول شماره ۱. مقادیر مهار رادیکال‌های آزاد (IC_{50}) میخک و نانوامولسیون میخک

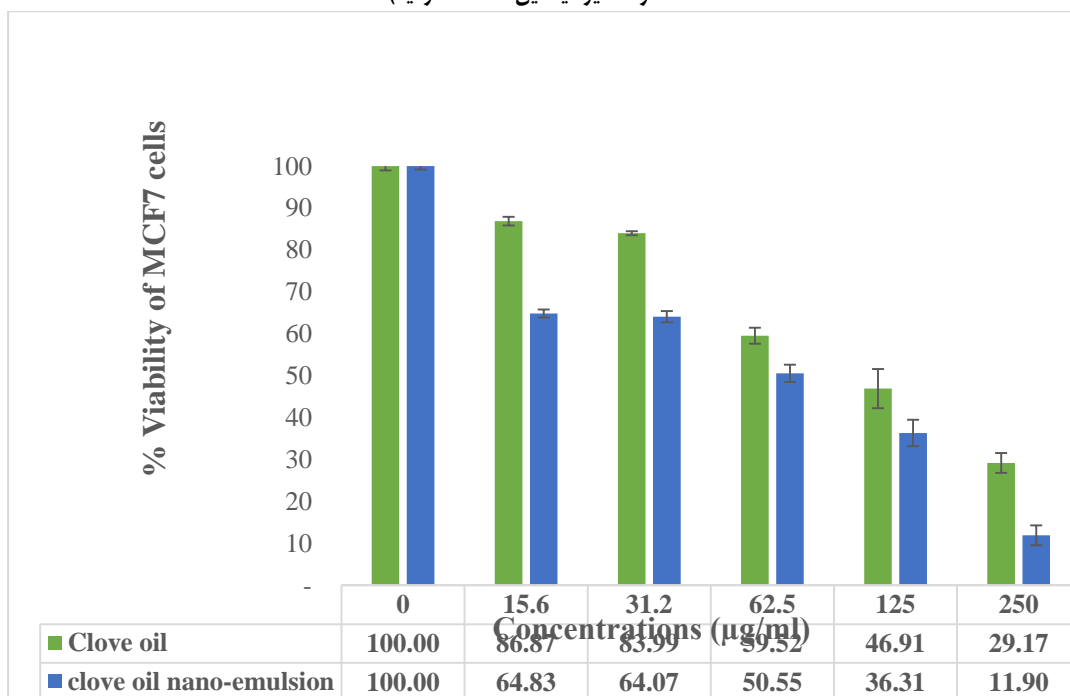
ABTS	IC_{50} (µg/mL)	DPPH	نمونه
۸۹/۱۳		۵۶/۷۲	میخک
۳۹/۷۸		۲۹/۶۷	نانوامولسیون میخک

حروف a و b در یک ستون یا یکدیگر، نشان‌دهنده اختلاف معناداری در سطح $P < 0/05$ است.

سلول‌ها ۴۸ ساعت پس از تیمار با عطرمایه و نانوامولسیون عطرمایه میخک به ترتیب از ۸۶/۸۷ درصد و ۶۴/۸۳ درصد در غلظت ۱۵/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر تا ۲۹/۱۷ درصد و ۱۱/۹ درصد در غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش پیدا کرد که نشان‌دهنده نیرومندتر بودن خاصیت ضدسرطانی نانوامولسیون عطرمایه نسبت به عطرمایه میخک بود (شکل شماره ۳).

تست سمیت سلولی: یافته‌های به‌دست‌آمده از آزمون MTT نشان داد که زیستایی سلول‌ها بسته به غلظت تغییر می‌کند. در غلظت‌های ابتدایی، سلول‌ها توان حیاتی بیشتری دارند و در غلظت‌های بالاتر، این سلول‌ها غالباً به میزان بیشتری دچار مرگ می‌شوند. بررسی میزان سمیت عطرمایه و نانوامولسیون عطرمایه میخک بر سلول‌های سرطانی نشان داد که درصد بقای

شکل شماره ۳. تست سمیت سلولی عطرمايه و نانوامولسیون عطرمايه ميخک (هر آزمایش با سه بار تکرار انجام شد و برای انجام محاسبات، از مقادير میانگين استفاده گردید).



سانتی‌متر و ۱/۲۲ تا ۱/۴۱ سانتی‌متر گزارش شد؛ همچنین نتایج آزمایش آشکار کرد که نانوامولسیون عطرمايه ميخک نسبت به عطرمايه، خاصیت ضد میکروبی بیشتری علیه باکتری‌های آزمایش شده دارد (جدول شماره ۲).

تست مهار رشد باکتری: بر اساس نتایج تست مهار باکتری، آزمایش هردو تست عطرمايه و نانوامولسیون گیاه ميخک در برابر این باکتری‌ها، فعالیت ضد میکروبی را نشان دادند، به طوری که هاله عدم رشد ایجاد شده با عطرمايه و نانوامولسیون عطرمايه ميخک به ترتیب بین محدوده ۱/۰۹ تا ۱/۳۷

جدول شماره ۲. نتایج تست‌های ضدباکتریایی بر اساس روش انتشار

هاله عدم رشد (سانتی‌متر)				نمونه
باکتری‌های گرم منفی		باکتری‌های گرم مثبت		
<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	
۱/۲۱	۲/۱۵	۱/۰۹	۱/۳۷	عطرمايه ميخک
۱/۳۶	۱/۲۸	۱/۲۲	۱/۴۱	نانوامولسیون عطرمايه ميخک

فنولی و کومارین‌ها که متابولیت‌های ثانویه گیاهان نیز به‌شمار می‌روند، به‌خوبی آثار زیستی متفاوت مانند خاصیت ضدسرطانی، آنتی‌اکسیدانی، آثار ضد میکروبی را نشان داده است (26,27).

نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق نشان داد که نانوامولسیون سنتز شده از عصاره گیاه ميخک خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیرومندتری در مقایسه با عطرمايه ميخک دارد و درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS به‌طور معناداری افزایش داشت؛ همچنین مشخص گردید که عطرمايه و نانوامولسیون عطرمايه

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، آثار آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و همچنین خاصیت ضدسرطانی عطرمايه و نانوامولسیون گیاه ميخک بررسی و مقایسه شد. برای ساخت این نانوامولسیون از عطرمايه ميخک، از سورفاکتانت غیر یونی و امولسیفایر پلی‌سوربات ۸۰ استفاده گردید و در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آزمایش شد. مطالعات گوناگون بر روی گیاهان دارویی و ترکیبات متنوع عصاره‌های گیاهی، از جمله آلکالوئیدها، تریپنئوئیدها، گلیکوزیدها، ترکیبات

میخک فعالیت ضدباکتریایی نیرومندی علیه استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیوتوجنز، سالمونلا انتریدایتیس، سراشیا مارسسنس و اشرشیاکلی نشان داد (5).

برای بررسی آثار ضدسرطانی گیاه میخک به روش مطالعه In-vivo و الگوی آزمایشگاهی سرطان در پستان، تحقیقی صورت گرفت که نتایج مطالعات آزمایشگاهی آثار ضدآپوپتوز عصاره میخک بر سلول‌های MCF-7 را نشان داد. بر پایه این تحقیق، گیاه میخک به‌طور چشمگیری، خطر ابتلا به سرطان غده پستان در موش‌ها را به‌صورت وابسته به دوز مهار می‌کند (30).

در مطالعه دیگری که هدف آن ارزیابی فعالیت سمیت سلولی عصاره میخک بر سلول‌های سرطان پستان انسان MCF-7 است، نتایج نشان داد که روغن عطرمایه بیشترین اثر سمیت سلولی و به دنبال آن، اتانول و عصاره آبی نیز اثر سیتوتوکسیک دارند. بر اساس نتایج تست MTT در این مطالعه، عطرمایه میخک بالاترین پتانسیل را به‌عنوان منبع ضدسرطان با غلظت IC_{50} پایین‌تر در هر دو روش زمان ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته، با مقادیر به ترتیب ۳۶/۴۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۷/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر را دارد (31).

در مطالعه‌ای که هدف از آن بررسی خواص آنتی‌اکسیدان و ضدباکتریایی نانوامولسیون استخراج‌شده از گیاه میخک در شرایط آزمایشگاهی بود، فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون میخک در غلظت‌های مختلف ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، از نظر فعالیت مهار رادیکال DPPH، در محدوده ۹۴/۵ تا ۹۴/۹ درصد گزارش شد. علاوه بر این، نتایج بررسی خاصیت آنتی‌باکتریایی نانوامولسیون میخک نشان داد که پاتوژن‌های مربوط به مواد غذایی نظیر استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و باسیلوس سوبتیلیس، بالاترین حساسیت را به نانوامولسیون میخک (ناحیه مهار رشد ۵/۱۲ تا ۱۴/۳۴ میلی‌متر) نشان داده‌اند که مؤید این است که نانوامولسیون عصاره میخک خاصیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی مناسبی در شرایط آزمایشگاهی دارد (32).

میخک بر روی همه باکتری‌های آزمایش‌شده در این پژوهش، اثر ممانعت‌کنندگی بر سلول‌های سرطانی دارد. از سویی، نتایج به‌دست‌آمده از تست MTT بیانگر تأثیر بیشتر نانوامولسیون عطرمایه میخک در از بین بردن سلول‌های سرطانی پستان رده MCF7 در مقایسه با عطرمایه میخک است.

در پژوهش‌های به‌بهانی و همکاران، فعالیت ضد میکروبی و ضد سمیت سلولی و آنتی‌اکسیدانی گیاه میخک و بر روی سوبه‌های باکتری اشرشیاکلی و لیستریا اینوکوا و استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس اثر جینوزا بررسی شده است. در این مطالعه، بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی از طریق DPPH و ABTS صورت گرفته است. بر اساس نتایج، رادیکال DPPH آلی نسبتاً پایدار قابلیت مناسبی برای تعیین پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه میخک دارد و همچنین نتایج آزمایش‌ها مهار بیشتر باکتری‌های گرم مثبت (لیستریا اینوکوا و سودوموناس اثر جینوزا) را در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی توسط روغن استخراج‌شده از گیاه میخک نشان داد (28).

در مطالعه عبدالعظیم و همکاران، ترکیبات فنولی از عصاره متانولی جوانه‌های گل میخک، به روش کروماتوگرافی شناسایی شد. کارایی عصاره متانولی ریشه گیاه میخک به‌عنوان یک عامل ضدسرطان پستان، روده بزرگ و کبد آزمایش گردید. نتایج این مطالعه آثار آنتی‌اکسیدانی نیرومندی با مقادیر مختلف IC_{50} ، ۳۱ میکروگرم در میلی‌لیتر برای سلول‌های سرطان روده بزرگ، ۲۹/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر برای سلول‌های سرطان پستان و ۱۸/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر برای سلول‌های سرطان کبد را نشان داد (29).

در یک مطالعه که با هدف بررسی عصاره‌های مختلف میخک از نظر پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و عملکرد ضدباکتریایی آن‌ها علیه باکتری‌های بیماری‌زا صورت گرفت، نشان داده شد عصاره‌های مختلف خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیرومندی دارند، به‌طوری‌که رادیکال DPPH از ۲۵/۳ تا ۹۱/۴ درصد و رادیکال‌های آزاد ABTS را از ۴۹/۴ تا ۹۹/۴ درصد به‌طور معناداری مهار کردند. علاوه بر این، عصاره استخراج‌شده از گیاه

در پژوهش صورت گرفته، نانوامولسیون سنتز شده توسط عطرمایه گیاه میخک، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و خاصیت ضد میکروبی نیرومندی داشت. بر اساس نتایج مطالعه انجام شده، این خاصیت نشانگر پتانسیل تبدیل شدن این نانوامولسیون به یک استراتژی درمانی برای بیماری‌های ناشی از استرس اکسیداتیو و همچنین سرطان در آینده است؛ همچنین پیشنهاد می‌شود به منظور بررسی سمیت مؤثر، اثر نانوامولسیون به دست آمده از گیاه میخک بر روی سایر رده‌های سلول‌های سرطانی و نیز مطالعه در محیط In-vivo مورد پژوهش قرار گیرد.

سپاس‌گزاری

این مقاله منتج از پایان‌نامه دانشجویی (با کد ثبت پایان‌نامه: ۱۱۱۳۰۵۵۴۹۷۲۰۰۴)، جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی گرایش سلولی و ملکولی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد است و این پایان‌نامه در جلسه کمیته اخلاق مورخه ۱۳۹۸/۰۷/۲۴ بررسی و تأیید گردیده است. بدین وسیله از زحمات بی‌دریغ اساتید ارجمند گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد صمیمانه سپاس‌گزاری می‌گردد.

کد اخلاق: این کار تحقیقاتی در جلسه کمیته اخلاق مورخه ۱۳۹۸/۰۷/۲۴ بررسی و تأیید گردیده است.

References

1. Elsaber Batiha G, Magdybeshbishy A, Elmmleeh AM, Abdeldaim M, Prasaddevkota H. Traditional uses bioactive chemical constituents and pharmacological and toxicological activities of glycyrrhiza glabra L. *Biomolecules* 2020;10:352. doi.10.3390/biom10030352
2. Sultana B, Anwar F, Mushtaq M, Aslam M, Ijaz S. Invitro antimutagenic antioxidant activities and total phenolics of clove *Syzygium aromaticum* L. seed extracts. *Pak J Pharm Sci* 2014;27:53-7.
3. Bhowmik D, Kumar KPS, Yadav A, Srivastava S, Paswan S, Dutta AS. Recent trends in Indian traditional herbs *Syzygium aromaticum* and its health benefits. *J Pharmacogn Phytochem* 2012;1:13-22.
4. Alawiyah AL, Senania A, Sari H, Perdana F, Musthafa I. Antioxidant activity

به‌هرحال، با توجه به مطالب بالا و نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق می‌توان گفت نانوامولسیون میخک، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی مناسبی در مقایسه با عطرمایه میخک دارد و تأثیر معناداری بر مهار رادیکال‌های آزاد می‌گذارد. میزان مهار رادیکال‌های آزاد (IC₅₀) نانوامولسیون عطرمایه میخک با روش DPPH و ABTS به ترتیب ۶۷/۲۹ و ۷۸/۳۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد که با توجه به بررسی مطالعات مختلف روشی کارآمد برای سنجش خواص آنتی‌اکسیدانی محسوب می‌شود. عطرمایه و نانوامولسیون میخک بر روی هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و منفی مورد آزمایش در این پژوهش، اثر مهاری داشت و از آنجاکه از دیرباز برای گیاه میخک آثار ضد میکروبی نام‌برده شده است، نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق مؤید آثار مناسب ضدباکتریایی عصاره این گیاه است. علاوه بر این، بر طبق نتایج این مطالعه، تست سمیت بیانگر تأثیر بیشتر نانوامولسیون میخک در از بین بردن سلول‌های سرطانی پستان در مقایسه با عطرمایه میخک است که این موضوع می‌تواند نقطه شروعی برای تحقیقات بیشتر درباره مطالعه اثر نانوامولسیون گیاه میخک و سایر گیاهان دارای ترکیبات زیستی سودمند، برای درمان سلول‌های سرطانی باشد.

of volatile compounds from *Syzygium aromaticum* L. leaves. *J Phys Con Ser* 2019;2:55038. doi.10.1002/ffj.3299

5. Elmaati MFA, Mahgoub SA, Labib SM, Algaby AMA, Ramadan MF. Phenolic extracts of clove *Syzygium aromaticum* with novel antioxidant and antibacterial activities. *Eur J Integr Med* 2016; 4:494-504. doi.10.1016/j.eujim.2016.02.006

6. Aziz ZAA, Ali SAM, Ahmad A, Mohd-Setapar SH. Application of herbal extract and its medicinal value. *Der Pharm Lett* 2016;8:161-7.

7. Chua LK, Lim CL, Ling APK, Chye SM, Koh RY. Anticancer potential of *syzygium species* a review. *Plant Foods Hum Nutr* 2019;74:18-27. doi.10.1007/s11130-018-0704-z

8. Wael S, Nuringtyas TR, Wijayanti N, Astuti P. Secondary metabolites production in clove *Syzygium aromaticum*

- chemical compounds. *J Biol Sci* 2018;18:399-406. doi. 10.1016/j.ics.2006.02.002
9. Kaur K, Kaushal S, Rani R. Chemical composition antioxidant and antifungal potential of clove *Syzygium aromaticum* essential oil its major compound and its derivatives. *J Essent Oil Bear Plants* 2019;22:1195-217.
 10. Severino P, Fangueiro JF, Ferreira S V, Basso R, Chaud M V, Santana MHA, et al. Nanoemulsions and nanoparticles for non-melanoma skin cancer effects of lipid materials. *Clin Transl Oncol* 2013;15:417-24. doi.10.1007/s12094-012-0982-0
 11. Tayeb HH, Sainsbury F. Nanoemulsions in drug delivery formulation to medical application. *Nanomedicine*2018;19:2507-25. doi.10.2217/nmm-2018-0088
 12. Arifin SF, Al Shami A, Omar SSS, Jalil MAA, Khalid KA, Hadi H. Impact of modern technology on the development of natural-based products. *J Ayurvedic Herb Med* 2019;5:133-42.
 13. Aswathanarayan JB, Vittal RR. Nanoemulsions and their potential applications in food industry. *Front Sustain Food Syst*2019;3:95. doi.10.3389/fsufs.2019.00095
 14. Jaiswal M, Dudhe R, Sharma PK. Nanoemulsion an advanced mode of drug delivery system. *Biotech* 2015;5:123-7. doi.10.1007/s13205-014-0214-0
 15. Sahu P, Das D, Mishra VK, Kashaw V, Kashaw SK. Nanoemulsion a novel eon in cancer chemotherapy. *Mini Rev Med Chem* 2017;17:1778-92. doi. 10.2174/1389557516666160219122755
 16. Perez F, Adachi J, Bonomo RA. Antibiotic resistant gram negative bacterial infections in patients with cancer. *Clin Infect Dis*2014;59: 335-9. doi.10.1093/cid/ciu612
 17. Sharifirad J, Sureda A, Tenore G, Daglia M, Sharifrad M, Valussi M, et al. Biological activities of essential oils from plant chemoecology to traditional healing systems. *Molecules* 2017;22:70.
 18. Torre MP, Cavero RY, Calvo MI, Vizmanos JL. A simple and a reliable method to quantify antioxidant activity in vivo. *Antioxidants* 2019;8:142.
 19. Shahavi MH, Hosseini M, Jahanshahi M, Meyer RL, Darzi GN. Evaluation of critical parameters for preparation of stable clove oil nanoemulsion. *Arab J Chem*2019;12:3225-30.
 20. Periasamy VS, Athinarayanan J, Alshatwi AA. Anticancer activity of an ultrasonic nanoemulsion formulation of nigella sativa L. essential oil on human breast cancer cells. *Ultrason Sonochem* 2016;31:449-55.
 21. Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Koo SI, Chun OK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant rich US foods. *J Food Compos Anal* 2011;24:1043-8.
 22. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci Technol* 1995; 28:25-30.
 23. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese J Nutr Diet* 1986;44:307-15.
 24. Khan FA, Akhtar S, Almohazey D, Alomari M, Almofty SA. Extracts of clove *Syzygium aromaticum* potentiate FMSP nanoparticles induced cell death in MCF-7 cells. *Int J Biomater* 2018 23;2018:1-10.
 25. Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell sensitivity assays the MTT assay. *Cancer cell Culture* 2011;2: 237-45.
 26. Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 2000;88:308-16.
 27. Verpoorte R, Kim HK, Choi YH. Plants as source for medicines new perspectives. *Frontis* 2006;261-73.
 28. Behbahani BA, Noshad M, Falah F. Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of *Syzygium aromaticum* essential oil on foodborne pathogens. *Potravin Slovak J Food Sci* 2019;13:875-83.
 29. Azim MHM. Anti tumor, antioxidant and antimicrobial and the phenolic constituents of clove flower buds *Syzygium aromaticum*. *J Microb Biochem Technol* 2014; 1:7-8.
 30. Kubatka P, Uramova S, Kello M, Kajo K, Kruzliak P, Mojzis J, et al. Antineoplastic effects of clove buds *Syzygium aromaticum* L) in the model of

breast carcinoma. *J Cell Mol Med* 2017;21:2837-51.

31. Kumar PS, Febriyanti RM, Sofyan FF, Luftimas DE, Abdullah R. Anticancer potential of *Syzygium aromaticum* L. in MCF-7 human breast cancer cell lines.

Pharmacogn Res 2014;6:350-4. A

32. Shahbazi Y. Antioxidant, antibacterial, and antifungal properties of nanoemulsion of clove essential oil. *Nanomedicine Res J*2019;4:204-8.



Comparison of Antioxidant, Antibacterial, and Cytotoxic Effects of Essential Oil and Nanoemulsion of Clove Essential Oil

Vafaeimalekabadi A¹, Karimi E^{1*}, Oskoueian E²

(Received: August 04, 2020

Accepted: June 19, 2021)

Abstract

Introduction: Medicinal plants are among the most important products in agriculture and medicine. The usefulness and cheapness, environmental friendliness, and limited side effects of medicinal plants have increased the rate of use of these plants in recent years. Plant extracts, such as cloves, have long been used in medicine, perfumery, and as additives in cooking. This study aimed to evaluate and compare the antioxidant, antibacterial, and anti-cancer effects of clove essential oil and nanoemulsion.

Materials & Methods: Antioxidant activity of essential oil and clove nanoemulsion by measuring the inhibitory activity of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS radicals (2 and 2-azino-bis-3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid) was measured in this study. The evaluation of antibacterial and bactericidal properties of essential oil and clove nanoemulsion was conducted by culture medium and suspension of four pathogenic bacteria of gram-positive, including *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, and gram-negative bacteria, including *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, followed by the measurement of the diameter of the growth inhibition zone. In addition, the effects of cytotoxicity of clove essential oil

and nanoemulsion on different concentrations of 15.6, 31.2, 62.5, 125, and 250 µg/ml on MCF7 cancer cells were evaluated by MTT staining.

Findings: Clove nanoemulsion, compared to essential oil, had good antioxidant potential and a significant effect on free radical scavenging. The rates of free radical scavenging (IC₅₀) of clove essential oil nanoemulsion were obtained at 67.29 and 78.39 µg/ml measured by DPPH and ABTS methods, respectively. Clove essential oil and nanoemulsion had an inhibitory effect on both groups of gram-positive and gram-negative bacteria tested in this study. The toxicity test also showed a greater effect of clove nanoemulsion in killing breast cancer cells, compared to the clove essential oil.

Discussions & Conclusions: The results of this *in vitro* study indicate the antioxidant and anti-cancer effects of clove nanoemulsion, compared to essential oil, which can be used to prevent and treat many diseases associated with the development of reactive oxygen species.

Keywords: Antioxidant, Antibacterial, Anticancer, Nanoemulsion, clove essential oil

1. Dept of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

2. Mashhad Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Mashhad, Iran

*Corresponding author Email: ehsankarimi@mshdiau.ac.ir ; ehsakarimi59@gmail.com