

مقاله تحقیقاتی

بررسی میزان کلروفیل، کاروتنوئید تام و بتاکاروتن در هویج و تأثیر آب و هوا بر آنها

علیرضا عباداللهی نظنزی*، غلامرضا عرب رحمتی پور

گروه گیاهان دارویی، مرکز آموزش عالی امام خمینی (ره)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

گل‌واژگان:

بتاکاروتن

شرایط آب و هوایی

کاروتنوئید

کلروفیل

هویج

مقدمه: کاروتنوئیدها رنگدانه‌هایی با اثرات فیزیولوژیکی مهم در بدن انسان می‌باشند که در تقویت سیستم ایمنی و کاهش خطر ابتلا به بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان نقش دارند. **هدف:** با توجه به اهمیت این مواد و وجود مقادیر بالای آنها در هویج و به منظور شناسایی منطقه جغرافیایی مناسب‌تر برای دستیابی به محصولاتی با بالاترین میزان این ترکیبات، مطالعه حاضر انجام گرفت. **روش بررسی:** نمونه‌ها از شش منطقه عمده هویج‌کاری، واقع در استان‌های خوزستان و اصفهان جمع‌آوری و بررسی شدند. همچنین اثرات تغییرات شرایط آب و هوایی در میزان این مواد نیز مورد مطالعه قرار گرفت. از نمونه‌ها عصاره تهیه و آزمایش‌های تعیین مقادیر کل کلروفیل، کاروتنوئیدها و بتاکاروتن به روش اسپکتروفتومتری به ترتیب در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵، ۴۸۰ و ۴۳۶ نانومتر انجام شد. **نتایج:** بیشترین میانگین اندازه‌گیری شده میزان کلروفیل در برگ‌ها (۱/۴۲ میلی‌گرم بر گرم) و میزان کاروتنوئید تام (۵۴/۶۲ میکروگرم بر گرم) و بتا کاروتن (۲۴/۹۷ میکروگرم بر گرم) موجود در ریشه گیاه، مربوط به اندیمشک در استان خوزستان بود. همچنین کم‌ترین مقادیر کلروفیل، کاروتنوئید تام و بتاکاروتن مربوط به دستگرد در استان اصفهان بود، که میزان آنها به ترتیب ۰/۶۱ میلی‌گرم بر گرم، ۱۸/۷۲ میکروگرم بر گرم و ۱/۹۸ میکروگرم بر گرم بدست آمد. **نتیجه‌گیری:** نتایج این تحقیق نشان داد که در استان خوزستان، پارامترهایی نظیر دما (۲۵ - ۲۳/۵ درجه سانتی‌گراد)، رطوبت نسبی (۵۸ - ۴۹/۵ درصد) و میزان بارندگی (۵۷۰ - ۲۶۰ میلی‌متر در سال) شرایط مناسب‌تری برای فعالیت متابولیکی هویج داشته و در نتیجه باعث افزایش معنی‌دار میزان کاروتنوئیدها و بتا کاروتن در این محصول گیاهی شده است.

۱. مقدمه

هویج (*Daucus carota* L.) متعلق به خانواده چتریان، دارای خواص تقویت سیستم ایمنی، ضدسرطانی، ضددیابتی، هیپوگلیسمی، ضدالتهابی می‌باشد [۲، ۳] و در درمان بیماری‌هایی مانند اسهال، سرفه، مالاریا، بیماری‌های جهان محسوب می‌شود [۱]. قسمت‌های مختلف این گیاه

مخفف‌ها: rpm، دور در دقیقه؛ AOAC، انجمن رسمی متخصصین شیمی تجزیه

* نویسنده مسؤول: ebad@ihc.ir

تاریخ دریافت: ۲۷ آذر ۱۳۹۸؛ تاریخ دریافت اصلاحات: ۴ اسفند ۱۳۹۸؛ تاریخ پذیرش: ۷ اسفند ۱۳۹۸

doi: [10.29252/jmp.19.75.254](https://doi.org/10.29252/jmp.19.75.254)© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

از آنجائی که میزان محتوای متابولیت‌های ثانویه و فعالیت بیولوژیکی ریشه هویج نیز به عوامل مختلفی از جمله منطقه کشت و رشد، ویژگی‌های زراعی خاک و شرایط آب و هوایی و وارثه آن بستگی دارد [۱۳، ۱۵]؛ در نتیجه بررسی تأثیر عوامل مختلف آب و هوایی و مناطق کشت در عملکرد محصولات گیاهی از جمله هویج از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. ضمن اینکه آگاهی و توجه به پارامترهایی همچون میزان بارندگی، شدت تابش نور، میزان دما، ارتفاع از سطح دریا و اینگونه عوامل جوی، در روند افزایش و کیفیت محصولات، ساختار شیمیایی و مقدار مواد مؤثره آنها می‌تواند تأثیرگذار باشد.

با توجه به اهمیت کاروتنوئیدها و بتاکاروتن که مهم‌ترین کاروتنوئید موجود در هویج بوده و مقدار آن نیز در هویج بالا می‌باشد، شناسایی منطقه جغرافیایی مناسب‌تر به منظور دستیابی به محصولاتی که دارای بالاترین میزان این مواد باشند از لحاظ کشاورزی و ارزش غذایی و نیز تأثیر آن در سلامت بسیار حائز اهمیت است. نتایج این مطالعه می‌تواند زمینه را در جهت توسعه و بهبود محصولات کشاورزی و تأمین متابولیت‌های حاصل از این گیاه و ارتباط آن با پارامترهای آب و هوایی فراهم نماید. لذا این مطالعه به منظور تعیین مقادیر کل کاروتنوئیدها و بتاکاروتن و همچنین مقدار کلروفیل موجود در برگ هویج‌های کشت شده در برخی شرایط آب و هوایی در مناطقی از ایران انجام شد.

میزان وجود کلروفیل نیز در رشد و نمو گیاه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. افزایش غلظت کلروفیل، سبب بالا بردن توانایی استفاده مؤثرتر از نور شده و گیاه را قادر می‌سازد تا شدت‌های مختلف نور را بهتر تحمل کند [۱۵]. بر این اساس در مطالعه حاضر اندازه‌گیری میزان محتوای کلروفیل در برگ‌های هویج مورد بررسی قرار گرفت و با مقایسه آنها با سایر مواد مؤثره، ارتباط احتمالی که می‌تواند بین تغییرات شرایط آب و هوایی با میزان متابولیت‌های ثانویه وجود داشته باشد و بخصوص تأثیر فاکتورهای مهم

کلوی و تقویت قوای جنسی نیز می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد [۴]. این گیاه منبع مهمی از ویتامین‌های A، B، C، اسید فولیک، اسید پانتوتینیک و موادی همچون روغن‌های فرار، استروئیدها، تری‌ترین‌ها، گلیسریدها، کربوهیدرات‌ها، تانن و اسیدهای آمینه می‌باشد [۵، ۶]. به نظر می‌رسد هویج انتخاب مناسبی برای توسعه داروهای جدید به منظور جلوگیری از آسیب‌های ناشی از قرارگرفتن در معرض رادیکال‌های آزاد باشد [۷].

این گیاه غنی از کاروتنوئیدها می‌باشد که گروه بزرگی از رنگدانه‌های گیاهی هستند و در میوه‌ها و برگ‌های گیاهان یافت می‌شوند. کاروتنوئیدها به دلیل داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی، بدن را در برابر بیماری‌ها مصون داشته و از تشکیل رادیکال‌های آزاد در بدن جلوگیری می‌کنند [۸]. مطالعات نشان داده که فراوان‌ترین کاروتنوئیدهای خون به ترتیب بتاکارتن و لیکوپن می‌باشند و اثرات محافظتی سطوح بالای بتاکاروتن در برابر بیماری‌های قلبی نیز گزارش شده است [۹، ۱۰].

کاروتنوئیدها در گیاهان نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند، آنها می‌توانند سیستم جمع‌کننده نور دستگاه فتوسنتزی را از گزند مولکول‌های اکسیژن یکتایی حفاظت نمایند. این عمل از طریق مکانیسمی که چرخه گزانتوفیل نامیده می‌شود باعث مصرف اکسیژن و حفاظت از کلروفیل در مقابل فتواکسیداسیون می‌شود [۱۱].

مطالعات بر روی هویج‌های با منشاء آسیای شرقی نشان داده است که این نوع از هویج از نظر مواد مؤثره، غنی‌تر بوده و فعالیت رادیکال‌زدایی بالاتری نسبت به هویج‌های غرب دارند [۱۲]. در مطالعات قبلی ما نشان داده شد که هویج‌های مناطق جنوبی ایران از کاروتنوئید بیشتری برخوردار می‌باشند [۱۳] ولی در عین حال بین میزان رادیکال‌زدایی در هویج‌های این مناطق و مقادیر بالای کاروتنوئیدها رابطه معنی‌دار وجود ندارد [۱۴].

۴.۲. اندازه‌گیری میزان کلروفیل و کاروتنوئید تام
یک گرم نمونه تازه هویج (برگ و ریشه به طور جداگانه) خرد و ساییده شدند و با استفاده از ۱۰ میلی لیتر استن ۸۰ درصد مخلوط هموژن از آن تهیه شد. یک میلی لیتر از مخلوط هموژن را با نه میلی لیتر استن ۸۰ درصد مخلوط کرده و به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس فازهای رویی برای اندازه‌گیری کلروفیل و کاروتنوئید تام جدا شد.

آزمایش‌ها به روش اسپکتروفوتومتری و با دستگاه اسپکتروفومتر UV/VIS انجام شد. فاز رویی جدا شده را در کووت ریخته و مقادیر جذب کلروفیل a و b و کاروتنوئید تام، به ترتیب در طول موج ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۸۰ نانومتر قرائت شد. از استن ۸۰ درصد به‌عنوان بلانک استفاده شد. با استفاده از معادله Arnon [۱۷] مقدار کلروفیل تام به دست آمد (رابطه ۱).

رابطه ۱)

$$\text{Chl. a (mg/g FW)} = [12.7 (A663) - 2.69 (A645)] \times V/W$$

$$\text{Chl. b (mg/g FW)} = [22.9 (A645) - 4.68 (A663)] \times V/W$$

$$\text{Chl. total (mg/g FW)} = [20.2 (A645) + 8.02 (A663)] \times V/W$$

که در این فرمول‌ها A جذب نوری نمونه‌ها، Chl. a، Chl. b، کلروفیل a، کلروفیل b، V حجم نهایی استن مصرفی، W وزن بافت تر است.

مقادیر کاروتنوئید تام نیز بر اساس فرمول Gross [۱۸] محاسبه شد (رابطه ۲).

رابطه ۲)

$$\text{carotenoids (}\mu\text{g / g)} = \frac{A \times V \times 10^6}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100 \times W}$$

آب و هوا در میزان یکی از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه گیاه هویج (کاروتنوئیدها) مشخص شد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. مناطق نمونه‌برداری

نمونه‌های هویج (*Daucus carota* L.) از شهرستان‌های اندیمشک، دزفول و شوش واقع در استان خوزستان در جنوب ایران که در محدوده ۴۷ درجه و ۴۲ دقیقه تا ۵۰ درجه و ۳۹ دقیقه طول شرقی از نصف‌النهار گرینویچ و ۲۹ درجه و ۵۸ دقیقه تا ۳۲ درجه و ۵۸ دقیقه شمالی از خط استوا قرار دارد و همچنین از شهرهای زرین شهر، خمینی شهر و دستگرد که در استان اصفهان و در محدوده ۴۹ درجه و ۳۶ دقیقه تا ۵۵ درجه و ۳۱ دقیقه طول شرقی از نصف‌النهار گرینویچ و ۳۰ درجه و ۴۳ دقیقه تا ۳۴ درجه و ۲۷ دقیقه عرض شمالی از خط استوا قرار دارند [۱۶] تهیه شدند. نمونه‌ها از مزارع زیر کشت هویج در مناطق فوق برداشت شدند و پس از انتقال به مرکز آموزش عالی امام خمینی کرج، توسط کارشناس بخش گیاهان دارویی شناسایی دقیق انجام گرفت.

۲.۲. آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی

نمونه‌ها، شامل ریشه و برگ‌های هویج‌های کشت پائیزه بودند که پس از جمع‌آوری از مزرعه به آزمایشگاه منتقل و بعد از پاک‌سازی، برگ‌ها و ریشه‌ها جداگانه و با دقت داخل پاکت فویل قرار داده شدند. مشخصات محل‌های نمونه‌برداری یادداشت و در فریزر با دمای ۷۴- سانتی‌گراد، تا زمان آنالیز نگهداری شدند.

۲.۳. مواد شیمیایی

مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق شامل استن، اتانل و پترولیوم اتر محصول شرکت "Merck" آلمان بودند که همه درجه خلوص بالای ۹۹ درصد داشتند.

در این فرمول A جذب نوری نمونه‌ها در طول موج 480 نانومتر، V حجم کامل عصاره (میلی‌لیتر)، $A_{1cm}^{1\%}$ جذب محلول 1 درصد در ضریب خاموشی 2500 ، W وزن نمونه تازه (گرم) است.

در این فرمول A جذب نوری نمونه‌ها در طول موج 480 نانومتر، V حجم کامل عصاره (میلی‌لیتر)، $A_{1cm}^{1\%}$ جذب محلول 1 درصد در ضریب خاموشی 2500 ، W وزن نمونه تازه (گرم) است.

۵.۲. اندازه‌گیری بتاکاروتن

استخراج بتاکاروتن بر اساس روش AOAC [۱۹] انجام شد. بدین ترتیب که 10 گرم نمونه هویج خرد شده با 50 میلی‌لیتر اتانل 95 درصد در یک ارلن مایر مخلوط شد و به مدت 20 دقیقه در حمام آب $70-80$ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس با اضافه کردن 15 میلی‌لیتر آب مقطر غلظت اتانل به 85 درصد رسانیده شد و پنج دقیقه در ظرف آب یخ قرار گرفت، سپس به قیف جدا کننده منتقل و 25 میلی‌لیتر پترولیوم اتر به آن اضافه شد و هم‌وزن شد و دو لایه تشکیل شده را جدا نموده و لایه زیر را دوباره به قیف جدا کننده منتقل کرده و با 10 میلی‌لیتر پترولیوم اتر برای پنج بار دیگر عمل استخراج تکرار شد تا زمانی که عصاره نسبتاً زرد رنگ به دست آمد. در آخر، کل فازهای پترولیوم اتری در ارلن مایر جمع‌آوری شد و یک بار دیگر با 50 میلی‌لیتر اتانل 80 درصد عمل استخراج تکرار شد تا عصاره نهایی برای اندازه‌گیری بتاکاروتن به دست آمد.

جذب نوری فاز رویی محلول حاصل از استخراج بتاکاروتن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV/VIS در طول موج 436 نانومتر قرائت شد. از پترولیوم اتر به عنوان بلانک استفاده شد. میزان غلظت بتاکاروتن نمونه‌ها با استفاده از فرمول زیر به دست آمد [۲۰] (رابطه ۳) و مقادیر حاصل بر حسب میکروگرم بر گرم محاسبه شد.

رابطه ۳

$$C (\mu\text{g/l}) = A/EL$$

۶.۲. روش آماری

مقادیر به دست آمده در هر منطقه از این دو استان با استفاده از نرم‌افزار Excel و SPSS (نسخه ۲۳) تجزیه و تحلیل شدند. نتایج داده‌های به دست آمده به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد مشخص شد و از طریق جدول آنالیز واریانس مقایسه شدند و سطح معنی‌داری آماری به صورت $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

۳. نتایج

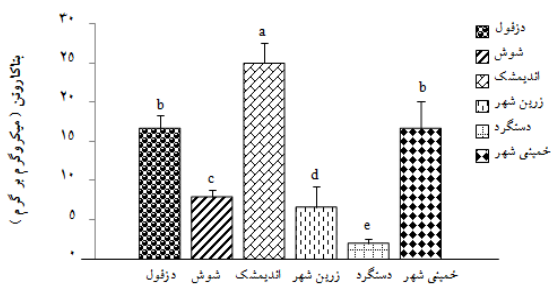
۱.۳. نتیجه به دست آمده از اندازه‌گیری کلروفیل تام در مناطق نمونه‌برداری

نتایج این مطالعه نشان داد، بیشترین میزان کلروفیل در برگ هویج‌ها، مربوط به اندیمشک با مقدار $0.11 \pm 1/42$ میلی‌گرم بر گرم و کمترین میزان آن مربوط به دستگرد با مقدار $0.07 \pm 0/61$ میلی‌گرم بر گرم بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بین کلروفیل‌های مناطق دزفول ($0.07 \pm 1/10$ میلی‌گرم بر گرم) و شوش ($0.06 \pm 1/08$ میلی‌گرم بر گرم) اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($P > 0.05$)، ولی مقادیر کلروفیل در مناطق زرین‌شهر ($0.05 \pm 0/74$ میلی‌گرم بر گرم)، خمینی‌شهر ($0.10 \pm 0/98$ میلی‌گرم بر گرم)، دستگرد و اندیمشک دارای اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$) (نمودار ۱).

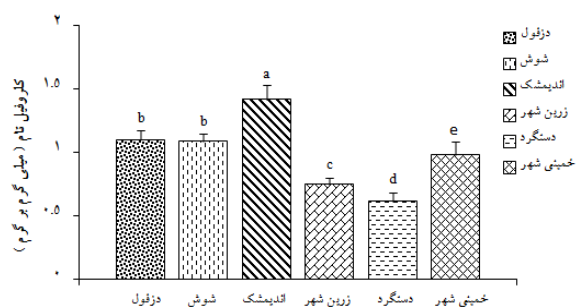
نمودار ۲. مقایسه میانگین کاروتنوئیدها در ریشه نمونه‌های به دست آمده از مناطق تحت پوشش این مطالعه (بارها نشان‌دهنده انحراف استاندارد بوده و میانگین‌های دارای حروف مشترک، در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با هم ندارند)

۳.۳. نتایج به‌دست آمده حاصل از اندازه‌گیری میزان بتاکاروتن در هویج‌های مناطق نمونه‌برداری

نتایج این تحقیق نشان داد؛ بین مناطق مختلف هویج‌کاری از لحاظ میزان بتاکاروتن اختلاف معنی‌داری وجود دارد. به‌طوری‌که بیشترین مقدار بتاکاروتن در شهرستان اندیمشک به‌دست آمد که برابر $2/55 \pm 24/97$ میکروگرم بر گرم بود و کمترین مقدار آن مربوط به شهرستان دستگرد بود که $0/59 \pm 1/98$ میکروگرم بر گرم محاسبه شد. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بین میزان بتاکاروتن به‌دست آمده از اندیمشک و مناطق شوش ($0/94 \pm 7/87$ میکروگرم بر گرم)، دزفول ($1/63 \pm 16/69$ میکروگرم بر گرم)، دستگرد و زرین شهر ($2/70 \pm 6/61$ میکروگرم بر گرم) اختلاف معنی‌داری بین وجود دارد ($P < 0/05$). همچنین؛ اختلاف معنی‌داری بین مقدار بتاکاروتن به‌دست آمده از مناطق هویج‌کاری دزفول و خمینی‌شهر ($3/45 \pm 16/66$ میکروگرم بر گرم) مشاهده نشد ($P > 0/05$) (نمودار ۳).



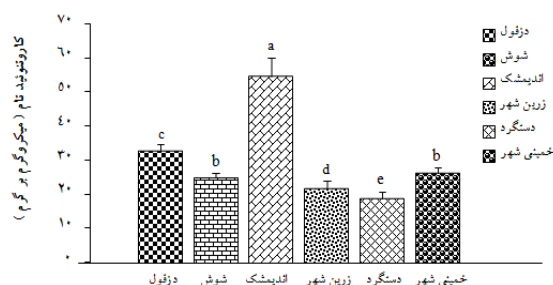
نمودار ۳. مقایسه میانگین بتاکاروتن در ریشه نمونه‌های به‌دست آمده از مناطق تحت پوشش این مطالعه (بارها نشان‌دهنده انحراف استاندارد بوده و میانگین‌های دارای حروف مشترک، در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با هم ندارند)



نمودار ۱. مقایسه میانگین کلروفیل در برگ نمونه‌های به‌دست آمده از مناطق تحت پوشش این مطالعه (بارها نشان‌دهنده انحراف استاندارد بوده و میانگین‌های دارای حروف مشترک، در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با هم ندارند)

۲.۳. نتایج به دست آمده حاصل از اندازه‌گیری میزان کاروتنوئید تام هویج‌ها در مناطق نمونه‌برداری

نتایج این اندازه‌گیری نشان داد، بیشترین میزان میانگین کاروتنوئید تام در ریشه این گیاه مربوط به اندیمشک در استان خوزستان با مقدار $5/30 \pm 54/62$ میکروگرم بر گرم و کم‌ترین میزان آن مربوط به دستگرد با مقدار $1/83 \pm 18/72$ میکروگرم بر گرم بوده است. مقایسه میانگین‌های کاروتنوئید تام این مناطق مشخص کرد که بین کاروتنوئیدهای مناطق اندیمشک، شوش ($1/25 \pm 24/93$ میکروگرم بر گرم)، دزفول ($1/70 \pm 32/86$ میکروگرم بر گرم)، دستگرد و زرین شهر ($2/25 \pm 21/72$ میکروگرم بر گرم) اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P < 0/05$). اما اختلاف بین مناطق شوش و خمینی‌شهر ($1/62 \pm 26/24$ میکروگرم بر گرم) معنی‌دار نبوده است ($P > 0/05$) (نمودار ۲).

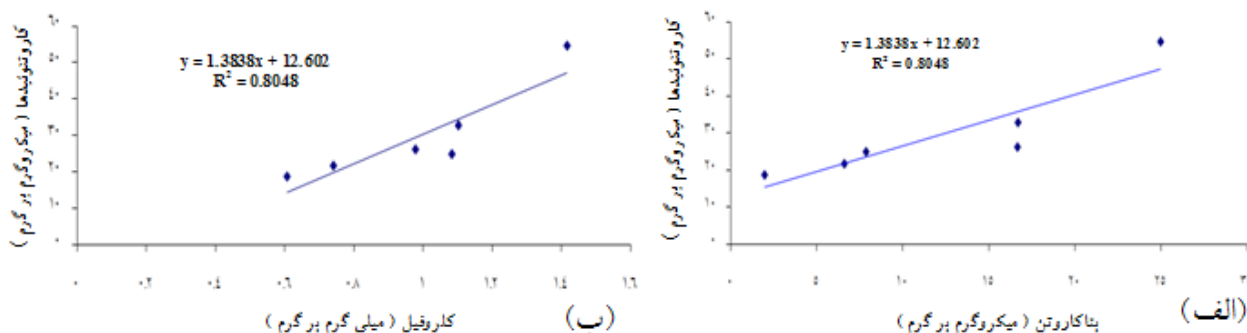


۴.۳. تعیین ارتباط بین مقادیر به دست آمده از سطوح کاروتنوئید تام و بتاکاروتن در مناطق هویج کاری نمونه برداری شده

نتایج میانگین مقادیر کاروتنوئیدها و بتاکاروتن در ۶ منطقه در دو استان همراه با افزایش متناسب این مواد، بیانگر ارتباط مثبت آنها با یکدیگر می باشد. بیشترین میزان کاروتنوئیدها و بتاکاروتن مربوط به اندیمشک در استان خوزستان، و کمترین میزان نیز مربوط به دستگرد در استان اصفهان به دست آمد (نمودار ۴ الف). میزان کاروتنوئیدها و بتاکاروتن و تناسب آنها با یکدیگر را در مناطق این مطالعه نشان می دهد.

۵.۳. ارتباط بین میزان کاروتنوئید و کلروفیل تام در نمونه های هویج تهیه شده از ۶ منطقه مورد بررسی

نتایج به دست آمده میانگین میزان کلروفیل در برگ هویج ها در ۶ منطقه دو استان در این تحقیق و افزایش متناسب کاروتنوئیدها در این مناطق، ارتباط آنها با یکدیگر را نشان می دهد. بیشترین مقدار کاروتنوئید تام مربوط به اندیمشک در استان خوزستان و همزمان بیشترین مقدار کلروفیل تام نیز در همین منطقه بوده است. کمترین میزان کاروتنوئید و کلروفیل تام نیز مربوط به دستگرد در استان اصفهان می باشد (نمودار ۴ ب).



نمودار ۴. ارتباط بین میانگین های به دست آمده حاصل از اندازه گیری سطوح کاروتنوئید تام با بتاکاروتن (الف) و کلروفیل (ب) در کل مناطق این مطالعه (هر نقطه میانگین ۳۰ نمونه است)

۶.۳. میانگین کلی پارامترهای آب و هوایی و منطقه ای در دو استان مورد مطالعه

میانگین اطلاعات پارامترهای آب و هوایی محل های نمونه گیری در دو استان جنوبی و مرکزی ایران در جدول ۱ نشان می دهد که استان خوزستان نسبت به استان اصفهان دارای ارتفاع پایین تری از سطح دریا قرار دارد و در طول سال از مجموع ساعات آفتابی کمتری نیز برخوردار است. میزان دمای محیط، رطوبت نسبی و بارندگی در این استان بیشتر از استان اصفهان است. مشخصات ده ساله پارامترهای آب و هوایی که در جدول ۲ آمده است نیز تفاوت های دما

و ... در مناطق نمونه برداری شده هویج در دو استان را به وضوح نشان می دهد.

ارتباطات میانگین پارامترهای آب و هوایی شامل دمای محیط، رطوبت نسبی و بارندگی سالیانه در مناطق نمونه برداری در دو استان جنوبی و مرکزی ایران و میزان کاروتنوئید تام و بتاکاروتن موجود در هویج های آن مناطق، و همچنین میزان کلروفیل تام موجود در برگ آنها، بیانگر ارتباط نسبی این مواد با این پارامترها بوده است (جدول ۳).

جدول ۱. میانگین کلی پارامترهای آب و هوایی و منطقه‌ای دو استان

استان	دما (درجه سانتی‌گراد)	رطوبت نسبی (درصد)	بارش (میلی‌متر در سال)	ساعات آفتابی	ارتفاع از سطح دریا (متر)
خوزستان	۲۴/۳۳	۵۲/۵	۴۳۶/۶	۲۹۷۳	۱۳۶/۶
اصفهان	۱۶/۷۶	۳۶/۳۶	۱۵۳/۳	۳۵۸۵	۱۶۴۵

جدول ۲. مشخصات آب و هوایی مناطق مورد مطالعه (استخراج از سالنامه سازمان هواشناسی ایران؛ ۱۳۸۵-۱۳۷۵ و نرم‌افزار Google earth)

مناطق مطالعه	دما (درجه سانتی‌گراد)	رطوبت نسبی (درصد)	بارندگی (میلی‌متر)	ارتفاع از سطح دریا (متر)
اندیمشک	۲۵	۵۸	۵۷۰	۱۵۵
دزفول	۲۴/۵	۵۰	۴۸۰	۱۴۳
شوش	۲۳/۵	۴۹/۷	۲۶۰	۱۱۲
زرین شهر	۱۶/۷	۳۶	۱۵۷	۱۶۸۵
خمینی شهر	۱۷/۷	۳۷/۶	۱۷۲	۱۷۰۰
دستگرد	۱۶	۳۵/۵	۱۳۱	۱۵۵۰

جدول ۳. ارتباط میانگین پارامترهای آب و هوایی با میزان پیگمانت‌های گیاهی موجود در هویج‌های مناطق مورد مطالعه

پیگمانت‌های گیاهی	استان خوزستان			استان اصفهان		
	دما (درجه سانتی‌گراد)	رطوبت نسبی (درصد)	بارش (میلی‌متر)	دما (درجه سانتی‌گراد)	رطوبت نسبی (درصد)	بارش (میلی‌متر)
کلروفیل تام	۰/۶۲	۰/۹۹	۰/۸۵	۰/۹۹	۰/۹۸	۰/۹۰
کاروتنوئید تام	۰/۸۱	۰/۹۵	۰/۷۷	۰/۹۹	۰/۹۷	۰/۹۳
بتاکاروتن	۰/۹۷	۰/۷۶	۰/۹۵	۰/۹۸	۰/۹۹	۰/۸۷

۴. بحث

جذب آب و مواد غذایی از خاک و ساخت و تهیه مواد

ذخیره شونده به کمک فتوسنتز در برگ‌ها به دما بستگی دارد [۲۲] و تغییرات درجه حرارت بر کیفیت و عملکرد محصولات زراعی مؤثر است و دانستن این تغییرات در هر منطقه، راهنمای مناسبی برای کشاورزان در کشت می‌باشد [۲۳]. میانگین دمای مناطق جنوبی در این مطالعه ۲۳/۵-۲۵ درجه سانتی‌گراد (جدول ۲ و ۱) بوده است و بیشترین میزان کاروتنوئید تام و بتاکاروتن نیز در هویج‌های این

میزان و کیفیت مواد شیمیایی یک گیاه در رویشگاه‌ها و مناطق مختلف تغییر می‌یابد و دلیل آن را می‌توان در نوسان فعالیت‌های متابولیسی گیاه و عوامل مختلف محیطی جستجو نمود. وجود این نوسانات متابولیسی و نیز تغییرات شرایط آب و هوایی و محیطی محل کاشت، می‌تواند بر میزان ترکیبات مواد مؤثره و فعال در گیاهان اثرگذار باشند [۲۱].

است. تنش کم آبی موجب تخریب رنگدانه‌های فتوسنتزی، کاهش مقدار کلروفیل برگ و تخریب تشکیلات فتوسنتزی می‌شود [۲۸، ۲۷، ۲۴]. گزارش‌های مشابهی نیز مبنی بر کاهش کلروفیل در تنش کم آبی در گیاهان خربزه و انگور وجود دارد که از علل آن می‌توان به موارد فوق اشاره کرد [۲۹، ۳۰].

رطوبت نسبی نیز تحت تأثیر درجه حرارت هوا قرار دارد و در سیستم‌های طبیعی اثر متقابل درجه حرارت در رطوبت موجود در هوا به عنوان عوامل مهم در ارزیابی ساختار یک اکوسیستم مورد بررسی قرار می‌گیرد [۳۱]. در مناطق جنوبی این مطالعه که از رطوبت نسبی مناسب‌تری برخوردار بوده‌اند (جدول ۲)، سبب شده است تا شرایط اکوسیستمی مناسب‌تری برای تشکیل میزان مواد مؤثره در هویج‌های این مناطق فراهم شود و سطوح به‌دست آمده از این مواد در این مناطق بیانگر همین موضوع است (نمودار ۱).

کیفیت، شدت و مدت تابش نور و روشنایی که در دسترس گیاهان قرار می‌گیرد هرکدام اثر مستقیمی بر میزان تولید مواد مؤثره آنها دارد [۳۲]. مقدار تشعشع خورشیدی که به سطح زمین می‌رسد به عرض جغرافیایی بستگی دارد و در هر عرض جغرافیایی نیز با افزایش ارتفاع درجه حرارت کاهش می‌یابد. یکی از علل اصلی تغییرات درجه حرارت در عرض‌های جغرافیایی مختلف تغییر در شدت تشعشع خورشیدی است [۳۳]. شوش، دزفول و اندیمشک در ارتفاع ۱۱۲-۱۵۵ متری از سطح دریا در استان خوزستان و دستگرد، زرین‌شهر و خمینی شهر در استان اصفهان در ارتفاع ۱۷۰۰-۱۵۵۰ متری از سطح دریا قرار دارند (جدول ۲).

مکان و منطقه رویش بر رشد و نمو و همچنین بر میزان کیفیت مواد مؤثره گیاهان تأثیر دارد. به طور مثال مشخص شده که با کاشت ریحان در ارتفاعات پایین مقدار لینالول موجود در اسانس افزایش می‌یابد، در حالی که کاشت این

مناطق به دست آمد. این موضوع بیانگر ارتباط مستقیم دما و میزان تولید این مواد می‌باشد. برخی مطالعات نیز نشان داده است که یکی از مهم‌ترین فاکتورهای محیطی در رنگ هویج و افزایش موادی مانند بتاکاروتن درجه حرارت مناسب و افزایش دمای خاک است [۲۲]. مطالعات گذشته ما نیز نشان داده که مقادیر به دست آمده از میزان کلروفیل در گیاهان تحت تأثیر درجه حرارت قرار داشته است [۲۴].

بارندگی نیز یکی از عوامل مهم است که به طور مستقیم در چرخه هیدرولوژی دخالت داشته و شامل کلیه نزولات جوی است که به سطح زمین وارد می‌شود [۲۵]. بارش بالا در طول سال از یک طرف نشان‌دهنده بالا بودن رطوبت منطقه می‌باشد که مهم‌ترین عامل جذب تابش موج کوتاه می‌باشد و از طرف دیگر بیانگر وجود ذرات معلق بالا در اتمسفر آن نقطه است، که در جذب و انعکاس تابش موج کوتاه نقش دارد [۲۶]. میانگین بارندگی سالیانه در استان خوزستان و اصفهان در میزان سطوح کاروتنوئیدها و بتاکاروتن موجود در هویج‌های این استان‌ها، نیز بیانگر ارتباط این پارامتر محیطی با یکدیگر می‌باشد. بیشترین میزان کاروتنوئیدها و بتاکاروتن در اندیمشک ($5/30 \pm 54/62$ و $2/55 \pm 24/97$ میکروگرم بر گرم) با میانگین بارندگی سالیانه 570 میلی‌متر در این منطقه از استان خوزستان و کم‌ترین میزان مربوط به دستگرد ($1/83 \pm 18/72$ و $1/98 \pm 0/59$ میکروگرم بر گرم) با میانگین بارندگی سالیانه 131 میلی‌متر در استان اصفهان می‌باشد. همچنین مقادیر به دست آمده از سطوح کلروفیل موجود در برگ هویج‌های این مناطق نیز این ارتباط را نشان می‌دهد (جدول ۳). بنابراین می‌توان اینطور بیان کرد که کاهش معنی‌دار مقدار رنگدانه‌های فتوسنتزی مشاهده شده در برخی از مناطق استان اصفهان در این تحقیق، به دلیل کاهش فاکتورهای لازم جهت سنتز کلروفیل و کاروتنوئیدها بوده است و با افزایش کاتابولیسم کلروفیل در شرایط کم آبی منتج به تخریب ساختمان آنها شده

ذخیره‌سازی مواد مؤثره هویج، عوامل محیطی مانند رطوبت و دما تأثیر قابل توجهی بر محتوای کاروتنوئیدها دارند [۳۸]. ارتباطاتی که در تحقیقات فوق بین پارامترهای آب و هوا با میزان ذخیره‌سازی گیاهی به دست آمده است و ارتباطات معنی‌داری که بین مقدار کاروتنوئیدها و میزان اسانس نسترن کوهی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران توسط زرین‌قلمی و ختایی [۳۹] مشخص شده‌اند؛ کاملاً منطبق با ارتباطاتی است که در این مطالعه بین پارامترهای آب و هوایی و پیگمانت‌های گیاهی-کاروتنوئیدها در هویج به دست آمده است. علاوه بر این، نتایج مطالعه حاضر چگونگی تأثیر شرایط اقلیمی را بر تغییرات مواد مؤثره (کاروتنوئیدها) که وابسته به میزان سنتز و یا تخریب کلروفیل بوده است را نیز نشان می‌دهد.

۵. نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که مقادیر کاروتنوئید تام، بتاکاروتن و کلروفیل با توجه به شرایط آب و هوایی و جغرافیایی هر منطقه متفاوت بوده است و میزان این مواد در هویج‌های مناطق مختلف تحت تأثیر این عوامل قرار داشتند. نتایج به دست آمده نشان داد که پارامترهایی نظیر دما، رطوبت نسبی و میزان بارندگی با اثر روی غلظت اتمسفر منطقه، میزان شدت تابش نور و مهیا نمودن شرایط فتوسنتزی مناسب‌تر برای فعالیت‌های متابولیکی گیاه، نقش به‌سزایی برای ساخت ترکیبات شیمیایی و مواد مؤثره در هویج‌های کشت شده در استان خوزستان داشته است. از آنجایی که این مواد به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند، در نتیجه به نظر می‌رسد نقش محافظتی و همچنین درمانی این گیاه پرمصرف در مناطق مختلف متفاوت باشد و این موضوع در صنایع غذایی بخصوص تولید رنگدانه‌های خوراکی و همین‌طور صنایع داروسازی بسیار مهم است. نتایج تحقیق حاضر با شناسایی برخی مناطق جغرافیایی و

گیاه در ارتفاعات بالا موجب افزایش تولید اوزنول موجود در اسانس می‌شود [۳۲]. با کمتر شدن ارتفاع منطقه‌ای از سطح دریا، ضخامت جو بیشتر می‌شود. جو ضخیم دارای غلظت بیشتری از ترکیبات و عوامل جذبی یا انعکاسی است. از آنجایی که مواد درشت‌تر و غلیظ‌تر در طبقات پایین جمع می‌شوند، بنابراین جو مناطق مرتفع‌تر رقیق‌تر بوده و ضخامت جو هم کمتر می‌باشد. ضخامت و ترکیبات جو علاوه بر ورود انرژی موج کوتاه خورشید، انرژی موج بلند زمین را هم کنترل می‌کند [۳۴]. با افزایش ارتفاع، به علت ضخامت کمتر اتمسفر و در نتیجه جذب و پراکندگی کمتر نور، شدت نور نیز افزایش می‌یابد. نور زیاد منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن شده و برگ‌ها به سبب آسیب دیدن چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک دچار سوختگی نوری و در نتیجه تخریب دستگاه فتوسنتزی می‌شوند [۳۵].

نتایج این بررسی نشان داد که پارامترهایی همچون ارتفاع از سطح دریا، مدت زمان دریافت نور و طول و عرض جغرافیایی بر مقادیر به دست آمده از میزان پیگمانت‌های تولید شده در هویج‌های مناطق مرکزی و جنوبی ایران، اثرگذار بوده و مناطق مرکزی که دارای ساعات آفتابی بیشتری بوده‌اند (جدول ۱) تخریب ساختمان کلروفیل در محصول این مناطق بیشتر مؤثر بوده است (نمودار ۱)

نتایج تحقیقی که در ارتباط با اثر عوامل اقلیمی بر میزان تولید پیگمانت‌های گیاهی در کشور ترکیه انجام گرفته، نشان داده است که میزان تولید برخی پیگمانت‌ها در میوه‌های گونه‌های مختلف رز با عوامل مهم اقلیمی نظیر نور، رطوبت، درجه حرارت و ارتفاع از سطح دریا ارتباط داشته است [۳۶]. مطالعه‌ای دیگر نیز نشان داده است که در عوامل متعدد اثرگذار بر کیفیت محتوای ترکیبات شیمیایی هویج، فاکتورهایی مانند عوامل ژنتیکی و شرایط آب و هوایی همچون نور، دما و بارش، در طول رشد تا مرحله برداشت آن مؤثرند [۳۷]. در تحقیق دیگری مشخص شد که در

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که در این پژوهش هیچگونه تعارضی در منافع وجود ندارد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله، از همکاری بخش گیاهان دارویی و آزمایشگاه استحصال مرکز آموزش عالی امام خمینی کرج و همچنین از تمامی کشاورزان مزارع کشت هویج در مناطق نمونه‌برداری تشکر و قدردانی می‌نمایند.

مشارکت نویسندگان

نویسنده اول، به‌عنوان مجری مطالعه شامل ارائه طرح اولیه تحقیق، نگارش محتوای مقاله، نظارت دقیق بر انجام آزمایش‌ها و آنالیز داده‌ها، و نویسنده دوم در جمع‌آوری نمونه‌ها، انجام آزمایش‌های مربوطه و جمع‌آوری داده‌های خام و تهیه پیش‌نویس مقاله مشارکت نمودند.

منابع

1. Singh K, Singh N, Chandy A and Manigauha A. In vivo antioxidant and hepatoprotective activity of methanolic extracts of *Daucus carota* seeds in experimental animals. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2012; 2: 385-388.
2. Fiedor J and Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients* 2014; 6: 466-488.
3. Ranjbar B, Pouraboli I, Mehrabani M, Dabiri S and Javadi A. Effect of the methanolic extract of *Daucus carota* seeds on the carbohydrate metabolism and morphology of pancreas in type I diabetic male rats. *Physiol. Pharmacol.* 2010; 14: 85-93.
4. Ahangarpour A, Amirzargar A, Oroojan A, Abaci Asl H, Zaman Pour Z and Hasanzadeh M. Effects of carrot (*Daucus carota*) aqueous extract on ileum contractions in male rats. *JBUMS* 2014; 16: 38-43.
5. Bystricka J, Kavalcova P, Musilova J, Vollmannova A, Toth T and Lenkova M. Carrot (*Daucus carota* L. ssp. sativus (Hoffm.) Arcang.) as source of antioxidants. *Acta Agric Slov.* 2015; 105: 303-311.
6. Vasudevan M and Parle M. Pharmacological evidence for the potential of *Daucus carota* in the management of cognitive dysfunctions. *Biol Pharm Bull.* 2006; 29: 1154-1161.
7. Chatatikun M and Chiabchalard A. Phytochemical screening and free radical scavenging activities of orange baby carrot and carrot (*Daucus carota* Linn.) root crude extracts. *J. Chem. Pharm. Res.* 2013; 5: 97-102.
8. Hassan soltan T, Noroozi M and Amoozgar MA. A survey on total carotenoids, chlorophyll a and b and also antioxidant activity of derived from four strain of green alga isolated from the Golestan coasts, (Caspian Sea). *NCMBJ* 2016; 6: 31-36.
9. Ito Y, Kurata M, Suzuki K, Hamajima N, Hishida H and Aoki K. Cardiovascular disease mortality and serum carotenoid levels: a

- Japanese population-based follow-up study. *J. Epidemiol.* 2006; 16: 154-160.
10. Rajendran V, Pu YS and Chen BH. An improved HPLC method for determination of carotenoids in human serum. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2005; 824: 99-106.
11. Latowski D, Kuczyńska P and Strzałka K. Xanthophyll cycle—a mechanism protecting plants against oxidative stress. *Redox Rep.* 2011; 16: 78-90.
12. Leja M, Kamińska I, Kramer M, Maksylewicz-Kaul A, Kammerer D, Carle R and et al. The content of phenolic compounds and radical scavenging activity varies with carrot origin and root color. *Plant Food Hum. Nutr.* 2013; 68: 163-170.
13. Ebadollahi-Natanzi A and Arab-Rahmatipour G. Determination of total carotenoids contents of carrots harvested from some regions in Khuzestan and Isfahan provinces. National congress on medicinal plants, 16- 17 May 2012; Kish Island. *IJPR* 2012; 11: 386.
14. Ebadollahi-Natanzi A and Arab-Rahmatipour G. Study on free radical scavenging activity of carrot (*Daucus carota* L.) grown in three different regions of Iran. *J. Chem. Pharm. Res.* 2014; 6: 268-274.
15. Khoshgoftarmansh AH. Advanced topics in plant nutrition. 2nd ed. Isfahan University of Technology Publication Center. Iran. 2013.
16. Jafari A. Iran's Gitashenasi. 2nd ed. Gitashenasi Geographical and Cartographic Institute publications. Iran. 2005.
17. Arnon DI. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 1949; 24: 1-15.
18. Gross J. Pigments in Vegetables: Chlorophylls and Carotenoids. Van Nostrand Reinhold. USA. 1991.
19. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Method of Analysis. Washington D.C.: Edited by Horwitz W; 1980.
20. Mustapha Y and Babura S. Determination of carbohydrate and β -carotene content of some vegetables consumed in Kano Metropolis. *BJPAS* 2009; 2: 119-121.
21. Alipour N, Mahdavi K, Mahmoudi J and Ghelij-Nia H. Investigation into the effect of environmental conditions on the quality and quantity of essential oil of *Stachys laxa*. *J. Plant Res.* 2015; 28: 561-572.
22. Peyvast G. Vegetable production. 5th ed. Daneshpazir Publications. Iran. 2009.
23. Alijani F, Karbasi A and Mozafari M. Effects of climate change on yield of irrigated wheat in Iran. *Agricultural Economics and Development.* 2011; 19: 143-167.
24. Ebadollahi-Natanzi A, Arab-Rahmatipour G and Mohammadpour M. A study on total chlorophyll content in leaves of *Daucus carota* L. grown in two provinces of Iran and its correlation with some meteorological parameters and carotenoids levels. 2nd National Congress on Medicinal Plants, 15-16 May 2013; Teharn. *IJPR* 2013; 12: 399.
25. Alizadeh A. Principles of applied hydrology. 30th ed. University of Imam Reza Publication. Iran. 2007.
26. Esfandiari A, Rangraz K, Saberi A and Fattahi-Moghadam M. Potentiometric analysis of solar power plants by investigating climate parameters in Khuzestan province using GIS. 18th national conference and exhibition on geomatic and international conference of

ISPRS WGII/4, 7; 15-18 May 2011; Tehran, 2011.

27. Sharifa S and Muriefah A. Effects of paclobutrazol on growth and physiological attributes of Soybean (*Glycine max*) plants grown under water stress conditions. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 2015; 2: 81-93.

28. Saeidi M and Abdoli M. Effect of drought stress during grain filling on yield and its components, gas exchange variables, and some physiological traits of wheat cultivars. *J. Agr. Sci. Tech.* 2015; 17: 885-898.

29. Esmailizadeh M, Lotfi A, Mirdehghan SH and Shamshiri MH. Effects of irrigation intervals on some physiological and biochemical characteristics in four Iranian grapevine cultivars. *J. Crop Improv.* 2018; 20: 1-15.

30. Lotfi H, Barzegar T, Ghahramani Z and Rabiei V. Assessing the growth and yield of some Iranian melons under limited water condition. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production.* 2017; 27: 111-123.

31. Ataei H and Fanaei R. Identification of changes of maximum relative humidity in Isfahan province during half last century is using the Mann-Kendall test. *Researches in Geographical Sciences.* 2014; 14: 111-132.

32. Omidbaigi R. Production and processing of medicinal plants. 8th ed. Astan Ghods Razavi of publications. Iran. 2015.

33. Mojarrad F, Fathnia A and Rajae Najafabadi S. Evaluation of spatial-temporal variations of incoming solar radiation in Kermanshah province using "Liu and Jordan" model. *Journal of Applied researches in Geographical Sciences.* 2017; 17: 25-43.

34. Alijani B. Weather of Iran. 12th ed. University of Payam Noor Publications. Iran. 2013.

35. Farahmand H and Mehdikhani N. The role of pigments and the putative mechanisms involved in plants' leaf colour change and its importance in landscape. *Journal of Flowers and Ornamental Plants* 2016; 1: 60-77.

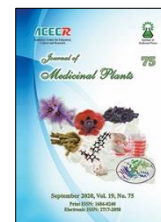
36. Olsson ME, Andersson S, Werlemark G, Ugglä M and Gustavsson KE. Carotenoids and phenolics in rose hips. *Acta Hort.* 2005; 690: 249-252.

37. Seljasen R, Kristensen HL, Lauridsen C, Wyss GS, Kretzschmar U, Birlouez-Aragone I, et al. Quality of carrots as affected by pre- and postharvest factors and processing. *J. Sci. Food Agric.* 2013; 93: 2611-2626.

38. Tsukakoshi Y, Naito S, Ishida N and Yasui A. Variation in moisture, total sugar, and carotene content of Japanese carrots: Use in sample size determination. *J. Food Compos. Anal.* 2009; 22: 373-380.

39. Zaringhalami S and Khataei M. Determination of some chemical composition of Dog Rose fruit and seed. *LWT-Food Sci. Technol.* 2017; 14: 1-8.

How to cite this article: Ebadollahi-Natanzi A and Arab-Rahmatipour G. A study on chlorophyll, total carotenoid and beta-carotene contents in carrot and the effect of climate on them. *Journal of Medicinal Plants* 2020; 19(75): 254-265. doi: 10.29252/jmp.19.75.254



Research Article

A study on chlorophyll, total carotenoid and beta-carotene contents in carrot and the effect of climate on them

Alireza Ebadollahi-Natanzi^{1,*}, Gholamreza Arab-Rahmatipour²

¹ Department of Medicinal plants, Imam Khomeini Higher Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

² Department of Medicinal plants, Imam Khomeini Higher Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

ARTICLE INFO

Keywords:

Beta carotene
Carotenoids
Carrot
Daucus carota L.
Chlorophyll
Climatic parameters

ABSTRACT

Background: Carotenoids are pigments with important physiological effects in the human body that are involved in strengthening the immune system and reducing the risk of many diseases, including cancer. **Objective:** With regard to the importance of these substances and the high content of them in carrots (*Daucus carota* L.), and in order to identify the most suitable geographical area for obtaining the products with the highest levels of these compounds, the present study was carried out. **Methods:** Samples were collected and investigated from six major carrot cultivation regions, located in Khuzestan and Isfahan provinces. The effects of climate changes on the amount of these substances were also studied. The extracts were prepared from the samples and the experiments were performed by spectrophotometric method at 663, 645, 480 and 436 nm wavelength, respectively. **Results:** The highest mean of total chlorophyll content in leaves (1.42 mg/g) and total carotenoids (54.62 µg/g) and beta-carotene (24.97 µg/g) in plant roots were related to Andimeshk in Khuzestan province, and the lowest amounts of them was related to Dastgerd in Isfahan province with average of 0.61 mg/g, 18.72 µg/g and 1.98 µg/g, respectively. **Conclusion:** The results of this study showed that in Khuzestan province, parameters such as temperature (23.5-25 °C), relative humidity (49.5-58 percent) and rainfall (260-570 mm/year) had better conditions for carrot metabolic activity and consequently having caused a significant increase in carotenoids and beta carotene in this plant product.

Abbreviations: AOAC, Association of Official Analytical Chemists; rpm, revolutions per minute

* Corresponding author: ebad@ihcc.ir

doi: [10.29252/jmp.19.75.254](https://doi.org/10.29252/jmp.19.75.254)

Received 18 December 2019; Received in revised form 23 February 2020; Accepted 26 February 2020

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)