علوم و تحقیقات بذر ایران
سال پنجم/ شماره چهارم/ ۱۳۹۷ (۷۰ - ۵۹)

DOI: 10.22124/jms.2018.2946

تأثیر پیش‌تیمار بذر با اسپرمیدین بر بهبود شاخص‌های جوانه‌زنی و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاهچه‌های سویاتحت تنش خشکی

معصومه حیدر قلی‌نژاد کناری*[۱]، منوچهر قلی‌پور[۲]، همت الله پیر دشتی[۳]، حمید عباس‌دخت[۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۹

چکیده

به‌منظور بررسی تاثیر پیش‌تیمار پلی‌آمین اسپرمیدین بر افزایش تحمل به تنش خشکی در مرحله جوانه‌زنی و رشد گیاهچه سویا رقم کاسپین، پژوهشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار در سال ۱۳۹۵ انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل سه سطح تنش خشکی (صفر، ۲- و ۴- بار) و سه سطح اسپرمیدین (صفر، ۱ و ۲ میلی مولار) بودند. نتایج آزمایش نشان داد استفاده از اسپرمیدین در غلظت یک میلی مولار باعث بهبود معنی‌دار خصوصیات جوانه‌زنی شامل حداکثر جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، یکنواختی جوانه‌زنی، زمان‌های رسیدن به ۱۰،۵۰ و۹۰ درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، وزن گیاهچه، و جوانه‌زنی نهایی در تنش خشکی متوسط (۲- بار) شد. غلظت بالای اسپرمیدین نتوانست باعث بهبود تحمل به تنش شدید در صفات مورد بررسی گردد. استفاده از اسپرمیدین یک میلی‌مولار، بیشتر شدن فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز، کاتالاز و میزان پروتئین محلول را در شرایط تنش خشکی متوسط نسبت به شاهد را به دنبال داشت. اثر متقابل معنی‌داری بین پلی‌آمین و تنش خشکی از نظر غلظت پروتئین مشاهده نشد. به طور کلی نتایج نشان داد که پیش‌تیمار بذر با اسپرمیدین باعث افزایش تحمل به تنش از طریق بهبود شاخص‌های جوانه‌زنی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاهچه‌های سویا گردید.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، بهبود تحمل به تنش، خشکی، شاخص‌های جوانه‌زنی

۱-دانشجوی دکترای زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران
۲- دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران
۳-دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
*نویسنده مسئول: hmasoumeh@rocketmail.com

مقدمه

امروزه استفاده از پیش‌تیمار (پرایمینگ) یکی از روش-های مورد استفاده جهت بهبود جوانه‌زنی در شرایط تنش بذر است. پیش‌تیمار بذر فناوری است که به واسطه آن بذرها پیش از قرارگرفتن در بستر کشت از لحاظ فیزیولوژیکی و بیولوژیکی آمادگی جوانه‌زنی را به دست می‌آورند. این امر سبب تغییرات زیستی و فیزیولوژیکی زیادی در بذرها و همچنین گیاه حاصل از آن‌ها می‌گردد، به طوری که نتیجه آن جوانه‌زنی بهتر و استقرار مناسب گیاهچه است (SalimiTamalla *et al.*, 2014). در بیشتر گیاهان زراعی، جوانه‌زنی بذر و رشد اولیه گیاهچه حساس‌ترین مراحل به محدودیت آب بوده و کمبود آب منجر به تاخیر، کاهش سرعت و یکنواختی جوانه‌زنی و در نتیجه کارکرد ضعیف گیاه و کاهش عملکرد آن می‌شود (Demir *et al.*, 2006; Basra *et al.*, 2004). از سویی توانایی جوانه‌زنی بذرها در شرایط تنش رطوبتی، شانس استقرار بیشتر گیاه و تراکم بالاتر را به دنبال دارد که منجر به افزایش عملکرد می‌گردد (Soltani *et al.*, 2008).

پلی‌آمین‌ها شامل پوتریسین (Put)، اسپرمیدین (Spd)، اسپرمین (Spm) و کاداورین (Cad) پلی‌کاتیون-های آلی با وزن ملکولی کم و فعالیت بیولوژیکی بالایی می‌باشند. پلی‌آمین‌ها از اجزای سلول‌های گیاهی و تنظیم-کننده‌های چندکاره فرآیندهای فیزیولوژیکی هستند که قادرند همانند هورمون‌های گیاهی، فرآیندهای مختلف در شرایط طبیعی و تنش را تنظیم نمایند (Kuznetsov *et al.*, 2006). مطالعات اخیر حاکی از نقش اساسی این مواد در سازگاری گیاه و افزایش تحمل به تنش‌های گیاهی است (Zhu *et al.*, 2001. Kuznetsov *et al.*, 2002. Shevyakova *et al.*, 2001). طی بررسی به عمل آمده، پلی‌آمین‌ها می‌توانند با جلوگیری از متیلاسیون DNA، بیان ژن‌های مسئول سنتز پروتئین‌های تنش را تنظیم نمایند (Minocha *et al.*, 2004; Wada *et al.*, 2004). همچنین این ترکیبات در اثر بلوکه‌کردن کانال-های پتاسیمی در غشاء پلاسمایی سلول‌های نگهبان و در نتیجه افزایش فشار تورگر منجر به کاهش بازبودن روزنه‌ها می‌شوند (Kuznetsov *et al.*, 2006). نقش حفاظتی پلی‌آمین‌ها به دلیل توانایی در خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) است که برای ساختمان سلول خطرناک و تحت تاثیر تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایجاد می‌شوند (Hasogawa *et al.*, 2000). در شرایط نامساعد محیطی میزان بالایی از گونه‌های فعال اکسیژن نظیر رادیکال سوپراکسید و رادیکال هیدروکسیل (OH) در سلول‌های گیاهی تولید می‌شوند، در نتیجه گیاهان واکنش‌های سازگاری نشان می‌دهند.

آنزیم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان مثل سوپراکسید - دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، پراکسیداز (POD)، گلوتاتیون ردوکتاز (GR) و مونودهیدرو آسکوربات ردوکتاز سیستم‌هایی هستند که برای حداقل‌کردن غلظت سوپراکسید و پراکسیدهیدروژن طراحی شده‌اند (Shehab *et al.*, 2010). بعضی از مطالعات تأثیرات مثبت پیش‌تیمار بذر با پلی‌آمین‌ها را روی درصد جوانه‌زنی، قدرت بذر و رشد گیاهچه در گندم (Farooq *et al.*, 2011)، آفتابگردان (Farooq *et al.*, 2007)، برنج (Farooq *et al.*, 2008) و گوجه‌فرنگی (Afzal *et al.*, 2009) نشان داده‌اند. در واقع، تأثیرات فیزیولوژیکی استفاده از اسپرمیدین بهبود تحمل به تنش سرما در برنج به علت افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، میزان پلی‌آمین‌ها در گیاه و افزایش آنزیم‌هایی بود که در بیوسنتز و بیان ژن‌های سازنده پلی‌آمین‌ها نقش دارند. بر این اساس با توجه به حساسیت بذر سویا به تنش خشکی به خصوص در کشت تابستانه حتی در رقم متحمل به خشکی کاسپین که با کمبود بارندگی مواجه شده و اغلب دچار تنش خشکی می شوند، پژوهش حاضر جهت بررسی تاثیر پیش‌تیمار بذر با پلی‌آمین اسپرمیدین بر بهبود شاخص‌های جوانه‌زنی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاه سویا تحت تنش خشکی طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه تکنولوژی بذر دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با دمای کنترل شده ۲۵ درجه سانتی‌گراد (Soltani *et al.*, 2008) انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل سطوح پتانسیل (صفر،۲- و ۴- بار) و پلی-آمین اسپرمیدین (Sigma-Aldrich) در سه غلظت صفر، یک و دو میلی‌مولار در چهار تکرار اعمال شدند. برای ایجاد پتانسیل‌های ۲- و ۴- بار از PEG 8000 بر اساس

رابطه میچل و کافمن (Meachel and Kuffman, 1973) و برای شاهد از آب مقطر استفاده گردید. بذر سویا رقم کاسپین از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران تهیه و به تعداد ۵۰ بذر در ظروف پتری به قطر ۹۰ میلی‌متر قرارداده شد (Soltani *et al.*, 2008). از کاغذ صافی جهت بستر و پوشش روی بذر استفاده گردید. سپس تیمارها اعمال و در این مدت طی دو بار در روز بذرها مورد بازبینی قرار می‌گرفتند. در صورت خشک شدن بستر بذر در طول آزمایش تیمارها شامل آب مقطر و محلول‌های تهیه‌شده اضافه گردید (Soltani *et al.*, 2008). معیار بذرهای جوانه‌زده، خروج ریشه‌چه حداقل به اندازه دو میلی‌متر در نظر گرفته شد (Farrokhi *et al.*, 2004). سپس صفات زمان‌های رسیدن به ۱۰درصد (D_{10})، ۵۰ درصد (D_{50}) و۹۰ درصد (D_{90}) جوانه‌زنی، حداکثر جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، طول گیاهچه، وزن خشک گیاهچه و نیز فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز و میزان پروتئین محلول اندازه‌گیری شد. درصد، سرعت، یکنواختی جوانه‌زنی و نیز صفات D_{90}, D_{50}, D_{10} با استفاده از برنامه Germin محاسبه گردید. این برنامه پارامترهای مورد نظر برای هر مشاهده را از طریق درون‌یابی منحنی افزایش جوانه‌زنی در مقابل زمان محاسبه می‌نماید (Soltani *et al.*, 2001): سرعت جوانه‌زنی (R_{50}) از طریق رابطه ۱ محاسبه گردید (Soltani *et al.*, 2001):

$$R50 = \frac{1}{D50} \quad \text{(رابطه ۱)}$$

یکنواختی جوانه زنی (GU) مدت زمان لازم بین ۱۰ و ۹۰ درصد جوانه زنی است که از رابطه ۲ به دست می‌آید (Fazeli Kakhaki *et al.*, 2014):

$$GU = \frac{1}{N} \quad \text{(رابطه ۲)}$$

هر چه مقدار GU بیشتر باشد، جوانه‌زنی و رشد اولیه گیاهچه‌ها یکنواخت‌تر و در نتیجه در استقرار مناسب، تامین مواد غذایی و مبارزه با علف‌های هرز مؤثر می‌باشد (Rohoollahi *et al.*, 2009). شمارش روزانه بذرهای جوانه‌زده تا زمان ثابت‌ماندن تعداد آنها ادامه یافت (Moradi Dezfuli *et al.*, 2008). بعد از آن، گیاهچه‌های نرمال به مدت دو روز در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد در آون (مدل BM 750) قرار داده و سپس وزن خشک گیاهچه با ترازویی به دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد.

جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها تیمارهایی انتخاب گردید که به مرحله گیاهچه (تولید ریشه‌چه و ساقه‌چه) رسیدند (شاهد و تیمار یک میلی‌مولار اسپرمیدین). ابتدا نمونه‌ها در هاون در شرایط نیتروژن مایع خرد و آسیاب شدند. سپس ۰/۵ گرم از آن‌ها در پنج سی‌سی بافر فسفات (pH=7) ۱۰۰ میلی‌مولار حاوی پلی‌ونیل پیرولیدین (PVP) یک درصد و یک میلی‌مولار اتیلن دی‌آمین ترا-استیک اسید (EDTA) هموژنیزه گردید. سپس در دستگاه سانتریفوژ (مدل Eppendorf centrifuge 5810R) با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای پنج درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. فاز بالایی عصاره جمع‌آوری و برای تعیین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و پراکسیداز استفاده شد (Taalat *et al.*, 2015). اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز به روش ابی (Aebi, 1984) و بر اساس کاهش جذب پراکسید هیدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر انجام شد. کمپلکس واکنش شامل ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH =7) ، ۰/۵ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۷/۵ میلی‌مولار و۵۰ میکرو-لیتر از محلول آنزیمی می‌باشد که حجم نمونه ها با اضافه-کردن آب مقطر به سه میلی لیتر رسانده شد (Alizadeh-Forotan *et al.*, 2016). آنزیم پراکسیداز به روش تانگ و نیوتن (Tang and Newton, 2005) و بر اساس میزان تجزیه پراکسید هیدروژن در طول موج ۴۷۰ نانومتر انجام شد که کمپلکس واکنش شامل یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار (pH=7)، ۲۵۰ میکرولیتر از EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، یک میلی‌لیتر گایاکول ۵ میلی‌مولار، یک میلی‌لیتر پراکسیدهیدروژن ۱۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی می‌باشد (AlizadehForotan *et al.*, 2016).

آنزیم آسکوربات پراکسیداز به روش یوشیمورا و همکاران (Yoshimura et al., 2000) و بر اساس میزان تجزیه پراکسیدهیدروژن در طول موج ۲۹۰ نانومتر انجام شد. ابتدا نمونه در نیتروژن مایع پودر و سپس در بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار حاوی یک میلی‌مولار آسکوربات، محلول سوربیتول ۲۰ درصد، یک میلی‌مولار EDTA، و محلول فنیل متان سولفونیل فلوراید ۰/۱ درصد هموژنیزه شد و سپس در دستگاه سانتریفوژ (مدل Eppendorf centrifuge 5810R) با ۱۰۰۰۰ دور

در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. فاز بالایی عصاره جمع‌آوری و برای تعیین فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز استفاده شد. کمپلکس واکنش شامل ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵ میلی‌مولار حاوی ۱۰ میکرومولار پراکسید-هیدروژن،۱۰ میکرولیتر آسکوربات ۱۰ میلی‌مولار و ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۲۰ میلی‌مولار بود (Yaghoubian *et al.*, 2014).

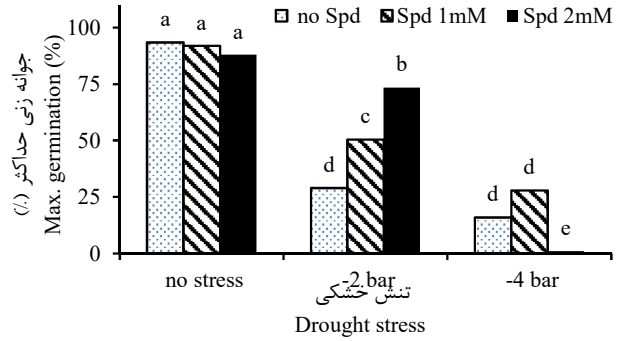
میزان پروتئین محلول موجود در نمونه‌ها به روش برادفورد (Bradford, 1976) به صورت زیر اندازه‌گیری شد. کمپلکس واکنش شامل ۱۰۰ میکرولیتر محلول آنزیمی، ۷۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه و ۲۰۰ میکرولیتر محلول برادفورد بود که جذب آنها در طول موج ۵۹۵ نانومتر بررسی گردید (AlizadehForotan *et al.*, 2016). اندازه‌گیری فعالیت تمامی این آنزیم‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل WPA) انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها در نرم‌افزار SPSS (Ver.20) انجام و میانگین داده‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد با یکدیگر مقایسه شدند. نمودارها نیز با نرم-افزار Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس بیانگر اثر معنی‌دار پلی‌آمین اسپرمیدین و تنش خشکی بر همه‌ی صفات اندازه‌گیری شده و برهمکنش اسپرمیدین و تنش خشکی بر همه صفات جوانه‌زنی به جز مقدار پروتئین بود (جدول‌های ۱ ، ۲ و ۳). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که در شرایط بدون تنش استفاده از اسپرمیدین نتوانست اثر معنی‌داری بر حداکثر جوانه‌زنی بذرها داشته باشد اما استفاده از اسپرمیدین در تنش خشکی متوسط (۲- بار) توانست این شاخص را به طور معنی‌داری بهبود ببخشد. اثر بخشی غلظت‌های یک و دو میلی‌مولار اسپرمیدین نسبت به شاهد به ترتیب برابر ۲۱/۵ و ۴۴/۵ درصد بود. با وجود این، در تنش خشکی بالاتر (۴- بار) کاربرد اسپرمیدین نتوانست اثر معنی‌داری بر بهبود حداکثر جوانه‌زنی داشته باشد و حتی در غلظت دو میلی‌مولار اثر کاهشی نسبت به غلظت یک میلی‌مولار در مقایسه با شاهد مشاهده شد (شکل ۱).

محل تولید، تنش سرما و اثر متقابل آن‌ها بر میزان کاروتنوئید بافت تازه برگ در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). در نتایج مقایسه میانگین بیش‌ترین و کم‌ترین میزان کاروتنوئید بافت برگ به‌ترتیب در دمای ۴ درجه سلسیوس (۶۰/۱۳ میلی‌گرم) و دمای ۲ درجه سلسیوس (۴۸/۵۶ میلی‌گرم) بر گرم است (جدول ۲). بیش‌ترین میزان کاروتنوئید بافت برگ مربوط بذر تولیدی کشور ایران با ۵۷/۲۸ میلی‌گرم بر گرم است (جدول۳).

بیشترین سرعت جوانه‌زنی (عکس زمان رسیدن به ۵۰ درصد جوانه زنی) در تنش خشکی بالا (۴- بار) با کاربرد اسپرمیدین در غلظت یک میلی‌مولار مشاهده شد که نسبت به شاهد و سایر تیمارها معنی دار بود. با این وجود، در تنش خشکی بالا استفاده از غلظت دو میلی‌مولار نتوانست سرعت جوانه‌زنی را بهبود دهد و حتی نسبت به شاهد به طور معنی‌داری (۱۹٪) کاهش یافت. بالاتر بودن سرعت جوانه‌زنی در استقرار سریع بذرها نقشی موثر دارد. نتایج بررسی‌ها حاکی از آن است که در ژنوتیپ‌های مختلف سویا، خشکی اثر معنی‌داری بر کاهش سرعت جوانه‌زنی به جای می‌گذارد (Farrokhi *et al.*, 2003).



شکل ۱- تاثیر پلی‌آمین اسپرمیدین بر حداکثر جوانه‌زنی سویا تحت تنش خشکی

Figure 1. The effect of spermidine polyamine on soybean maximum germination under drought stress

جدول ۱- تجزیه واریانس اثرتیمارهای آزمایشی بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذرهای سویا در سطوح مختلف تنش خشکی

Table 1. Variance analysis of experimental treatments effects on germination indicators of soybean seeds under drought stress

منابع تغییر Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	D_{10}	D_{50}	D_{90}	سرعت جوانه زنی R_{50}
اسپرمیدین Spermidine(S)	2	112.8**	60.540**	74.882**	291.19**
خشکی Drought(D)	2	68.0**	30.058**	420.721**	62.558**
S×D	4	70.4*	34.386**	391.178**	268.27**
خطا Error	27	0.174	0.184	6.548	9.494
ضریب تغییرات CV (%)		6.39	2.42	7.41	5.71

**: معنی دار در سطح احتمال یک درصد

**: significant at 1 % of probability.

جدول ۲- تجزیه واریانس اثرتیمارهای آزمایشی بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذرهای سویا در سطوح مختلف تنش خشکی

Table 2. Variance analysis of experimental treatments effects on germination indicators of soybean seeds under drought stress

منابع تغییر Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	طول ریشه‌چه Seedling length (mm)	وزن گیاهچه Seedling weight (g)	جوانه‌زنی نهایی Final germination (%)	یکنواختی جوانه‌زنی Germination uniformity (day^{-1})	حداکثر جوانه‌زنی Germination maximum (%)
اسپرمیدین Spermidine(S)	2	97.30**	7.03**	546.52**	248.86**	369.778**
خشکی Drought(D)	2	436.85**	20.29**	21773.40**	598.25**	17421.40**
S×D	4	83.89**	2.415**	245.77**	515.27**	1187.77**
خطا Error	27	2.932	0.019	2.574	1.852	40.037
ضریب تغییرات CV (%)		12.69	5.82	3.46	4.66	12.08

**: معنی دار در سطح احتمال یک درصد

**: significant at 1 % of probability.

جدول ۳- تجزیه واریانس اثرتیمارهای آزمایشی بر فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهچه های سویا در سطوح مختلف تنش خشکی

Table 3. Variance analysis of experimental treatments effects on antioxidant activity of soybean seedlings under drought stress

منابع تغییر Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	کاتالاز CAT (u/mg protein.min)	آسکوربات پراکسیداز APX (u/mg protein.min)	پراکسیداز POD (u/mg protein.min)	پروتئین Protein (mg/gr.plant)
اسپرمیدین Spermidine (S)	1	32964**	388235**	15705.7**	19.127**
خشکی Drought(D)	1	1495**	5982*	8755**	60.525**
S×D	1	36956**	459985**	55688**	1.300n.s
خطا Error	8	333.174	573.37	37.925	0.353
ضریب تغییرات CV (%)		18.7	6.7	4.69	15.48

n.s و **: به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال یک درصد

and **: non-significant and significant at 1 % of probability, respectively n.s

چنین کاهشی به قابلیت انتشار پوسته بذر در پتانسیل‌های منفی آب نسبت داده شده است. نتایج مشابهی نیز برای سایر گیاهان زراعی مانند گندم و لوبیا مشاهده شده است (Farrokhi *et al.*, 2003; Singh, 2001). در واقع با استفاده از اسپرمیدین در شرایط تنش سرعت جوانه زنی افزایش یافت اما این افزایش سرعت بسته به غلظت اسپرمیدین و میزان تنش خشکی متفاوت بود (جدول ۴). عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در شرایط بدون اسپرمیدین تا تنش خشکی ۲- بار شاید به خصوصیت ژنتیکی رقم مورد آزمایش مرتبط باشد چون، رقم کاسپین تابستانه و تا حدودی متحمل به خشکی (Arab *et al.*, 2017) است.

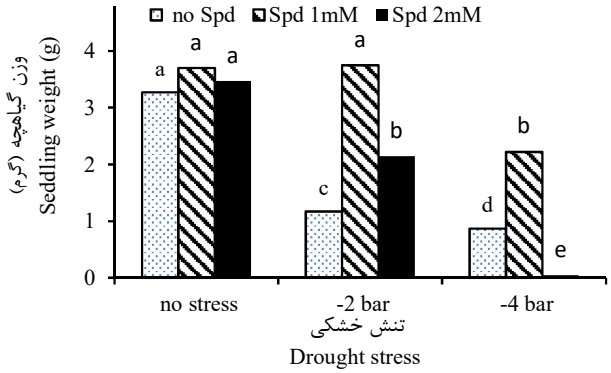
مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که استفاده از اسپرمیدین با غلظت یک میلی‌مولار باعث یکنواختی بیشتر جوانه‌زنی در تنش خشکی بالا (۴- بار) شد و برتری غیر معنی‌داری نسبت به شاهد داشت (جدول ۴). غلظت دو میلی‌مولار اسپرمیدین نتوانست بر تنش خشکی متوسط و بالا غلبه نماید. به گونه‌ای که کمترین یکنواختی جوانه‌زنی در این تیمار مشاهده شد که با شرایط تنش خشکی بدون اسپرمیدین تفاوت معنی‌داری نداشت. میزان افزایش یکنواختی جوانه‌زنی توسط اسپرمیدین در غلظت یک میلی‌مولار نسبت به شاهد حدود بیست درصد بود.

پیش‌تیمار بذر با غلظت یک میلی‌مولار اسپرمیدین زمان رسیدن به ده درصد جوانه‌زنی را در شرایط تنش خشکی در مقایسه با غلظت دو میلی‌مولار بهبود بخشید (جدول ۴). در مورد شاخص D_{50} نیز تأثیر اسپرمیدین با غلظت یک میلی‌مولار در تنش خشکی بالا (۴- بار) تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد (جدول ۴) درحالی که غلظت دو میلی‌مولار تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها نداشت. اما در غلظت دو میلی‌مولار اسپرمیدین و تنش خشکی ۴- بار شاخص D_{90} به شدت کاهش یافت.

با افزایش تنش خشکی طول ریشچه کمتر شد و استفاده از غلظت یک میلی‌مولار اسپرمیدین باعث افزایش طول ریشچه در شرایط بدون تنش گردید (جدول ۴). اما در شرایط تنش خشکی متوسط (۲- بار) طول ریشچه در غلظت یک میلی‌مولار اسپرمیدین بیشتر از طول ریشچه در غلظت دو میلی‌مولار اسپرمیدین بود. با بیشتر شدن شدت تنش، پیش‌تیمار بذر با اسپرمیدین یک میلی‌مولار باعث افزایش طول ریشچه گردید به طوری که در مقایسه با شاهد، حدود ۶/۶ میلی‌متر بیشتر بود، اما درغلظت دو میلی‌مولار ریشچه‌ای ظاهر نشد (جدول ۴). معمولا طول ریشچه با افزایش غلظت PEG به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (Almaghrabi, 2012) اما مشاهدات حاکی از واکنش سازگاری در ارقامی است که طول ریشچه بیشتری دارند. در نتیجه توانایی دسترسی به آب‌های عمیق‌تر در آنها بیشتر خواهد بود (Almaghrabi, 2012; Dodd and Donovan,1999) . کاهش در طول ریشچه تحت تنش خشکی ممکن است به علت عدم امکان تقسیم سلولی و طویل‌شدن آن باشد که منجر به فرآیند غده‌زایی و لیگنینی شدن سیستم ریشه شده و اجازه می دهد تا شرایط دوباره مساعد گردد (Almaghrabi, 2012). در این میان استفاده از پلی‌آمین اسپرمیدین تحت تنش خشکی در غلظت یک میلی‌مولار حتی در تنش خشکی ۴- بار با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشته و این امر حاکی از تاثیر آن بر افزایش تحمل به خشکی در ریشچه می باشد. سمیکالیس و همکاران (Semieikalis *et al.*, 1989) بیان کردند که با کاهش پتانسیل آب، طول ریشچه و ساقچه ارقام سویا به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد که علت کاهش طول ریشچه، محدودشدن تحرک ذخایر بذر در اثر کاهش پتانسیل آب می‌باشد. از سوی دیگر، ایراکی و همکاران (Iraki *et al.*, 1989) علت کاهش طول ریشچه و ساقچه را با کاهش و یا ثابت‌ماندن فعالیت آلفاسلولز و همی‌سلولز مرتبط دانستند. سرعت رشد ریشه‌چه و ساقه‌چه در بذر از اهمیت خاصی برخوردار است چرا که بذرهایی که در شرایط خشکی از رشد ریشچه و ساقچه خوبی برخوردار باشند، می‌توانند استقرار بیشتر و سریع‌تری پیدا کنند و در شرایط نامناسب محیطی تضمین‌کننده عملکرد بالاتر هستند (Farrokhi *et al.*, 2003).

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با افزایش میزان تنش خشکی، میزان وزن گیاهچه کاهش می‌یابد اما پیش‌تیمار بذر با غلظت یک میلی‌مولار اسپرمیدین در تنش خشکی متوسط (۲- بار) باعث افزایش وزن گیاهچه شد (شکل ۲). در تنش خشکی بالا (۴- بار) نیز غلظت یک میلی‌مولار اسپرمیدین تاثیر مثبتی بر وزن گیاهچه داشت.

در آزمایشی که فاروق و همکاران (Farooq *et al.*, 2010) روی برنج رقم باسماتی در شرایط تنش خشکی انجام دادند مشاهده شد تنش خشکی باعث کاهش رشد



شکل ۲- تأثیر اسپرمیدین بر وزن گیاهچه سویا تحت تنش خشکی

Figure 2. The effect of spermidin on soybean seedling weight under drought stress

جدول۴- مقایسه میانگین اثر متقابل تنش خشکی و پلی‌آمین اسپرمیدین بر مؤلفه‌های جوانه‌زنی و فعالیت آنزیم-های آنتی‌اکسیدان

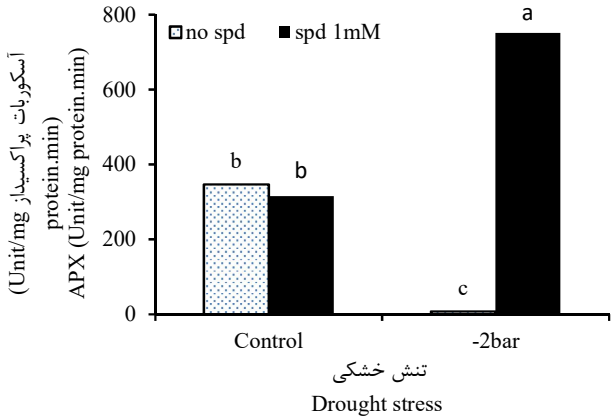
Table 4. Mean comparison of interaction effects of drought stress and spermidine polyamine on germination indicators and antioxidant enzymes activity

اسپرمیدین Spermidine	تنش خشکی Drought stress	طول ریشه چه Radicle length(mm)	سرعت جوانه زنی R_{50}	یکنواختی جوانه زنی Germination uniformity(/day)	D_{10}	D_{50}	D_{90}
No Spd	Control	17.85b	54.15b	41.79a	3.548e	18.527a	42.59a
	-2 bar	10.18d	55.00b	26.89c	12.803b	18.592a	23.94c
	-4 bar	7.51e	55.27b	22.12d	1.527c	19.517a	26.40c
1 mM	Control	18.72ab	52.97b	29.74b	3.795e	18.662a	33.03b
	-2 bar	17.52b	58.00b	27.60c	3.670e	17.277a	31.77b
	-4 bar	14.10c	64.40a	41.92a	1.770f	9.500b	45.74a
2 mM	Control	21.13a	53.27b	40.35a	4.470d	19.562a	45.32a
	-2 bar	14.44c	56.47b	22.88d	4.500d	19.140a	34.25b
	-4 bar	0.00f	36.37c	9.30e	13.600a	18.500a	24.90c

در هر ستون میانگین های دارای حرف یا حروف مشابه بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی داری ندارند

Means of each column with same letter(s) are not significantly different at 5% of probability level based on Duncan test.

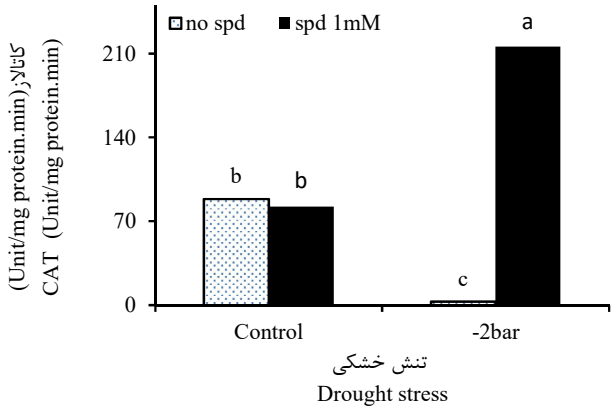
گیاهچه گردید و استفاده از پلی‌آمین اسپرمین تحمل به تنش خشکی و رشد گیاهچه را بهبود بخشید. به نظر می-رسد تنش خشکی باعث تغییرات متفاوتی در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌شود به طوری‌که در گیاهان تحت تنش میزان فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون‌ردوکتاز (GR)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و کاتالاز (CAT) بالاتر بود (Talaat *et al.*, 2015). در مطالعه کزنتسوف و همکاران (Kuznetsov *et al.*, 2006) استفاده از غلظت بالاتر از یک میلی‌مولار پلی‌آمین‌ها موجب تشکیل گونه فعال اکسیژن سوپراکسید از پراکسیدهیدروژن گردید که حاکی از خاصیت ضدآنتی‌اکسیدانی پلی‌آمین‌ها در این غلظت بود. بر اساس نتایج این آزمایش، تاثیر تنش خشکی و اثر متقابل آن با اسپرمیدین بر میزان فعالیت آنزیم APX به ترتیب در سطح پنج و یک درصد معنی دار بود (جدول ۳). استفاده از پلی‌آمین اسپرمیدین در سطح یک میلی-مولار در تنش خشکی ۲- بار باعث افزایش فعالیت این آنزیم گردید (شکل ۳). در تنش خشکی متوسط (۲- بار) نمونه گیاهی جهت آندازه‌گیری آنزیم وجود نداشت اما استفاده از غلظت یک میلی‌مولار اسپرمیدین منجر به تولید نمونه و افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد (۱۳۸ درصد) شد.



شکل ۳- تأثیر پلی‌آمین اسپرمیدین بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز (واحدآنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه) در گیاهچه سویا تحت تنش خشکی

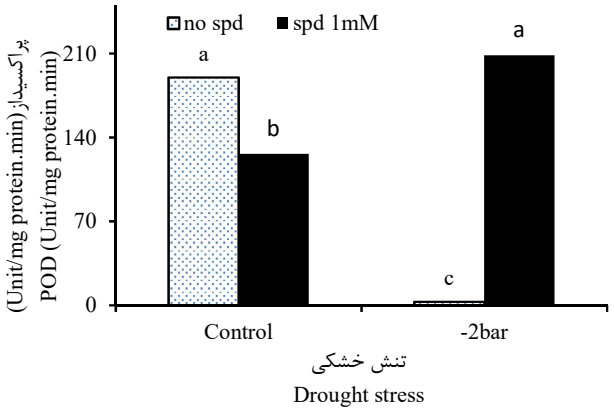
Figure 3. The effect of spermidin polyamine on APX activity (U/mg protein.min) in soybean seedlings under drought stress

استفاده از اسپرمیدین باعث افزایش فعالیت آنزیم CAT در گیاهچه روییده در شرایط تنش خشکی متوسط شد (شکل ۴). اسپرمیدین کاهش حدود ۳۳ درصدی آنزیم POD در شرایط بدون تنش را به دنبال داشت (شکل ۵). این در حالی است که با اعمال تنش خشکی تا ۲- بار، استفاده از اسپرمیدین با افزایش آنزیم POD همراه بود. این امر حاکی از تاثیر پلی‌آمین بر افزایش فعالیت آنزیم POD در شرایط تنش خشکی و در نتیجه افزایش تحمل به تنش می باشد. در این میان اسپرمیدین بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مورد مطالعه (کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز) در شرایط تنش ۲- بار و در نتیجه افزایش تحمل به تنش خشکی داشت. از آنجایی که کاتالاز و پراکسیدازها نقش اساسی در خنثی-سازی سمیت پراکسید هیدروژن دارند، با تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و مولکول اکسیژن از آسیب سلولی تحت شرایط نامساعد نظیر تنش خشکی جلوگیری می‌کنند (Shehab *et al.*, 2010).



شکل ۴- تاثیر اسپرمیدین بر فعالیت کاتالاز (واحدآنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه) در گیاهچه سویا تحت تنش خشکی

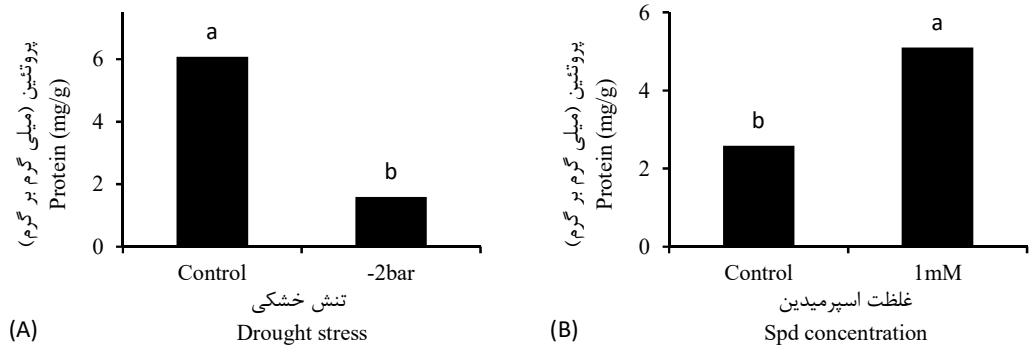
Figure 4. The effect of spermidin on CAT activity (U/mg protein.min) in soybean seedling under drought stress



شکل ۵ - تاثیر پلی آمین اسپرمیدین بر فعالیت پراکسیداز در گیاهچه سویا در تنش خشکی

Figure 5. The effect of spermidine polyamine on peroxidase activity in soybean seedling under drought stress

بر اساس نتایج (جدول ۱)، تنها اثر ساده تنش خشکی و اسپرمیدین بر میزان پروتئین محلول در سطح یک درصد معنی‌دار بود. استفاده از پیش‌تیمار اسپرمیدین باعث افزایش محتوی پروتئین محلول شد (شکل ۶). از سوی دیگر، تنش خشکی موجب کاهش معنی‌دار محتوی پروتئین گردید (شکل ۶). در پژوهش مشابهی کمبود آب باعث کاهش تدریجی در پروتئین‌های محلول کل در همه قسمت‌های گیاه شده است (Ashraf and Iram, 2005).



شکل ۶- اثرات ساده تنش خشکی (A) و اسپرمیدین (B) بر میزان پروتئین محلول در گیاهچه‌های سویا

Figure 6. The simple effects of drought stress (A) and spermidine (B) on soluble protein amount in soybean seedlings

نتیجه‌گیری کلی

استفاده از پلی‌آمین اسپرمیدین برای پیش‌تیمار بذر توانست شاخص های‌های جوانه‌زنی در گیاه سویا رقم کاسپین را، از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدان تحت شرایط تنش خشکی بهبود ببخشد. در این میان غلظت پلی‌آمین عاملی موثر در افزایش تحمل به تنش بود به طوری که غلظت یک میلی‌مولار دارای روند مثبت و پایداری در تاثیر بر شاخص‌های جوانه‌زنی تحت تنش خشکی به خصوص در تنش متوسط (۲- بار) بود. در بیشتر موارد غلظت بالاتر پلی‌آمین اسپرمیدین (دو میلی-مولار) تاثیری بر بهبود تحمل به تنش خشکی نشان نداد. هر چند تحقیقات بیشتری لازم است تا چگونگی نقش اسپرمیدین در بهبود تحمل به تنش خشکی به ویژه در شرایط مزرعه‌ای مورد تایید قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از راهنمایی‌ها و نظرات ارزشمند سرکار خانم مهندس سیده حدیثه بهاری ساروی، آقای دکتر یاسر

یعقوبیان و سرکار خانم مهندس مریم جنابیان در انجام کارهای آزمایشگاهی سپاسگزاری می‌گردد. همچنین از مساعدت‌های پژوهشکده‌ی ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری قدردانی می‌گردد.

منابع

Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. Method of Enzymology. 105:121-12. **(Journal)**

Afzal, I., Munir, F., Ayeh, C. M., Basra, S. M. A., Hamed, A. and Nawaz, A. 2009. Changes in antioxidant enzymes, germination capacity and vigor of tomato seeds in response of priming with polyamines. Seed Science and Technology. 37:765-770. **(Journal)**

AlizadehForotan, M., Pirdashti, H., Yaghoubian, Y. and Babaeizad, V. 2016. The effect of Paklobutrazol and incubution fungus *Piriformospora indica* on activity of antioxidant enzymes and morphological characteristics of green bean (*Phaseoluse vulgaris*) under cold stress. Journal of Plant Process and Function 5: 133-146. (In Persian) **(Journal)**

Almaghrabi, O. A. 2012. Impact of drought stress on germination and seedling growth parameters of some wheat cultivars. Life Science Journal. 9: 590-598. **(Journal)**

Arab, G. H., Mozaffari, S. and Enayati Kaliji, H. 2017. Caspian soybean. Promotional Magazine, Ministry of Agriculture. (In Persian)

Ashraf, M. and Iram, A. 2005. Drought stress induced changes in some organic substances in nodules and other plant parts of two potential legumes differing in salt tolerance. Flora. 200: 535-546. **(Journal)**

Basra, S. M. A., Ashraf, M., Iqbal, N., Khaliq, A. and Ahmad, R. 2004. Physiological and biochemical aspects of pre-sowing heat stress on cotton seed. Seed Sciences and Technology. 32:756-774. **(Journal)**

Bates, L. S., Waldern, R. P. and Tear, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water- stress studies. Plant and Soil. 39: 205-207. **(Journal)**

Bouchereau, A., Larher, F. and Martin-Tangay, J. 1999. Polyamines and environmental challenges: recent and development. Plant and Science. 140: 103-125. **(Journal)**

Bradford, M. M. 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Methods of Biochemical Analysis. 72: 248-254. **(Journal)**

Dodd, G. L. and Donovan, L. A.1999.Water potential and ionic effects on germination and seedling growth of two cold desert shrubs. American Journal of Botany. 86: 1146-1153. **(Journal)**

Farooq, M., Basra, S. M. A., Hossain, M., Rehman, H. and Saleem, B. A. 2007. Incorporation of polyamines in the priming media enhances the germination and early seedling growth in hibrids sunflower (*Helianthus annus* L.). International Journal of Agriculture and Biology. 9: 868-872. **(Journal)**

Farooq, M., Aziz, T., Rehman, H. and Hossain,M. 2008. Seed priming polyamines improves the germination and early seedling growth in fine rice. Journal of New Seeds. 9: 145-155. **(Journal)**

Farooq, M., Wahid, A., Lee, D. J., Cheema, S. A. and Aziz, T. 2010. Comparative time course action of the foliar applied glycinebetaine, salicylic acid, nitrous oxide, brassinosteroids and spermine in improving drought resistance of rice. Journal of Agronomy and Crop Science. 196: 336-345. **(Journal)**

Farooq, M., Aziz, T., Reman, H., Rehman, A. and Aziz, S. A. 2011. Evaluating surface drying and re-drying for wheat seed priming with polyamines effects of emergence: early seedling growth and starch metabolism. Acta Physiologica Plantarum. 33: 1707-1713. **(Journal)**

Farrokhi, A., Galeshi, S., Zeinali, E. and Abdoul zadeh, A. 2004. Evaluation of drought tolerance genotypes of soybean [*Glycine max.* (L.) Merril] in germination stage. Journal of Agriculture Science and Natural Resources. 11: 21-28. (In Persian) **(Journal)**

Fazel Kakhaki, F., Nezami, A., Parsa, M. and Kafi, M. 2014. Evaluation of germination parameters and seedling growth of seasame ecotypes under salt stress. Environmental Stresses in Crop Sciences, 7(2): 217-232. (In Persian) **(Journal)**

Hasogawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K. and Bohnert, H. J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Plant Molecular Biology. 51: 463-497. **(Journal)**

Iraki, S. N., Bressan, R. A. and Carpita, N. C. 1989. Cell walls of tobacco cells and changes in composition associated with reduced growth upon adaptation to water and saline stress. Plant Physiology. 91: 48-53. **(Journal)**

Kuznetsov, V. I. V., Rakitin, V., Sadomov, N. G., Dam, D. V., Stetsenko, L. A. and Shevyakova, N. I. 2002. Do polyamines participate in the long- distance translocation of stress signals in plants? Russian Journal of Plant Physiology. 49:136-147. **(Journal)**

Kuznetsov, V. I. V., Radyukina, N. L. and Sheryakova, N. I. 2006. Polyamines and stress: biological role, metabolism, and regulation. Russian Journal of Plant Physiology. 53(5): 583-604. **(Journal)**

Meachel, B. and Kuffman, M. R. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. Plant Physiology. 51: 914-916. **(Journal)**

Minocha, R., Minocha, S. C. and Long, S. 2004. Polyamines and their biosynthetic enzymes during somatic embryo development in red spruce (*Picea rubens* Sarg.). In Vitro Cellular Developmental Biology. 40: 527-580. **(Journal)**

Moradi Dezfuli, P., Sharif-zadeh, F. and Janmohammadi, M. 2008. Influence of priming techniques on seed germination behavior of maize inbred lines (*Zea mays* L.). Journal of Agricultural and Biological Science. 3: 22-25. (In Persian) **(Journal)**

Rohollahi, I., Kafi, M., Syyad Amin, P. and Arghavani, M. 2009. Salinity effect on germination and initial growth of *pea pranthesis, Cynodon dactylon, Lolium perenum.* Pajohesh and Sazandegi. 81:147-153. (In Persian) **(Journal)**

Salimi Tamalla, N., Seraj, F., Pirdashti, H. and Yaghoubian, Y. 2014. The effect of seed biopriming by *Piriformospora indica* and *Trichoderma virens* on the growth, morphological and physiological parameters of mongbean (*Vigna radiate* L.) seedlings. Iranian Journal of Seed Science and Research. 1: 67-78. (In Persian) **(Journal)**

Shehab, G. G., Ahmed, O. K. and El-Betagi, H. S. 2010. Effects of various chemical agents for alleviation of drought stress in rice plants *(Orhyza sativa* L.). Notulae Botanicae Hort Agrobotanici Cluj-Napoca. 38: 139-148. **(Journal)**

Shevyakova, N. I., Rakitin, V., Duong, D. B., Sadomov, N. G. and Kuznetsov, V. 2001. Heat shock-induced cadaverine accumulationand traslocation throughout the plant. Plant Science. 161: 1125-1133. **(Journal)**

Singh, K. P. 2001. Effect of water stress on seed germination and seedling growth of some wheat genotypes. Advance in Plant Science. 14: 23-26. **(Journal)**

Soltani, A., Zeinali, E., Galeshi, S. and Latifi, N. 2001. Genetic variation for and interrelationships among seed vigor traits in wheat from the Caspian Sea coast of Iran. Seed Science and Technology. 29: 653-662. (In Persian) **(Journal)**

Soltani, E., Akram-Ghaderi, F. and Maemar, H. 2008. The effect of priming on germination components and seedling growth of cotton seeds under drought. Journal of Agricultural Science and Natural Resources. 14: 75-82. (In Persian) **(Journal)**

Smieikalis, K. D., Mullen, R. E., Carlson, R. E. and Knapp, A. D. 1989. Drought-induced stress effects on soybean seed calcium and quality. Crop Science. 29:1519-1523. **(Journal)**

Talaat, N. B., Shawky, B. T. and Ibrahim, A. S. 2015. Alleviation of drought-induced oxidative stress in maize (*Zea mays* L.) plants by dual application of 24- epibrassinolide and spermine. Environmental and Experimental Botany. 113: 47-58. **(Journal)**

Tang, W. and Newton, R. J. 2005. Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus strobus* L.) zygotic embryos. Journal of Plant Physiology and Biochemistry. 43:730-769. **(Journal)**

Wada, Y., Miyamoto, T., Kusano, T. and Sano, H. 2004. Association between up-regulation of stress-responsive genes and hypomethylation of genomic DNA in tobacco plants. Molcular Genetic and Genomics. 271: 658-666. **(Journal)**

Yaghoubian, Y., Mohammadi-Goltapeh, E., Pirdashti, H., Esfandiari, E., Feiziasl, V. and Kari Dolatabadi, H. 2014. Effect of *Glomus mosseae* and *Piriformospora indica* on growth and antioxidant defense responses of wheat plants under drought stress. Agriculture Research. 3: 239-245. (In Persian)**(Journal)**

Yoshimura, K., Yabuta Y., Ishikawa, T. and Shigeoka, S. 2000. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. Plant Physiology, 123: 223–233.

Zhu, J. K. 2001. Plant salt tolerance. Trands in Plant Science. 6: 65-71. **(Journal)**

Effect of seed priming with spermidine on boosting germination indicators and activity of some antioxidant enzymes in drought-stressed soybean seedlings

Masoumeh Heidar Gholinezhad[*1], Manoochehr Gholipour[2], Hemat Allah Pirdashti[3], Hamid Abasdokht[2]

Received: December 24, 2017 Accepted: February 18, 2018

Abstract

In order to evaluate the effect of priming by spermidin polyamine on increasing drought stress at germination and seedling growth stages of soybean, cv. Caspian, a factorial experiment was conducted based on completely randomized design with four replications at Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University in 2016. The treatments were three drought stress levels (0, -2 and -4 bar) and three spermidine levels (0, 1 and 2 mM). The results showed that application of spermidine at the rate of 1 mM improved germination properties including germination maximum, germination rate, germination uniformity, times to 10, 50 and 90% germination, radicle length, seedling weight and final germination under mild drought stress (-2 bar). High dose of spermidine could not improve the tolerance to intensive stress in evaluated traits. Application of 1 mM spermidine led to increased activity of antioxidant enzymes ascorbat peroxidase, peroxidase, catalase, and amount of soluble protein in mild drought stress conditions compared to control. It was found no interaction between spermidine and drought stress for protein concentration. Generally results indicated that the pretreatment of seeds with spermidine improved tolerance to moderate drought stress through boosting germination indices and increasing activity of antioxidant enzymes in soybean seedlings.

Keywords: Antioxidant enzymes; Drought tolerance boosting; Drought; Germination indicators

How to cite this article

Heidar Gholinezhad, M., Gholipour, M., Pirdashti, H., Abasdokht, H. 2019. Effect of seed priming with spermidine on boosting germination indicators and activity of some antioxidant enzymes in drought-stressed soybean seedlings. Iranian Journal of Seed Science and Research, 5(4): 59-70. (In Persian)(**Journal)**

COPYRIGHTS

Copyrights for this article are retained by the author(s) with publishing rights granted to the Iranian Journal of Seed Science and Research

The content of this article is distributed under Iranian Journal of Seed Science and Research open access policy and the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY4.0) License. For more information, please visit http://jms.guilan.ac.ir/

1. Ph.D Student of Agronomy, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran
2. Associate Professor, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran
3. Associate Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
*Corresponding author Email: hmasoumeh@rocketmail.com