علوم و تحقیقات بذر ایران
سال ششم/ شماره چهارم/ ۱۳۹۸ (۴۸۳ - ۴۷۱)

DOI: 10.22124/jms.2020.3926

اثر پلی‌آمین‌ها بر جوانه‌زنی، بیان برخی ژن‌ها و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در بذرهای کم‌بنیه جو

محمد صدقی[1*]، حوریه توکلی[2]، نصیبه توکلی[2]، سولماز عزیزی[2]، سحر قلی‌طلوعی[3]

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۶/۲۶

چکیده

به منظور بررسی اثرات فرسودگی بذر و کاربرد پلی‌آمین‌ها بر شاخص‌های جوانه‌زنی، بیان ژن و فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانت گیاهچه‌های جو آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. تیمارهای آزمایش شامل سه سطح فرسودگی (شاهد، ۱۱ و ۱۴ روز) و دو نوع پلی‌آمین (پوترسین و اسپرمین) بود. صفات اندازه‌گیری شامل شاخص‌های جوانه‌زنی، فعالیت چند آنزیم آنتی‌اکسیدانت و بیان ژن‌های مربوط به آن‌ها بود. نتایج بررسی نشان داد که فرسودگی بذر به‌مدت ۱۴ روز موجب کاهش درصد جوانه‌زنی به میزان ۲۴ درصد نسبت به شاهد شد، ولی کاربرد پوترسین آن را حدود ۱۸ درصد افزایش داد. سرعت جوانه‌زنی نیز در بذرهای ۱۴ روز فرسوده‌شده به میزان ۳۶ درصد کاهش داشت که کاربرد اسپرمین آن را تا حدود ۸۷/۵ درصد افزایش داد. وزن خشک ساقه‌چه و ریشه‌چه به‌ترتیب در حدود ۲ و ۳ برابر در تیمار کاربرد پوترسین و عدم فرسودگی نسبت به شاهد بیش‌تر بود. بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز و سوپراکسید دیسمیوتاز در بذرهای فرسوده به‌مدت ۱۴ روز با کاربرد پوترسین مشاهده شد. میزان بیان نسبی ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون ترانسفراز در تیمار پوترسین و بذرهای فرسوده به-مدت ۱۴ روز، ۸ و ۲۲ برابر نسبت به شاهد بیش‌تر شد. همچنین، بیان نسبی ژن‌های *HSP90* و *PR10* نیز در همین تیمار به ترتیب ۵ و ۸ برابر شاهد بود. به‌طورکلی، کاربرد پوترسین تا حدود زیادی موجب بهبود قدرت بذر جو گردید که این امر می-تواند ناشی از بهبود شرایط اکسیداتیو سلول، مقاومت پروتئین‌های بذر به دلیل فعالیت بیش‌تر *HSP90* و افزایش غلظت درون‌زاد هورمون‌های بذر باشد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، بیان ژن، پروتئین‌های شوک حرارتی، جو

۱- استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۲- دانشجوی دکتری زراعت، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۳- دانشجوی دکتری ویروس‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
*نویسنده مسئول: m_sedghi@uma.ac.ir

مقدمه

فرسودگی بذر پدیده‌ای فیزیولوژیک است که پس از رسیدگی فیزیولوژیک بذر و در دوره پس از برداشت در شرایط بالابودن دما و رطوبت محیط نگهداری بذر به‌تدریج آغاز می‌شود و موجب تخریب DNA و RNA ریبوزومی می‌شود (McDonald, 1999). همچنین موجب به هم خوردن تعادل بین رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) و سیستم‌های آنتی‌اکسیدانت می‌شود (Paul and Foyer, 2001). اثرات زیانبار ROS می‌تواند شامل آسیب‌های اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک باشد (Khan *et al*., 2012).

مطالعات اخیر نشان می‌دهد که سطح ROS و محافظت‌کننده‌ها در سلول کنترل می‌شود. گیاهان دارای آنتی‌اکسیدانت‌های با وزن مولکولی کم (اسید آسکوربیک، گلوتاتیون ردوکتاز، کاروتنوئیدها، توکوفرول‌ها) و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD; E.C. 1.15.1.1) آسکوربات پراکسیداز (APX; E.C. 1.11.1.11) و کاتالاز (CAT; E.C. 1.11.1.6) هستند که سطوح ROS را کنترل و مانع از آسیب به غشاها و ماکرومولکول‌ها می‌شوند (Sharma and Dietz, 2009).

گیاهان دارای راهکارهای طبیعی بسیاری هستند که می‌توانند از خود در مقابل شرایط تنش‌زا دفاع کنند. آن‌ها می‌توانند تعداد متعددی ژن کاربردی و نظارتی تولید کنند (Bartels and Sunkar, 2005). علاوه بر این پاسخ‌ها، مولکول‌هایی به نام پلی‌آمین نیز گیاه را در مقابله با تنش‌ها یاری می‌کند. پلی‌آمین‌ها (پوترسین، اسپرمین، اسپرمیدین و کاداورین) علاوه بر اثرات تثبیت‌کنندگی که از طریق اتصال به آنیون‌های داخل سلولی مانند DNA و RNA انجام می‌دهند، دارای چندین عملکرد نظارتی نیز هستند (Alcázar *et al*., 2010). پلی‌آمین‌ها فرآیندهای فیزیولوژیک بسیاری از قبیل اندام‌زایی، جنین‌زایی، رشد و نمو گل، پیری برگ، رشد و رسیدن میوه و پاسخ به استرس‌های زنده و غیرزنده محیطی را تنظیم می‌کند (Kusano *et al*., 2008). پژوهش‌ها نشان می‌دهد که در هنگام بروز تغییرات محیطی، پلی‌آمین‌ها هم از نظر ترکیب و هم از نظر غلظت دچار نوسان می‌شوند (Burritt, 2008).

برخی بررسی‌ها مؤید این مطلب است که پیش‌تیمار بذر با تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی علاوه بر افزایش جوانه‌زنی و سبزشدن بذرها، رشد و عملکرد نهایی گیاهان حاصل از بذرهای پیش‌تیما شده را افزایش می‌دهد (Yari *et al*., 2010؛ Basra *et al*., 1994). استفاده از روش پیش‌تیمار می‌تواند خطرات از دست‌رفتن محصول در شرایط نامساعد را به حداقل برساند. خان و همکاران (Khan *et al*., 2012) با بررسی اثر پیش‌تیمار با پلی‌آمین‌ها بر جوانه‌زنی بذر فلفل تند اظهار داشتند که افزایش غلظت اسپرمین موجب افزایش مدت زمان ۵۰ درصد جوانه‌زنی و کاهش قدرت جوانه‌زنی بذر شد، ولی بر طول ساقه‌چه و ریشه‌چه اثری نداشت. غلظت ۷۵ میلی‌مول از اسپرمیدین موجب کاهش درصد و قدرت جوانه‌زنی نسبت به غلظت‌های دیگر آن شد، ولی طول ریشه‌چه را اندکی افزایش داد. غلظت‌های مختلف پوترسین اثر معنی‌داری بر شاخص‌های جوانه‌زنی نداشت.

نوح‌پیشه و کلانتری (Noohpishe and Kalantari, 2011) نشان دادند که تیمار با اسپرمیدین در شرایط بدون تنش موجب کاهش طول ریشه‌چه شد، ولی در شرایط تنش شوری تیمار اسپرمیدین موجب افزایش طول گردید. این پژوهشگران همچنین اظهار داشتند که اثر تیمار با اسپرمیدین بسته به شدت تنش و غلظت اسپرمیدین مورد استفاده متفاوت بود.

فاروق و همکاران (Farooq *et al*., 2011) با بررسی اثر پیش‌تیمار بذر با پلی‌آمین‌ها بر سب شدن و رشد اولیه گیاهچه نشان دادند که پیش‌تیمار موجب کاهش مدت جوانه‌زنی بذر نسبت به شاهد شد، به‌طوری‌که بیش‌ترین درصد جوانه‌زنی و کم‌ترین مدت جوانه‌زنی برای پیش‌تیمار اسپرمیدین با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر با خشک‌شدن سطحی حاصل شد.

آنزیم‌های گلوتامیل ترانسفراز و سوپراکسیددیسمیوتاز از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت هستند که در شرایط تنش‌های مختلف و هنگام تولید رادیکال‌های آزاد، نقش دفاعی بارزی دارند و افزایش فعالیت آن‌ها موجب بهبود شرایط تنش در سلول می‌گردد. افزایش بیان ژن این آنزیم‌ها (به‌ترتیب ژن‌های *GST* و *SOD*) بیانگر کارایی سیستم‌های آنتی‌اکسیدانت در حذف رادیکال‌های آزاد و کمک به تعادل شرایط تنش است (Shagimardanova *et al*., 2010). ژن پروتئین شوک حرارتی ۹۰ (*HSP90*)، یکی از مولکول‌های مهم چاپرون است که در تاخوردن پروتئین‌ها و حفاظت از ساختمان آن‌ها نقش عمده‌ای

دارد. این مولکول‌ها تاحدودی نقش آنتی‌اکسیدانت نیز دارند و در شرایط تنش به حفظ ساختمان پروتئین‌ها و آنزیم‌ها کمک می‌کنند (O'Boyle *et al*., 2011).

به نظر می‌رسد که پلی‌آمین‌ها در مقاومت گیاهان به بیماری‌ها نقش دارند و موجب افزایش بیان پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR) در گیاهان می‌شوند. *PR10* یکی از این پروتئین‌هاست که در هنگام بروز بیماری‌های ویروسی به‌شدت بیان پیدا می‌کند و گیاه را در مقابل عامل بیماری‌زا محافظت می‌کند. غیر از آلودگی‌های ویروسی، عواملی مثل کاربرد هورمون‌های گیاهی، صدمات مکانیکی، افزایش سن بافت گیاهی و تنش‌های غیرزیستی نیز موجب افزایش بیان این پروتئین‌ها می‌شوند (Janne *et al*., 2004).

از آن‌جایی‌که بذر مهم‌ترین نهاده در کشاورزی است و بیش‌ترین سهم را در جهت افزایش و یا کاهش عملکرد دارد، جهت دست‌یابی آسان به حداکثر عملکرد دانه و بهره‌وری بیش‌تر لزوم استفاده از بذر قوی و با کیفیت عالی بیش از هر زمان احساس می‌گردد. در این پژوهش سعی شده است تا اهمیت بیان برخی از ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و افزایش فعالیت آن‌ها در شرایط فرسودگی بررسی بررسی شود و همچنین، تاثیر کاربرد موادی مانند پلی‌آمین‌ها در کاهش آسیب‌های ناشی از تنش فرسودگی ارزیابی گردد.

مواد و روش‌ها

برای بررسی اثر پلی‌آمین‌ها بر رفتار جوانه‌زنی و بیان ژن‌ها در بذرهای فرسوده جو، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار اجرا شد. بذر جو (رقم بهمن) ابتدا در شرایط فرسودگی سریع (دمای ۴۰ درجه سلسیوس و رطوبت بالای ۹۰ درصد) به‌مدت صفر، ۱۱ و ۱۴ روز قرار گرفت و سپس با پلی‌آمین‌ها (پوترسین و اسپرمین با غلظت ۱۵ میلی‌گرم در لیتر) پیش‌تیمار شد. بذرها قبل از کاشت با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به - مدت ۳ دقیقه ضدعفونی و پس از شستشو با آب مقطر، به پتریدیش منتقل شد. برای هر تیمار، چهار تکرار صدتایی از بذر در نظر گرفته شد.

بذرهای جوانه‌زده در هر روز شمارش و سرعت جوانه-زنی (فرمول ۱) محاسبه گردید (Ellis, 1992):

$$GR = \sum_{I=1}^{N} \frac{Si}{Di} \quad \text{(رابطه ۱)}$$

در این رابطه GR = سرعت جوانه‌زنی (تعداد بذر جوانه‌زده در هر روز)، Si= تعداد بذر جوانه‌زده در هر روز، Di= تعداد روز تا شمارش nام و N= تعداد دفعات شمارش است.

در انتهای دوره آزمون رشد گیاهچه، نمونه‌ها به آون ۷۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ ساعت منتقل و پس از خشک‌شدن، وزن خشک ریشه‌چه و ساقه‌چه اندازه‌گیری گردید.

برای استخراج عصاره حاوی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت ۰/۵ گرم بافت برگ از هر تیمار به‌خوبی ساییده شد. سپس، با افزودن ۱۰-۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات سرد حاوی ۰/۵ میلی‌مول EDTA هموژنیزه و در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه، به‌مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد (Sairam *et al*., 2002). برای استخراج و تعیین فعالیت آسکوربات پراکسیداز از روش ناکانو و آسادا (Nakano and Asada, 1981)، برای تعیین فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسمیوتاز از روش جیانوپلیتیس و ریز (Giannopolitis and Ries, 1977)، برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX) از روش کاتو و شیمیزو (Kato and Shimizu, 1987) و برای تعیین فعالیت پلی‌فنل اکسیداز از روش کار و میشرا (Kar and Mishra, 1976) استفاده شد.

در این پژوهش میزان بیان ژن برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت از جمله گلوتامیل ترانسفراز (*GST*) و سوپراکسید دیسمیوتاز (*SOD*) به‌همراه پروتئین شوک حرارتی *HSP90* و پروتئین *PR10* بررسی شد. برای این منظور با استفاده از شماره دسترسی ژن‌های مربوطه در سایت NCBI توالی‌های مربوطه جهت طراحی آغازگر به-دست آمد و با رعایت تمام اصول اساسی در طراحی آغازگر و با تعیین اندازه ۱۰۰ تا ۲۰۰ جفت بازی برای محصول PCR آغازگر طراحی شدند (جدول ۱).

برای استخراج RNA کل از نمونه‌های برگ، از کیت استخراج RNX-plus شرکت سیناژن استفاده گردید. کیفیت RNA استخراج شده در ژل آگارز ۱ درصد ارزیابی شد. جهت تعیین درجه خلوص و غلظت نمونه‌های RNA از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودرآپ (Thermoscientific, 2000c) استفاده و کمیت نمونه‌ها بررسی شد. سپس

نمونه‌های RNA با آنزیم DNase I (RNase – free, Fermentase) تیمار و به‌عنوان الگوی واکنش RT-PCR قرار گرفتند. پس از یکسان‌سازی غلظت نمونه‌های RNA، cDNA مربوط به هر نمونه با استفاده از کیت سنتز cDNA (Thermo scientific) طبق دستورالعمل کیت ساخته شد.

بررسی بیان ژن با اسفاده از دستگاه Real time PCR مدل Light cycler 96 Roche انجام شد. هر واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۷/۵ میکرولیتر مخلوط سایبرگرین، ۰/۳ میکرومولار از هر آغازگر رفت (Forward primer) و آغازگر برگشت (Reverse primer)، ۵۰ نانوگرم cDNA الگوی رقیق شده و آب عاری از نوکلئاز بود. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده‌اند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس، سپس ۴۰ چرخه (شامل ۱۵ ثانیه ۹۵ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه در ۶۰ درجه سلسیوس) بود. پس از پایان واکنش PCR رسم منحنی ذوب واکنش در دمای ۹۵-۶۰ درجه سلسیوس با اختلاف ۰/۵ درجه در هر چرخه انجام گرفت. به‌منظور استانداردکردن داده‌ها، نمونه‌ها با ژن خانه‌دار اکتین نرمال گردیدند. نرخ بیان ژن با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001) محاسبه شد. رسم نمودارها با نرم افزار Excel 2013 انجام گردید.

جدول ۱- توالی آغازگرهای رفت و برگشت استفاده‌شده در qRT-PCR برای ژن‌های هدف مورد بررسی
Table 1. Sequences of the forward and reverse primers used in qRT-PCR for target genes

ژن هدف Gene	توالی آغازگر Primer sequence	طول قطعه تکثیرشده Product size (bp)	دمای اتصال Annneling temperature (°C)	شماره دسترسی NCBI Acc. No.
HSP90	5' GACTCCCAGAACAGGACCAA 3' 5' GTTCTCCACAGCCTTCTTGC 3'	159	60	AY325266.1
GST	5' TCAACCACTTCCCCTACACC 3' 5' AGATCACGGCTTCTTGGGAA 5'	155	60	AF430069.1
SOD	5' TTTCTGTTCCCCTTCCAGCA 3' 5' TCACATTTCCGAGGTCACCA 3'	152	60	KU179440.1
PR10	5' AAGGTAAGTGGCCAGCTCAA 3' 5' CTCGACCATCTTGAGCAGGT 3'	180	60	KP293851.1
Actin (ACT)	5′-GTGTTTCCTAGTATTGTTGGTCG-3′ 5′-TGATGCCAGATCTTCTCCAT-3′	125	60	BT013524

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه‌های آماری و مقایسه میانگین‌ها پس از اطمینان از نرمال‌بودن داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD استفاده گردید. رسم شکل و نمودارها با بهره‌گیری از نرم‌افزار Excel انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

درصد جوانه‌زنی

اثرات ساده فرسودگی و پلی‌آمین‌ها بر درصد جوانه‌زنی معنی‌دار شد (جدول ۲). فرسودگی به‌شدت درصد جوانه‌زنی را کاهش داد، به‌طوری‌که کم‌ترین درصد جوانه‌زنی (۷۱ درصد) در بذرهای ۱۴ روز فرسوده‌شده قابل مشاهده بود و بیش‌ترین درصد جوانه‌زنی (۹۳ درصد) مربوط به شاهد بود (شکل ۱-A). کاربرد پلی‌آمین‌ها توانست موجب افزایش درصد جوانه‌زنی شود و بیش‌ترین درصد جوانه‌زنی (۸۶ درصد) مربوط به کاربرد پوترسین بود و کم‌ترین درصد جوانه‌زنی (۷۳ درصد) در شاهد مشاهده شد (شکل ۱-B). فرسودگی بذر موجب کاهش کیفیت و استقرار بذر می‌شود. طی فرآیند فرسودگی، اولین مولفه‌ای که کاهش می‌یابد، کیفیت بذر است که بر کاهش ظرفیت جوانه‌زنی و قدرت حیات موثر است (Basra *et al*., 2003). فرسودگی به‌طور معنی‌داری جوانه‌زنی، سبزشدن و رشد گیاهچه‌ها را کاهش می‌دهد (Soltani *et al*., 2008).

برخی از پژوهش‌ها نشان می‌دهند که پیش‌تیمار بذر درصد جوانه‌زنی را در بذرهای فرسوده افزایش می‌دهد (Fujikura *et al*., 1993). همچنین، استفاده از پیش تیمار به‌ویژه در شرایط نامطلوب موجب افزایش درصد، سرعت و یکنواختی جوانه‌زنی، سب شدن بذرها و گیاهچه‌ها و ظهور یکنواخت ریشه‌چه و ساقه‌چه شد (Mauromicale and Cavallaro, 1995). استفاده از

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری‌شده بر اثر کاربرد پلی‌آمین‌ها در بذرهای فرسوده جو

Table 2. Analysis of variance for the measured traits in aged barley seeds as affected by polyamines

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	پراکسیداز POX	سوپراکسید دیسمیوتاز SOD	آسکوربات پراکسیداز APX	پلی فنل اکسیداز PPO	گلوتاتیون ردوکتاز GR	درصد جوانه‌زنی GP	وزن خشک ریشه‌چه RDW	وزن خشک ساقه‌چه PDW
فرسودگی Aging (A)	2	0.77**	0.019 ns	0.073 ns	0.014 **	0.005 **	1103**	0.044 **	0.18 **
پلی‌آمین Polyamine (P)	2	2.675**	0.304**	2.3 **	0.18 **	0.011 **	367**	0.035 **	0.39 **
(P) * (A)	4	0.045*	0.074**	0.097 **	0.004 *	0.0004 ns	59 ns	0.009 **	0.04 **
خطا (error)	18	0.01	0.015	0.02	0.001	0.0002	35	0.0003	0.01
ضریب تغییرات CV(%)	-	4.37	22	5.2	9.3	12.4	7.4	11	13.2

ns، * و ** به ترتیب بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار و معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد است

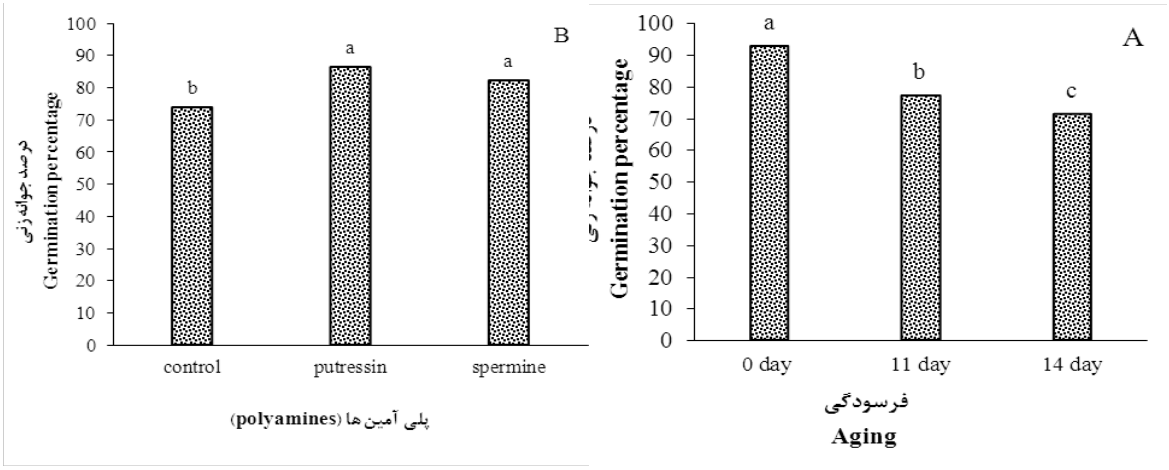
ns, * and ** represent the non-significant, significant effect at 1 and 5 % probability levels, respectively

POX=peroxidase; SOD=superoxide dismutase; APX= ascorbate peroxidase; PPO=poly phenoloxidase; GR=germination rate; GP=germination percentage; RDW=radicle dry weight; PDW=plumule dry weight.

پلی‌آمین‌ها موجب افزایش جوانه‌زنی، رشد و عملکرد محصولات زراعی می‌شود (Lee *et al*., 1998). سعیدنژاد و همکاران (Saeidnejad *et al*., 2012) بیان کردند که پیش‌تیمار با اسپرمین موجب بهبود جوانه‌زنی شد. اشرف و رئوف نیز (Ashraf and Rauf, 2001) نیز گزارش کردند که پیش‌تیمار بذر در ذرت، جوانه‌زنی و استقرار اولیه را بهبود بخشید.

سرعت جوانه‌زنی

اثرات ساده فرسودگی و پلی‌آمین‌ها بر سرعت جوانه‌زنی معنی‌دار شد (جدول ۲). فرسودگی به‌شدت سرعت جوانه‌زنی را کاهش داد، به‌طوری‌که کم‌ترین سرعت جوانه‌زنی (۰/۰۹) در بذرهای ۱۴ روز فرسوده‌شده و بیش‌ترین سرعت جوانه‌زنی (۰/۱۴) مربوط به شاهد بود (شکل ۲-A). کاربرد پلی‌آمین‌ها توانست موجب افزایش سرعت جوانه‌زنی شود و بیش‌ترین سرعت جوانه‌زنی (۰/۱۵) مربوط به کاربرد اسپرمین و کم‌ترین سرعت جوانه‌زنی (۰/۰۸) در شاهد مشاهده شد (شکل ۲-B). فرسودگی سرعت جوانه‌زنی را به‌شدت کاهش داد که با نتایج سایر پژوهش‌ها مطابقت دارد (Verma *et al*., 2003؛ Kapoor *et al*., 2010). به عقیده کوپلند و مک‌دونالد (Copeland and McDonald, 2001) توده‌های بذری با درصد جوانه‌زنی مشابه، ممکن است سرعت جوانه‌زنی متفاوتی داشته باشند، بنابراین این شاخص برای تشخیص بذرهایی با توانایی جوانه‌زنی مطلوب مناسب است.

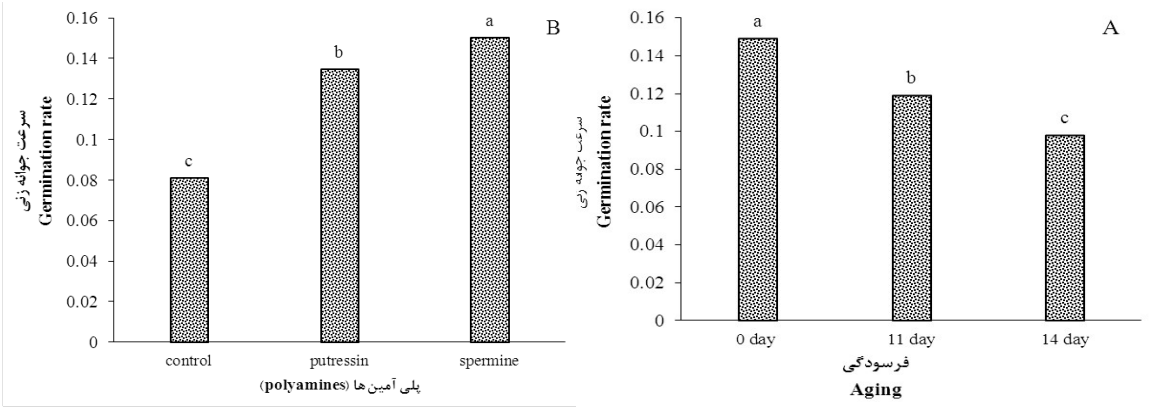


شکل ۱- اثر فرسودگی (A) و پلی‌آمین‌ها (B) بر درصد جوانه‌زنی بذر جو

Figure 1. Effect of aging (A) and polyamines (B) on germination percenage of barley seed

در یک بررسی، فرسودگی بذر گندم زمان شروع و پایان جوانه‌زنی را افزایش داد. با افزایش سطح فرسودگی در این بذرها، از درصد و سرعت جوانه‌زنی کاسته شد، به طوری‌که تیمار شاهد (بدون اعمال فرسودگی) بیش‌ترین درصد و سرعت جوانه‌زنی را داشت (Soltani *et al*., 2008). به احتمال زیاد، فرسودگی موجب تاخیر در

فرآیندهای متعدد جذب آب و شروع فعالیت‌های آنزیمی می‌گردد و به دنبال این پدیده سرعت جوانه‌زنی کاهش پیدا می‌کند. در پژوهشی دیگر مشاهده شد که کاربرد پلی‌آمین‌ها موجب افزایش سرعت جوانه‌زنی گردید. محققان دریافتند که پلی‌آمین‌ها با افزایش میزان پروتئین محلول و فعالیت آنزیم‌ها از جمله آنزیم کاتالاز و کاهش نفوذپذیری غشا موجب بهبود سرعت جوانه‌زنی و رشد گیاهچه نسبت به تیمار شاهد شدند. آن‌ها نتیجه گرفتند که افزایش سرعت جوانه‌زنی توسط پیش‌تیمار بذر در جهت استقرار همزمان و یکنواخت گیاهچه حایز اهمیت است (Demir and Mavi, 2004).



شکل ۲- اثر فرسودگی (A) و پلی‌آمین‌ها (B) بر سرعت جوانه‌زنی بذر جو

Figure 2. Effect of aging (A) and polyamines (B) on germination rate of barley seed

وزن خشک ساقه‌چه و ریشه‌چه

اثر متقابل فرسودگی و پلی‌آمین‌ها بر میزان وزن خشک ساقه‌چه معنی‌دار بود (جدول ۲). وزن خشک ساقه‌چه بر اثر فرسودگی به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد و در سطح فرسودگی دوم (۱۱ روز فرسودگی) کم‌ترین میزان وزن خشک ساقه‌چه (۰/۴۸ گرم) به عدم کاربرد پلی‌آمین‌ها تعلق یافت. درحالی‌که در بذرهای بدون فرسودگی کاربرد پوترسین و اسپرمین بیش‌ترین میزان وزن خشک ساقه (۱/۱ گرم) را به خود اختصاص دادند (جدول ۳). از عوامل کاهش طول ساقه‌چه در شرایط تنش، کاهش یا عدم انتقال مواد غذایی از لپه‌ها به جنین گزارش شده است، علاوه بر آن کاهش جذب آب توسط بذر در شرایط تنش موجب کاهش ترشح هورمون‌ها و فعالیت آنزیم‌ها و در نتیجه اختلال در رشد گیاهچه شامل ریشه‌چه و ساقه‌چه می‌شود (Kafi *et al*., 2005) و کاهش رشد در نهایت منجر به کاهش وزن خشک می‌گردد. یان‌پینگ و همکاران (Yan-Ping *et al*., 2010) بیان کردند که پیش‌تیمار بذر با پوترسین و اسپرمیدین موجب افزایش وزن ساقه‌چه شد.

وزن خشک ریشه‌چه تحت تاثیر تیمارهای فرسودگی و پلی‌آمین‌ها قرار گرفت (جدول ۲). نتایج نشان داد که کاربرد پلی‌آمین‌ها به‌طور معنی‌داری موجب افزایش تجمع ماده خشک در ریشه گردید، به‌طوری‌که در بذرهای سالم (شاهد فرسودگی) کاربرد پلی‌آمین‌ها به ویژه اسپرمین توانست موجب افزایش سه برابری وزن خشک ریشه‌چه نسبت به شاهد شود. این درحالی بود که در بذرهای فرسوده کاربرد پوترسین نسبت به اسپرمین کارآمدتر بود. بیش‌ترین وزن خشک ریشه‌چه به کاربرد اسپرمین در شرایط بدون فرسودگی و کم‌ترین میزان آن به عدم کاربرد پلی‌آمین‌ها در ۱۴ روز فرسودگی تعلق گرفت (جدول ۳). یان‌پینگ و همکاران (Yan-Ping *et al*., 2010) با بررسی اثر پیش‌تیمار بذر با اسپرمین و اسپرمیدین بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه اظهار داشتند که پیش‌تیمار بذر موجب افزایش درصد جوانه‌زنی و وزن ریشه‌چه شد. مک-دونالد (McDonald, 1999) بیان کرد که مناطق مریستمی جنین به‌ویژه ریشه‌چه بیش‌تر تحت تاثیر فرسودگی قرار می‌گیرد. بنابراین کاهش وزن ریشه‌چه بر اثر فرسودگی اجتناب‌ناپذیر است. برخی از مواد شیمیایی از جمله پلی‌آمین‌ها به‌عنوان مولکول‌های سیگنالی ممکن است اثرات مطلوبی بر رشد و گسترش گیاه داشته باشند

(Bradford, 1995). سینگ و رائو (Singh and Rao, 1993) گزارش کردند که پرایمینگ بذر موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آلفا آمیلاز، بتاآمیلاز و دهیدرژناز گردید. بنابراین افزایش فعالیت آنزیمی می‌تواند موجب بهبود جوانه‌زنی، رشد ریشه‌چه و رشد و نموگیاهچه شده باشد.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

اثر متقابل تیمارهای آزمایشی بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز معنی‌دار بود (جدول ۲). کاربرد تیمارهای پوترسین و اسپرمین توانست تاثیر مثبتی بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز داشته باشد و فرسودگی نیز تا حدودی بر میزان فعالیت آسکوربات پراکسیداز افزود. بیش‌ترین فعالیت آسکوربات پراکسیداز (۳/۲۷ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) به کاربرد اسپرمین در شرایط بدون فرسودگی اختصاص یافت که اختلاف آماری معنی‌داری با کاربردی اسپرمین در بذرهای ۱۱ و ۱۴ روز فرسوده‌شده نداشت. کم‌ترین فعالیت آسکوربات پراکسیداز (۲/۰۹ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) نیز به شاهد (عدم کاربرد پلی‌آمین‌ها و بدون فرسودگی) تعلق گرفت (جدول ۳). آنتی‌اکسیدانت‌ها می‌توانند با کم‌کردن انواع اکسیژن فعال از فرسودگی بذر جلوگیری و روند آن را کندتر کنند، ولی کاهش مقدار آنتی‌اکسیدانت‌ها پس از ادامه یافتن روند فرسودگی می‌تواند نشان‌دهنده شکست مکانیسم دفاعی سیستم‌های آنتی‌اکسیدانت بذر در برابر این رادیکال‌ها باشد. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت بذر در روزهای اول فرسودگی افزایش می‌یابند، ولی با افزایش روند فرسودگی قابلیت دفاع را از دست می‌دهند و از مقدار آن‌ها کاسته می‌شود (Kaewnaree *et al.,* 2011). آسکوربات پراکسیداز از رایج‌ترین مکانیسم‌ها برای سمیت‌زدایی ROS تولیدشده در طول تنش است (Gressel and Galun, 1994) که می‌تواند پراکسید هیدروژن را حذف کند. این آنزیم دارای سوبسترای اختصاصی به نام آسکوربات است که از طریق اکسیداسیون این مولکول در حضور رادیکال پراکسید هیدروژن، موجب تولید آب می‌گردد (Wahid *et al*., 2007).

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای فرسودگی و پلی‌آمین بر فعالیت آنزیمی و وزن گیاهچه جو

Table 3. Comparison of means for the interaction between aging and polyamines on enzymatic activity and seedling weight of barley

فرسودگی (روز) Aging (day)	پلی‌آمین Polyamine	پراکسیداز POX (U mg^{-1} protein)	سوپراکسید دیسمیوتاز SOD (U mg^{-1} protein)	آسکوربات پراکسیداز APX (U mg^{-1} protein)	پلی فنل اکسیداز PPO (U mg^{-1} protein)	وزن خشک ریشه‌چه RDW (g)	وزن خشک ساقه‌چه PDW (g)
0	شاهدCotrol	1.17	0.28	2.09	0.17	0.13	0.52
	پوترسینPutressin	2.32	0.42	2.57	0.44	0.23	1.1
	اسپرمینSpermine	2.05	0.83	3.27	0.43	0.36	1.1
11	شاهدCotrol	1.6	0.45	2.21	0.22	0.08	0.48
	پوترسینPutressin	2.39	0.61	3.05	0.47	0.16	0.72
	اسپرمینSpermine	2.53	0.65	3.17	0.38	0.16	0.66
14	شاهدCotrol	1.8	0.33	2.27	0.25	0.07	0.55
	پوترسینPutressin	2.69	0.82	3.03	0.57	0.15	0.92
	اسپرمینSpermine	2.81	0.65	3.09	0.44	0.11	0.73
	LSD	0.2483	0.2138	0.2534	0.0602	0.0306	0.1716

In each coloumn means which are greater than LSD value are different statistically at 5% probability level
POX=peroxidase; SOD=superoxide dismutase; APX= ascorbate peroxidase; PPO=poly phenoloxidase; RDW=radicle dry weight; PDW=plumule dry weight.

فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز

اثر متقابل تیمارهای آزمایشی بر میزان فعالیت پلی‌فنل اکسیداز معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج نشان داد که در بذرهای سالم و فرسوده پیش‌تیمار نشده، فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در حداقل بود و تشدید فرسودگی بذر تا حدودی توانست موجب افزایش فعالیت پلی‌فنل اکسیداز شود. این درحالی بود که کاربرد پلی‌آمین‌ها به‌ویژه پوترسین توانست فعالیت این آنزیم را به‌طور معنی‌داری افزایش دهد. به‌طوری‌که بیش‌ترین فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز (۰/۵۷ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) به کاربرد پوترسین در بذرهای فرسوده در ۱۴ روز تعلق گرفت و کم‌ترین فعالیت این آنزیم (۰/۱۷ واحد بر میلی‌گرم

پروتئین) در شاهد قابل مشاهده بود (جدول ۳). پلی‌آمین‌ها در مراحل مختلف فیزیولوژیک و نموی گیاهان نقش دارند (Kaur-Sawhney *et al*., 2003). بهره‌گیری از پیش‌تیمار پلی‌آمین موجب ظهور سریع‌تر ریشه و ساقه، تولید گیاهان با بنیه قویتر، تحمل بالاتر نسبت به شرایط نامساعد محیطی، گلدهی زودتر، تسریع در برداشت و بهبود عملکرد می‌شود (Kaur *et al*., 2002). پلی‌فنل اکسیداز با استفاده از اکسیژن، در اکسیداسیون ترکیبات دی‌فنل نقش دارد و از این طریق موجب کاهش اکسیژن درون سلولی و در نهایت کاهش تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود (Yoruk and Marshall, 2003).

فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز

فعالیت سوپراکسیددیسموتاز نیز تحت تاثیر اثر متقابل پلی‌آمین‌ها و فرسودگی قرار گرفت (جدول ۲). فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در شرایط بدون فرسودگی و عدم کاربرد پلی‌آمین‌ها در حداقل مقدار (۰/۲۸ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) بود، ولی فرسودگی توانست موجب افزایش فعالیت این آنزیم گردد و کاربرد پلی‌آمین‌ها نیز به افزایش فعالیت سوپراکسیددیسموتاز کمک کرد. به‌طوری‌که بیش‌ترین فعالیت این آنزیم به کاربرد اسپرمین در شرایط بدون فرسودگی تعلق گرفت که با کاربرد پوترسین در بذرهای فرسوده (۱۴ روز فرسودگی) تفاوت آماری معنی‌داری نداشت (جدول ۳).

طی تنش اکسیداتیو اولین ROS تولید شده رادیکال سوپراکسید است (Bowler *et al*., 1992) که توسط پیوند دوگانه با لیپیدها واکنش می‌دهد و منجر به پراکسیداسیون چربی‌ها می‌شود (Sunkar, 2010). اولین خط دفاعی آنزیم‌ها در برابر تنش اکسیداتیو فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز است که منجر به حذف سوپراکسید و تبدیل آن به پراکسید هیدروژن می‌شود (Sedghi *et al*., 2012). با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که کاربرد پیش‌تیمار پوترسین در بذرهای فرسوده می‌تواند تا حدود زیادی موجب بهبود فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانت بذر شود و درصد جوانه‌زنی را بهبود بخشد.

فعالیت آنزیم پراکسیداز

نتایج نشان داد که کاربرد پلی‌آمین‌ها و فرسودگی تاثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت پراکسیداز داشت (جدول ۲). با توجه به مقایسه میانگین اثرات متقابل، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اثر فرسودگی و کاربرد پلی‌آمین‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، به‌طوری‌که بیش‌ترین فعالیت پراکسیداز (۲/۸ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) به کاربرد اسپرمین در شرایط ۱۴ روز فرسودگی تعلق گرفت که با کاربرد پوترسین در همین سطح از فرسودگی تفاوت آماری معنی‌داری نداشت. کم‌ترین میزان فعالیت پراکسیداز (۱/۱۷ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) نیز به شاهد اختصاص یافت (جدول ۳). آنزیم پراکسیداز در سیتوزول و کلروپلاست حضور دارد و می‌تواند پراکسید هیدروژن را تجزیه کند. این عمل به‌ویژه در کلروپلاست که کاتالاز حضور ندارد، حایز اهمیت است (Huseynova, 2012). پلی‌آمین‌های اگزوژن فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز را افزایش می‌دهند که این عمل همزمان با تولید پرولین است (Öztürk and Demir, 2003). فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز موجب تولید پراکسید هیدروژن می‌گردد که در مراحل بعد این رادیکال به کمک پراکسیداز یا کاتالاز به آب تجزیه می‌شود. بنابراین افزایش فعالیت این آنزیم نیز در شرایط پیش‌تیمار با پلی‌آمین‌ها نشان از بهبود شرایط فیزیولوژیک بذرهای فرسوده دارد که در نهایت با افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی همراه بوده است.

بیان ژن

تغییرات بیان ژن بر اساس داده‌های نرمال‌شده در جدول ۴ ارایه شده است. نتایج نشان داد که بیان ژن‌های *HSP90*، *PR10*، *GST* و *SOD* در شاهد در حداقل بود. بیان اندک این ژن‌ها در شرایط طبیعی (تیمار شاهد)، بیانگر نقش آن‌ها در متابولیسم ثانویه است، زیرا در شرایط طبیعی و عدم وجود استرس، نیازی به مقادیر بالای بیان ژن‌های دفاعی نیست (Nims *et al*., 2006). با این حال در بذرهای فرسوده تشدید بیان ژن‌های *HSP90*، *PR10*، *GST* و *SOD* قابل مشاهده بود و پلی‌آمین‌ها تاثیر سینرژیک بر افزایش بیان این ژن‌ها در بذرهای فرسوده داشتند، به‌طوری‌که کاربرد پوترسین در بذرهای ۱۴ روز فرسوده شده موجب افزایش ۵ برابری بیان *HSP90* نسبت به شاهد شد. همچنین، کاربرد پوترسین افزایش ۸ برابری بیان *PR10* را در بذرهای ۱۴ روز فرسوده‌شده نشان داد. علاوه بر این، بر اثر کاربرد پوترسین در بذرهای ۱۴ روز فرسوده‌شده بیان ژن آنزیم‌های *GST* و *SOD* به ترتیب ۲۲ و ۸ برابر بیش‌تر از شاهد بود.

جدول ۴- میزان بیان نسبی ژن‌های *HSP90*، *PR10*، *GST* و *SOD* بر اثر فرسودگی و پیش‌تیمار با پلی‌آمین‌ها در جو

Table 4. Relative gene expression values for *HSP90*, *PR10*, *GST* and *SOD* genes as affected by aging and polyamine priming in barley

فرسودگی Aging (day)	پلی‌آمین‌ها Polyamines	*HSP90*	*PR10*	*GST*	*SOD*
	control	1 e	1 f	1 g	1 f
control	Putressin	2 d	3 d	5 e	2 e
	Spermine	2 d	2 e	3 f	2 e
	control	2 d	1 f	3 f	3 d
11	Putressin	4 b	5 bc	19 c	9 a
	Spermine	3 c	4 c	14 d	7 b
	control	2 d	2 e	3 f	2 e
14	Putressin	5 a	8 a	25 a	8 a
	Spermine	3 c	6 b	22 b	5 c

در هر ستونْ میانگین‌های دارای حرف مشترک از نظر آماری تفاوت معنی‌داری ندارند

In each coloumn, means with the same letter have not significant differnec.

در پژوهش حاضر مشاهده شد که *HSP90* بر اثر فرسودگی و کاربرد پلی‌آمین‌ها به‌ویژه پوترسین افزایش یافت. پرونوتو و همکاران نیز (Prunotto *et al*., 2010) نشان دادند که پلی‌آمین‌ها موجب افزایش بیان *HSP90* می‌شوند. بر اساس گزارش‌های موجود RNAs پروتئین شوک حرارتی (HSP90) می‌تواند تا ۱۰ برابر افزایش یابد. HSPsها قادرند از دناتوره‌شدن پروتئین‌ها جلوگیری کنند. پرایمینگ بذر موجب افزایش میزان اسیدهای نوکلئیک، پروتئین و افزایش تحرک مواد ذخیره‌شده در بذر می‌گردد، در نتیجه بذر سریع‌تر جوانه می‌زند و گیاهچه در سطح خاک ظاهر می‌گردد. جوانه‌زنی سریع‌تر موجب افزایش بنیه و استقرار گیاه می‌شود و بهتر می‌تواند از منابع استفاده کند و عملکرد نهایی آن نیز افزایش می‌یابد (Bradford, 1995).

ژن‌هایی که پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR10) را کد می‌کنند، در بسیاری از گونه‌های گیاهی شناسایی شده‌اند. این پروتئین‌ها وزن مولکولی کم (۱۵-۱۸ کیلو دالتون) دارند (Markovic-Housley *et al.,* 2003). بیان ژن‌های *PR10* در پاسخ به پاتوژن‌ها در گیاهان مشاهده شده است (McGee *et al*., 2001)، ولی در این پژوهش مشاهده شد که فرسودگی و کاربرد پلی‌آمین‌ها نیز می‌تواند موجب افزایش بیان ژن *PR10* گردد. یکی از هورمون‌هایی که اثر قوی بر تولید PR دارد، اسید سالیسیلیک است که حتی در گیاهان سالم بدون حضور بیمارگر موجب القای پروتئین‌های PR می‌گردد. در این پژوهش به احتمال زیاد غلظت درون‌زای اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک تحت تاثیر فرسودگی و پیش‌تیمار با پلی‌آمین‌ها قرار گرفته است و در نتیجه آن تولید PR افزایش یافته است. این فرضیه نیاز به بررسی و آزمایش دارد.

بیان ژن *GST* در گیاهچه‌های جو بر اثر تیمارهای فرسودگی و پلی‌آمین‌ها افزایش یافت. گلوتامیل ترانسفرازها جزو آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت هستند (Lederer and Boger, 2005). در گیاه فرفیون رونویسی و فعالیت این آنزیم به‌طور گسترده‌ای در بافت‌هایی که تحت تنش‌های محیطی هستند، افزایش می‌یابد (Anderson and Davis, 2003). ظرفیت پاک‌سازی GST، بستگی به شدت بیان این ژن در گیاهان مختلف دارد (Tausz, 2003). از نتایج این مطالعه و نتایج مشابه سایر محققان می‌توان استنباط کرد که در جو بر اثر تیمارهای فرسودگی و پلی‌آمین‌ها، GST در محدودکردن آسیب‌های اکسیداتیو و دیگر پاسخ‌ها به تنش‌ها مشارکت می‌کند. این پروتئین‌ها با متابولیسم گیاهی و دفاع در برابر تنش با انواع اکسیژن واکنش‌پذیر مرتبط هستند.

افزایش بیان ژن *SOD* بر اثر کاربرد پلی‌آمین‌ها و فرسودگی قابل مشاهده بود. آنزیم SOD از بزرگ‌ترین آنزیم‌های شکننده عوامل مخرب (انواع اکسیژن فعال) در گیاه است و سوپراکسید را به مولکول اکسیژن و H_2O_2 کاتالیز می‌کند (Sedghi *et al*., 2012). سمیت پراکسید هیدروژن نسبت به O_2^- کم‌تر است (Sunkar, 2010). خسارت اکسیداتیو در رشته‌های DNA به‌صورت جهش و تغییر در بیان ژن‌ها بروز و ظهور می‌کند.

سوپراکسیددیسموتاز به‌عنوان آنزیم مهمی در کاهش سمیت رادیکال‌های اکسیژن شناخته شده است (Pagani *et al*., 1995).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج کلی نشان داد که فرسودگی موجب کاهش شاخص‌های جوانه‌زنی شامل درصد و سرعت جوانه‌زنی، وزن تر و خشک ریشه‌چه و ساقه‌چه گردید، درحالی‌که کاربرد پلی‌آمین‌ها (پوترسین و اسپرمین) موجب افزایش این صفات در بذرهای فرسوده‌شده و سالم شد. در بذرهای فرسوده میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت (پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسمیوتاز) افزایش یافت و کاربرد پلی‌آمین‌ها توانست بر فعالیت آن‌ها بیفزاید. بیان ژن‌های *HSP90*، *PR10*، *GST* و *SOD* بر اثر تنش ناشی از فرسودگی بذرها و کاربرد پلی‌آمین‌ها (پوترسین و اسپرمین) افزایش نشان داد. این ژن‌ها موجب تولید پروتئین‌هایی می‌شوند که در سیستم دفاعی سلول نقش دارند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مسئولین دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., Carrasco, P. and Tiburcio, A. 2010. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. Planta, 231(6): 1237-1249. **(Journal)**

Anderson, J. and Davis, D. 2003. Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione *S*-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in (*Euphorbia esula*). Plant Biology, 32:430-441. **(Journal)**

Ashraf, M. and Rauf, H. 2001. Inducing salt tolerance in maize (*Zea mays* L.) through seed priming with chloride salt growth and ion transport at early growth stages. Acta Physiologiae Plantarum, 23:407-414. **(Journal)**

Bartels, D. and Sunkar, R. 2005. Drought and Salt Tolerance in Plants. Critical Reviews in Plant Sciences, 24(1): 23-58. **(Journal)**

Basra, A.S., Singh, B. and Malik, C.P. 1994. Priming-induced changes in Polyamine levels in relation to vigor of aged Onion seeds. Botanical Bulletine of Academia Sinica, 35(1): 19-23. **(Journal)**

Basra, S.M.A., Ahmad, N., Khan, M.M., Iqbal, N. and Cheema, M.A. 2003. Assessment of cotton seed deterioration during accelerated ageing. Seed Science and Technology, 31: 531-542.. **(Journal)**

Bowler, C., Van Montagu, M. and Inzé, D. 1992. Superoxide dismutases and stress tolerance. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 43: 83-116. **(Journal)**

Bradford, K.J. 1995. Water relations in seed germination. In "Seed Development and Germination " (J. Kigel and G. Galili, Eds.). pp. 351-396. Marcel Dekker Inc. New York. **(Book)**

Burritt, D. 2008. The polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene causes oxidative stress and alters polyamine metabolism in the aquatic liverwort *Ricciafluitans* L. Plant, Cell & Environment, 31(10): 1416-1431. **(Journal)**

Copeland, L.O. and McDonald. M.B. 2001. Principles of seed science and technology John Wiley and Sons, New York. 4th edition. **(Book)**

Demir, I. and Mavi, K. 2004. The effect of priming on seedling emergence of differentially matured watermelon (Citrullus lanatus (Thunb.) Matsum and Nakai) seeds. Scientia Horticulturae, 102:467–473. **(Journal)**

Ellis, R.H. 1992. Seed and seedling vigour in relation to crop growth and yield. Plant Growth Regulation, 11: 249-255.

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

Fujikura, Y., Kraak, H.L., Basra, A.S. and Karssen, C.M. 1993. Hydropriming a simple and inexpensive priming method. Seed Science and Technology, 21:693-642. **(Journal)**

Giannopolitis, C.N. and Ries, S.K. 1977. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. Journal of Plant Physiology, 59: 309-314. **(Journal)**

Gressel, J. and Galun, E. 1994. Genetic controls of photo- oxidant tolerance, pp. 237-274. In: Causes of Photo-Oxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants. Foyer CH, Mullineaux PM, eds. CRC Press. **(Book)**

Huseynova, I. 2012. Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of leaves from wheat cultivars exposed to drought. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1817(8): 1516-1523. **(Journal)**

Janne, J., Alhonen, L., Pietia, M., and Keinanen, T.A. 2004. Genetic approach to the cellular function of polyamines in Arabidopsis. European Journal of Biochemistry, 271: 877-894.

Kaewnaree, P., Vichitphan, S., Klanrit, P., Siri, B. and Vichitphan, K. 2011. Effect of accelerated aging process on seed quality and biochemical chnages in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). Seed Biotechnology, 10(2): 175-182. **(Journal)**

Kafi, M., Nezami, A., Hosaini, H. and Masomi, A. 2005. Physiological effects of drought stress by polyethylene glycol on germination of lentil (*Lens culinaris* Medik.) genotypes. Iranian Journal of Field Crops Research. 3(1): 69-80.

Kapoor, N., Arya, A., Siddiqui, M.A., Amir, A. and Kumar, H. 2010. Seed deterioration in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under accelerated ageing. Asian Journal of Plant Science, 9: 158-162. **(Journal)**

Kar, M. and Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology 578: 315-319. **(Journal)**

Kato, M. and Shimizu, S. 1987. Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves: phenolic-dependent peroxidative degradation. Canadian Journal of Botany, 65, 729–735. **(Journal)**

Kaur, S., Gupta, A.K. and Kaur, N. 2002. Effect of osmo-and hydropriming of chickpea seeds on seedling growth and carbohydrate metabolism under water deficit stress. Plant Growth Regulation, 37: 17- 22. **(Journal)**

Kaur-Sawhney, R., Tiburcio, A.F., Altabella, T. and Galston, A.W. 2003. Polyamines in plants: and overview. Journal of Cellular and Molecular Biology, 2: 1-12. **(Journal)**

Khan, H.A., Ziaf, K., Amjad, M. and Iqbal, Q. 2012. Exogenous application of polyamines improves germination and early seedling growth of hot pepper. Chilean Journal of Agricultural Research, 72(3): 429-433. **(Journal)**

Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C. and Takahashi, Y. 2008. Polyamines: essential factors for growth and survival. Planta, 228(3): 367-381. **(Journal)**

Lederer, B. and Boger, P. 2005. A ligand function of glutathione s-transferase. Plant Physiology, 171:63-87. **(Journal)**

Lee, S.S., Kim, J.H., Hong, S.B., Yun, S.H. and Park, E.H. 1998. Priming effect of rice seeds on seedling establishment under adverse soil conditions. Korean Journal of Crop Science, 43: 194-198. **(Journal)**

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 25: 402-408. **(Journal)**

Markovic-Housley, Z., Degano, M., Lamba, D., von Roepenack-Lahaye, E., Clemens, S., Susani, M., Ferreira, F., Scheiner, O. and Breiteneder, H. 2003. Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. Journal of Molecular Biology, 325:123–133. **(Journal)**

Mauromicale, G. and Cavallaro, V. 1995. Effects of seed osmopriming on germination of tomato at different water potential. Seed Science and Technology, 23(2): 393-403. **(Journal)**

McDonald, M.B. 1999. Seed deterioration: Physiology, repair and assessment. Seed Science and Technology, 27: 177-237. **(Journal)**

McGee, J.D., Hamer, J.E. and Hodges, T.K. 2001. Characterization of a PR-10 pathogenesis- related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 14:877–886. **(Journal)**

Nakano, Y. and Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology, 22: 267–280. **(Journal)**

Nims, E., Dubois, C.P., Roberts, S.C. and Walker, E.L. 2006. Expression profiling of genes involved in paclitaxel biosynthesis for targeted metabolic engineering. Metabolic Engineering, 8: 385-394. **(Journal)**

Noohpishe, Z. and Kalantari, Kh.M. 2011. The interaction effects of spermidine application and salinity stress in pepper plants. International journal of Biology, 24(6): 848-857. **(Journal)**

O'Boyle, N.M., Knox, A.J., Price, T.T., Williams, D.C., Zisterer, D.M., Lloyd, D.G. and Meegan, M.J. 2011. Lead identification of β-lactam and related imine inhibitors of the molecular chaperone heat shock protein 90. Bioorganic and Medicinal Chemistry. 19(20): 6055–6068. **(Journal)**

Öztürk, L. and Demir, Y. 2003. Effects of putrescine and ethephon on some oxidative stress enzyme activities and proline content in salt stressed spinach leaves. *Plant Growth Regulation,* 40:89–95. **(Journal)**

Pagani, S., Colnaghi, R., Palagi, A. and Negri, A. 1995. Purification and characterization of an iron superoxide dismutase from the nitrogen-fixing Azotobacter vinelandii. FEBS Letter, 357(1):79-82. **(Journal)**

Paul, M.J. and Foyer, C.H. 2001. Sink regulation of photosynthesis. Journal of Experimental Botany, 52: 1383–1400. **(Journal)**

Prunotto, M., Compagnone, A., Bruschi, M., Candiano, G., Colombatto, S., Bandino, A., Petretto, A., Moll, S., Luce, M., Piallat, B., Gabbiani, G., Dimuccio, V., Parola, M., Citti, L. and Ghiggeri, G. 2010. Endocellular polyamine availability modulates epithelial-to-mesenchymal transition and unfolded protein response in MDCK cells. Laboratory Investigation, 90: 929–939. **(Journal)**

Saeidnejad, A.H., Pouramir, F. and Naghizadeh, M. 2012. Improving chilling tolerance of maize seedlings under cold conditions by Spermine application. Notulae Scientia Biologicae, 4(3): 110-117. **(Journal)**

Sairam, R.K., Rao, K.V. and Srivastava, G.C. 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolytes concentration. Plant Science, 163:1037-1046. **(Journal)**

Sedghi, M., Seyed Sharifi, R., Pirzad, A., Amanpour-Balaneji, B. 2012. Phytohormonal regulation of antioxidant systems in petals of drought stressed Pot Marigold (*Calendula officinalis* L.). Journal of Agricultural Science and Technology, 14(4): 869-878. **(Journal)**

Sharma, S.S. and Dietz, K.J. 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. Trends in Plant Science, 14:43–50. **(Journal)**

Singh, B.G. and Rao G. 1993. Effect of chemicals soaking of sunflower seed on vigor index. Indian Journal of Agricultural Sciences, 63:232-233. **(Journal)**

Soltani, E., Kamkar, B., Galeshi, S. and Akram Ghaderi, F. 2008. The effect of seed deterioration on seed reserves depletion and heterotrophic seedling growth of wheat. Journal of Agricultural Science and Natural Resources. 15(1): 46-54. **(Journal)**

Sunkar, R. 2010. Plant Strss Tolerance (Methods and Protocols). Department of Biochemistry and Molecular Biology. 401p. **(Book)**

Tausz, M. 2003. The Role of Glutathione in plant response and adaptation to natural stress. Plant Ecophysiology, 45:102-122. **(Journal)**

Verma, S.S., Verma, U. and Tomer, R.P.S. 2003. Studies on seed quality parameters in deteriorating seeds in Brassica (*Brassica campestris*). Seed Science and Technology, 31: 389-396. **(Journal)**

Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M. and Foolad, M.R. 2007. Heat tolerance in plants: an overview. Environmental and Experimental Botany, 61 (3): 199-223. **(Journal)**

Yan-ping, Z., Hai-he, L., Shu-xing, S., Cheng-he, Z. and Xin-e, H. 2010. Effect of polyamine priming on seed vigor and seedling chilling tolerance in eggplant. Acta Horticultrae Sinica, 37(11): 1783–1788. **(Journal)**

Yari, L., Aghaalikani, M. and Khazaei, F. 2010. Effect of seed priming duration and temperature on seed germination behavior of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Journal of Agricultural and Biological Sciences, 5(1): 1-6. **(Journal)**

Yoruk, R. and Marshall, M.R. 2003. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. Journal of Food Biochemistry. 27: 361-422. **(Journal)**

Effect of polyamines on germination, expression of some genes and activity of antioxidant enzymes in barley seeds with low vigour

Mohammad Sedghi[1], Hourieh Tavakoli[2], Nasibeh Tavakoli[2], Solmaz Azizi[2], Sahar Gholi-Tolouie[3]

Received: February 6, 2018 Accepted: September 17, 2018

Abstract

In order to investigate the effects of seed aging and application of polyamines on the germination indices, gene expression and antioxidant enzymes activity in barley, a factorial experiment conducted based on completely randomized design with three replications. Treatments consisted of three aging levels (0, 11 and 14 days) and polyamines (putrescine and spermine). Germination indices, activity of antioxidant enzymes and expression of some genes were studied. Results showed that aging decreased germination percentage (GP) about 24 % in comparison to the control, but putrescine application increased GP about 18%. Germination rate (GR) decreased in the seeds aged for 14 days about 36 % and spermine increased GR about 87.5 %. Plumule and radicle dry weight increased 2 and 3 folds, respectively in putrescine and non-aged treatment rather than control. The highest activity of ascorbate peroxidase, peroxidase, polyphenol oxidase and superoxide dismutase (SOD) observed in the seeds aged over 14 days with putrescine application. Relative expression of genes encoding SOD and glutathione transferase was 8 and 22 folds greater, respectively in putrescine applied seeds aged for 14 days over control. Relative expression rate for *HSP90* and *PR10* genes was 5 and 8 folds greater than control, respectively in the same treatment. In conclusion, putrescine application invigorated the weak barley seeds and it can be related to improving the oxidative state of cells, greater protein conservation by high activity of HSP90 and increasing in the endogenous levels of seed hormones. Further in depth studies require to prove the role of hormones in seed vigor.

Keywords: Antioxidant enzymes; Barley; Gene expression; Heat shock proteins

How to cite this article

Sedghi, M., Tavakoli, H., Tavakoli, N., Azizi, Solmaz. and Gholi-Tolouie, S. 2020. Effect of polyamines on germination, expression of some genes and activity of antioxidant enzymes in barley seeds with low vigour. Iranian Journal of Seed Science and Research, 6(4): 471- 483. (In Persian)**(Journal)**

DOI: 10.22124/jms.2020.3926

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. Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabili, Iran

2. Ph.D student of Agronomy, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabili, Iran

3. Ph.D student of Virology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz. Iran

*Corresponding author: m_sedghi@uma.ac.ir