نشریه پژوهش‌های اکوفیزیولوژی گیاهی ایران، شماره پیاپی ۳۱، سال هشتم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲/صفحات: ۹۰-۷۸

تاثیر پوتریسین برون زا بر میزان ترکیبات فنلی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و نیترات ردوکتاز دانه رست گیاه بنگ دانه (*Hyoscyomus niger*) تحت تنش خشکی

زهرا زمانی[۱]، مریم نیاکان*[۲]، مه‌لقا قربانلی[۳]

[۱] کارشناس‌ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، گرگان

[۲] دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، گرگان

[۳] استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، گرگان

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۳۱

چکیده

در این پژوهش جهت اعمال تیمار خشکی از پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ با غلظت ۱۵۰ گرم در لیتر معادل ۲- بار (تنش ملایم خشکی) و ۲۵۰ گرم در لیتر معادل ۷- بار (تنش شدید خشکی) و برای اعمال تیمار پلی‌آمین از پوتریسین با غلظت ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌مولار به‌صورت مستقل و ترکیبی به شکل ۹ تیمار همراه با ٤ تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد و تغییرات میزان ترکیبات فنلی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و نیترات ردوکتاز دانه رست بنگ دانه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد در شرایط تنش شدید خشکی ترکیبات فنلی دانه رست نسبت به شاهد کاهش یافت و کاربرد غلظت ۰/۰۵ میلی‌مولار پوتریسین در شرایط غیرتنش و تنش منجر به افزایش معنی‌دار میزان ترکیبات فنلی گردید. همچنین در شرایط تنش خشکی افزایش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و پلی‌فنل‌اکسیداز و آسکوربات پراکسیداز دانه‌رست مشاهده شد. کاربرد پوتریسین در هر دو غلظت در شرایط تنش شدید خشکی منجر به افزایش فعالیت کاتالاز دانه‌رست شد. میزان فعالیت پلی فنل اکسیداز دانه‌رست نیز در شرایط تنش شدید خشکی، با افزودن غلظت‌های مختلف پوتریسین کاهش معنی‌داری یافت. مطابق با نتایج بدست آمده فعالیت آسکوربات پراکسیدازی دانه‌رست در تنش‌های خشکی به همراه کاربرد غلظت ۰/۰۵ میلی‌مولار پوتریسین افزایش و در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار منجر به کاهش فعالیت آنزیم شد. فعالیت نیترات ردوکتاز نیز در تنش خشکی ملایم و شدید نسبت به شاهد کاهش یافت و کاربرد پوتریسین در غلظت ۰/۰۵ میلی‌مولار موجب افزایش فعالیت آنزیم نامبرده در تنش خشکی شدید شد. با توجه به نتایج این تحقیق کاربرد پوتریسین برون زا توانست با تغییر سیستم آنتی‌اکسیدانی و نیز نیترات ردوکتازی روند پاسخ‌های بیوشیمیایی دانه رست گندم را درجهت مقابله با تنش خشکی تعدیل کند.

واژگان کلیدی: آنزیم‌های آنتی اکسیدان، بنگ دانه، پوتریسین، ترکیبات فنلی، تنش خشکی

مقدمه

مقاومت به خشکی یک واژه عمومی است که به یکسری از مکانیسم‌ها که موجب مقاومت گیاه به آب و هوای خشک می‌شوند اطلاق می‌گردد (Crawfor, 1988). خشکی طولانی‌مدت منجر به تولید و تجمع رادیکال‌های آزاد سمی در سلول‌های گیاهی و آسیب به آنها خواهد شد. برای بقاء و تداوم رشد گیاه، این رادیکال‌ها باید حذف شوند و ساختارهای سلولی توسط پروتئین‌ها یا متابولیت‌های تنشی همچون مانیتول، پرولین، فروکتان، گلیسین بتائین، تری‌هالوزها

*نویسنده مسئول: mnniakan@yahoo.com

و دی اونیتول محافظت شوند (Ashraf et al., 1996). تحقیقات نشان داده است گیاهانی که مقدار بیشتری از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر کاتالاز پراکسیداز از نوع ساختاری یا القایی داشته باشند، در برابر آسیب‌های اکسیداتیو مقاومت بیشتری نشان می‌دهند (Ashraf and Bashir, 2006).

نیترات ردوکتاز یکی از آنزیم‌های کلیدی در فرایندهای مربوط به مصرف نیترات می‌باشد. شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد تنظیم نیترات ردوکتاز در گیاهان عالی دارای پیچیدگی است. همچنین پژوهش‌های متعدد بیان می‌کنند که پاسخ این آنزیم بسته به شرایط محیطی تغییر می‌کند (Werner et al., 1995). حضور نیترات که سبب بیان ژن‌های سازنده و یا کاهش فرایندهای تخریبی آن می‌گردد در القاء و افزایش این آنزیم نقش بسزایی دارد (Campbell, 1996). منشاء تنش‌هایی نظیر محدودیت غذایی با تنش آبی آغاز می‌شود. با افزایش کمبود آب، میزان آمونیفیکاسیون (آزاد شدن آمونیوم از ترکیبات آلی نیتروژن‌دار) و نیتریفیکاسیون (اکسیداسیون آمونیوم به نیترات) کاهش یافته و مقدار نیتروژن قابل دسترس به منظور همگن‌سازی کم و بدنبال آن از فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز کاسته می‌شود (Thomas and Sodek, 2005).

پلی‌آمین‌ها پلی کاتیون‌های مهمی هستند که در مراحل مختلف فیزیولوژیک و نموی گیاهان نقش دارند. پلی‌آمین‌ها در القای تقسیم سلولی، جنین زائی، ریخت زائی، نمو گل، میوه و دانه و پیری نقش ایفا می‌کنند. مهمترین پلی‌آمین‌ها شامل اسپرمیدین (تری آمین) اسپرمین (تترا آمین) و پیش‌ساز آنها پوترسین (دی آمین) است. در بافت گیاهان پلی‌آمین‌ها به شکل هم یوغ[1] با مولکول‌های آلی دیگر و یا به شکل آزاد یافت می‌شوند (Martin-Tanguy, 2001). اخیراً نقش پلی‌آمین‌ها در افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های غیرزیستی، از جمله شوری و خشکی مورد توجه قرار گرفته است (Groppa and Benavides, 2008). در بسیاری از موارد، تنش به انباشتگی پلی‌آمین‌های آزاد و هم‌یوغ منجر می‌گردد که نشان دهنده اهمیت نقش پلی‌آمین‌ها در پاسخ‌های بیوشیمیایی گیاهان به تنش است (Martin-Tanguy, 2001). تحقیقات نشان داده است تمام تنش‌های غیرزیستی، تنش اکسیداتیو را القا کرده که یکی از پیامدهای آن در سلول پراکسیداسیون لیپیدها می‌باشد (Apel and Hirt, 2004) در این راستا گزارش شده است پلی‌آمین‌ها بواسطه ویژگی پلی کاتیونی خود مانند ترکیبات آنتی اکسیدانی عمل کرده وسبب برداشت رادیکال‌های آزاد و در نتیجه مهار پراکسیداسیون لیپیدها می گردند .از میان پلی‌آمین‌ها، انواع هم یوغ شده با مولکول‌های دیگر، از اهمیت بیشتری در مقاومت به تنش برخوردارند. اتصال پلی‌آمین‌های آزاد به درشت مولکول‌ها، موجب حفاظت آنها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود، در حالی که نقش پلی‌آمین‌های آزاد، عمدتاً در تعادل اسمزی و pH سلولی است (Martin-Tanguy, 2001). پلی‌آمین‌ها معمولاً با ترکیبات فنلی، از جمله هیدروکسی سینامیک اسید هم‌یوغ می‌شوند. این آمیدهای فنولیک در اتصال کووالانسی به ماتریکس دیواره سلولی در ساختارهایی مانند لیگنین دیده شده‌اند. اصولاً نه تنها پلی‌آمین‌ها، بلکه ترکیبات فنلی نیز به تنهایی به عنوان شاخص‌های تنش اکسیداتیو محسوب می‌شوند (Górecka et al., 2007). انباشتگی انواع ترکیبات فنلی در شرایط تنشی می‌تواند به‌عنوان یک سیگنال در راه‌اندازی زنجیره‌ای از واکنش‌های که در نهایت به افزایش تحمل تنش منجر می‌شوند، شرکت نماید (Anderson and Jordheim, 2005).

بنگ دانه یا بذرالبنج گیاهی دو ساله از خانواده Solanaceae با نام علمی *Hyoscyamus niger* می‌باشد.

1- Conjugate

ایـن گیـاه محتـوی آلکالوئیـدهایی از قبیـل هیوسـیامین، آتروپین، اسـکوپولامین اسـت کـه بـر سیسـتم اعصـاب مرکزی اثر می‌کنند. در صنـایع داروسـازی بـرای تهیـه داروهـای ضد آسم، آرام بخـش، تـرمیم‌کننـده سیسـتم اعصاب و تسکین ناراحتی‌هـایی که در رابطه بـا ضـعف پیری ایجاد می‌شود از این گیاه استفاده می‌شود. از ضـماد آن جهت از بین بردن و تسکین دردها مانند میگـرن، درد اعصاب، درد دندان، درد روماتیسم، نقـرس و درد گـوش نیز استفاده می‌گردد (صمصام شریعت، ۱۳۷۱).

پژوهش حاضر با هدف بررسی اثـر کـاربرد پلـی آمین پوتریسین برون زا در القاء تحمل تنش خشـکی دانه رست گیاه بنگ دانـه از طریـق مطالعـه تغییـرات ترکیبات فنلی به عنوان یک ترکیب آنتـی اکسـیدانی و نیز فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و نیترات ردوکتـاز انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

ابتدا بذور گیاه بنگ دانه از شرکت پاکان اصفهان تهیه و جهت رفع خفتگی تحت تأثیر اسید جیبرلیک با غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام در ژرمیناتور با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک روز قرار گرفتند. جهت اعمال تنش خشکی از پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ استفاده شد. با توجه به نتیجه پیش آزمایش جهت اعمال تنش خشکی ملایم و شدید خشکی از پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ به ترتیب با غلظت ۱۵۰ گرم در لیتر (معادل ۲- بار) و نیز ۲۵۰ گرم در لیتر (معادل ۷- بار) و نیز شاهد (آب مقطر) استفاده شد. هورمون پوتریسین نیز در غلظت‌های ۰، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌مولار تهیه گشت. سپس به پلیت‌های حاوی دانه‌های بنگ دانه، ٤ میلی‌لیتر از محلول‌های فوق در قالب ۹ تیمار همراه با ٤ تکـرار داده شد. از دانـه رست‌هـای ٤ روزه برای سنجش‌های بیوشیمیایی استفاده شد. تیمارهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. تیمارهای آزمایشی شامل سه سطح پلی‌اتیلن گلیکول (۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ گرم در لیتر) و پوتریسین شامل سه سطح (۰، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌مولار)

تیمار / تنش	پلی‌اتیلن گلیکول (۰)		پلی‌اتیلن گلیکول (۱۵۰ گرم در لیترمعادل ۲- بار)		پلی‌اتیلن گلیکول (۲۵۰ گرم در لیترمعادل ۷- بار)
۱	پوتریسین ۰	٤	پوتریسین ۰	۷	پوتریسین ۰
۲	پوتریسین ۰/۰۵ میلی‌مولار	۵	پوتریسین ۰/۰۵ میلی‌مولار	۸	پوتریسین ۰/۰۵ میلی‌مولار
۳	پوتریسین ۰/۱ میلی‌مولار	٦	پوتریسین ۰/۱ میلی‌مولار	۹	پوتریسین ۰/۱ میلی‌مولار

سنجش‌های آزمایشگاهی

سنجش ترکیبات فنلـی (Matta and Giai, 1969): ابتدا انـدام هـوایی و قسـمت مشخصـی از ریشـه، از گیاهان تحت تیمار جداشده و جهت سنجش ترکیبات فنلی مورد ارزیابی قرار گرفتند. مراحل زیر به ترتیـب جهت سنجش ترکیبات فنلی انجام شد:

نمونه‌های مورد نظـر در ۱۰ میلـی‌لیتـر اتـانول ۸۰ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد. سپس به‌مـدت ۱۵ دقیقه با ۳۰۰۰ دور در دقیقـه سـانتریفیوژ شـدند. محلول فوقانی جدا و توسط الکل ۸۰ درصد به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانیده شدند. به ۲/۵ میلی‌لیتر از محلـول فوق ۲/۵ میلی‌لیتر فولن رقیق شده (۱:۳) و ۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم اشباع اضافه شـد. پـس از سـانتریفیوژ نمودن نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه، جذب در طول موج ٦٤۰ نانومتر توسط دسـتگاه اسـپکتروفتومتردر مقابـل شاهد دستگاه قرائت شد. برای یافتن غلظت ترکیبـات

فنلی از منحنی استاندارد و با استفاده از کاتکول با تراکم‌های مختلف، مقدار این ترکیبات برحسب میلی‌گرم در گرم وزن تر نمونه‌ها محاسبه گردید.

سنجش فعالیت کاتالازی (Chance and Maehly, 1955): به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز از نمونه عصاره‌گیری شد. برای تهیه محلول عصاره‌گیری، ۱/۲ گرم تریس، ۲ گرم اسیدآسکوربیک، ۳/۸ گرم بوراکس (Di-sodium tetra borate)، ۲ گرم $EDTANa_2$ و ۵۰ گرم پلی‌اتیلن گیلکول ۲۰۰۰ با یکدیگر مخلوط شد و با آب مقطر به حجم نهایی ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانیده شد (pH ۷). سپس ۱ گرم نمونه با ٤ میلی‌لیتر محلول عصاره‌گیری سائیده و به مدت ٢٤ ساعت در یخچال در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد بدین ترتیب عصاره آنزیمی تهیه گردید.

جهت سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز مراحل زیر به‌ترتیب صورت گرفت: ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار با ۰/۲ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳ درصد و ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی مخلوط و جذب در ٢٤٠ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم بر حسب $(OD.min^{-1}.g^{-1}.FW)$ تعیین شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیدازی (Koroi, 1989): به منظور سنجش فعالیت آنزیم پراکسیدازی نیز از عصاره آنزیمی استفاده و مراحل زیر انجام شد: ۲میلی‌لیتر تامپون استات ۰/۲ مولار (pH ٥) با ۰/٤ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳ درصد و ۰/۲ میلی‌لیتر بنزیدین محلول در الکل ۵۰ درجه ۰/۰۱ مولار مخلوط شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به مخلوط فوق اضافه و جذب نوری در طول موج ۵۳۰ نانومتر در مقابل شاهد دستگاه اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است به منظور حفظ فعالیت پراکسیداز کلیه مراحل سنجش فعالیت آنزیم در ظرف یخ انجام گرفت. فعالیت این آنزیم برحسب $ODmin^{-1}g^{-1}FW$ سنجش شد.

سنجش فعالیت آسکوربات پراکسیداز (Arrigoni and Detullio, 2000): جهت بررسی فعالیت این آنزیم نیز از عصاره آنزیمی استخراجی استفاده شد. در این سنجش ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار با pH٦/٥، ۰/۲ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳ درصد و ۰/۲ میلی‌لیتر آسکوربات ۵۰ میکرومولار در حمام یخ مخلوط گردید و بلافاصله ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه شد، سپس تغییرات جذب در طول موج ٢٦٥ نانومتر خوانده و فعالیت آنزیم بر حسب $ODmin^{-1}g^{-1}FW$ تعیین شد.

اندازه‌گیری فعالیت نیترات ردوکتاز (Sym, 1984)

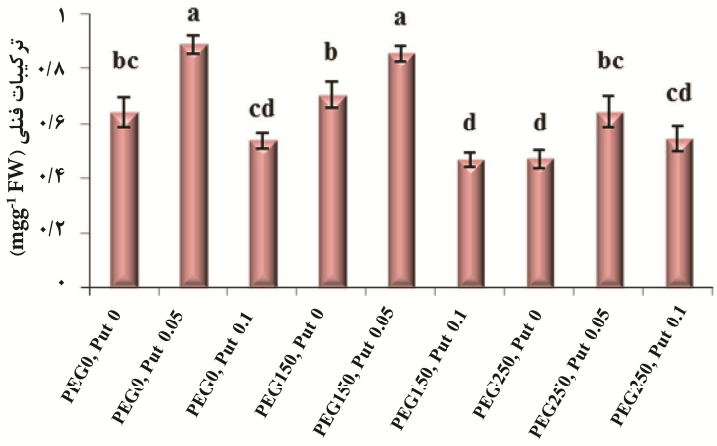
تهیه محلول انکوباسیون: در ابتدا محلول ۵۰۰ میلی‌لیتر از محلولی که غلظت نیترات پتاسیم در آن ۱۵۰ میلی‌مولار، پروپانول ۳ درصد حجمی و تامپون فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار بود آماده گشت (محلول انکوباسیون). سپس ۵ میلی‌لیتر از محلول انکوباسیون در لوله آزمایش ریخته و نمونه گیاهی توزین و در لوله قرار داده شد. آنگاه لوله به‌مدت یک ساعت در آون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد از این مدت محلول صاف گردید. سپس به ۲ میلی‌لیتر از محلول فوق به‌ترتیب ۱ میلی‌لیتر گریس I و گریس II افزوده گردید و با استفاده از شاهد جذب آن در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. برای یافتن غلظت نیتریت حاصل از احیای نیترات تحت تأثیر آنزیم نیترات ردوکتاز، غلظت‌های متفاوتی از نیتریت سدیم استفاده شد. پس از ترسیم منحنی استاندارد، معادله خط تعیین و سپس مقدار نیتریت تولید شده به ازای هر گرم وزن تر ماده محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها از طریق واریانس دو عاملی و میانگین انجام گرفت. همچنین مقایسه بین تیمارها براساس آزمون دانکن توسط برنامه آماری SPSS برای چهار تکرار صورت گرفت. رسم

نمودارها با کمک نرم‌افزار Excel انجام شد. نمودارها نشانگر $X \pm SE$ می‌باشد.

نتایج

بررسی اثرخشکی و پوتریسین بر میزان ترکیبات فنلی دانه رست: بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها، بیشترین میزان ترکیبات فنلی مربوط به تیمار پلی‌اتیلن گلیکول۰ به همراه پوتریسین ۰/۰۵ میلی‌مولار و پلی‌اتیلن گلیکول ۱۵۰ گرم در لیتر و پوتریسین ۰/۰۵ میلی‌مولار بود که با شاهد و دیگر تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان داد. ایجاد تنش شدید خشکی با کاربرد پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ گرم در لیتر در تحقیق حاضر منجر به کاهش در میزان ترکیبات فنلی دانه رست نسبت به شاهد یعنی بدون کاربرد پلی‌اتیلن گلیکول شد. در خشکی ملایم (پلی‌اتیلن گلیکول ۱۵۰ گرم در لیتر) کاربرد ۰/۰۵ میلی‌مولار پوتریسین منجر به افزایش معنی‌دار و ۰/۱ میلی‌مولار پوتریسین منجر به کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد گردید. در خشکی شدید (پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ گرم در لیتر) کاربرد ۰/۰۵ میلی‌مولار پوتریسین منجر به افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد شد (شکل ۱).

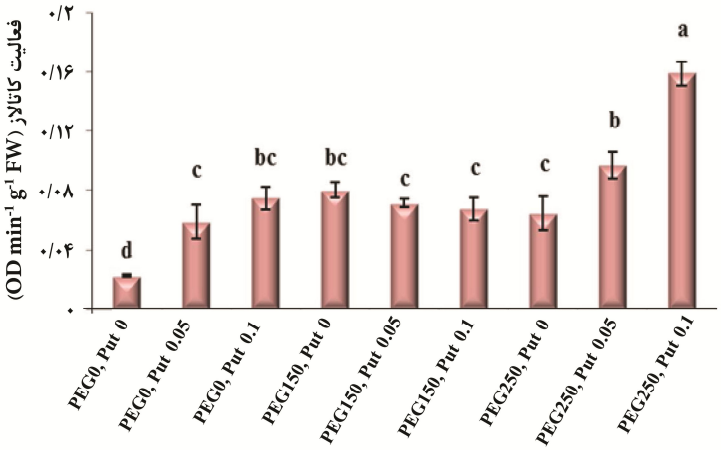


شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف پلی‌اتیلن گلیکول (۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ گرم در لیتر) و پوتریسین (۰، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌مولار) بر ترکیبات فنلی دانه‌رست بنگ‌دانه. PEG 0, Put 0 = شاهد; PEG 0, Put 0.05 =پلی‌اتیلن گلیکول۰+ پوتریسین۰/۰۵ mM؛ PEG 0, Put 0.1= پلی‌اتیلن گلیکول۰+ پوتریسین ۰/۱ Mm ;PEG 150, Put 0 =پلی‌اتیلن گلیکول ۱۵۰ $g.L^{-1}$+ پوتریسین ۰؛ PEG 150, Put 0.05= پلی‌اتیلن گلیکول ۱۵۰ $g.L^{-1}$+ پوتریسین۰/۰۵ mM ; PEG 150, Put 0.1=پلی‌اتیلن گلیکول ۱۵۰ $g.L^{-1}$+ پوتریسین ۰/۱ mM ;PEG 250, Put 0 =پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ $g.L^{-1}$+ پوتریسین ۰ ; PEG 250, Put 0/05= پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ $g.L^{-1}$+ پوتریسین ۰/۱ mM ;PEG 250, Put 0.1 =پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ $g.L^{-1}$+ پوتریسین۰/۱ mM.
حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ $\geq P$ است

بررسی اثر خشکی و پوتریسین بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان دانه رست

فعالیت کاتالاز دانه رست: بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها، بیشترین میزان فعالیت کاتالازی دانه رست در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ گرم در لیتر به همراه پوتریسین ۰/۱ میلی‌مولار مشاهده شد که با شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت و کمترین میزان فعالیت آنزیم در شاهد مشاهده شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان داد. در خشکی شدید (پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ گرم در لیتر) کاربرد

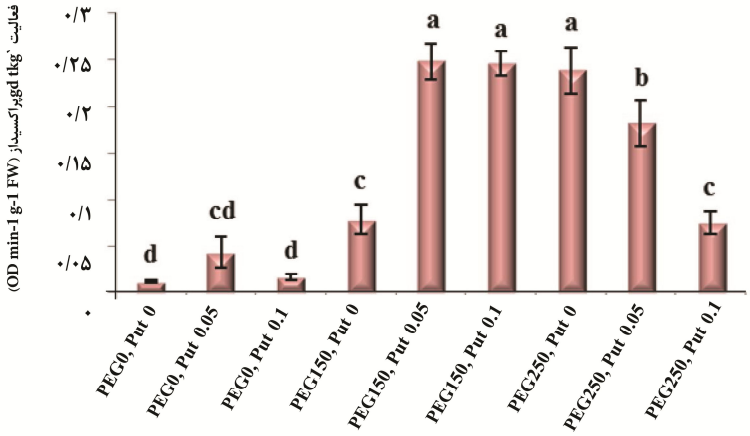
پوتریسین منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت کاتالازی دانه رست گشت، به‌طوری‌که کاربرد ۰/۱ میلی‌مولار پوتریسین به همراه پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ گرم در لیتر موجب افزایش بیشتری نسبت به عدم کاربرد آن در تنش شدید خشکی شد (شکل ۲).



شکل ۲. اثر غلظت‌های مختلف پلی‌اتیلن گلیکول (۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ گرم در لیتر) و پوتریسین (۰، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌مولار) بر فعالیت کاتالاز دانه‌رست بنگ‌دانه. PEG 0, Put 0 = شاهد; PEG 0, Put 0.05 =پلی‌اتیلن گلیکول۰+ پوتریسین۰/۰۵ mM ; PEG 0, Put 0.1= پلی‌اتیلن گلیکول۰+ پوتریسین۰/۱ Mm ;PEG 150, Put 0 =پلی‌اتیلن گلیکول ۱۵۰ $g.L^{-1}$+ پوتریسین ۰ ; PEG 150, Put 0.05= پلی‌اتیلن گلیکول ۱۵۰ $g.L^{-1}$+ پوتریسین ۰/۰۵ mM ; PEG 150, Put 0.1 =پلی‌اتیلن گلیکول $g.L^{-1}$ ۱۵۰+ پوتریسین۰/۱ mM ;PEG 250, Put 0 =پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ $g.L^{-1}$+ پوتریسین ۰ ; PEG 250, Put 0.05= پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ $g.L^{-1}$+ پوتریسین۰/۱ mM ;PEG 250, Put 0.1 =پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ $g.L^{-1}$+ پوتریسین۰/۱ mM

حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ ≥P است.

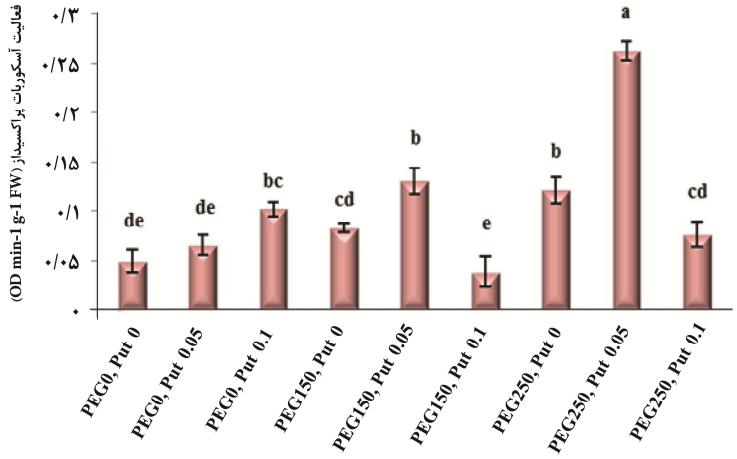
فعالیت پلی‌فنل اکسیداز دانه رست: طبق شکل ۳، بیشترین میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در تیمار با خشکی ملایم (پلی‌اتیلن گلیکول ۱۵۰ گرم در لیتر) با پوتریسین ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌مولار مشاهده شد که با تیمار خشکی شدید (پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ گرم در لیتر) همراه با پوتریسین ۰ اختلاف معنی‌داری نداشت اما با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بود. تیمار خشکی ملایم (پلی‌اتیلن گلیکول ۱۵۰ گرم در لیتر) به همراه کاربرد پوتریسین در دو غلظت کاربردی و نیز تنش شدید خشکی(پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ گرم در لیتر) بدون کاربرد پوتریسین بیشترین فعالیت پلی فنل اکسیداز را به خود اختصاص داد. در خشکی شدید کاربرد غلظت ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌مولار پوتریسین موجب کاهش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در مقایسه با تنش خشکی شدید بدون کاربرد هورمون شد که این کاهش در غلظت کاربردی ۰/۱ میلی‌مولار پوتریسین بیشتر بود (شکل ۳).



شکل ۳. اثر غلظت‌های مختلف پلی‌اتیلن گلیکول (۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ گرم در لیتر) و پوتریسین (۰، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌مولار) بر فعالیت پلی فنل اکسیداز دانه‌رست بنگ‌دانه. PEG 0, Put 0 = شاهد; PEG 0, Put 0/05 =پلی‌اتیلن گلیکول ۰+ پوتریسین ۰/۰۵ mM ; PEG 0, Put 0.1= پلی‌اتیلن گلیکول ۰+ پوتریسین ۰/۱ Mm ; PEG 150, Put 0= پلی‌اتیلن گلیکول ۱۵۰ $g.L^{-1}$ + پوتریسین ۰ ; PEG 150, Put 0.05= پلی‌اتیلن گلیکول ۱۵۰ $g.L^{-1}$ + پوتریسین ۰/۰۵ mM ; PEG 150, Put 0.1 = پلی‌اتیلن گلیکول ۱۵۰ $g.L^{-1}$ + پوتریسین ۰/۱ mM ; PEG 250, Put 0= پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ $g.L^{-1}$ + پوتریسین ۰ ; PEG 250, Put 0.05= پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ $g.L^{-1}$ + پوتریسین ۰/۰۵ mM ; PEG 250, Put 0.1 = پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ $g.L^{-1}$ + پوتریسین ۰/۱ mM

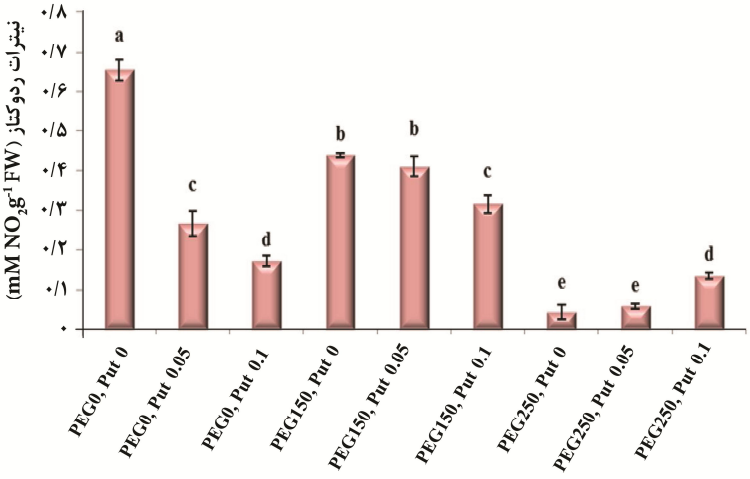
حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ٪۵ $P\leq$ است.

فعالیت آسکوربات پراکسیداز دانه رست: بر اساس مقایسه میانگین‌ها، بیشترین میزان فعالیت آسکوربات پراکسیداز در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ گرم در لیتر به همراه پوتریسین ۰/۰۵ میلی‌مولار مشاهده شد که اختلاف آن با شاهد و دیگر تیمارها معنی‌دار بود. کمترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ گرم در لیتر به همراه پوتریسین ۰/۰۱ میلی‌مولار مشاهده شد. ایجاد خشکی شدید (پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ گرم در لیتر) منجر به افزایش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم گشت، در حالی که در خشکی ملایم (پلی‌اتیلن گلیکول ۱۵۰ گرم در لیتر) اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشت. در خشکی ملایم کاربرد ۰/۰۵ میلی‌مولار پوتریسین منجر به افزایش و استفاده از ۰/۱ میلی‌مولار آن موجب کاهش معنی‌داری نسبت پلی‌اتیلن گلیکول ۱۵۰ گرم در لیتر به همراه پوتریسین ۰ شد. در خشکی شدید (پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ گرم در لیتر)، کاربرد ۰/۰۵ میلی‌مولار پوتریسین منجر به افزایش و غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار آن موجب کاهش معنی‌داری نسبت به پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ گرم در لیتر و پوتریسین ۰ شد (شکل ٤).



شکل ٤. اثر غلظت‌های مختلف پلی‌اتیلن گلیکول (۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ گرم در لیتر) و پوتریسین (۰، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌مولار) بر فعالیت آسکوربات پر اکسیداز دانه‌رست بنگ‌دانه. PEG 0, Put 0 = شاهد; PEG 0, Put 0.05 =پلی‌اتیلن گلیکول ۰+ پوتریسین ۰/۰۵ mM ; PEG 0, Put 0.1= پلی‌اتیلن گلیکول ۰+ پوتریسین ۰/۱ Mm; PEG 150, Put 0 =پلی‌اتیلن گلیکول ۱۵۰ $g.L^{-1}$+ پوتریسین ۰ ; PEG 150, Put 0.05= پلی‌اتیلن گلیکول ۱۵۰ $g.L^{-1}$+ پوتریسین ۰/۰۵ mM ; PEG 150, Put 0.1 =پلی‌اتیلن گلیکول $g.L^{-1}$ ۱۵۰+ پوتریسین ۰/۱ mM; PEG 250, Put 0 =پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ $g.L^{-1}$+ پوتریسین ۰ ; PEG 250, Put 0.05= پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ $g.L^{-1}$+ پوتریسین ۰/۰۵ mM; PEG 250, Put 0.1 =پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ $g.L^{-1}$+ پوتریسین ۰/۱ mM.

حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ ≥P است.



شکل ۵. اثر غلظت‌های مختلف پلی‌اتیلن گلیکول (۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ گرم در لیتر) و پوتریسین (۰، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌مولار) بر فعالیت نیترات ردوکتاز دانه‌رست بنگ‌دانه. PEG 0, Put 0 = شاهد; PEG 0, Put 0.05 = پلی‌اتیلن گلیکول ۰+ پوتریسین ۰/۰۵ mM ; PEG 0, Put 0.1= پلی‌اتیلن گلیکول ۰+ پوتریسین ۰/۱ Mm; PEG 150, Put 0 =پلی‌اتیلن گلیکول ۱۵۰ $g.L^{-1}$+ پوتریسین ۰ ; PEG 150, Put 0.05= پلی‌اتیلن گلیکول ۱۵۰ $g.L^{-1}$+ پوتریسین ۰/۰۵ mM ; PEG 150, Put 0.1 = پلی‌اتیلن گلیکول $g.L^{-1}$ ۱۵۰+ پوتریسین ۰/۱ mM; PEG 250, Put 0 =پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ $g.L^{-1}$+ پوتریسین ۰ ; PEG 250, Put 0.05= پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ $g.L^{-1}$+ پوتریسین ۰/۰۵ mM; PEG 250, Put 0.1 = پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ $g.L^{-1}$+ پوتریسین ۰/۱ mM

حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ ≥P است

فعالیت نیترات ردوکتاز دانه رست: بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها، بیشترین میزان فعالیت نیترات ردوکتاز در شاهد مشاهده شد که با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بود. ایجاد تنش ملایم و شدید خشکی حاصل از پلی‌اتیلن گلیکول ۱۵۰ و ۲۵۰ گرم در لیتر منجر به کاهش فعالیت نیترات ردوکتاز نسبت به شاهد شد. در خشکی شدید کاربرد ۰/۱ میلی‌مولار پوتریسین افزایش معنی‌داری را نسبت به پلی‌اتیلن گلیکول ۲۵۰ گرم در لیتر و عدم کاربرد پوتریسین نشان داد (شکل۵).

بحث

در تحقیق حاضر تنش ملایم و شدید خشکی موجب کاهش ترکیبات فنلی در دانه‌رست بنگ دانه شد. بررسی‌های انجام شده نشان داده است که هرگونه تنش بر گیاه، مقدار ترکیبات فنلی را افزایش می‌دهد و وجود چنین ترکیباتی موجب کاهش استقرار میکروارگانیسم‌ها می‌شود. در این راستا عنوان شده است گیاه در زمان تنش خشکی به علت تضعیف سیستم ایمنی، ترکیبات فنلی را افزایش داده تا بتواند واکنش‌های دفاعی مناسبی را در برابر حمله میکروارگانیسم‌ها در پیش گیرد (Salisbury and Ross, 1991) که این نتایج با یافته‌های بدست آمده در این تحقیق متضاد بود. در این رابطه به نظر می‌رسد در دانه رست امکان افزایش این ترکیبات از طریق فرایندهای متابولیسمی نبوده و یا شدت تنش اعمال شده در این تحقیق در حدی نبوده است تا موجب واکنش‌های درگیر در بیوسنتز این ترکیبات شود.

مطابق با داده‌های بدست آمده با افزودن پوتریسین بویژه در غلظت ۰/۰۵ میلی‌مولار در مقایسه با تنش‌های خشکی اعمال شده بدون کاربرد پوتریسین، افزایش معنی داری در ترکیبات فنلی مشاهده شد. به رغم اینکه دلایل مختلفی در مورد سازوکار عمل پلی‌آمین‌ها در القای تحمل تنش در طی کاربرد آنها ارائه شده است، ولی تاکنون نقش احتمالی این ترکیبات از طریق ایجاد تغییراتی در متابولیسم ترکیبات فنلی مطالعه نشده است. این احتمال وجود دارد که پلی‌آمین‌های برون زا از طریق تغییر در متابولیسم، هم‌یوغ شدگی و یا انباشتگی فنل‌ها موجب تغییر در تحمل تنش‌ها شوند (Groppa and Benavides, 2008) که این مطلب موید تحقیق حاضر است.

طبق نتایج بدست آمده، در تیمارهای تنش ملایم و شدید خشکی افزایش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و پلی‌فنل اکسیداز دانه‌رست مشاهده شد. در رابطه با میزان فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیدازی دانه‌رست نیز در تنش شدید افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد دیده شد.

هنگام تنش، گونه‌های‌اکسیژن فعال مانند رادیکال‌های سوپراکسید (O_2^-). پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل ایجاد می‌گردند که باعث خسارت اکسیداتیو به ترکیبات سلولی مانند لیپیدهای غشاء، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند (Mittler, 2002؛ Masood et al., 2006). Sairam و همکارن (۲۰۰۲) نشان دادند که سیستم‌های جاروب کننده هیدروژن مانند پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز و کاتالاز در ایجاد مقاومت در برابر تنش اکسیداتیو ایجاد شده در اثر تنش خشکی نسبت به سوپر اکسید دیسموتاز به تنهایی از اهمیت بیشتری برخوردار است (Bacon et al., 1997; Arora et al., 2002). Csiszar و همکاران، در سال ۲۰۰۵ بیان داشتند که درگندم تحت تنش خشکی حاصل از محلول پلی‌اتیلن گلیکول میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در مقایسه با شاهد بیشتر شد و همچنین مقاومت گیاه نسبت به تنش افزایش یافت.

مطابق با نتایج حاصل از پژوهش حاضر کابرد پوتریسین در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار موجب افزایش

فعالیت آنزیم کاتالاز در تنش شدید خشکی شد. همچنین استفاده از پوتریسین در دو غلظت ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌مولار در تنش شدید خشکی موجب کاهش فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در مقایسه با اعمال تنش خشکی بدون کاربرد پوتریسین شد. فعالیت آسکوربات پراکسیداز نیز با کاربرد پوتریسین بویژه در غلظت ۰/۰۵ میلی‌مولار به همراه تنش خشکی در مقایسه با اعمال تنش خشکی بدون استفاده از پوتریسین افزایش معنی‌داری یافت.

پلی‌آمین‌ها به‌عنوان مواد تنظیم کنندهٔ رشد گیاهی در محدوده وسیعی از فرآیندهای رشد و نمو، شامل تقسیم سلولی، رویان‌زایی، ریخت‌زایی، گلدهی، رسیدن میوه‌ها، تکوین ریشه، تأخیر پیری، پایداری غشاها، جمع‌آوری رادیکال‌های فعال و تحمل تنش‌های مختلف مشارکت دارند (Kaur-Sawhney et al., 2003). به نظر می‌رسد اهمیت پلی‌آمین‌ها در رویارویی با تنش‌ها می‌تواند به‌دلیل نقش آنها در تنظیم اسمزی، پایداری غشاء و جاروب کنندگی رادیکال‌های اکسیژنی فعال از محیط سلول‌ها باشد (Singh et al., 2002). در گیاه Welshonion، تیمار گیاه با پوتریسین ۲ میلی‌مولار ۲٤ ساعت قبل از ایجاد شرایط غرقابی منجر به کاهش اثرات استرس در گیاه شد. پوتریسین سیستم‌های آنتی اکسیدانی و جاروب کننده رادیکال‌های آزاد را ترفیع داده و با کاهش رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن، صدمات اکسیداتیو ناشی از شرایط غرقابی را در این گیاه تخفیف داد (Yiu et al., 2009). همچنین در طی تحقیق که بر روی دانه‌رست‌های *Brassica juncea* در محیط کشت هوگلند حاوی مقادیر مختلف نمک در حضور پوتریسین و بدون پوتریسین انجام گرفت، مشخص شد که پوتریسین اثر القاءکننده بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت‌های برگی تحت استرس شوری دارد. پوتریسین با فعال کردن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش محتوای آنتی اکسیدان‌ها، اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد را کاهش داد(Verma and Mishra, 2005).

اثر آنتی‌اکسیدانی پلی‌آمین‌ها به‌طور عمده به ویژگی کاتیونی آنها مربوط است که موجب برداشت رادیکال‌های آزاد شده و در نتیجه قادر به مهار پراکسیداسیون لیپیدها می باشند. با این حال شواهد و داده‌های ضد و نقیضی در مورد نقش آنتی‌اکسیدانی پلی‌آمین‌های برون زا موجود می‌باشد. در برخی موارد این ترکیبات به عنوان اکسیدان و القا کننده تنش و گاهی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان و کاهش‌دهنده رادیکال‌های آزاد معرفی شده‌اند. دلیل تفاوت در نقش این ترکیبات که بستگی به نوع پلی‌آمین و شرایط کاربرد آنها دارد، روشن نیست (Groppa and Benavides, 2008).

تحقیقات نشان داده است که ترکیبات پلی‌آمین می‌توانند مانند ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، رادیکال‌های آزاد را حذف کنند. لذا به علت کاهش این رادیکال‌ها از فعالیت آنزیم در حضور ترکیب پلی‌آمینی کاسته می‌شود (Velikova et al., 2000). گزارش شده است پوتریسین دارای نقش حمایتی مستقیم در بردباری به تنش‌های زیستی و غیرزیستی است (Capell et al., 2004).

در نتایج حاضر بیشترین میزان فعالیت نیترات ردوکتاز دانه‌رست در شاهد مشاهده شد و محیط حاوی پلی‌اتیلن گلیکول ۱۵۰ و ۲۵۰ گرم در لیتر که موجب تنش ملایم و شدید خشکی شدند منجر به کاهش معنی‌داری در میزان فعالیت این آنزیم شد که این کاهش در تنش شدید خشکی بیشتر بود. تحقیقات نشان داده است فعالیت نیترات ردوکتاز می‌تواند به سرعت در پاسخ به تنش آبی تغییر کند (Kenjebaera and Rokora, 1995). به‌عنوان مثال کاهش پتانسیل آبی در برگ ذرت از فعالیت آنزیمی

مورد نظر می‌کاهد (Tejo and Diaz, 1981). چنین نتیجه مشابه‌ای نیز توسط Bandurska (۱۹۹۱) در برگ‌های جو گزارش شد. همچنین عنوان شده است بهبودی از این شرایط (آبیاری مجدد) منجر به افزایش سنتز آن می‌گردد (Tejo and Diaz, 1981). همچنین پژوهش‌های متعددی دال بر پاسخ‌های متفاوت این آنزیم همراه با تغییر شرایط محیطی موجود است (Huber et al., 1998). برای نمونه فعالیت این آنزیم در اندام هوایی به تغییرات وضعیت آبی حساس بوده و زمانی که پتانسیل آبی کاهش می‌یابد فعالیت آنزیم نیز مهار می‌شود (Christine et al., 1998؛ Huber et al., 1998). به نظر برخی از محققان این کاهش ناشی از میزان سنتز این آنزیم است که این عامل مهم تر از کاهش فعالیت آنزیم است.

در تحقیق حاضر مشاهده شد کاربرد پوتریسین در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار افزایش فعالیت نیترات ردوکتاز را در تنش خشکی بویژه تنش شدید در مقایسه با عدم کاربرد آن در این تنش را بدنبال داشت. شاید بتوان افزایش فعالیت آنزیم را این گونه توضیح داد که افزایش تنش موجب شد دانه‌رست با جداسازی عامل آمین از پوتریسین از این ترکیب پلی آمینی در تشکیل نیترات به عنوان سوبسترای آنزیم استفاده نموده و به دنبال آن موجب افزایش آنزیم گردد. حضور نیترات که سبب بیان ژن‌های سازنده و یا کاهش فرایندهای تخریبی آنزیم نیترات ردوکتاز می‌گردد در القاء و افزایش میزان این آنزیم نقش بسزایی دارد (Campbell, 1996).

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این تحقیق نشان داد اعمال تنش‌های خشکی ملایم و شدید حاصل از کاربرد پلی‌اتیلن گلیکول موجب کاهش ترکیبات فنلی و نیز فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاتالاز، پلی‌فنل اکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در دانه رست ٤ روزه بنگ دانه شد. از سوی دیگر کاربرد پوتریسین برون زا موجب کاهش فعالیت پلی‌فنل اکسیداز و افزایش کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، نیترات ردوکتاز و ترکیبات فنلی در دانه رست گشت. با توجه به نتایج این تحقیق کاربرد پوتریسین برون زا به نظر می‌رسد این ترکیب پلی‌آمینی با تغییر فعالیت سیستم آنتی اکسیدانی و نیز نیترات ردوکتازی روند پاسخ‌های بیوشیمیایی دانه رست گندم را درجهت مقابله با تنش خشکی تعدیل می کند.

سپاسگزاری

بدینوسیله از زحمات سرکار خانم دکتر کیائی مسئول محترم آزمایشگاه تحقیقات و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد واحد گرگان قدر دانی می گردد.

منابع

صمصام شریعت، س.ه. (۱۳۷۱). عصاره‌گیری و استخراج مواد موثر بر گیاهان دارویی و روش‌های شناسایی و ارزشیابی آنها. صفحات ۱۵۷-۱۵۲.

Anderson, O.M. and Jordheim, M. (2005). The anthocyanin. In: Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications (eds. Anderson, O.M. and Markham, K.R.) 471-553. CRC Press, London.

Apel, K. and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology. 55: 373-399.

Arora, A., Sairam, R.K. and Srivastava, G.C. (2002). Oxidative stress and antioxidative systems in plants. Current Science. 82(10): 1227–1238

Arrigoni, O. and Detullio, M.C. (2000). The roll of ascorbic acid in cell metabolism: between gene-directed function and an predictable chemical reaction. Plant Physiology. 57: 781-788.

Ashraf, M. and Bashir, A. (2006). Salt stress induced changes in some organic metabolites and ionic relation in nodules and other plant parts of two crop legumes differing in salt tolerance. Flora. 198: 486-498.

Ashraf, M., Mutasa, E., Butstevens, M. and Roggen, P. (1996). Molecular biology. How can't it help the sugar beet industry? British Sugar Beet Review. 64(1): 20-22.

Bacon, M.A., Thampson, D.S. and Davies, W.J. (1997). Cell wall peroxidase activity enplane the leaf growth response of *Olium temuelentum* in during drought. Experimental Botany. 48: 2075-2085.

Bandurska, H. (1991). Effect of proline of nitrate reductase activity in water stress barely leaves. ACTA Physiol. Plantarum. 13 (1): 3-11.

Campbell, W.H. (1996). Nitrate reductase biochemistry comes of age. Plant Physiology. 111:355-361.

Capell, T., Bassie, L. and Christou, P. (2004). Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. Proceedings of the National Academy of Science of the USA. 101: 9909–9914.

Chance, B. and Maehly, C. (1955). Assay of catalase and peroxidase. Methods Enzymology. 11: 764-775.

Christine, H.F., Valadier, M.H., Migge A. and Becker, Th. (1998). Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. Plant Physiology. 117:283-292.

Crawfor, R.M.M. (1988). Studies in plant survival: Ecological case histories of plant adaption to adversity. Studies in ecology V.11. Oxford: Blackwell Scientific Publication.

Csiszar, J., Feher-Juhasz, E., Kotai, E., Ivankoits- kiss, O., Harvath, G.V., Mai, A., Galle, A., Tari, I., Pauk, J., Dudits, D. and Erfei, L. (2005). Effects of osmotic stress on antioxidant enzyme activities in transgenic wheat call bearing MS ALRGene Acta Biological Szegediensis.49 (1-2): 49-50.

Górecka, K., Cvikrová, M., Kowalska, U., Eder, J., Szafrańska, K., Górecki, R. and Janas, K.M. (2007). The impact of Cu treatment on phenolic and polyamine levels in plant material regenerated from embryos obtained in another culture of carrot. Plant Physiology and Biochemistry. 45: 54-61.

Groppa, M.D. and Benavides, M.P. (2008). Polyamines and abiotic stress: recent advances. Amino Acids. 34: 35-45.

Huber, S.C., Israel. D.W., Foyer, CH., Valadier, M.H., Migge A. and Becker T.W. (1998). Drought induced effects on nitrate reductase activity on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. Plant Physiology. 117: 283-292.

Ashraf, M., Mutasa, E., Butstevens, M. and Roggen, P. (1996). Molecular biology. How can't it help the sugar beet industry? British Sugar Beet Review. 64(1): 20-22.

Bacon, M.A., Thampson, D.S. and Davies, W.J. (1997). Cell wall peroxidase activity enplane the leaf growth response of *Olium temuelentum* in during drought. Experimental Botany. 48: 2075-2085.

Bandurska, H. (1991). Effect of proline of nitrate reductase activity in water stress barely leaves. ACTA Physiol. Plantarum. 13 (1): 3-11.

Campbell, W.H. (1996). Nitrate reductase biochemistry comes of age. Plant Physiology. 111:355-361.

Capell, T., Bassie, L. and Christou, P. (2004). Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. Proceedings of the National Academy of Science of the USA. 101: 9909–9914.

Chance, B. and Maehly, C. (1955). Assay of catalase and peroxidase. Methods Enzymology. 11: 764-775.

Christine, H.F., Valadier, M.H., Migge A. and Becker, Th. (1998). Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. Plant Physiology. 117:283-292.

Crawfor, R.M.M. (1988). Studies in plant survival: Ecological case histories of plant adaption to adversity. Studies in ecology V.11. Oxford: Blackwell Scientific Publication.

Csiszar, J., Feher-Juhasz, E., Kotai, E., Ivankoits- kiss, O., Harvath, G.V., Mai, A., Galle, A., Tari, I., Pauk, J., Dudits, D. and Erfei, L. (2005). Effects of osmotic stress on antioxidant enzyme activities in transgenic wheat call bearing MS ALRGene Acta Biological Szegediensis.49 (1-2): 49-50.

Górecka, K., Cvikrová, M., Kowalska, U., Eder, J., Szafrańska, K., Górecki, R. and Janas, K.M. (2007). The impact of Cu treatment on phenolic and polyamine levels in plant material regenerated from embryos obtained in another culture of carrot. Plant Physiology and Biochemistry. 45: 54-61.

Groppa, M.D. and Benavides, M.P. (2008). Polyamines and abiotic stress: recent advances. Amino Acids. 34: 35-45.

Huber, S.C., Israel. D.W., Foyer, CH., Valadier, M.H., Migge A. and Becker T.W. (1998). Drought induced effects on nitrate reductase activity on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. Plant Physiology. 117: 283-292.

Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. Plant Sciences. 151:59-66.

Verma, S. and Mishra, S.N. (2005). Putrescine alleviation of growth in salt stressed *Brassica juncea* by inducing antioxidative defense system. Journal of Plant Physiology. 60: 669-677.

Werner, M., Kaiser, E. and Behnish, B. (1995). Acid-Base modulation of nitrate reductase in leaf tissues. Planta. 196: 1-6.

Yiu, J., Juang, L., Fang, D., Liu, Ch. and Wu, Sh. (2009). Exogenous putrescine reduces flooding- induced oxidative damage by increasing the antioxidant properties of Welsh onion. Scientia Horticulture. 120(3): 306-314.