پژوهش‌های بذر ایران/ سال ششم/ شماره دوم/ ۱۳۹۸/ صفحات: ۷۹-۶۱

مقاله پژوهشی

تأثیر آمینوسیکلوپروپان کربوکسیلیک اسید و اسید سالیسیلیک بر ترمیم پذیری و بیان ژن‌های *GAI1* و *LOX2* در جوانه‌زنی بذرهای زوال یافته سویا (*Glycine max*)

محبوبه حاجی عباسی [۱]، رضا توکل افشاری [۲،*]، علیرضا عباسی [۳]، رضا کمائی [۴]

چکیده مبسوط

مقدمه: سویا یا *Glycine max* (L.) Merrill **منبع اولیه روغن گیاهی است. بذرهای سویا معمولاً توانایی جوانه‌زنی را در طول ذخیره‌سازی بلند مدت حتی در شریط مطلوب از دست می‌دهند. فاکتورهای زیادی در زوال بذر موثر هستند که شامل عوامل ژنتیکی، آسیب مکانیکی، رطوبت نسبی، دمای محیط ذخیره‌سازی، محتوی رطوبت بذر، وجود میکروفلورا، رسیدگی بذر و عوامل دیگر می‌باشد که در صورت کاهش کیفیت بذر، شرایط را برای اهداف کشت نامناسب می‌کند. هدف از این آزمایش بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیک بذر و همچنین شناسایی نقش ژن‌های** *LOX2* **و** *GAI1* **در زوال بذر تحت تاثیر اتیلن و اسید سالیسیلیک در جوانه‌زنی بذر زوال یافته سویا بود.**

مواد و روش‌ها: به منظور تعیین اثر زوال بر بذر سویا و همچنین تعیین اثر آمینوسیکلوپروپان کربوکسیلیک اسید (ACC) و اسید سالیسیلیک بر بهبود زوال بذر، طی این تحقیق بذرهای سویا در معرض پیری تسریع شده به مدت صفر، ۶ و ۱۰ روز و پیری طبیعی به مدت ۶ ماه قرار گرفتند. بذرها پس از پیری با اسید سالیسیلیک با غلظت ۵۰ میکرو مولار و ACC (پیش ماده اتیلن) با غلظت ۱۰ میکرو مولار به مدت ۶ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس تیمار شدند. همچنین دسته‌ای بذر پس از آزمون پیری تسریع شده و طبیعی بدون هیچ تیماری به عنوان شاهد (بذر خشک) استفاده شدند. درصد جوانه‌زنی، میزان قند کل، گلوکز و فرکتوز بذر مورد بررسی قرار گرفت. همچنین بیان ژن‌های *GAI1* **و** *LOX2* **در بذرهای خشک و همچنین طی ۶ و ۱۲ ساعت تحت اثر آب، اسید سالیسیلیک و ACC به روش Q-RT- PCR بررسی شد.**

یافته‌ها: نتایج جوانه‌زنی نشان داد که با افزایش تعداد روزهای پیری، جوانه‌زنی کاهش می‌یابد. میزان قند کل در بذرهای ۶ روز پیر تفاوت معنی‌داری با بذر پیر نشده **نداشت؛ اما میزان قند کل در بذور ۱۰ روز پیر نسبت به بذرهای** پیر نشده **افزایش معنی‌دار داشت. با افزایش سطوح پیری تسریع شده از صفر به ۱۰ روز، محتوی گلوکز و فروکتوز در بذرهای خشک افزایش یافت. ژن‌ها هم بیان متفاوتی را در روزها و ساعت‌های مختلف از خود نشان دادند. با افزایش پیری از صفر به ۱۰ روز، بیان** *GAI1* **افزایش یافت. همچنین بیان** *LOX2* **طی پیری تسریع شده از صفر روز به ۶ روز افزایش یافت. بیان** *LOX2* **در بذرهای پیر طبیعی خشک نسبت به بذرهای** پیر نشده **افزایش یافت. هورمون اسید سالیسیلیک و ACC اثرات متفاوتی را بر موارد اندازه‌گیری شده داشتند.**

نتیجه‌گیری: در مجموع می‌توان چنین استنباط کرد که زوال بذر و کاهش بنیه نتیجه برآیند فرآیندهای تخریبی متعدد و اختلال در فعالیت‌های فیزیولوژیکی بذر است. این پژوهش نشان داد که پیری با افزایش در میزان قندکل، گلوکز و فرکتوز همراه می‌باشد. همچنین بیان ژن‌های دخیل در مسیر جوانه‌زنی نیز دستخوش تغییر می‌شوند. افزایش بیان ژن *LOX2* **در هر دو مسیر پیری تسریع شده و پیری طبیعی مشاهده شد. بیان** *GAI1* **در پیری تسریع شده افزایش و در پیری طبیعی کاهش یافت.**

واژه‌های کلیدی: پیری تسریع شده، فروکتوز، گلوکز، زوال بذر، قند کل

جنبه‌های نوآوری:

۱- نقش ژن‌های *LOX2* و *GAI1* در زوال بذر سویا شناسایی گردید.

۲-پاسخ‌های فیزیولوژیک بذر تحت شرایط پیری طبیعی و آزمایشگاهی بررسی شد.

[۱] دانش آموخته دکترای تخصصی فیزیولوژی گیاهان زراعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

[۲] استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه فردوسی مشهد

[۳] دانشیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

[۴] دانشجوی دکترای تخصصی فیزیولوژی گیاهان زراعی، دانشگاه فردوسی مشهد

[*] رایانامه نویسنده مسئول: Tavakolafshari@um.ac.ir

http://dorl.net/dor/20.1001.1.23831251.1398.6.2.11.3

http://dx.doi.org/10.29252/yujs.6.2.61

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۲۶)

مقدمه

سویا یا *Glycine max* (L.) Merrill منبع اولیه روغن گیاهی است. مطالعات در زمینه علم تغذیه نشان می‌دهد که مصرف سویا کلسترول سرم خون، سرطان و بیماری‌های قلبی را کاهش می‌دهد که خود می‌تواند زمینه‌ساز افزایش تقاضا برای تولید آن باشد (لی[1] و همکاران، ۲۰۰۷). یکی از مشکلات کشت سویا عدم دسترسی به بنیه بالا در زمان کشت می‌باشد. بذرهای سویا معمولاً توانایی جوانه‌زنی را در طول ذخیره‌سازی بلند مدت حتی در شریط مطلوب از دست می‌دهند.

زوال بذر تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی را در بر می‌گیرد که شامل تغییرات ژنتیکی، تغییر فعالیت‌های آنزیمی و آسیب‌های غشایی است با این وجود دلیل اصلی از دست دادن قوه نامیه روشن نیست (شارما[2] و همکاران، ۲۰۰۵). از عوامل تاثیرگذار در زوال بذر می‌توان به عوامل ژنتیکی، رطوبت بذر، دمای محیط نگه‌داری بذر، رطوبت نسبی محیط، رسیدگی و آسیب‌های مکانیکی اشاره کرد (مک‌دونالد[3]، ۲۰۰۴).

سازوکارهای مختلفی در فرایندهای پیری شرکت دارند که سبب کاهش بنیه و کیفیت بذر می‌شوند و می‌توان به تغییر پروتئین‌ها، گونه‌های فعال اکسیژن، تغییرات لیپیدها، تغییر در قندها و تغییرات DNA اشاره کرد.

در زوال بذر واکنش‌های میلارد و آمادوری[4] نقش مهمی دارند. در حقیقت واکنش‌های میلارد و آمادوری یک سری از واکنش‌های پیچیده هستند که به دنبال واکنش کربونیل- آمین اتفاق می‌افتند. این واکنش‌ها به طور کلی به چهار مرحله تقسیم می‌شوند. در مرحله اول متراکم شدن غیرآنزیمی قندهای احیا شونده، آلدهیدی یا کتوزی با یک گروه آمینی آزاد پروتئین یا اسید نوکلئیک رخ می‌دهد تا گلیکوزیل آمین (محصولات میلارد) تشکیل شود (مرحله قابل برگشت). در مرحله دوم آرایش مجدد گلیکوزیل آمین صورت می‌گیرد تا محصول آمادوری یعنی آمینو- آلفا دئوکسی کتوز تشکیل شود. در مرحله سوم اضمحلال و دهیدراسیون محصولات آمادوری به حدواسطهای آمینو یا کربونیل صورت می‌گیرد. در مرحله چهارم واکنش حدواسطهای کربونیل با دیگر گروه‌های آمینی و همچنین آرایش مجدد آنها رخ می‌دهد تا محصولات نهایی گلیکوزیلاسیون تشکیل شود. تشکیل محصولات میلارد و آمادوری نقش مهمی در فرآیند پیری در سیستم‌های گیاهی، انسانی و جانوری دارد (سان و لئپولود[5]، ۱۹۹۵).

بذرهای بالغ بسیاری از گونه‌های گیاهی حاوی میزان کمی از قندهای احیا شده هستند. با این وجود نیم رخ ترکیب قندی می‌تواند در طول ذخیره‌سازی تغییر کند. بذر ماش سبز (*Vigna radiata* Wilczek) میزان قابل توجهی گلوکز دارد و محتوی گلوکز در محورهای بذر در طول انبارداری افزایش می‌یابد که احتمالاً به واسطه هیدرولیز تدریجی دی‌ساکاریدها و الیگوساکاریدها می‌باشد (نارایانامورتی و سان [6]، ۲۰۰۰). وجود قندهای احیا شونده مثل فرکتوز، گالاکتوز و گلوکز نیروی محرکه اولیه واکنش‌های آمادوری و میلارد می‌باشد. در سویا قندهای احیا شونده به واسطه هیدرولیز رافینوز و استاکیوز در طول انبارداری تشکیل می‌شوند و به سرعت در واکنش‌های آمادوری و میلارد بکار برده می‌شوند (سان و دیوپلود، ۱۹۹۵). در بذر *V.radiata* تجمع محصولات میلارد همبستگی بالایی با سطوح گلوکز و از دست دادن بنیه داشت که نشان می‌دهد هیدرولیز قندها در طول ذخیره‌سازی، ممکن است در زوال بذر به واسطه واکنش‌های آمادوری و میلارد دخالت داشته باشد. بذرهای خشک ظاهراً قادر نیستند ترمیم را بکار ببرند و بنابراین آسیب پروتئین و DNA به وسیله واکنش‌های آمادوری و میلارد در طول زمان تجمع می‌یابد و سرانجام موجب مرگ بذر می‌شوند (نارایانا و همکاران، ۲۰۰۰).

جوانه‌زنی و سبز شدن یکی از مهمترین مراحل رشدی گیاه است که تعیین‌کننده درجه موفقیت سیستم‌های زراعی در تولید می‌باشد (فورسلا[7] و همکاران، ۲۰۰۰). قدرت جوانه‌زنی بذر بسته به دما و رطوبت در دوران رسیدگی، برداشت و انبارداری نامناسب

[1] Lee
[2] Sharma
[3] McDonald
[4] Maillard and Amadori
[5] Sun and Leopold
[6] Narayana Murthy and Sun
[7] Forcella

کاهش پیدا می‌کند و دچار زوال یا فرسودگی می‌شود (مارشال و لویز[1]، ۲۰۰۴). بطور معمول در بذرهای زوال یافته جوانه‌زنی، سبز شدن بذر و رشد گیاهچه کاهش می‌یابد (مک‌دونالد[2]، ۱۹۹۹).

فرسودگی بذر موجب تخریب DNA شده و این امر منجر به اختلال در فرآیند نسخه برداری و در نهایت عدم سنتز آنزیم‌های ضروری (آمیلازها و آنتی‌اکسیدان‌ها) مورد نیاز برای مراحل اولیه جوانه‌زنی بذر می‌گردد. بدون فعالیت آنزیمی مناسب، ذخایر بذر هیدرولیز نشده و در نتیجه مولکول‌های لازم برای سنتز حامل‌های انرژی نظیر ATP قابل دسترس نخواهد بود (مک‌دونالد، ۱۹۹۹).

ژن *GAI* از ژن‌های مسیر انتقال پیام جیبرلین است. جیبرلین‌ها جزو هورمون‌های گیاهی و مولکول‌های ترپنوئید حلقوی هستند که در فرآیندهای مختلف و ضروری رشد و نمو گیاهان، از جمله جوانه‌زنی بذر، طویل شدن محور زیر لپه، رشد ساقه، گسترش برگ، گل آغازی و توسعه اندام گل نقش دارند (یاماگوچی[3]، ۲۰۰۸). علاوه بر آن در بلوغ باروری و در بقاء در محیط نامطلوب نقش دارند (آچارد[4] و همکاران، ۲۰۰۶). ژن *GAI* پروتئینی را کد می‌کند که دارای یک زیر واحد حفاظت شده به نام DELLA است. پروتئین‌های DELLA، نام خود را از دنباله حفاظت شده اسید آمینه‌های D-E-L-L-A که بعدا به N-ترمینال قرار دارند گرفته‌اند و در اصل به عنوان تنظیم‌کننده منفی رشد ناشی از GA و زیر مجموعه‌ای از خانواده فاکتور رونویسی GRAS هستند (بوله[5]، ۲۰۰۴). جهش در این این ژن‌ها و بخصوص دامین DELLA باعث کاهش شدید رشد در گیاهان می‌شود (آچارد و همکاران، ۲۰۰۷).

همچنین لیپوکسیژناز (*LOX*) یک آنزیم کلیدی در چرخه بیوسنتز جاسمونات (JAs) است؛ بنابراین، بسیاری از روش‌های فیزیولوژیکی گیاهان را می‌توان با تنظیم فعالیت *LOX* برای کنترل JAs تنظیم کرد (فیوسنر[6] و همکاران، ۲۰۰۱). ژن‌های *LOX* به طور عمده بر اساس توالی‌های اسید آمینه و الگوی بیان آنها به سه دسته تقسیم شدند. ژن *LOX1* در غده و ریشه‌ها، ژن *LOX2* تنها در برگ‌ها و ژن *LOX3* در برگ و ریشه بیان شده است (کلومیتس[7] و همکاران، ۲۰۰۱؛ رویا[8] و همکاران، ۱۹۹۶). کلومیتس و همکاران (۲۰۰۱) پیشنهاد کردند که نسخه کلاس *LOX1* بیشتر به شکل‌گیری استولون‌ها و رشد و توسعه غده‌ها نزدیک هستند. از طرفی اولین آنزیم در مسیر بیوسنتز اسید جاسمونیک لیپوکسی‌ژناز *LOX* می‌باشد. آنزیم *LOX* باعث تبدیل اسید لینولئیک به JA می‌شود. نقش *LOX* در پاسخ‌دهی به بسیاری از تنش‌های زنده و غیر زنده در گیاهان گزارش شده است (شورش[9] و همکاران، ۲۰۰۵).

از طرفی رشد و نمو گیاهان از مراحل ابتدایی تا مراحل پیشرفته چرخه زندگی به وسیله فیتوهورمون‌های مختلف تنظیم می‌شود. یکی از این فیتوهورمون‌ها اتیلن است. اتیلن یک هیدروکربن گازی دارای ساختار شیمیایی CH_2-CH_2 می‌باشد و در جنین‌زایی زیگوتی بذر، جوانه‌زنی، گلدهی، رسیدگی، پیری و پاسخ به پاتوژن‌ها دخالت دارد (ماتیلا[10]، ۲۰۰۰). به نظر می‌رسد که اتیلن در فرآیند جوانه‌زنی بذرهای معینی دخالت دارد و خروج ریشه‌چه را تحت شرایط نامطلوب (برای مثال در دمای بالا) افزایش می‌دهد. در بذور کاهو دمای رسیدگی بر جوانه‌زنی بذر اثر می‌گذارد که خود به وسیله اثر بر تولید اتیلن می‌باشد (کوزاروا[11] و همکاران، ۲۰۰۶). در مطالعات اخیر نشان داده شده که کاربرد اتیلن جوانه‌زنی را به وسیله کاهش حساسیت به اسید آبسیزیک، افزایش می‌دهد (بیوداین[12] و همکاران، ۲۰۰۰).

همچنین اسید سالیسیلیک یک ترکیب فنولیک است که سطوح پایه آن در میان گونه‌ها متفاوت است. سطوح اختلاف می‌تواند حتی در میان اعضای یک گونه مشاهده شود. اسید سالیسیلیک در بیان ژن‌های مرتبط

[1] Marshal and Lewis
[2] McDonald
[3] Yamaguchi
[4] Achard
[5] Bolle
[6] Feussner
[7] Kolomiets
[8] Royo
[9] Shoresh
[10] Matilla
[11] Kozarewa
[12] Beaudoin

با پاتوژن‌ها (PR)[1]، مقاومت اکتسابی سیستمی و پاسخ‌های فوق حساسیت دخالت دارد. همچنین در پاسخ به تنش‌های غیر زنده مثل ازون، شوری، اشعه فرابنفش، خشکی، گرما، سرما، پاراکوات و تنش فلزات سنگین دخالت دارد. در انتقال نموی تاثیر پذیرفته به وسیله تنش مثل گلدهی، القای غده و پیری دخیل است (ریواس سان ویسنته و جویر پلاسنسیا[2]، ۲۰۱۱).

هدف از این آزمایش بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیک بذر و همچنین شناسایی نقش ژن‌های *LOX2* و *GAI1* در زوال بذر تحت تاثیر آمینوسیکلوپروپان کربوکسیلیک اسید و اسید سالیسیلیک در جوانه‌زنی بذرهای زوال یافته سویا بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار در دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی پردیس کرج اجراء شد. در این تحقیق از بذر سویا رقم Bauyana استفاده شد. بذر سویا از موسسه بین المللی CSIRO[3] واقع در شهر کانبرای استرالیا تهیه شد. عوامل آزمایشی شامل زوال بذر در چهار سطح (پیری تسریع شده صفر، ۶، ۱۰ روز و پیری طبیعی) و هورمون‌های مختلف که شامل اسید سالیسیلیک و پیش ماده اتیلن بود. بذرهای در معرض پیری تسریع شده به مدت صفر، شش و ده روز (در دمای ۴۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۰۰٪) و پیری طبیعی (نگهداری شده در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت شش ماه) قرار گرفتند. بذور پس از پیری با اسید سالیسیلیک با غلظت ۵۰ میکرو مولار و ACC (پیش ماده اتیلن) با غلظت ۱۰ میکرو مولار به مدت شش ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس تیمار شدند. همچنین، تعدادی از بذرها پس از اعمال شدن آزمون پیری تسریع شده و طبیعی، بدون هیچ تیماری به عنوان شاهد (بذر خشک) استفاده شدند. درصد جوانه‌زنی، میزان قندهای کل، گلوکز و فرکتوز و همچنین بیان ژن‌های *GAI1* و *LOX2* در بذرهای خشک و طی شش و دوازده ساعت تحت اثر آب، اسید سالیسیلیک و ACC به روش Q-RT- PCR مورد بررسی قرار گرفت.

برای انجام آزمون پیری زودرس تعداد ۲۵۰ عدد بذر به صورت یک لایه بر روی صفحات مشبک درورن جعبه‌های مخصوص آزمون پیری زودرس قرار داده شدند. درون جعبه‌ها به میزان یک سوم حجم ظرف آب به دقت اضافه شد به که طوری از پاشیدن آب روی بذرها خودداری شد. سپس جعبه‌ها در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به مدت تعیین شده در هر تیمار قرار گرفتند. پس از پایان مدت زمان تعیین شده در هر تیمار، درصد رطوبت نمونه‌های بذری باید در محدوده ۲۷ تا ۳۰٪ باشد. در غیر این صورت آزمون باید دوباره تکرار شود (همپتون و تکرونی[4]، ۲۰۰۵). در پایان آزمون جوانه‌زنی استاندارد برای بذرها انجام گرفت.

تنها به منظور اطمینان از درستی آزمون پیری زودرس رطوبت بذر درصد رطوبت بذر باید تعیین گردید. بدین منظور ۵ گرم از بذر وزن و در دمای ۱۰۳ درجه سلسیوس به مدت ۱۷ ساعت قرار داده شد و در نهایت درصد رطوبت بر اساس وزن تر تعیین گردید. بدین منظور از رابطه (۱) استفاده شد. در این رابطه W_1 وزن ظرف خالی، W_2 وزن ظرف به همراه وزن نمونه بذر قبل از خشک شدن، W_3 وزن ظرف به همراه وزن نمونه خشک می‌باشد (ایستا[5]، ۲۰۰۹). مجدداً تایید می‌شود این آزمون تنها جهت اطمینان از درستی کار انجام گرفت و تمام نمونه‌های بذری پس از آزمون پیری زودرس به محتوای رطوبت ۲۸ درصد رسیدند.

رابطه (۱) $\text{محتوی رطوبت (٪)} = (W_2 - W_3)/(W_2 - W_1) \times 100$

بخش فیزیولوژی و مولکولی این آزمایش در کشور استرالیا و مرکز تحقیقاتی CSIRO انجام شد. استخراج و اندازه گیری قندهای محلول طبق روش فنل- اسید سولفوریک (آ او آ سی[6]، ۱۹۹۵) با اندکی تغییرات صورت گرفت. همچنین برای اندازه گیری غلظت هر یک از قندهای مدنظر (در این تحقیق قندگلوکز و فرکتور مدنظر بود) از دستگاه HPLC استفاده شد.

[1] Pathogen-Related gene
[2] Rivas-San Vicente and Javier Plasencia
3 Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization

[4] Hampton and Tekrony
[5] ISTA
[6] AOAC

آزمون جوانه‌زنی استاندارد به روش بین کاغذ[1] در دمای ۰/۵± ۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی به مدت ۶ روز انجام گرفت.

استخراج RNA بر اساس روش (چانگ[2] و همکاران، ۱۹۹۳) انجام شد. همچنین برای ساخت cDNA، میزان ۲ میکروگرم از RNA درون تیوب ریخته شد و به آن ۱ میکرو لیتر ۵ mM Oligo DT و ۲ میکرو لیتر dNTP ۵mM اضافه شد و به حجم ۱۳ میکرولیتر رسانده شد. سپس تیوب‌ها ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند و سپس ۱ دقیقه روی یخ قرار داده شدند و برای ۵ ثانیه سانتریفیوژ شدند و به آن ها ۴ میکرولیتر از بافر FSB[3]، ۱ میکرولیتر از هر یک از [4] ۰/۱mM DTT، ۱ mM RNase out و SSIII[5] ۱ mM ۱ اضافه شد. سپس تحت دمای ۵۰ درجه سلسیوس برای ۶۰ دقیقه و بعد ۷۰ درجه سلسیوس برای ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. سپس ۰/۵ میکرولیتر از RNaseH به تیوب‌ها اضافه شد و ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند و در نهایت به تیوب‌ها MQ[6] H_2O اضافه شد تا به حجم ۱۰۰ میکرولیتر برسند. در این مرحله ساخت cDNA کامل شد. برای انجام Q-RT PCR ابتدا cDNA آماده شده در مرحله قبل به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شد. سپس برای انجام Q-RT PCR از ۱۰ میکرولیتر مستر Q-RT-PCR (شرکت اینویتروژن)[7] و ۱۰ میکرولیتر از cDNA رقیق شده، ۱ میکرولیتر از پرایمر استفاده شد. پرایمرها که با نرم افزار Primer 3 و Oligo analyzer طراحی شده اند در جدول ۱ آورده شده است. برای انجام Q-RT PCR از دستگاه روتور ژن کیو (کوایژن)[8] استفاده شد.

مراحل Q-RT PCR مشتمل بود بر ۴ دقیقه در دمای ۹۴ در درجه سلسیوس آنگاه ۵۰ دور چرخه تکرار شامل ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ۱۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس و ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس سپس بدنبال هر دور، برنامه منحنی ذوب (از ۷۲ درجه سلسیوس تا ۹۵ درجه سلسیوس با ۵ ثانیه درنگ در هر دما) صورت می‌گرفت که ثبت نتایج فلوروسنس در مرحله ۷۲ درجه سلسیوس طی برنامه منحنی ذوب انجام می‌گرفت. سطوح بیان ژن‌های مورد نظر متناسب با بیان ژن UKN2[9] (به عنوان ژن مرجع) به روش آنالیز کمی مقایسه‌ای با استفاده از نرم افزار Rotor-Gene-Q Series صورت گرفت. به منظور کنترل نتایج و حصول اطمینان از این که نتایج به واسطه تشکیل پرایمر دایمر رقم نخورده است از تیمار کنترل که در آن به جای نمونه از آب استفاده می‌گردید، بهره گرفته شد.

تجزیه‌های آماری بر اساس مدل آماری طرح‌های مورد استفاده توسط نرم‌افزار SAS 9.1 انجام شد. مقایسه میانگین‌های هر صفت با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام گرفت. رسم شکل و نمودارها با بهره‌گیری از نرم‌افزار Excel انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

آزمون جوانه‌زنی

نتایج جوانه‌زنی نشان داد که با افزایش تعداد روزهای پیری، جوانه‌زنی کاهش می‌یابد (شکل ۱). بذرهای خشک که هیچ گونه تیماری بر آن‌ها صورت نگرفته بود، ۹۵٪ جوانه‌زنی داشتند بعد از ۶ روز پیری، جوانه‌زنی ۹۲/۵٪ بود که تفاوت معنی‌دار با بذرهای پیر نشده (صفر روز پیری) نداشت (جدول ۲). بذرهای پیر طبیعی (نگهداری شده به مدت شش ماه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس) ۵۷/۵ درصد جوانه‌زنی داشتند. استفاده از اسید سالیسیلیک و ACC بر بذرهای پیر طبیعی جوانه‌زنی را به ترتیب به ۶۲/۵ و ۶۵ درصد رساند که تفاوت معنی‌داری بایکدیگر نداشتند (شکل ۱a). بعد از ۱۰ روز جوانه‌زنی به صفر رسید (شکل ۱b).

جوانه‌زنی بذرهای پیر نشده تیمار شده با ACC به میزان ۸۰ درصد رسید که تفاوت معنی‌دار با بذرهای پیر نشده خشک نداشت.

[1] Between paper
[2] Chang
[3] 5x First Strand Buffer
[4] Dithiothreitol (DTT)
[5] Super Script III Riverse transcriptase
[6] Mill Q H_2O
[7] Invitrogen
[8] Rotor Gene Q (QIAGEN)
[9] Hypothetical protein

جدول ۱. آغازگرهای به جلو و معکوس

Table 1. Forward and reverse primers

ژن (Gene)	آغازگر به جلو (Forward primer)	آغازگر معکوس (Reverse primer)	دمای آنیلینگ (Annealing temperature) °C
LOX2	CAAGTCCT CAAGTTTCC ACCA	CATGTTCTT TGCGCTCTC CT	61.2
GAI1	TGTGCGAA GTGAGGGA GATG	AGCTTGAG GTTCCTGCG TTG	59.5

همچنین جوانه‌زنی بذرهای پیر نشده تیمار شده با اسید سالیسیلیک ۸۷/۵ درصد بود که تفاوت معنی‌دار با بذرهای پیر نشده خشک نداشت. ACC و اسید سالیسیلیک نتوانستند جوانه‌زنی بذرهای ۱۰ روز پیر را از صفر درصد تغییر دهند (شکل ۱b).

مطابق با این نتایج، مطالعات نشان می‌دهد همچنان که تغییرات کاتابولیک با افزایش سن ادامه می‌یابد، توانایی بذر برای جوانه‌زدن کاهش می‌یابد. کاهش در زنده‌مانی یا ظرفیت جوانه‌زنی بلافاصله بعد از رسیدگی شروع نمی‌شود. تحت شرایط مطلوب ذخیره‌سازی، شروع کاهش در جوانه‌زنی ممکن است چندین ماه تا چندین سال بسته به شرایط ذخیره‌سازی و شرایط در طول نمو بذر شروع شود (شلار[1] و همکاران، ۲۰۰۸). بذر سویا به طور کلی زندگی کوتاه‌تری در مقایسه با سایر گونه‌ها دارد. بذرهای سویا که برای ۱۱ ماه در دمای اتاق نگه‌داری شده‌اند، جوانه‌زنی اندکی را نشان دادند (شلار و همکاران، ۲۰۰۸).

میزان قندها

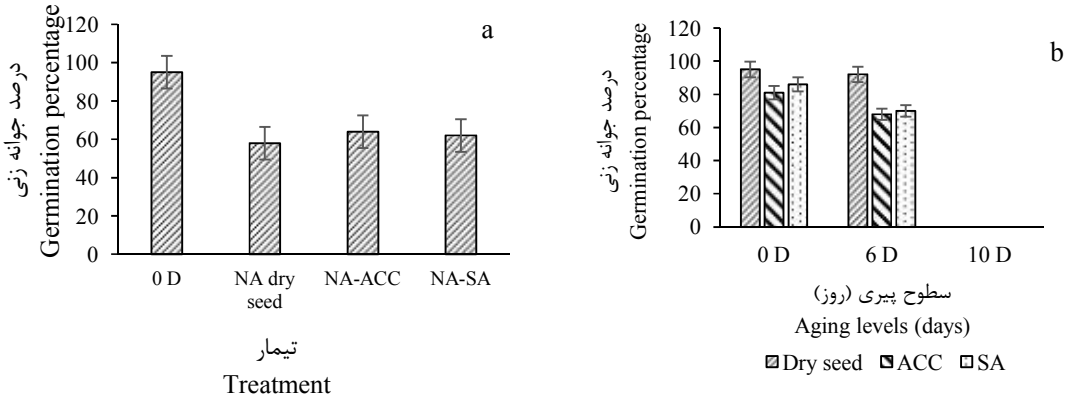
میزان قند کل در بذرهای ۶ روز پیر تفاوت معنی‌داری با بذرهای پیر نشده نداشت اما میزان قند کل در بذرهای ۱۰ روز پیر نسبت به بذرهای پیر نشده افزایش معنی‌دار داشت (شکل ۲a). با افزایش سطوح پیری تسریع شده از صفر به ۱۰ روز، محتوی گلوکز و فروکتوز در بذرهای خشک افزایش یافت (شکل ۲c و ۲e). این نتایج نشان‌دهنده پتانسیل واکنش‌های غیرآنزیمی در زوال بذر می‌باشند و افزایش میزان قندهای گلوکز و فرکتوز با افزایش هدایت الکتریکی و کاهش جوانه‌زنی مطابقت داشت. نتایج ما با مطالعاتی که نشان می‌دهد قندهای احیا کننده در طول پیری افزایش می‌یابد، مطابقت می‌کند. در واقع یکی از نتایج وجود قندهای احیا کننده مانند گلوکز، فروکتوز و گالاکتوز در بذر خشک، کاهش قوه نامیه به واسطه واکنش‌های آمادوری و میلارد می‌باشد.

یکی از ویژگی‌های بذور ارتدکس میزان ناچیز و یا عدم وجود قندهای احیاکننده است. قندهای احیاکننده با افزایش سن بذر، افزایش می‌یابند. نشان داده شده است که میزان نشت گلوکز و فروکتوز از بذرهای آب نوش با از دست دادن بنیه متناسب است (وتلافر و لئوپولد[2]، ۱۹۹۱). همچنین مشاهده شده است که محتوی گلوکز و محصولات پراکسیداسیون لیپیدها در محورهای بذرهای *Vigna radiate* در طول انبارداری افزایش یافته است. تجمع محصولات آمادوری در محورهای بذر با پراکسیداسیون لیپیدها همبستگی داشت، در حالی که تجمع محصولات میلارد ارتباط نزدیکی با هیدرولیز قندها داشت (نارایانامورتی و سان، ۲۰۰۰). گزارش شده است که قندهای محلول و اساساً الیگوساکاریدها و نسبت الیگوساکاریدها به سوکرز همبستگی مثبتی با طول عمر بذر دارند و یا شاخص خوبی از طول عمر بذر هستند (برنال-لوگو و لئوپولد[3]، ۱۹۹۵).

افزودن اسید سالیسیلیک تاثیری بر میزان قندکل، گلوکز و فرکتوز در بذرهای صفر، ۶ و ۱۰ روز پیر شده (شکل ۲a، ۲c و ۲e) و همچنین بر بذرهای پیر طبیعی نداشت (شکل ۲b، شکل ۲d و شکل ۲f)؛ اما افزودن ACC در بذرهای صفر، ۶ و ۱۰ روز پیر شده سبب افزایش گلوکز (شکل ۲c) و در بذرهای صفر و ۶ روز پیر شد و همچنین در بذرهای پیر طبیعی سبب افزایش فروکتوز شد (شکل ۲e و ۲f). اتیلن در تنفس بحرانی[4]، تبدیل نشاسته به قندهای آزاد، تخریب کلروپلاست، سنتز کاروتنوئیدها و فلاونوئیدها نقش دارد (بلیکر و کنده[5]، ۲۰۰۰).

[1] Shelar

[2] Wettlaufer and Leopold
[3] Bernal-Lugo and Leopold
[4] Climacteric
[5] Bleecker and Kende



شکل ۱. a: جوانه‌زنی بذرها با سطوح پیری طبیعی بدون استفاده و با استفاده از هورمون در بذر سویا. b: جوانه‌زنی بذرها تحت پیری تسریع شده در زمان‌های مختلف (۰، ۶ و ۱۰ روز) تحت تأثیر هورمون‌های مختلف. ACC: آمینوسیکلوپروپان-۱- کربوکسیلیک اسید. SA: اسید سالیسیلیک. D: تعداد روزهای پیری تسریع شده در دمای ۴۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد. NA: پیری طبیعی به مدت شش ماه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس.

Fig. 1. a: Seed germination at different aging levels using various hormones in soybean seeds. b: Seed germination under accelerated aging at different times (0, 6 and 10 days) as affected by various hormones. ACC: Amino-cyclopropane-1-carboxylic acid, SA: salicylic acid, D: Accelerated aging days at 40 ° C and relative humidity of 100%, NA: Natural aging for six months at 25 ° C

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر زوال بذر و هورمون بر درصد جوانه‌زنی و صفات بیوشیمیایی بذر سویا

Table 2. Analysis of variance for effect of seed aging and hormones on germination and biochemical traits in soybean seed

منابع تغییر (Source of variation)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات Mean Squares			
		درصد جوانه‌زنی Germination percentage	قند کل Total sugar	گلوکز (Glucose)	فروکتوز (Fructose)
زوال (Deterioration)	3	18319.6**	1218.2**	23.4**	20.1**
هورمون (Hormone)	2	289.3**	70.3ns	21.9**	8.7**
زوال × هورمون (Deterioration×Hormone)	6	254.3**	31.2ns	0.59ns	0.83*
خطا (Error)	36	24.6	40.05	0.6	0.3

**، * و ns به‌ترتیب بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد، پنج درصد و عدم تفاوت معنی‌دار می‌باشند.

ns, *, **: non-significant, significant at p = 0.05 and p = 0.01, respectively

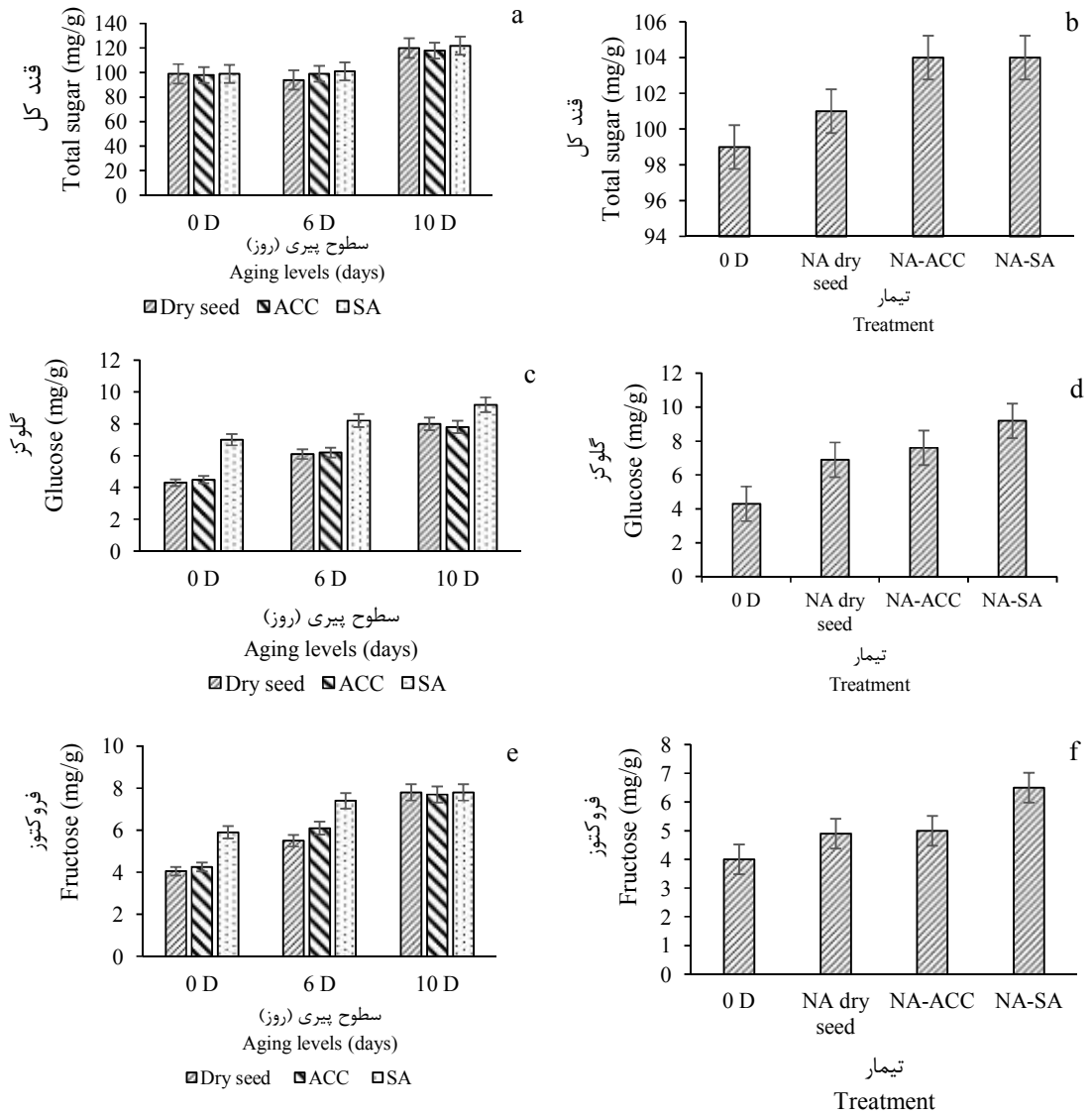
افزایش میزان قند طی پیری در اثر استفاده از ACC با نقش اتیلن در تبدیل نشاسته به قندهای آزاد و افزایش قندها در میوه های کلیماتریک مطابقت دارد.

بیان ژن *GAI1*[1]

با افزایش پیری از صفر به ۱۰ روز، بیان *GAI1* افزایش یافت (شکل ۳a). *GAI1* در ۶ ساعت آب نوشی در بذر پیر نشده، ۶ و ۱۰ روز پیر کاهش بیان را در مقایسه با بذرهای خشک پیر نشده، ۶ و ۱۰ روز پیر داشت (شکل ۳b، ۳c و ۳d) *GAI1* به پروتئین‌های DELLA تعلق دارد. پروتئین‌های DELLA یک کلاسی از بازدارنده‌های سیگنالینگ جیبرلین هستند که در آرابیدوپسیس بسیار حفاظت شده هستند و شامل RGA[2]، *GAI*، RGL1، RGL2 و RGL3 هستند.

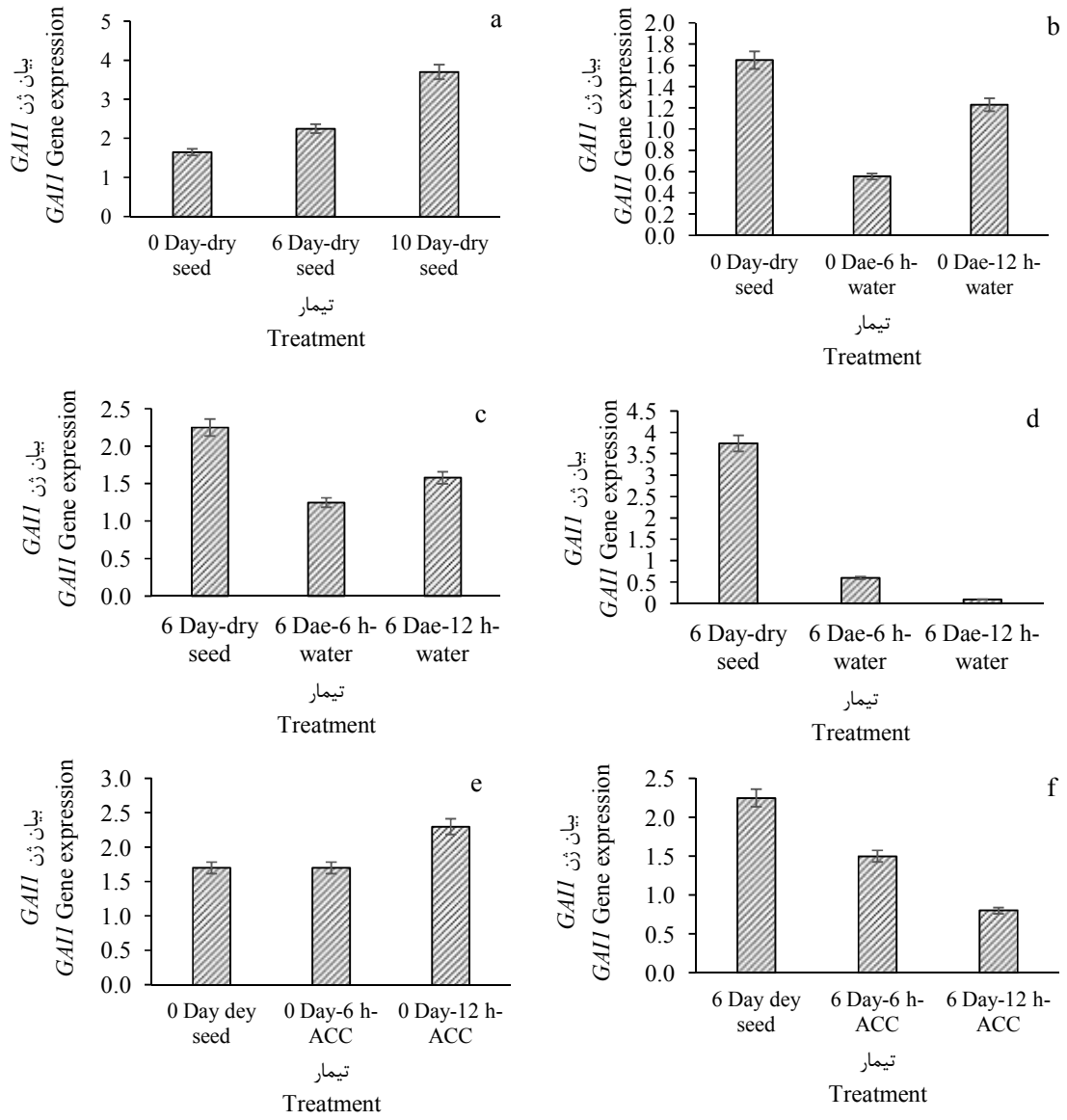
[1] Gibberellin Insensitive

[2] Repressor Gibberellin Like (RGL)



شکل ۲. a: میزان قند کل، c: گلوکز و e: فروکتوز تحت تأثیر پیری تسریع شده در زمان‌های مختلف (۰، ۶ و ۱۰ روز) و هورمون‌های متفاوت. b: میزان قند کل، d: گلوکز و f: فروکتوز با سطوح مختلف پیری بدون استفاده و با استفاده از هورمون در بذر سویا. ACC: آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلیک اسید. SA: اسید سالیسیلیک. D: تعداد روزهای پیری تسریع شده در دمای ۴۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد. NA: پیری طبیعی به مدت شش ماه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس.

Fig. 2. a: Total sugar, c: Glucose and e: fructose under accelerated aging at different times (0, 6 and 10 days) as affected by various hormones. b: Total sugar, d: Glucose and f: fructose at different aging levels using various hormones in soybean seeds. Days: accelerated aging days number at 40 ° C and relative humidity of 100%, h: The number of hours affected by hormone or water treatment, ACC: Amino-cyclopropane-1-carboxylic acid.



شکل ۳. بیان ژن *GAI1* a: تحت تأثیر سطوح مختلف (۰، ۶ و ۱۰ روز) ا پیری تسریع شده در بذور خشک. b: تحت تأثیر تیمار زمان‌های مختلف آب نوشی (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت آب نوشی) در بذور پیر نشده. c: تحت تأثیر اعمال ۶ روز پیری تسریع شده و تیمار زمان‌های مختلف آب نوشی (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت آب نوشی). d: تحت تأثیر اعمال ۱۰ روز پیری تسریع شده و تیمار زمان‌های مختلف آب نوشی (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت آب نوشی). e: تحت تأثیر تیمار زمان‌های مختلف اعمال هورمون ACC (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت) در بذور پیر نشده. f: تحت تأثیر اعمال ۶ روز پیری تسریع شده و تیمار زمان‌های مختلف اعمال هورمون ACC (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت) در بذر سویا. Days: تعداد روزهای اعمال پیری تسریع شده در دمای ۴۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد. h: تعداد ساعت تحت تاثیر تیمار هورمون و یا آب. و ACC: آمینوسیکلوپروپان-۱- کربوکسیلیک اسید.

Fig. 3. *GAI1* gene a: affected by different aging levels in dry seeds. b: affected by different imbibition times treatments (dry seeds, 6 and 10 h imbibition) in non-aging seeds. c: affected by 6 days aging and different inhibition times treatments (dry seeds, 6 and 10 h imbibition). d: affected by 10 days aging and different inhibition times treatments (dry seeds, 6 and 10 h imbibition). e: affected by ACC application at different times (dry seeds, 6 and 10 h ACC application) in non-aging seeds. f: affected by 6 days aging and ACC application at different times (dry seeds, 6 and 10 h ACC application). Days: accelerated aging days number at 40 ° C and relative humidity of 100%, h: The number of hours affected by hormone or water treatment, ACC: Amino-cyclopropane-1-carboxylic acid.

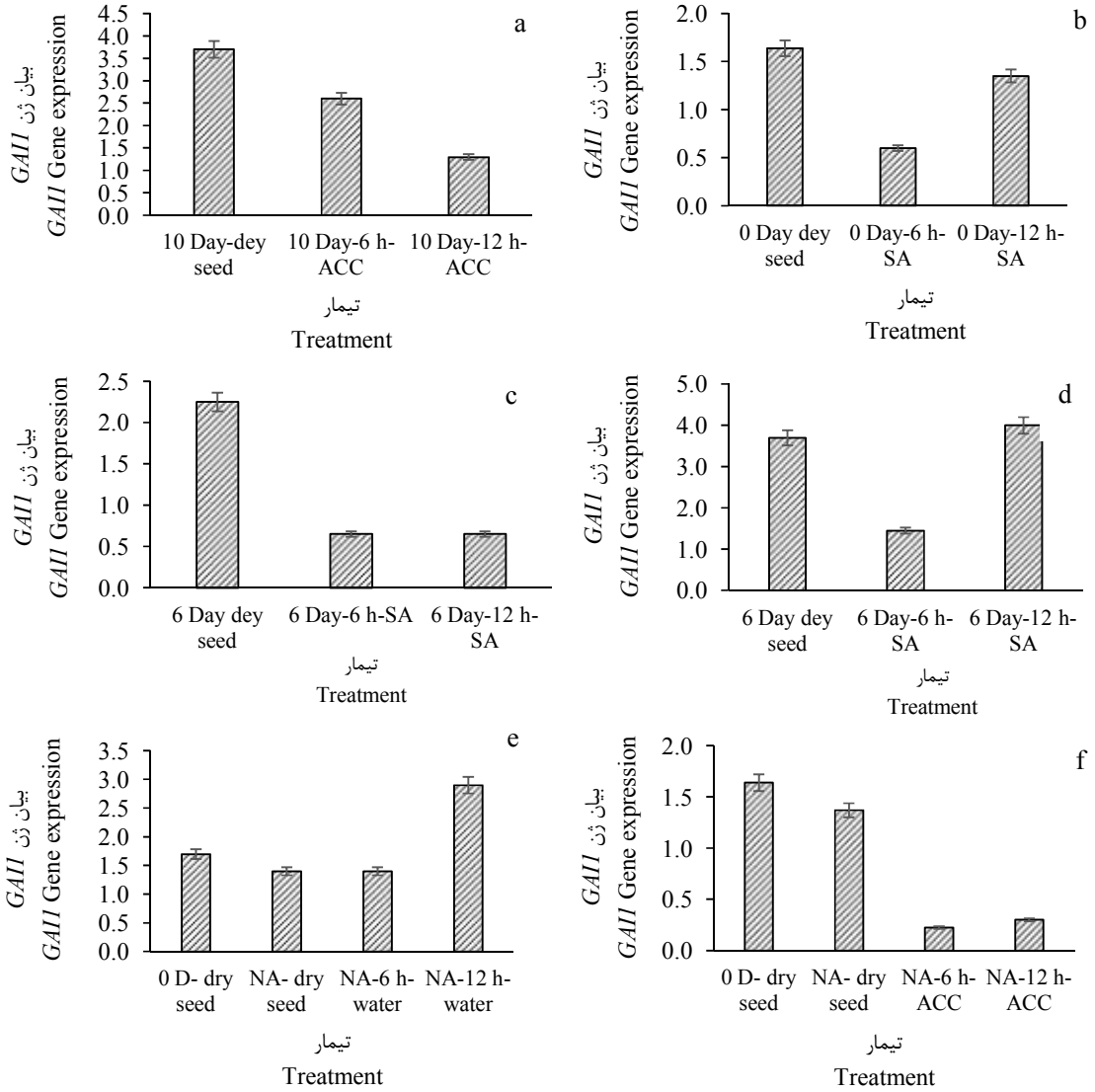
GAI و RGA در آرابیدوپسیس دو پروتئین DELLA هستند که اولین بار شناسایی شدند (اولشوفسکی[1] و همکاران، ۲۰۰۲). افزایش بیان *GAI1* با افزایش تعداد روزهای پیری، بیانگر افزایش عمل بازدارنده‌های جوانه‌زنی با افزایش پیری است.

کاهش بیان *GAI1* در بذرهای پیر نشده و ۶ روز پیر در ۶ ساعت در اثر آب‌نوشی نشان می‌دهد که آب‌نوشی سبب کاهش نقش *GAI1* شده است (شکل ۳b و ۳c). همچنین نتایج کاهش بیان *GAI1* بذر پیر نشده با افزایش بیان AMY1 و جوانه‌زنی ۹۵ درصد مطابقت می‌کند که نشان می‌دهد با کاهش اثر بازدارنده آلفا آمیلاز (کاهش بیان *GAI1*) و افزایش بیان آلفا آمیلاز (AMY1) جوانه‌زنی بالایی رخ داده است. در بذرهای پیر نشده پس از ۱۲ ساعت بیان *GAI1* در اثر استفاده از ACC افزایش یافت. در واقع در بذر پیر نشده، ACC سبب افزایش بیان بازدارنده جوانه‌زنی شده است (شکل ۳e)؛ اما در بذر ۶ روز پیر ACC سبب کاهش *GAI1* شد (شکل ۳f) که همچنان با نتایج افزایش بیان AMY1 مطابقت دارد. در بذرهای پیر نشده و ۶ روز پیر اسید سالیسیلیک سبب کاهش *GAI1* شد (شکل ۴b و ۴c) که مشاهده می‌شود در این بذر نیز کاهش در بیان *GAI1* با افزایش در بیان AMY1 مطابقت دارد.

در بذر ۱۰ روز پیر تحت تاثیر آب، ACC و اسید سالیسیلیک بیان *GAI1* کاهش یافت (شکل ۳d، ۴a و ۴d) که نشان می‌دهد یکی از اثرات بازدارندگی بر آلفا آمیلاز کاهش یافته؛ اما جوانه‌زنی در هر سه تیمار صفر بود. در بذر ۱۰ روز پیر تحت تاثیر آب، ACC و اسید سالیسیلیک مشاهده شد که نه تنها بیان AMY1، بلکه بیان BMY1 نیز کاهش یافته است که بر این دلالت دارد که کاهش بیان *GAI1* برای جوانه‌زنی لازم است اما کافی نیست و باید عامل تحریک‌کننده مانند بیان ژن‌های آنزیم‌های تحریک‌کننده جوانه‌زنی مثل آلفا آمیلاز و بتا آمیلاز نیز وجود داشته باشد. در بذرهای پیر طبیعی خشک بیان *GAI1* نسبت به بذرهای پیر نشده خشک کاهش یافت که در اثر استفاده از آب و اسید سالیسیلیک بیان آن پس از ۱۲ ساعت افزایش یافت (شکل ۴e و ۵) اما در اثر استفاده از ACC بیان *GAI1* کاهش یافت (شکل ۴f).

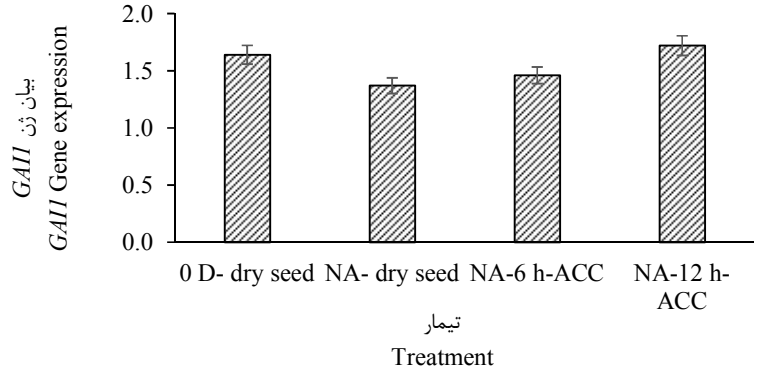
موتانت *GAI-1* آرابیدوپسیس به طور قابل توجهی کاهش پاسخ به جیبرلین را در طول نمو رویشی از خود نشان می‌دهند. موتانت *GAI-1* حاوی میزان زیادی از جیبرلین فعال هستند که نشان می‌دهد پروتئین RGA/*GAI* در تنظیم فیدبک بیوسنتز جیبرلین دخالت دارند (سان و گوبلر[2]، ۲۰۰۴). پروتئین *GAI-1* آرابیدوپسیس در برنج سبب پاکوتاهی شد و القای آلفا آمیلاز را به وسیله جیبرلین منسوخ کرد (فو[3] و همکاران، ۲۰۰۱). مطالعات RGA/*GAI* در چندین غلات نشان می‌دهد که عملکرد پروتئین‌های DELLA در سرکوبی سیگنالینگ جیبرلین در تک لپه‌ای‌ها و دو لپه‌ها بسیار حفاظت شده است (سان و گوبلر، ۲۰۰۴).

[1] Olszewski
[2] Sun and Gubler
[3] Fu



شکل ۴. بیان ژن *GAI1* a: تحت تأثیر اعمال ۱۰ روز پیری تسریع شده و تیمار زمان‌های مختلف اعمال هورمون ACC (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت). b: تحت تأثیر تیمار زمان‌های مختلف اعمال هورمون SA (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت) در بذور پیر نشده. c: تحت تأثیر اعمال ۶ روز پیری تسریع شده و تیمار زمان‌های مختلف اعمال هورمون SA (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت). d: تحت تأثیر اعمال ۱۰ روز پیری تسریع شده و تیمار زمان‌های مختلف اعمال هورمون SA (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت). e: تحت تأثیر بذر پیر نشده و اعمال پیری طبیعی و تیمار زمان‌های مختلف آب نوشی (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت آب نوشی). f: تحت تأثیر بذر پیر نشده و اعمال پیری طبیعی و تیمار زمان‌های مختلف اعمال هورمون SA (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت) در بذر سویا. ACC: آمینوسیکلوپروپان-۱- کربوکسیلیک اسید. SA: اسید سالیسیلیک. Days: تعداد روزهای اعمال پیری تسریع شده در دمای ۴۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد. h: تعداد ساعت تحت تاثیر تیمار هورمون و یا آب. NA: پیری طبیعی به مدت ۶ ماه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس

Fig. 4. *GAI1* gene expression a: affected by 10 days aging and ACC application at different times (dry seeds, 6 and 10 h ACC application). b: affected by SA application at different times (dry seeds, 6 and 10 h ACC application) in non-aging seeds. c: affected by 6 days aging and SA application at different times (dry seeds, 6 and 10 h ACC application). d: affected by 10 days aging and SA application at different times (dry seeds, 6 and 10 h ACC application). e: affected by non-aging seeds and natural aging and different imbibition times treatments (dry seeds, 6 and 10 h imbibition). f: affected by non-aging seeds and natural aging and SA application at different times (dry seeds, 6 and 10 h ACC application) in soybean seeds. ACC: Amino-cyclopropane-1-carboxylic acid, SA: salicylic acid, Days: accelerated aging days number at 40 ° C and relative humidity of 100%, h: The number of hours affected by hormone or water treatment, NA: Natural aging for six months at 25 ° C.



شکل ۵. بیان *GAI1* در سطوح پیری طبیعی بدون و با استفاده از هورمون در بذر سویا. SA: اسید سالیسیلیک. h: تعداد ساعت تحت تاثیر تیمار هورمون و یا آب. NA: پیری طبیعی به مدت ۶ ماه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس.

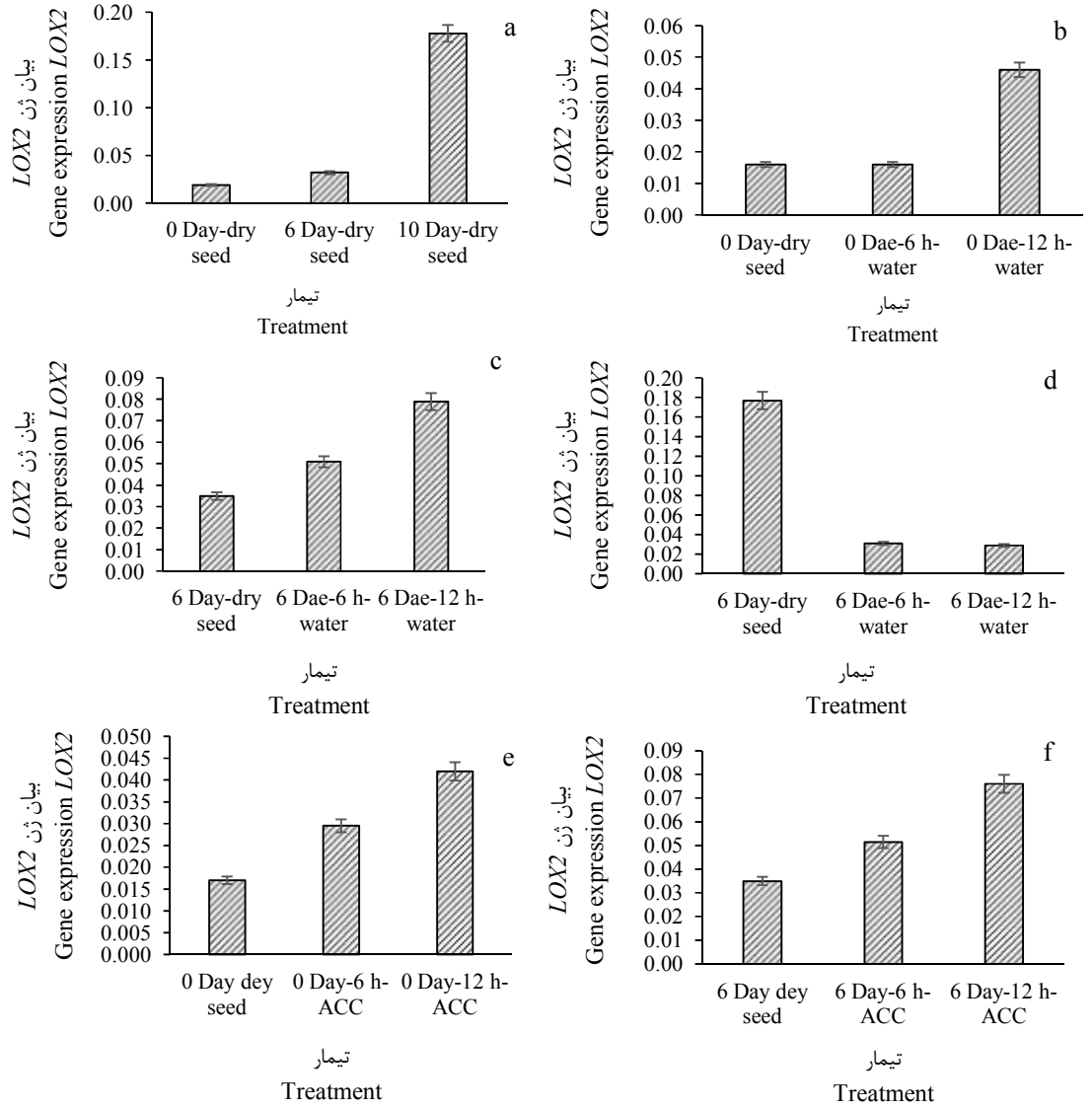
Fig. 5. *GAI1* gene expression at different aging levels using various hormones in soybean seeds. SA: salicylic acid, h: The number of hours affected by hormone or water treatment, NA: Natural aging for six months at 25 ° C.

بیان ژن *LOX2*

بیان *LOX2* طی پیری تسریع شده از صفر به ۶ روز افزایش یافت (شکل ۶a). بیان *LOX2* در بذرهای پیر طبیعی خشک نسبت به بذرهای پیر نشده افزایش یافت (شکل ۷e). ژن *LOX2* در فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز سویا دخالت دارد. افزایش بیان *LOX2* طی پیری با گزارش‌های افزایش فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز طی پیری بذر سویا مطابقت می‌کند. اثرات منفی آنزیم لیپواکسیژنازها در طول ذخیره‌سازی بذر سویا مشاهده شده است و گزارش شده است که زوال بذر سویا به وسیله محتوی اسیدلینولئیک و به وسیله آنزیم لیپواکسیژناز تاثیر می‌پذیرد و ژنوتیپ‌هایی از سویا که دارای محتوی پایین اسید لینولئیک هستند در طول انبارداری بنیه بالاتری دارند (لیما[1] و همکاران، ۲۰۱۰). بیان *LOX2* در بذور پیر نشده و ۶ روز پیر طی ۶ و ۱۲ ساعت آب‌نوشی افزایش یافت (شکل ۶b و ۶c) ولی در بذر ۱۰ روز پیر طی ۶ و ۱۲ ساعت آب‌نوشی کاهش یافت (شکل ۶d). آنزیم لیپواکسیژناز هیدروپراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع را کاتالیز می‌کند. در واقع اضافه شدن اکسیژن مولکولی به اسیدهای چرب غیراشباع معینی (برای مثال لینولیت، لوینونات و آرشیدونات) را کاتالیز می‌کند. لیپواکسیژنازها ۲۰ درصد پروتئین‌های سویا را تشکیل می‌دهند و حتی به عنوان پروتئین‌های ذخیره‌ای می‌توانند عمل کنند. بذر سویا منبع غنی از لیپواکسیژنازهاست. مطابق با نتایج ما گزارش شده است فعالیت *LOX* به محض جوانه‌زنی افزایش می‌یابد. گزارش شده است که فعالیت زیاد *LOX* در محور جنینی گیاهچه سویا باعث می‌شود که پروتیئن جدید از نو سنتز شود، از طرفی اسیدیته ایزوالکتریک این پروتئین‌ها متفاوت از دیگر *LOX* های بذر هستند (پارک[2] و همکاران، ۱۹۹۴). افزایش بیان *LOX2* در بذرهای پیر نشده و ۶ روز پیر طی ۶ و ۱۲ ساعت آب‌نوشی با افزایش فعالیت این آنزیم به محض آب‌نوشی و نقش آن در جوانه‌زنی مطابقت می‌کند.

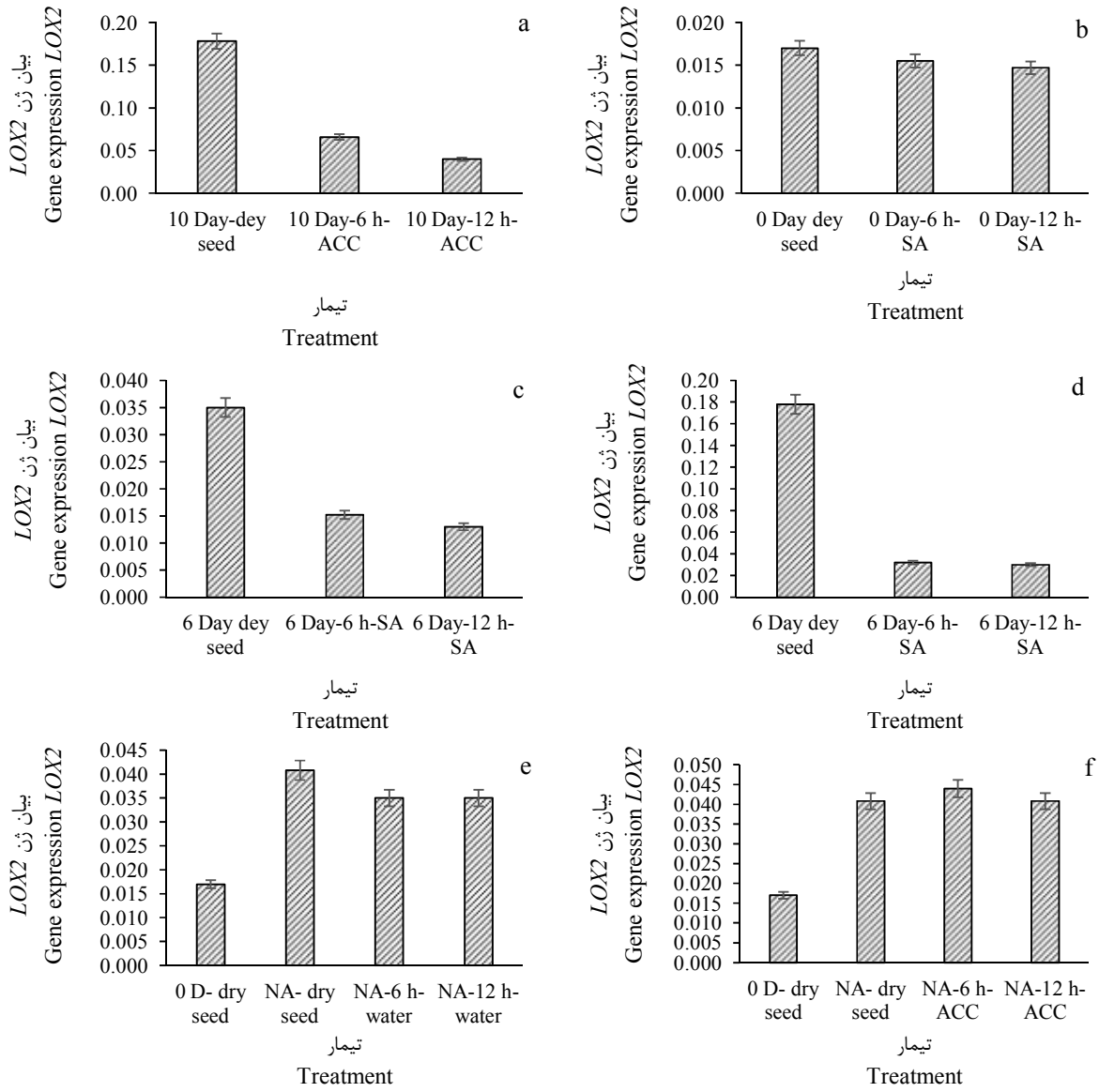
ACC در بذر پیر نشده و ۶ روز پیر سبب افزایش *LOX2* شد (شکل ۶e و ۶f) و در ۱۰ روز پیری منجر به روند کاهشی شد (شکل ۷a). نتایج ما با نتایج افزایش فعالیت لیپوکسیژناز گیاهچه‌های چاودار در اثر تیمار با اتفن و ACC مطابقت می‌کند. گزارش شده است که فعالیت لیپوکسیژناز در طول پیری و همچنین در بافت‌های آلوده و تحت تنش افزایش می‌یابد. پیری، آلودگی و تنش با افزایش تولید اتیلن مرتبط بودند. تیمار گیاهچه‌های چاودار با اتفن یا ACC منجر به افزایش در فعالیت لیپواکسیژناز شد. افزایش در فعالیت لیپواکسیژناز ۳۰ دقیقه پس از تیمار با اتفن مشاهده شد که بیانگر این است که این آنزیم در تنظیم سریع متابولیک در پاسخ به تغییرات هورمونی دخالت دارد (ایوینش[3]، ۱۹۹۲).

[1] Lima
[2] Park
[3] Ievinsh



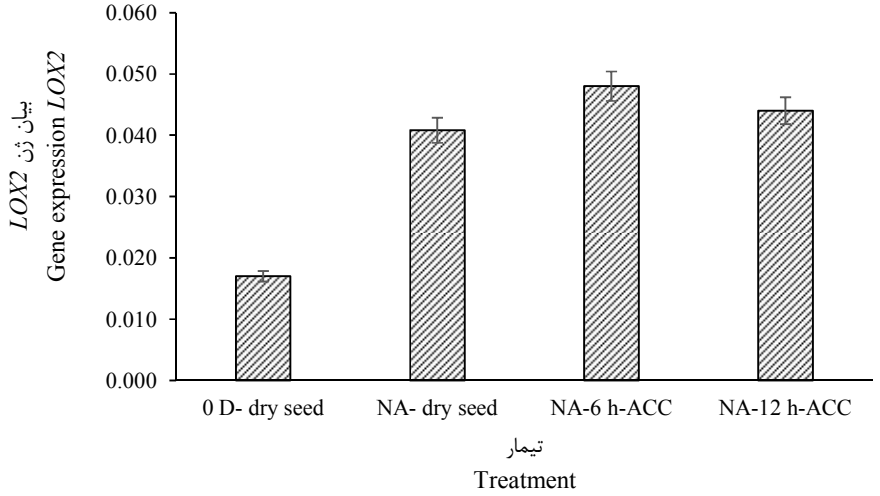
شکل ۶. بیان ژن *LOX2* a: تحت تأثیر سطوح مختلف (۰، ۶ و ۱۰ روز) پیری تسریع شده در بذور خشک. b: تحت تأثیر تیمار زمان‌های مختلف آب نوشی (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت آب نوشی) در بذور پیر نشده. c: تحت تأثیر اعمال ۶ روز پیری تسریع شده و تیمار زمان‌های مختلف آب نوشی (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت آب نوشی). d: تحت تأثیر اعمال ۱۰ روز پیری تسریع شده و تیمار زمان‌های مختلف آب نوشی (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت آب نوشی). e: تحت تأثیر تیمار زمان‌های مختلف اعمال هورمون ACC (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت) در بذور پیر نشده. f: تحت تأثیر اعمال ۶ روز پیری تسریع شده و تیمار زمان‌های مختلف اعمال هورمون ACC (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت) در بذر سویا. Days: تعداد روزهای اعمال پیری تسریع شده در دمای ۴۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد. h: تعداد ساعت تحت تاثیر تیمار هورمون و یا آب. و ACC: آمینوسیکلوپروپان-۱- کربوکسیلیک اسید.

Fig. 6. *LOX2* gene a: affected by different aging levels in dry seeds. b: affected by different imbibition times treatments (dry seeds, 6 and 10 h imbibition) in non-aging seeds. c: affected by 6 days aging and different imbibition times treatments (dry seeds, 6 and 10 h imbibition). d: affected by 10 days aging and different imbibition times treatments (dry seeds, 6 and 10 h imbibition). e: affected by ACC application at different times (dry seeds, 6 and 10 h ACC application) in non-aging seeds. f: affected by 6 days aging and ACC application at different times (dry seeds, 6 and 10 h ACC application). Days: accelerated aging days number at 40 ° C and relative humidity of 100%, h: The number of hours affected by hormone or water treatment, ACC: Amino-cyclopropane-1-carboxylic acid.



شکل ۷. بیان ژن *LOX2* a: تحت تأثیر اعمال ۱۰ روز پیری تسریع شده و تیمار زمان‌های مختلف اعمال هورمون ACC (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت). b: تحت تأثیر تیمار زمان‌های مختلف اعمال هورمون SA (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت) در بذور پیر نشده. c: تحت تأثیر اعمال ۶ روز پیری تسریع شده و تیمار زمان‌های مختلف اعمال هورمون SA (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت). d: تحت تأثیر اعمال ۱۰ روز پیری تسریع شده و تیمار زمان‌های مختلف اعمال هورمون SA (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت). e: تحت تأثیر بذر پیر نشده و اعمال پیری طبیعی و تیمار زمان‌های مختلف آب نوشی (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت آب نوشی). f: تحت تأثیر بذر پیر نشده و اعمال پیری طبیعی و تیمار زمان‌های مختلف اعمال هورمون SA (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت) در بذر سویا. ACC: آمینوسیکلوپروپان-۱- کربوکسیلیک اسید. SA: اسید سالیسیلیک. Days: تعداد روزهای اعمال پیری تسریع شده در دمای ۴۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد. h: تعداد ساعت تحت تاثیر تیمار هورمون و یا آب. NA: پیری طبیعی به مدت ۶ ماه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس

Fig. 7. *LOX2* gene expression a: affected by 10 days aging and ACC application at different times (dry seeds, 6 and 10 h ACC application). b: affected by SA application at different times (dry seeds, 6 and 10 h ACC application) in non-aging seeds. c: affected by 6 days aging and SA application at different times (dry seeds, 6 and 10 h ACC application). d: affected by 10 days aging and SA application at different times (dry seeds, 6 and 10 h ACC application). e: affected by non-aging seeds and natural aging and different imbibition times treatments (dry seeds, 6 and 10 h imbibition). f: affected by non-aging seeds and natural aging and SA application at different times (dry seeds, 6 and 10 h ACC application) in soybean seeds. ACC: Amino-cyclopropane-1-carboxylic acid, SA: salicylic acid, Days: accelerated aging days number at 40 ° C and relative humidity of 100%, h: The number of hours affected by hormone or water treatment, NA: Natural aging for six months at 25 ° C.



شکل ۸. بیان *LOX2* در سطوح پیری طبیعی بدون و با استفاده از هورمون در بذر سویا. SA: اسید سالیسیلیک. h: تعداد ساعت تحت تاثیر تیمار هورمون و یا آب. NA: پیری طبیعی به مدت ۶ ماه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس.

Fig. 8. *LOX2* gene expression at different aging levels using various hormones in soybean seeds. SA: salicylic acid, h: The number of hours affected by hormone or water treatment, NA: Natural aging for six months at 25 ° C

نشان داده شده است که زخم مکانیکی بافت گیاهی سبب می‌شود که افزایش سریع در تولید اتیلن ۱۰ تا ۳۰ دقیقه پس از تحریک آغاز شود (ایوینش، ۱۹۹۲).

تیمار اسید سالیسیلیک سبب کاهش بیان *LOX2* در بذرهای ۶ و ۱۰ روز پیر شد (شکل ۷c و ۷d). نتایج این آزمایش مطابق تحقیقات دیگر نشان داد که اسید سالیسیلیک به تنهایی فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز و محتوی MDA را کاهش داد و اثرات فلزات سنگین همانند جیوه و سرب را بر غشا بهبود بخشید. سازوکار عمل اسید سالیسیلیک ممکن است نتیجه توقف تشکیل اتیلن باشد؛ زیرا بین تشکیل اتیلن و فعالیت لیپواکسیژناز همبستگی وجود دارد (میشرا و چودهوری[1]، ۱۹۹۹). گزارش شده است که اسید سالیسیلیک تکمیل مسیر سنتز اتیلن را بازداری می‌کند (راسکین[2]، ۱۹۹۲). اسید سالیسیلیک و ACC تاثیری بر بیان *LOX2* در مقایسه با بذرهای خشک پیر طبیعی نداشتند (شکل ۷f و ۸).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این پژوهش در مجموع می‌توان چنین استنباط کرد که زوال بذر و کاهش بنیه نتیجه برآیند فرآیندهای تخریبی متعدد و اختلال در فعالیت‌های فیزیولوژیکی بذر است. این پژوهش نشان داد که پیری بذر سویا با افزایش در میزان قندکل، گلوکز و فرکتوز همراه می‌باشد. همچنین بیان ژن‌های دخیل در مسیر جوانه‌زنی نیز دستخوش تغییر می‌شوند. افزایش بیان ژن *LOX2* در هر دو مسیر پیری تسریع شده و پیری طبیعی مشاهده شد. بیان *GAI1* در پیری تسریع شده افزایش و در پیری طبیعی کاهش یافت. برآیند تمام این تغییرات کاهش بنیه و جوانه‌زنی بود. اسید سالیسیلیک و ACC هنگامی که بر بذرهای پیر نشده استفاده شدند خود همانند عامل تنش‌زا عمل کردند؛ ولی هنگامی که بر بذرهای پیر شده طبیعی و مصنوعی اعمال شدند تنها در برخی موارد اندازه‌گیری شده اثر مثبت داشتند. در مجموع این دو هورمون نتوانست سبب ترمیم بذر زوال یافته سویا شوند. در مجموع می‌توان گفت پیری سبب اختلال در صفات فیزیولوژیکی بذر می‌گردد و اسید سالیسیلیک و آمینوسیکلوپروپان کربوکسیلیک اسید نمی‌توانند سبب بهبود زوال بذر سویا شوند.

[1] Mishra and Choudhuri
[2] Raskin

منابع

Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J. and Harberd, N.P. 2006. Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. Science, 311: 91-94. https://doi: 10.1126/science.1118642

Achard, P., Liao, L., Jiang, C., Desnos, T., Bartlett, J., Fu, X. and Harberd, N.P. 2007. DELLAs contribute to plant photomorphogenesis. Plant Physiology, 143: 1163-1172. https://doi.org/10.1104/pp.106.092254

AOAC.1995. Official method of analysis (16th Ed.). Arlington, VA., USA: AOAC.

Beaudoin, N., Serizet, C., Gosti, F. and Giraudat, J. 2000. Interactions between bscisic acid and ethylene signaling cascades. The Plant Cell, 12(7): 1103–1115. https://doi.org/10.1105/tpc.12.7.1103

Bernal-Lugo, I. and Leopold, A.C. 1995. Seed stability during storage: raffinose content and seed glassy state. Seed Science Research, 5: 75–80. https://doi.org/10.1017/S0960258500002646

Bleecker, A.B. and Kende, H. 2000. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 16(1): 1-18. https://doi.10.1146/annurev.cellbio.16.1.1

Bolle, C. 2004. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. Planta, 218(5): 683-692. https://doi.10.1007/s00425-004-1203-z

Chang, S., Puryear, J. and Cairney, K. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. Plant Molecular Biology Reporter, 11(2): 113-116. https://doi.org/10.1007/BF02670468

Feussner, I., Kiihn, H. and Wasternack, C. 2001. Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. Trends in Plant Science, 6(6): 268–273. https://doi.10.1007/s00425-004-1203-z

Forcella, F., Benech Arnold, R.L., Sanchez, R. and Ghersa, C.M. 2000. Modeling seedling emergence. Field Crop Research, 67(2): 123-139. https://doi.org/10.1016/S0378-4290(00)00088-5

Fu, X., Sudhakar, D., Peng, J., Richards, D.E., Christou, P. and Harberd, N.P. 2001. Expression of Arabidopsis *GAI* in transgenic rice represses multiple gibberellin responses. The Plant Cell, 13(8): 1791-1802. https://doi: 10.1105/TPC.010020

Hampton, J.G. and Tekrony, D.M. 2005. Handbook of vigour test methods (3rd.ed). The International Seed Testing Association, 70-72.

Ievinsh, G. 1992. Soluble lipoxygenase activity in rye seedlings as related to endogenous and exogenous ethylene and wounding. Plant Science, 82(2): 155-159. https://doi.org/10.1016/0168-9452(92)90217-A

International Seed Testing Association (ISTA). 2009. International rules for seed testing. Seed Science and Technology, 24: 155-202.

Kolomiets, M.V., Hannapel, D.J., Chen, H., Tymenson, M. and Gladon, R.J. 2001. Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development. The Plant Cell, 13(3): 613–626. https://doi.org/10.1105/tpc.13.3.613

Kozarewa, I., Cantliffe, D.J., Nagata, R.T. and Stoffella, P.J. 2006. High maturation temperature of lettuce seeds during development increased ethylene production and germination at elevated temperatures. American Horticulture Science, 131: 564–570. https://doi.org/10.21273/JASHS.131.4.564

Lee, G.J., Wu, X., Shannon, J.G. Sleper, D.A. and Nguyen, H.T. 2007. Genome mapping and molecular breeding in plants. In Oilseeds, Volume II, ed. Kole, C. (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007). pp. 21-53.

Lima, W.A.A., Borem, A., Dias, D.C.F.S., Moreira, M.A. and Dias, L.A.S. 2010. Lipoxygenase and physiological quality of soybean seeds during storage. Seed Science and Technology, 38(3): 767-771. https://doi.org/10.15258/sst.2010.38.3.23

Marshal, A.H. and Lewis, D.N. 2004. Influence of seed storage conditions on seedling emergence, seedling growth and dry matter production of temperature forage grasses. Seed Science and Technology, 32(2): 493-501. https://doi.org/10.15258/sst.2004.32.2.19

Matilla, A.J. 2000. Ethylene in seed formation and germination. Seed Science Research. 10(2): 111-126. https://doi.org/10.1017/S096025850000012X

Mc Donald, M.B. 1999. Seed deterioration: Physiology, repair and assessment. Seed Science and Technology, 27(1): 177-237.

McDonald, M.B. 2004. Orthodx seed deterioration and its repair. 2004. In Handbook of seed physiology applications to agriculture. Food Products Press. Volum II, ed. Benech, R.L. and Sanchez, R.A. (Food Products Press, 2004), pp.273-304. https://doi.10.1017/S0021859605235347

Mishra, A. and Choudhuri, M.A. 1999. Effect of salicylic acid on heavy metal-induced membrane deterioration mediated by lipoxgenase in rice. Biologial Plantrum, 42(3): 409-415. https://doi/10.1023/A:1002469303670

Narayana Murthy, U.M. and Sun, W.Q. 2000. Protein modification by amadori and maillard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. Journal of Experimental Botany, 51: 1221-1228. https://doi.org/10.1093/jexbot/51.348.1221

Olszewski, N., Sun, T.P. and Gubler, F. 2002. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. The Plant Cell, 61–80. https://doi/10.1105/tpc.010476.

Park, T.K., Holland, M.A., Laskey, J.M. and Palacco, J.C. 1994. Germination-associated lipoxygenase transcripts persist in maturing soybean plants and are induced by jasmonate. Plant Science, 96: 109-117. https://doi.org/10.1016/0168-9452(94)90227-5

Raskin, L. 1992. Role of salicylic in plant. Plant Molecular Biology, 43: 439-463. https://doi.10.1146/annurev.pp.43.060192.002255

Rivas-San Vicente, M. and Javier Plasencia, J. 2011. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and Development. Journal of Experimental Botany, 62(10): 3321–3338. https://doi.10.1093/jxb/err031

Royo, J., Vancanneyt, G., Perez, A.G., Sanz, C., Siormann, K., Rosahl, S. and Sanchez Serrano, J.J. 1996. Characterization of three potato lipoxyenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. Journal of Biological Chemistry, 271: 21012–21019. https://doi. 10.1074/jbc.271.35.21012

Sharma, S., Virdi. P., Gambhir, S. and Munshi, S.K. 2005. Changes in soluble sugar content and antioxidant enzymes in soybean seeds stored under different storage conditions. Agricultural Biochemistry, 18: 9-12.https://doi. 10.15258/sst.2007.35.2.14

Shelar, V.R., Shaikh, R.S. and Nikam, A.S. 2008. Soybean seed quality during storage: A review. Agricultural Reviews, 29(2): 125-131. https://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v20n11p1025-1030

Shoresh, M., Yedidia, I. and Chet, I. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum T203*. Phytopathology, 95(1): 76-84. https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0076

Sun, T. and Gubler, F. 2004. Molecular mechanism of gibberellin signalling plants. Annual Review of Plant Biology, 55: 197–223. https://doi.10.1146/annurev.arplant.55.031903.141753

Sun, W.Q. and Leopold, A.C. 1995. The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds. Physiologia Plantarum, 94(1): 94-105.

Wettlaufer, S. and Leopold, A.C. 1991. Relevance of amadori and maillard products to seed deterioration. Plant Physiology, 97: 165-1 69. https://doi.10.1104/pp.97.1.165

Yamaguchi, S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. Annual Review of Plant Biology, 59: 225-251. https://doi.10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804

Iranian Journal of Seed Research, 2020, 6(2): 61-79

Research Article

The Effect of ACC and Salicylic Acid on Germination and *GAI1* and *LOX2* Genes Expression in Deteriorated Soybean Seeds (*Glycine max*)

Mahboubeh Haji Abbasi[1], Reza Tavakkol Afshari[2], Alireza Abbasi[3], Reza Kamaei[4]

Extended Abstract

Introduction: Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is the primary source of vegetable oil. Even in desirable conditions, soybean seeds lose their viability in long term storage. Many factors contribute to seed deterioration, including genetic factors, mechanical damage, relative humidity, storage temperature, seed moisture content, existence of microflora, and seed maturity, which reduce seed quality and make seeds unfit for cultivation purposes.

Materials and Methods: In order to investigate the effects of seed deterioration on seed germination and also the effects of salicylic acid and ethylene on the improvement of deteriorated seeds of *G. max*., accelerated aging test for 0, 6 and 10 days and natural aging test for 6 months were conducted. After aging conditions, seeds were imbibed with 50 µM salicylic acid and 10 µM ACC (precursor of ethylene) for 6 hours at 25 °C. In addition, after natural and accelerated aging tests, a bunch of seeds was used without any hormonal treatment (i.e., dry seeds) as control seeds. The seeds' germination percentage, total sugar, fructose, and glucose were investigated. Moreover, the gene expression of *GAI1* and *LOX*1 was measured on dry seeds and under imbibition of water, salicylic acid and ACC at 6, 12 hours using Q-RT-PCR method.

Results: The germination results showed that increasing number of aging days led to a decrease in germination. Total sugar content in seeds aged for 6 days did not have a significant difference, as compared with non-aged seeds. However, total sugar content in seeds aged for 10 days was significantly higher than non-aged seeds. Increasing accelerated aging levels from 0 days to 10 days led to increases in glucose and fructose contents in dry seeds. In addition, genes exhibited different expressions in different days and hours. Increasing aging from 0 days to 10 days led to increases in *GAI1* gene expression. Moreover, *LOX2* expression increased in accelerated aging from 0 to 6 days. *LOX2* gene expression in naturally dried aged seeds also increased and was higher than that in non-aged seeds. SA and ACC had different effects on measured values.

Conclusion: In general, it can be concluded that the deterioration of seed quality and vigor result from numerous degradation processes and disruption in seeds' physiological activity. This study showed that aging is associated with an increase in total sugar, glucose and fructose levels. In addition, the expression of the genes involved in the germination is also affected. Increases in *LOX2* gene expression were observed in both accelerated aging and natural aging pathways. *GAI1* gene expression increased in accelerated aging. However, in normal aging, it decreased.

Keywords: Accelerated aging, Fructose, Glucose, Total sugar, Seed deterioration

***Highlights*:**

1- Identifying the role of *LOX2* and GAL1 genes in soybean seed deterioration.
2- Investigating seeds' physiological responses under natural and laboratory aging conditions.

[1] Graduated Ph.D. in Physiology of Plants, Agriculture and Natural Resources Campus, University of Tehran, Karaj, Karaj, Iran.
[2] Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
[3] Associate Professor, Agricultural and Natural Resources Campus, University of Tehran, Karaj, Karaj, Iran.
[4] Ph.D. Student of Agronomy, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

*Corresponding author, E-mail: Tavakolafshari@um.ac.ir

http://dorl.net/dor/20.1001.1.23831251.1398.6.2.11.3

http://dx.doi.org/10.29252/yujs.6.2.61

(Received: 03.03.2019 ; Accepted: 17.09.2019)