

اثر اسید سالیسیلیک و اتیلن بر جوانه‌زنی و بیان ژن‌های آلفا آمیلاز و بتا آمیلاز در بذر زوال یافته سویا (*Glycine max*)

محبوبه حاجی عباسی^۱، رضا توکل افشاری^{۲*}، علیرضا عباسی^۳، رضا کمانی^۴

۱. دانش آموخته دکتری تخصصی فیزیولوژی گیاهان زراعی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۲. استاد گروه آگروتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
۳. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۴. دانشجوی دکتری تخصصی فیزیولوژی گیاهان زراعی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۰۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۲۱)

چکیده

سویا از مهم‌ترین گیاهان دانه روغنی جهان است که از مشکلات تولید آن کاهش قوه نامیه و بنیه بذر طی مدت نگهداری و پیش از کشت می‌باشد. به منظور تعیین اثر اتیلن و اسید سالیسیلیک بر بهبود بذر زوال یافته سویا، طی این تحقیق بذور سویا در معرض پیری تسریع شده به مدت صفر، ۶، ۱۰ روز و پیری طبیعی به مدت ۶ 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 ۶ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد تیمار شدند. همچنین دسته‌ای بذور پس از آزمون پیری تسریع شده و طبیعی بدون هیچ تیماری به عنوان شاهد (بذر خشک) استفاده شدند. درصد جوانه‌زنی، هدایت الکتریکی و همچنین بیان ژن‌های AMY1، BMY1 در بذور خشک و همچنین طی ۶ و ۱۲ ساعت تحت اثر آب، اسید سالیسیلیک و ACC به روش qRT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. با افزایش پیری درصد جوانه‌زنی کاهش و هدایت الکتریکی افزایش یافت. بیشترین میزان جوانه‌زنی در بذور خشک غیر پیر (۹۵ درصد) بدست آمد. از طرفی ACC و اسید سالیسیلیک نتوانستند جوانه‌زنی بذور ۱۰ روز پیری را از صفر درصد تغییر دهند. همچنین بیشترین میزان هدایت الکتریکی ($53 \mu\text{Scm}^{-1}\text{gr}^{-1}$) در تیمار پیری تسریع شده ۱۰ روز و هورمون SA بدست آمد. بیان ژن AMY1 و BMY1 با افزایش سطح پیری افزایش یافت. هورمون اسید سالیسیلیک و ACC اثرات متفاوتی را بر صفات اندازه‌گیری شده داشتند. در بذور غیر پیر اسید سالیسیلیک سبب کاهش بیان AMY1 شد که نشان می‌دهد اسید سالیسیلیک در بذور غیر پیر همانند عامل تنش‌زا عمل می‌کند. میزان بیان ژن AMY1 در بذر صفر روز پیر به میزان ۱/۸ بود که این میزان در بذر ۱۰ روز پیری ۳/۳ بود. در مجموع می‌توان گفت پیری سبب اختلال در صفات فیزیولوژیکی (مانند هدایت الکتریکی) بذر می‌گردد و اسید سالیسیلیک و اتیلن نمی‌توانند سبب بهبود زوال بذر سویا شوند.

واژه‌های کلیدی: اتیلن، اسید سالیسیلیک، زوال بذر، آلفا آمیلاز، بتا آمیلاز

Effects of salicylic acid and ethylene on the germination and gene expression of alpha and beta amylase in deteriorated soybean seeds (*Glycine max*)

M. Hajiabbasi¹, R. Tavakkol Afshari^{2*}, A.R. Abbasi³, R. Kamaei⁴

1. Ph.D Graduate, in Crop Physiology, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
2. Professor, Department of Agrotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
4. Ph.D. Student of Agronomy, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
(Received: Jan. 21, 2019 – Accepted: Jun. 11, 2019)

Abstract

Glycine max is an important oilseed crop in all of the world. One of the problems of the *G. max* production is seed deterioration during seed storage, resulting in low germination and vigor before planting. In order to investigate the effects of ethylene and salicylic acid on the improvement of deteriorated soybean seed, accelerated aging tests were conducted for 0, 6 and 10 days and natural aging test for 6 months. After the aging conditions, seeds were imbibed by 50 μM salicylic acid and 10 μM ACC (precursor of ethylene) for 6 hours at 25 °C. Also, a batch of the seed was used after the natural and accelerated aging tests without any hormonal treatment as a control (called dry seeds). Germination percentage, electrical conductivity and gene expression of AMY1, BMY1 were investigated in the dry seed, imbibition of water, salicylic acid and ACC at 6, 12 hours by the qRT-PCR method. The seed germination decreased and electrical conductivity increased with the progress of the aging. Gene expression varied in different days and hours. Salicylic acid and ACC had different effects on measured traits. The highest germination rate was observed in non-aged dry seeds (95%). On the other hand, ACC and salicylic acid failed to change seed germination of 10-day aged seeds. Moreover, the highest electrical conductivity ($53 \mu\text{Scm}^{-1}\text{gr}^{-1}$) was in 10-day aged seeds affected by SA. The expression of AMY1 and BMY1 genes increased coincide with the age levels. Salicylic acid reduced the expression of AMY1 in non-aged seed, implicated that salicylic acid works as a stress factor in non-aged seeds. The expression of AMY1 gene in the non-aged seeds was 1.8, while it was 3.3 in 10-aged seed. Overall, aging caused disturbing of seed physiology and salicylic acid and ACC were not able to improve germination of deteriorated soybean seed.

Key words: Ethylene, salicylic acid, seed deterioration, AMY, BMY1

* Email: tavakolafshari@um.ac.ir

مقدمه

یکی از مهمترین منابع تامین روغن‌های گیاهی سویا یا *Glycine max (L.) Merrill* می‌باشد. 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 (Lee et al., 2007). یکی از مشکلات کشت سویا عدم دسترسی به بذر بالا در زمان کشت می‌باشد. بذور سویا معمولاً توانایی جوانه‌زنی را در طول ذخیره‌سازی بلند مدت حتی در شرایط 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. اگرچه دلیل اصلی از دست دادن قوه نامیه روشن نیست (Sharma et al., 2005)، اما فاکتورهای زیادی نظیر آسیب مکانیکی، رطوبت نسبی، دمای محیط ذخیره سازی، محتوی رطوبت بذر، دما، وجود میکروفلورا، رسیدگی بذر و عوامل دیگر در این فرآیند دخالت دارند که در صورت کاهش کیفیت بذر، شرایط را برای اهداف کشت نامناسب می‌کنند (McDonald, 2004).

جوانه‌زنی و سبز شدن بذر یکی از مهمترین مراحل رشدی گیاه است که تعیین کننده درجه موفقیت سیستم‌های زراعی در تولید می‌باشد (Forcella et al., 2000). قدرت جوانه‌زنی بذر بسته به دما و رطوبت در دوران رسیدگی، برداشت و انبارداری نامناسب کاهش یافته و دچار زوال یا فرسودگی می‌شود (Marshall and Lewis, 2004). بطور معمول در بذرهای زوال یافته جوانه‌زنی، سبز شدن بذر و رشد گیاهچه کاهش می‌یابد (McDonald, 1999).

فرسودگی بذر موجب تخریب DNA شده و این امر منجر به اختلال در فرآیند نسخه‌برداری 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 نخواهند بود (McDonald, 1999).

آنزیم آلفا‌آمیلاز هیدرولیز اتصالات گلیکوزیدی آلفا ۱-۴ پلی ساکاریدهای نشاسته و گلوکان را کاتالیز می‌کند. این آنزیم در میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و خصوصاً در فعالیت جوانه‌زنی غلات یافت می‌شود. آلفا‌آمیلاز نقش بحرانی را در تجزیه نشاسته در بذور در حال جوانه‌زنی دارد. انرژی لازم برای رشد بهتر گیاهان به وسیله آزاد شدن قندها از نشاسته ذخیره شده فراهم می‌شود. هیدرولیز نشاسته ابزار پایه فرآیندهای صنعتی مانند تهیه پخت نان، صنایع دارویی و تخمیری است (Van der Maarel et al., 2002).

بیان ژن آلفا‌آمیلاز (AMY1) در تعیین جوانه‌زنی یا عدم جوانه‌زنی نقش مهمی دارد. هورمون جیبرلین باعث می‌شود که فاکتور رونویسی ¹GAMYB در سلول‌های لایه آلورون غلات بیان شود. GAMYB به پروموتور ژن AMY1 متصل شده و در رونویسی ژن AMY1 مشارکت می‌کند. اسید آبسزیک از رونویسی این ژن جلوگیری می‌کند و باعث ایجاد خواب می‌گردد (Gubler et al., 1999). همچنین نشان داده شده که افزایش بیان GAMYB در جو سبب افزایش فعالیت آنزیم آلفا‌آمیلاز می‌گردد (Murray et al., 2006).

بتا‌آمیلازها اگرچه هیدرولازهایی هستند که بتا‌مالتوز را از انتهای غیر احیا شونده آلفا ۱-۴ متصل به پلی و الیگلوگلوکان تا رسیدن به اولین نقطه انشعاب آلفا ۱ و ۶ گلوکز در طول مولکول سوپسترا، آزاد می‌کنند. این آنزیم در بسیاری از گیاهان عالی و بعضی از باکتری‌ها وجود دارد. در غلات این آنزیم به فرم‌های آزاد و متصل به غشا وجود دارد (Yamasaki, 2003). همچنین گزارش شده که بتا‌آمیلاز در طول اوایل جوانه‌زنی برنج سنتز می‌شود

¹ GA-induced Myb-like protein

خشکی، گرما، سرما، علفکش‌ها و تنش فلزات سنگین دخالت دارد. این هورمون در انتقال نموی القاء شده توسط تنش مانند گلدهی، القای غده و پیری دخیل است (Rivas-San Vicente and Javier Plasencia, 2011).

هدف از این آزمایش بررسی تاثیر اسید سالیسیلیک و اتیلن بر جوانه‌زنی و فعالیت آلفا آمیلاز و بتا آمیلاز در بذر زوال یافته سویا بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با چهار تکرار در دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی پردیس کرج در سال ۹۴-۱۳۹۳ اجراء شد. در این تحقیق از بذر سویا *Glycine max* رقم Bauyana استفاده شد. بذر سویا از موسسه بین المللی CSIRO واقع در شهر کانبرا 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. بذور در معرض پیری تسریع شده به مدت صفر، شش و ده روز (در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۱۰۰٪) و پیری طبیعی (نگهداری شده در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد 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 سانتی گراد تیمار شدند. همچنین دسته‌ای بذور پس از آزمون پیری تسریع شده و طبیعی بدون هیچ تیماری به عنوان شاهد (بذر خشک) استفاده شدند. درصد جوانه‌زنی، هدایت الکتریکی و همچنین بیان ژن‌های *AMY1* و *BMY1* در بذور خشک و طی شش و دوازده ساعت تحت اثر آب، اسید سالیسیلیک و ACC به روش qRT-PCR بررسی شدند.

(Okamoto and Akazawa, 1980). پیشنهاد شده که فعالیت بتا آمیلاز شاخص مطلوبی در ارزیابی جوانه‌زنی توده‌های بذر برنج و بنیه آن‌ها در طول جوانه‌زنی است (Nandi et al., 1995). در بذر ارزن فعالیت بتا آمیلاز به طور قابل توجهی در طول ۱ تا ۴ روز اولیه جوانه‌زنی افزایش می‌یابد و مطابق با افزایش در فعالیت آنزیم، جوانه‌زنی بذر به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد و نشان می‌دهد که بتا آمیلاز ممکن است نقش مهمی در جوانه‌زنی داشته باشد (Yamasaki, 2003).

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 (Matilla, 2000). اتیلن اغلب نقش تحریک کننده در جوانه‌زنی دارد (Tavakokol Afshari and Shayanfar, 2016) به نظر می‌رسد که اتیلن در فرآیند جوانه‌زنی بذور معینی دخالت دارد و خروج ریشه‌چه را تحت شرایط نامطلوب (برای مثال در دمای بالا) افزایش می‌دهد (Kozarewa et al., 2006). در بذور کاهو دمای رسیدگی بر جوانه‌زنی بذر اثر می‌گذارد که خود به وسیله اثر بر تولید اتیلن می‌باشد (Kozarewa et al., 2006). در مطالعات اخیر نشان داده شده که کاربرد اتیلن جوانه‌زنی را به وسیله کاهش حساسیت به اسید آبسزیک، افزایش می‌دهد (Beaudoin, 2000). همچنین اسید سالیسیلیک یک ترکیب فنولیک است که سطوح پایه آن در گونه‌های مختلف، متفاوت می‌باشد. این تفاوت در سطوح، می‌تواند حتی در میان اعضای یک گونه مشاهده شود. اسید سالیسیلیک در بیان ژن‌های مرتبط با پاتوژن‌ها (PR^1)، مقاومت اکتسابی سیستمیک و پاسخ‌های فوق حساسیت دخالت دارد. همچنین در پاسخ به تنش‌های غیر زنده مانند ازن، شوری، اشعه فرابنفش،

¹ Pathogen-Related gene

حرارت به تعادل برسند. یک ظرف ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۲۵۰ میلی لیتر آب دیونیزه نیز به عنوان به عنوان شاهد تهیه شد. ۴ نمونه ۵۰ بذری از هر تیمار به طور تصادفی انتخاب شد و قبل از قرار دادن در ظروف حاوی آب دیونیزه توزین شدند. بعد از ریختن بذور درون ظرف آن‌ها به آرامی چرخانده شد. سپس ظروف حاوی آب و بذر به مدت ۲۴ ساعت در دمای 20 ± 1 درجه سانتی گراد قرار داده شدند. دستگاه اندازه گیری هدایت الکتریکی مدل (Inolab Listed 9F300) قبل از شروع به اندازه گیری کالیبره شد. در پایان دوره ۲۴ ساعته خیساندن بذر هدایت الکتریکی محلول بلافاصله اندازه گیری شد. باید کلیه اندازه گیری‌ها در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد انجام شود و قبل از اندازه گیری ظروف حاوی آب به مدت ۱۰ تا ۱۵ ثانیه تکان داده شود. از قرار دادن سلول دستگاه بر روی بذور باید اجتناب شود. میزان هدایت الکتریکی آب دیونیزه ظرف شاهد در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد و مقدار آن را از میزان هدایت الکتریکی بدست آمده برای هر ظرف کم شد. میزان هدایت الکتریکی به ازای هر گرم بذر مربوط به هر نمونه از رابط زیر بدست آمد (ISTA, 2009).

$$EC (\mu S cm^{-1} g^{-1}) = \frac{EC_s - EC_c}{W} \quad \text{رابطه (۲)}$$

W: وزن نمونه بذر بر حسب گرم

EC_s: هدایت الکتریکی هر نمونه بذر بر حسب

میکروزیمنس بر سانتی متر

EC_c: هدایت الکتریکی آب (نمونه شاهد) بر حسب

میکروزیمنس بر سانتی متر

EC: هدایت الکتریکی بدست آمده بر حسب

میکروزیمنس بر سانتی متر بر گرم

اگر حداقل و حداکثر میزان هدایت الکتریکی

اندازه گیری شده برای نمونه‌ها (تکرارهای هر تیمار) بیش

برای انجام آزمون پیری زودرس تعداد ۲۵۰ عدد بذر به صورت یک لایه بر روی صفحات مشبک درون جعبه‌های مخصوص آزمون پیری زودرس قرار داده شدند. درون جعبه‌ها به میزان یک سوم حجم ظرف آب به دقت اضافه شد به طوری که از پاشیدن آب بر روی بذرها خودداری شد. سپس جعبه‌ها در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد 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 (Hampton and Tekrony, 2005). در پایان آزمون جوانه‌زنی استاندارد و هدایت الکتریکی برای بذور انجام گرفت.

تنها به منظور اطمینان از درستی آزمون پیری زودرس رطوبت بذر درصد رطوبت بذر باید تعیین گردد. بدین منظور ۵ گرم از بذر را وزن شد و در دمای ۱۰۳ درجه سانتی گراد 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 W₁ وزن ظرف خالی، W₂ وزن ظرف به همراه وزن نمونه بذر قبل از خشک شدن، W₃ وزن ظرف به همراه وزن نمونه خشک می‌باشد (ISTA, 2009). مجدداً تایید می‌شود این آزمون تنها جهت اطمینان از درستی کار انجام گرفت و تمام نمونه‌های بذری پس از آزمون پیری زودرس رطوبتشان به ۲۸٪ رسیده بود.

$$\text{رابطه (۱)} \quad (\%) = (W_2 - W_3) / (W_2 - W_1) = \text{محتوی رطوبت}$$

اندازه گیری هدایت الکتریکی طبق دستور العمل انجمن بین المللی آزمون بذر^۱ انجام شد (ISTA, 2009). ۲۵۰ میلی لیتر آب دیونیزه در ظرف دربار ۵۰۰ میلی لیتری ریخته شد. سپس ظروف حاوی آب در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند تا از لحاظ

¹ International Seed Test Association (ISTA)

از ۵ میکروزیمنس بر سانتی متر گرم با هم تفاوت داشته باشند، باید آزمون تکرار شود (ISTA, 2009).

طبق قوانین انجمن بین‌المللی آزمون بذر، آزمون جوانه‌زنی استاندارد به روش بین کاغذ^۱ در دمای 25 ± 0.5 درجه سانتی‌گراد در تاریکی به مدت ۶ روز انجام گرفت.

استخراج RNA بر اساس روش (Chang *et al.*, 1993) انجام شد. همچنین برای ساخت cDNA، میزان ۲ میکروگرم از RNA درون تیوب ریخته شد و به آن یک میکرولیتر ۲ و ۵ mM Oligo DT میکرولیتر ۱۳ میکرولیتر رسانده شد. سپس تیوب‌ها ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس یک دقیقه بر روی یخ قرار داده شدند و برای ۵ ثانیه سانتریفیوژ شدند و به آن‌ها ۴ میکرولیتر از بافر FSB^۲، یک میکرولیتر از هر یک از 1 mM DTT ^۳، 1 mM RNase out و 1 mM SSIII ^۴ اضافه شد. سپس تحت دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ دقیقه و بعد ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. سپس ۰/۵ میکرولیتر از RNaseH به تیوب‌ها اضافه شد و ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و در نهایت به تیوب‌ها $5 \text{ MQ H}_2\text{O}$ اضافه شد تا به حجم ۱۰۰ میکرولیتر برسند. در این مرحله ساخت cDNA کامل شد. برای انجام qRT PCR ابتدا cDNA آماده شده در مرحله قبل به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شد. سپس برای انجام qRT-PCR از ۱۰ میکرولیتر مستر qRT-PCR (شرکت اینویتروژن)^۶ و ۱۰ میکرولیتر از cDNA رقیق شده، یک میکرولیتر از آغازگر استفاده شد.

آغازگرها با نرم‌افزار Primer 3 و Oligo analyzer طراحی شده‌اند و در جدول (۱) آورده شده است. برای انجام q-RT PCR از دستگاه روتورژن کیو (کوایژن)^۷ استفاده شد.

مراحل q-RT PCR شامل ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۵۰ چرخه تکرار شامل ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد سپس بدنبال هر دور، برنامه منحنی ذوب (از ۷۲ درجه سانتی‌گراد تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد با ۵ ثانیه درنگ در هر دما) صورت می‌گرفت که ثبت نتایج فلوروسنس در مرحله ۷۲ درجه سانتی‌گراد طی برنامه منحنی ذوب انجام می‌گرفت. سطوح بیان ژن‌های مورد نظر متناسب با بیان ژن UKN2 (به عنوان ژن مرجع) به روش آنالیز کمی مقایسه‌ای با استفاده از نرم‌افزار Rotor-Gene-Q Series صورت گرفت. به منظور کنترل نتایج و حصول اطمینان از این که نتایج به واسطه تشکیل پرایمر دایمر ایجاد نشده باشد از تیمار کنترل که در آن به جای نمونه از آب استفاده گردید، بهره گرفته شد. نتایج ارائه شده میانگین سه نمونه (سه تکرار) است و از اشتباه استاندارد برای مقایسه تفاوت‌ها استفاده شده است.

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.

¹ Between paper

² 5x First Strand Buffer

³ Dithiothreitol (DTT)

⁴ Super Script III Reverse transcriptase

⁵ Mill Q H₂O

⁶ Invitrogen

⁷ Rotor Gene Q (QIAGEN)

جدول ۱- توالی‌های آغازگر ژن AMY1 و BMY1 استفاده شده در این آزمایش

Table 1- Initial sequences of AMY1 and BMY1 genes used in this experiment

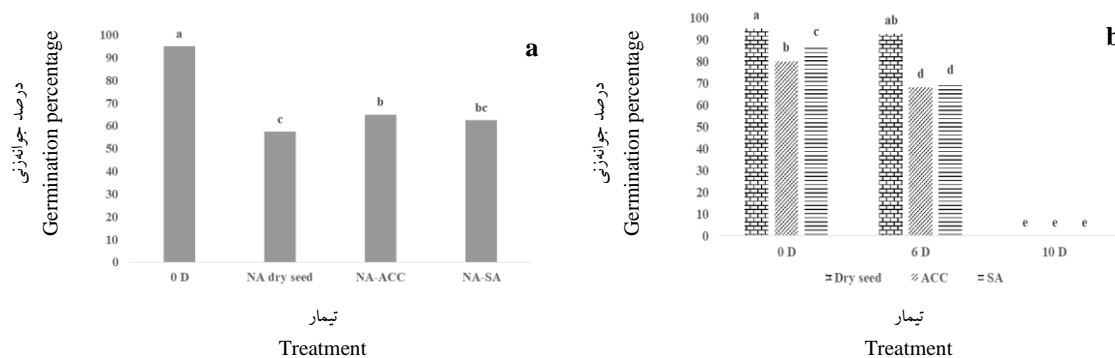
ژن (Gene)	آغازگر به جلو (5'-3') (Forward primer)	آغازگر معکوس (5'-3') (Reverse primer)	شماره دسترسی (Access number)	طول محصول (bp) (Product length)
AMY1	CCCTGCTCGTACTTGTGTGG	GGGAGAGGTTGTGGGTTGA	BK007878.1	217
BMY1	TGGAGGGAACGTAGGAGATATAG	CTGAGCGGTTGGTGTAGAAG	NM_001249318.1	196
UKN2	GCCTCTGGATACCTGCTCAAG	ACCTCCTCCTCAAACCTCTCTG	BE330034	79
ژن مرجع (Reference gene)				

پیری) نداشت. بعد از ۱۰ روز جوانه‌زنی به صفر رسید (شکل ۱b). جوانه‌زنی بذر غیر پیر تیمار شده با ACC به میزان ۸۰٪ رسید که تفاوت معنی‌دار با بذر غیر پیر خشک نداشت. همچنین جوانه‌زنی بذر غیر پیر تیمار شده با اسید سالیسیلیک ۸۷/۵٪ بود که تفاوت معنی‌دار با بذر غیر پیر خشک نداشت. ACC و اسید سالیسیلیک نتوانستند جوانه‌زنی بذر ۱۰ روز پیر را از صفر درصد تغییر دهند (شکل ۱a).

نتایج و بحث

آزمون جوانه‌زنی

نتایج جوانه‌زنی نشان داد که با افزایش تعداد روزهای پیری، جوانه‌زنی کاهش می‌یابد (شکل ۱). بذر خشک غیر پیر که هیچ گونه تیماری بر آن‌ها صورت نگرفته بود، ۹۵٪ جوانه‌زنی داشتند بعد از ۶ روز پیری، جوانه‌زنی به ۹۲/۵٪ بود که تفاوت معنی‌دار با بذر غیر پیر (صفر روز



شکل ۱- a: جوانه‌زنی بذر با سطوح مختلف پیری بدون استفاده و با استفاده از هورمون در بذر سویا.

b: جوانه‌زنی بذر 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 سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد. NA: پیری طبیعی به مدت شش ماه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد.

Fig. 1- a: Seed germination in different aging levels using various hormones in soybean seed.

b: Seed germination under accelerated aging in different times (0, 6 and 10 days) and 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

استفاده از اسید سالیسیلیک و ACC بر بذر پیر طبیعی جوانه‌زنی را به ترتیب به ۶۲/۵ و ۶۵٪ رساند که تفاوت

بذر پیر طبیعی (نگهداری شده به مدت شش ماه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) ۵۷/۵٪ جوانه‌زنی داشتند.

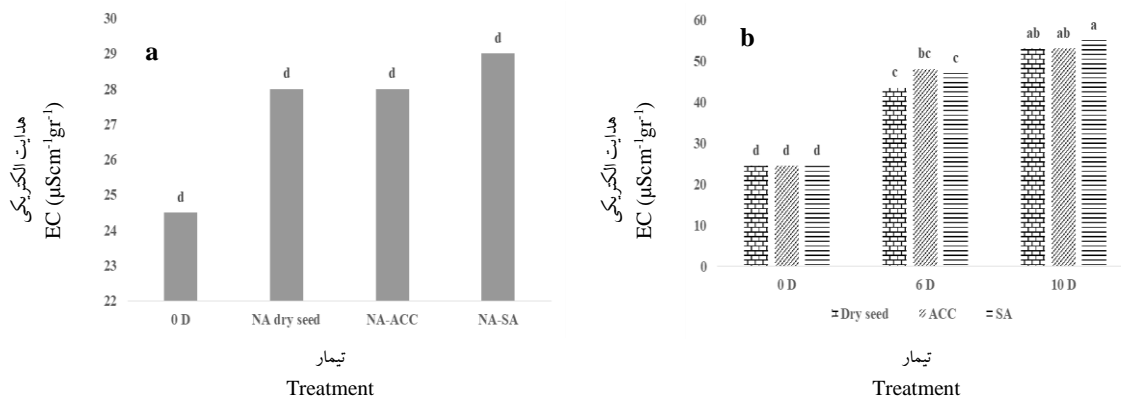
مطابق با نتایج ما مشاهده شده که فرآیندهای زوال یکنواختی غشا را برهم می‌زنند و نشست مواد محلول را از غشا افزایش می‌دهند و سبب کاهش کیفیت فیزیولوژیکی بذر و متعاقباً سبب کاهش بنيه بذر می‌گردند. از این رو هدایت الکتریکی به عنوان شاخص مهمی برای ارزیابی بنيه بذر در نظر گرفته شده است (Panobianco and Vieira., 2007). مطابق با نتایج ما مشاهده شد که پیری طبیعی در بذرهای لویبای فرانسوی که بیش از ۴ سال ذخیره شده بودند، سبب تخریب غشا و نشست مواد جذب‌کننده اشعه ماورای بنفش و افزایش هدایت الکتریکی شد (Pandey, 1988).

افزودن ACC و اسیدسالیسیلیک تغییری در هدایت الکتریکی بذر صفر و ده روز پیر به وجود نیاورد که نشان می‌دهد این دو هورمون تأثیری بر بهبود و یا زوال بیش‌تر در صفر روز و ده روز پیری نداشتند اما هدایت الکتریکی بذر شش روز پیر تحت تأثیر ACC و اسیدسالیسیلیک افزایش یافت که نشان می‌دهد ACC و اسیدسالیسیلیک سبب زوال بیش‌تر بذر شش روز پیر شده‌اند (شکل ۲b). ACC و اسیدسالیسیلیک تأثیری بر هدایت الکتریکی بذر زوال یافته طبیعی نیز نداشتند (شکل ۲a).

معنی‌داری بایکدیگر نداشتند (شکل ۱a). مطابق با نتایج ما، مطالعات نشان می‌دهد همچنان که تغییرات کاتابولیک با افزایش سن ادامه می‌یابد، توانایی بذر برای جوانه‌زنی 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 (Shelar et al., 2008). بذر سویا به طور کلی زندگی کوتاهتری در مقایسه با سایر گونه‌ها دارد. بذر سویا که برای ۱۱ ماه در دمای اتاق نگهداری شده‌اند، جوانه‌زنی اندکی را نشان دادند (Shelar et al., 2008).

هدایت الکتریکی

از آنجا که اغلب اثر زوال بذر با تأثیر بر بنيه بذر همراه است، آزمون هدایت الکتریکی صورت گرفت. هدایت الکتریکی بذر از صفر روز به ده روز افزایش یافت (شکل ۲b) که بیانگر افزایش زوال و تخریب غشا است. هدایت الکتریکی بذر پیر طبیعی نیز نسبت به بذر غیر پیر افزایش یافت که نشان‌دهنده وقوع فرآیند زوال و کاهش بنيه است.



شکل ۲- a: جوانه‌زنی بذر با سطوح مختلف پیری بدون استفاده و با استفاده از هورمون در بذر سویا.

b: جوانه‌زنی بذر 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 سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد. NA: پیری طبیعی به مدت شش ماه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد.

Fig. 2- a: - Electrical conductivity in different aging levels using various hormones in soybean seed.
b: - Electrical conductivity under accelerated aging in different times (0, 6 and 10 days) and 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

بیان ژن آلفا آمیلاز (AMY1)

بیان AMY1 با افزایش سطوح پیری افزایش یافت (شکل ۳a). بیان ژن AMY1 در صفر روز پیری طی ۶ و ۱۲ ساعت آب نوشی نسبت به بذر خشک افزایش بیان داشت (شکل ۳b). بیان ژن AMY1 در ۶ روز پیری طی ۶ و ۱۲ ساعت آب نوشی تفاوت معنی دار با بذر خشک ۶ روز پیر نداشت (شکل ۳c) اما در بذر ۱۰ روز پیر کاهش معنی دار در مقایسه با بذور خشک مشاهده شد (شکل ۳d) که با نتایج جوانه زنی هماهنگ است و همان طور که در نمودار (شکل ۱b) مشاهده می شود جوانه زنی در صفر و شش روز پیری تحت تاثیر آب تفاوت معنی داری با هم نداشت ولی در ۱۰ روز پیری جوانه زنی به صفر رسید. بیان AMY1 در بذور غیر پیر که ۶ ساعت با ACC تیمار شده بودند در مقایسه با بذور خشک افزایش داشت (شکل ۳e). در بذور ۶ روز پیر پس از ۱۲ ساعت تحت اثر ACC بیان AMY1 افزایش معنی دار داشت (شکل ۳f).

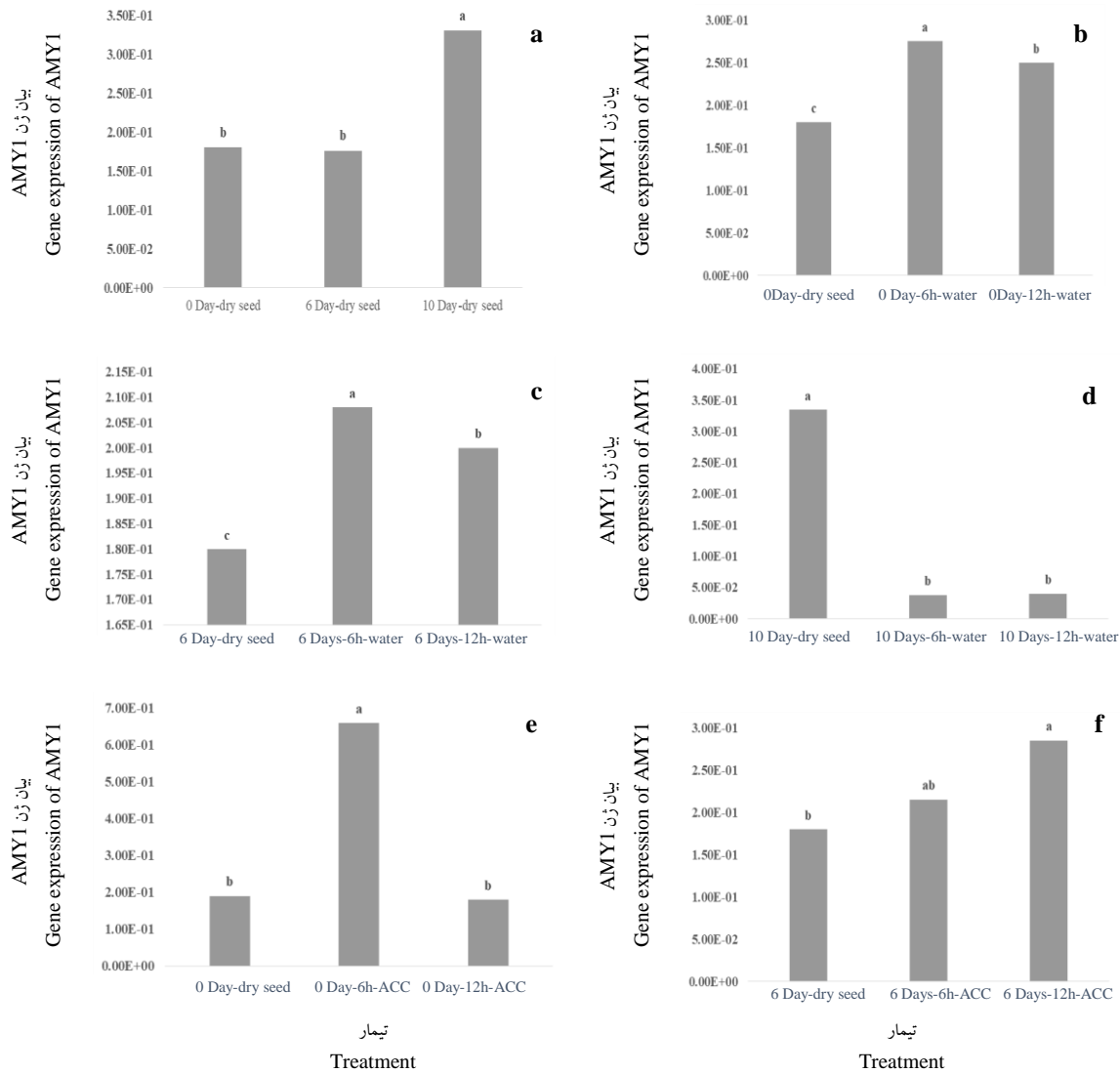
سنتز اتیلن به وسیله انواعی از تنش ها تحریک می شود و از آن به عنوان یک هورمون تنش یاد می شود که نقش مهمی در شرایط تنش ایفا می کند (Pierik et al., 2006). اتیلن در هماهنگی نمو، خواب و جوانه زنی دخالت دارد. در اکثر گونه ها اتیلن قبل یا همزمان با خروج ریشه چه افزایش می یابد (Siriwitayawan et al., 2007). اتیلن توانایی بذر را برای جوانه زدن در شرایط نامطلوب افزایش می دهد (Abeles, 1986).

با توجه به نتایج آزمون هدایت الکتریکی بذور ۶ روز پیر در مقایسه با بذور غیر پیر در شرایط نامساعدتری برای جوانه زنی قرار داشتند اما مشاهده شد که ACC در بذور ۶ روز پیر سبب افزایش بیان AMY1 شد که می توان این نتیجه را استنباط کرد که ACC در شرایط نامطلوب سبب افزایش بیان AMY1 می شود. این نتایج با نتایج افزایش جوانه زنی بذر کاهو در دمای بالا تحت تاثیر اتیلن مطابقت دارد. دمای بالا مانع از جوانه زنی بذر کاهو می شود که اتیلن در این شرایط سبب جوانه زنی می شود (Abeles, 1986). همچنین

مشاهده شده که بذوری که بنیه بالایی دارند در مقایسه با بذوری که بنیه پایینی دارند، اتیلن بیشتری تولید می کنند (Gorecki et al, 1991; Khan, 1994).

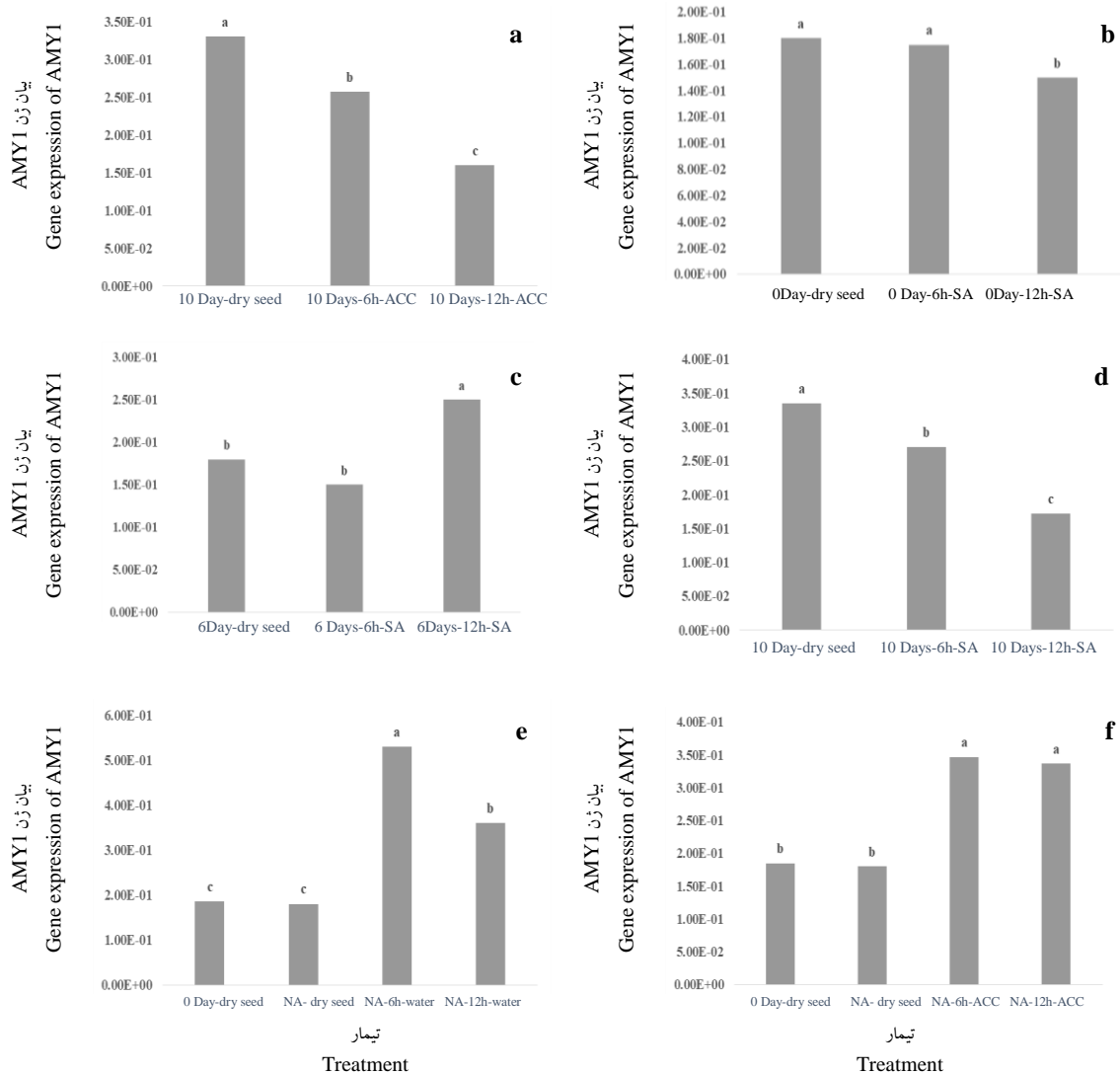
در جوانه زنی بذر *Amaranthus caudatus* اتفن (فرم تجاری اتیلن) در مقایسه با جیبرلین در برگرداندن اثر بازدارندگی پلی اتیلن گلایکول موثرتر بود. برخلاف جیبرلین، اتفن فعالیت آلفا آمیلاز را در بذرها بعد از ۱۲ و ۱۴ ساعت تحت شرایط کم آبی افزایش داد (Bilecka and Kepczynski, 2010). در بسیاری از گونه ها بازدارنده جوانه زنی بذر نه تنها در شرایط تنش بلکه در شرایط خواب می تواند نسبتاً یا کاملاً به وسیله اتیلن یا اتفن بازگردانده شود (Bilecka and Kepczynski, 2010). در بذور ۱۰ روز پیر، بیان AMY1 طی ۶ و ۱۲ ساعت تحت تاثیر ACC کاهش یافت (شکل ۴a). تاثیر متفاوت ACC بر بیان AMY1 طی ۶ و ۱۰ روز پیری می تواند با شدت شرایط نامساعد بذر ارتباط داشته باشد. در هر دو تیمار بذور ۱۰ روز پیر (بدون هورمون) و بذور ۱۰ روز پیر تحت تاثیر ACC جوانه زنی صفر درصد بود و در هر دو بیان AMY1 کاهش یافت. مطالعات نشان می دهد که بسته به گونه گیاهی و محیط، اتیلن می تواند تولید شدگی هیپوکوتیل را تحریک یا بازدارنده کند (Vriezen et al., 2003).

در بذور غیر پیر اسید سالیسیلیک سبب کاهش بیان AMY1 شد (شکل ۴b) که نشان می دهد اسیدسالیسیلیک بر بذور غیر پیر همانند عامل تنش زا عمل می کند. گزارش شده که در شرایط غیر تنش اسیدسالیسیلیک سبب کاهش بیان آلفا آمیلاز می شود و احتمالاً اسیدسالیسیلیک با القای تنش اکسیداتیو مانع از جوانه زنی می گردد (Rivas-San Vicente and Javier Plasencia, 2011). نقش اسید سالیسیلیک در جوانه زنی بذر بسیار بحث برانگیز است. برخی گزارشات نشان داده اند که اسید سالیسیلیک جوانه زنی را کاهش داده، در حالی که برخی دیگر نشان می دهد که آن جوانه زنی را افزایش می دهد.



شکل ۳- بیان ژن AMY1 a: تحت تأثیر سطوح مختلف (۶، ۱۰ و ۱۶ 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 غیر پیر. 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 غیر پیر. f: تحت تأثیر اعمال ۶ روز پیری تسریع شده و تیمار زمان‌های مختلف اعمال هورمون ACC (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت) در بذور سوپا. Days: تعداد روزهای اعمال پیری تسریع شده در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد. h: تعداد ساعت تحت تأثیر تیمار هورمون و یا آب. و ACC: آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلیک اسید.

Fig. 3- AMY1 gene a: affected by different aging levels in dry seeds. b: affected by different inhibition times treatments (dry seed, 6 and 10 h inhibition) in non-aging seeds. c: affected by 6 days aging and different inhibition times treatments (dry seed, 6 and 10 h inhibition). d: affected by 10 days aging and different inhibition times treatments (dry seed, 6 and 10 h inhibition). e: affected by ACC application in different times (dry seed, 6 and 10 h ACC application) in non-aging seeds. f: affected by 6 days aging and ACC application in different times (dry seed, 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 ۴- بیان ژن AMY1 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 غیر پیر. 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 غیر پیر و اعمال پیری طبیعی و تیمار زمان‌های مختلف آب نوشی (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت). f: تحت تأثیر بذر غیر پیر 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 سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد. h: تعداد ساعت تحت تأثیر تیمار هورمون یا آب. NA: پیری طبیعی به مدت ۶ ماه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد.

Fig. 4- AMY1 gene expression a: affected by 10 days aging and ACC application in different times (dry seed, 6 and 10 h ACC application). b: affected by SA application in different times (dry seed, 6 and 10 h ACC application) in non-aging seeds. c: affected by 6 days aging and SA application in different times (dry seed, 6 and 10 h ACC application). d: affected by 10 days aging and SA application in different times (dry seed, 6 and 10 h ACC application). e: affected by non-aging seed and natural aging and different inhibition times treatments (dry seed, 6 and 10 h inhibition). f: affected by non-aging seed and natural aging and SA application in different times (dry seed, 6 and 10 h ACC application) in soybean seed.

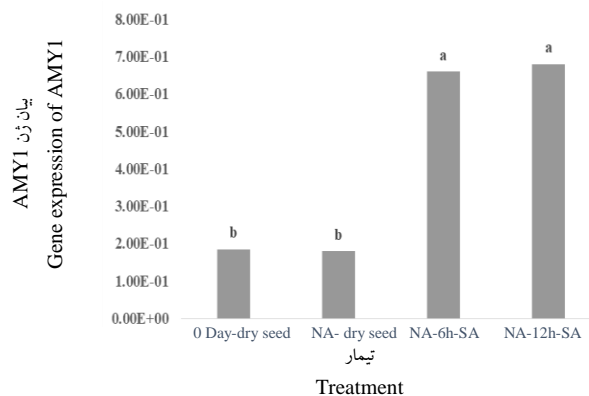
ACC: Amino-cyclopropane-1-carboxylic acid, SA: salicylic acid, Days: accelerated aging days number at 40°C and relative humidity of 100%, h: The number of hours affected by hormone or water treatment, NA: Natural aging for six months at 25°C.

در بذر *Phaseolus vulgaris* نشان داده شده که تیمار اسید سالیسیلیک با غلظت ۰/۱ میلی مولار سبب افزایش درصد جوانه‌زنی تحت شرایط مطلوب و تنش دمای پایین نسبت به بذر شاهد (بدون تیمار هورمونی) شد (Gharib and Hegazi, 2010). استفاده از غلظت‌های ۳ تا ۵ میلی مولار اسید سالیسیلیک شاخص‌های رشد را در باقلا افزایش داد اما رشد را در گیاهچه ذرت کاهش داد (El-Mergawi, 2007). به نظر می‌رسد دلیل رفتار متفاوت اسیدسالیسیلیک وابسته به شرایط و شدت تنش باشد (Rajjou *et al.*, 2006).

در بذر ۶ روز پیر، اسیدسالیسیلیک سبب تغییر معنی‌دار بر بیان *AMY1* در ۶ ساعت اول نشد (شکل ۴c). در بذر ۱۰ روز پیر که جوانه‌زنی نداشتند (صفر درصد)، اسیدسالیسیلیک روند کاهشی را بر بیان *AMY1* داشت (شکل ۴d).

در بذر پیر طبیعی *AMY1*، تحت تاثیر ۶ و ۱۲ ساعت آب نوشی در مقایسه با بذر غیر پیر خشک افزایش بیان را داشت (شکل ۴e). اسید سالیسیلیک سبب افزایش بیان *AMY1* در بذر پیر طبیعی شد اما بیان آن در ۶ و ۱۲ ساعت اثر معنی‌دار با یکدیگر نداشتند (شکل ۵). مطالعات نشان می‌دهد که اسیدسالیسیلیک نقش مهمی در سازگاری گیاه به شرایط نامساعد دارد (Kunkel and Brooks, 2002). افزایش بیان *AMY1* در بذر پیر طبیعی می‌تواند در جهت این سازگاری باشد.

AMY1 در بذر پیر طبیعی در ۶ و ۱۲ ساعت تحت اثر *ACC* افزایش بیان را در مقایسه با بذر پیر طبیعی خشک داشت (شکل ۴f). اسید سالیسیلیک سبب افزایش بیان *AMY1* در بذر پیر طبیعی شد اما بیان آن در ۶ و ۱۲ ساعت اثر معنی‌دار با یکدیگر نداشتند (شکل ۵). مطالعات نشان می‌دهد که اسیدسالیسیلیک نقش مهمی در سازگاری گیاه به شرایط نامساعد دارد (Kunkel and Brooks, 2002). افزایش بیان *AMY1* در بذر پیر طبیعی می‌تواند در جهت این سازگاری باشد.



شکل ۵- بیان *AMY1* در سطوح مختلف پیری بدون استفاده و با استفاده از هورمون.

SA: اسید سالیسیلیک. h: تعداد ساعت تحت تاثیر تیمار هورمون و یا آب. NA: پیری طبیعی به مدت ۶ ماه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد.

Fig. 5- *AMY1* gene expression in different aging levels without using and with using hormones.

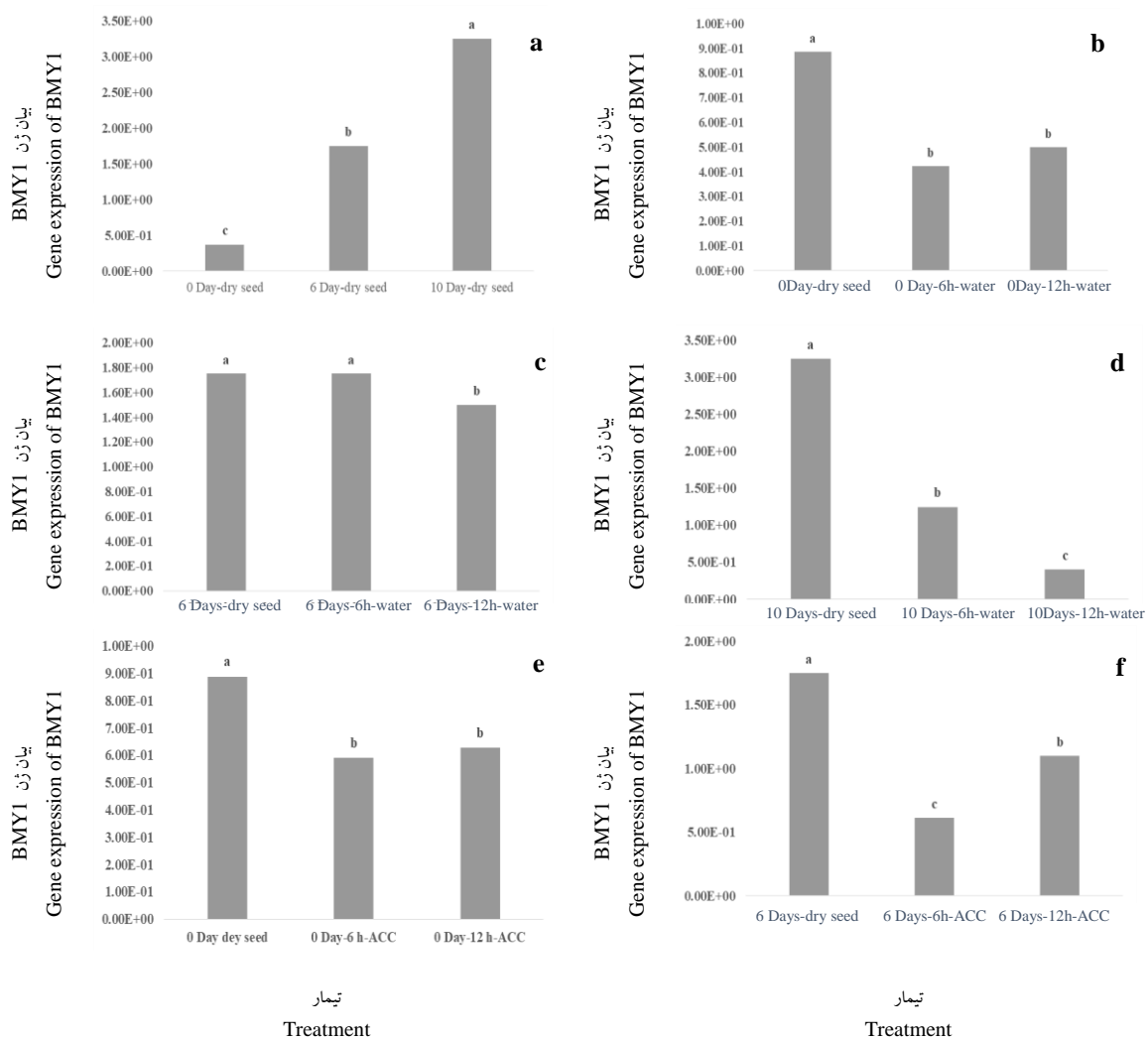
SA: salicylic acid, h: The number of hours affected by hormone or water treatment,

NA: Natural aging for six months at 25°C.

بذر خشک نداشت (شکل ۶c) ولی در ۶ روز پیری تحت تیمار *ACC* و اسیدسالیسیلیک در ۶ ساعت و در ۱۲ ساعت کمتر از بذر خشک ۶ روز پیر خشک بود (شکل ۶f) و شکل ۷c) که با کاهش جوانه‌زنی بذر ۶ روز پیر در اثر استفاده از *ACC* و اسیدسالیسیلیک مطابقت می‌کند.

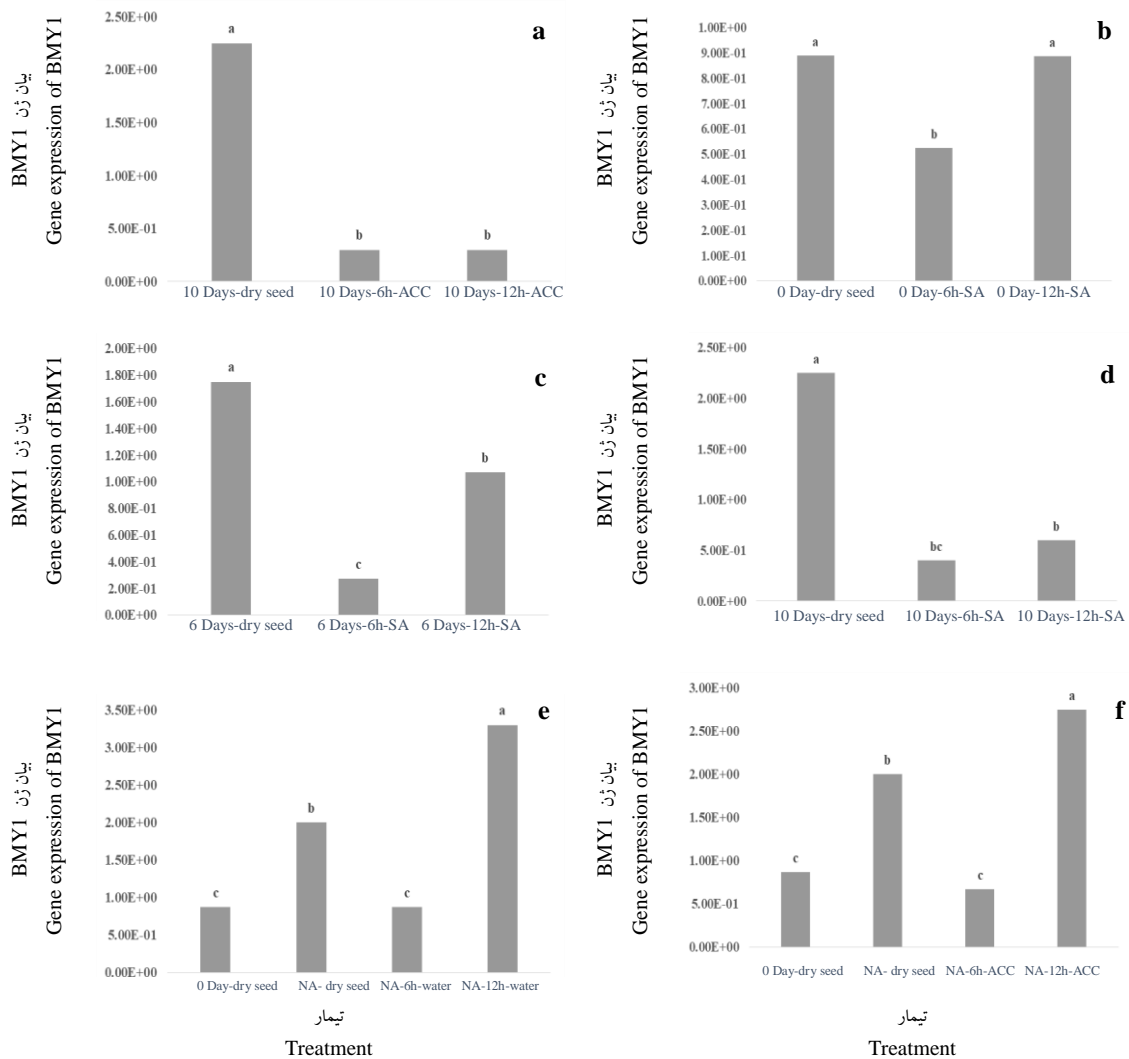
بیان ژن بتا آمیلاز (*BMY1*)

با افزایش سطوح پیری بیان *BMY1* افزایش یافت (شکل ۶a). بیان *BMY1* در بذر غیر پیر در هر سه تیمار آب (شکل ۶b)، *ACC* (شکل ۶e) و اسیدسالیسیلیک (شکل ۶b) در ۶ ساعت کاهش یافت. در ۶ روز پیری بیان *BMY1* در ۶ و ۱۲ ساعت آب نوشی تفاوت معنی‌داری با



شکل ۶- بیان ژن BMY1 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 غیر پیر. 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 غیر پیر. f: تحت تأثیر اعمال ۶ روز پیری تسریع شده و تیمار زمان‌های مختلف اعمال هورمون ACC (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت) در بذور سوپا. Days: تعداد روزهای اعمال پیری تسریع شده در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد. h: تعداد ساعت تحت تأثیر تیمار هورمون و یا آب. و ACC: آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلیک اسید.

Fig. 6- BMY1 gene a: affected by different aging levels in dry seeds. b: affected by different inhibition times treatments (dry seed, 6 and 10 h inhibition) in non-aging seeds. c: affected by 6 days aging and different inhibition times treatments (dry seed, 6 and 10 h inhibition). d: affected by 10 days aging and different inhibition times treatments (dry seed, 6 and 10 h inhibition). e: affected by ACC application in different times (dry seed, 6 and 10 h ACC application) in non-aging seeds. f: affected by 6 days aging and ACC application in different times (dry seed, 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.



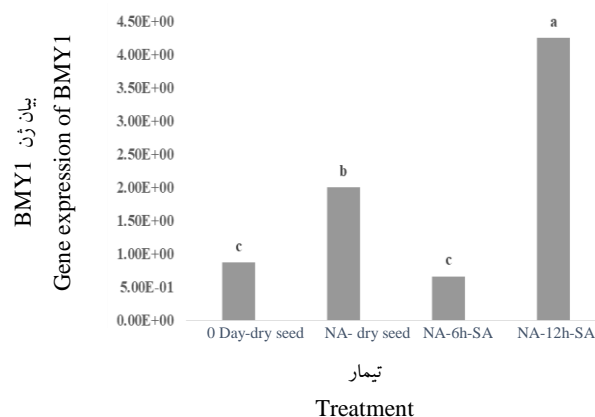
شکل ۷- بیان ژن BMY1 a: تحت تأثیر اعمال ۱۰ روز پیری تسریع شده و تیمار زمان‌های مختلف اعمال هورمون ACC (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت). b: تحت تأثیر تیمار زمان‌های مختلف اعمال هورمون SA (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت) در بذر غیر پیر. c: تحت تأثیر اعمال ۶ روز پیری تسریع شده و تیمار زمان‌های مختلف اعمال هورمون SA (بذر خشک، 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 غیر پیر و اعمال پیری طبیعی و تیمار زمان‌های مختلف آب‌نوشی (بذر خشک، ۶ و ۱۲ ساعت آب‌نوشی). f: تحت تأثیر بذر غیر پیر و اعمال پیری طبیعی و تیمار زمان‌های مختلف اعمال هورمون ACC (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 سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد. h: تعداد ساعت تحت تأثیر تیمار هورمون و یا آب. NA: پیری طبیعی به مدت ۶ ماه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد.

Fig. 7- BMY1 gene expression a: affected by 10 days aging and ACC application in different times (dry seed, 6 and 10 h ACC application). b: affected by SA application in different times (dry seed, 6 and 10 h ACC application) in non-aging seeds. c: affected by 6 days aging and SA application in different times (dry seed, 6 and 10 h ACC application). d: affected by 10 days aging and SA application in different times (dry seed, 6 and 10 h ACC application). e: affected by non-aging seed and natural aging and different inhibition times treatments (dry seed, 6 and 10 h inhibition). f: affected by non-aging seed and natural aging and SA application in different times (dry seed, 6 and 10 h ACC application) in soybean seed.

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.

نمو دانه، در بذر خشک وجود دارد. بتا آمیلاز به شروع جوانه زنی کمک می کند و از رشد گیاهچه حمایت می کند. همچنین پیشنهاد شده که فعالیت بتا آمیلاز می تواند شاخصی برای پتانسیل جوانه زنی باشد و آن با شروع جوانه زنی مرتبط است (Nandi *et al.*, 1995). در جوانه زنی بذر *Amaranthus caudatus* برگرداندن اثرات بازدارندگی کمبود آب به وسیله اتفن و جیبرلین با فعالیت بتا آمیلاز و دهیدروژناز مرتبط نبوده بلکه به تنظیم فعالیت آلفا آمیلاز مرتبط می شد و هیچ یک از اتفن و جیبرلین بر فعالیت بتا آمیلاز و دهیدروژناز تاثیر نداشتند (Bilecka and Kepczynski, 2010).

در ۱۰ روز پیری بیان *BMY1* در ۶ و ۱۲ ساعت آبنوشی روند کاهش را در مقایسه با بذر خشک داشت (شکل ۶d) ولی در اثر تیمار با *ACC* در ۶ و ۱۲ ساعت نسبت به بذر خشک کاهش بیان را داشت و بایکدیگر تفاوت معنی دار نداشتند (شکل ۷a) و در اثر تیمار با اسیدسالیسیلیک در ۶ ساعت کاهش بیان داشت (شکل ۷d). در بذر پیر طبیعی، *BMY1* در مقایسه با بذر غیر پیر خشک افزایش یافت اما تحت اثر هر سه تیمار آب، *ACC* و اسیدسالیسیلیک در ۶ ساعت کاهش و در ۱۲ ساعت افزایش بیان را داشت (شکل ۷e و ۷f و شکل ۸). بتا آمیلاز رفتاری متفاوت از آلفا آمیلاز دارد. بتا آمیلاز به عنوان یکی از نتایج فرآیند ذخیره سازی در طی



شکل ۸- بیان ژن *BMY1* در سطوح مختلف پیری بدون استفاده و با استفاده از هورمون.

SA- اسید سالیسیلیک، h: تعداد ساعت تحت تاثیر تیمار هورمون و یا آب. NA: پیری طبیعی به مدت ۶ ماه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد.

Fig. 8- *BMY1* gene expression in different aging levels without using and with using hormones. 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 *AMY1* و *BMY1* با افزایش سطوح پیری افزایش یافتند. هورمون اسید سالیسیلیک و *ACC* اثرات متفاوتی را بر موارد اندازه گیری شده داشتند. در بذور غیر پیر اسید سالیسیلیک سبب کاهش بیان *AMY1* شد که نشان می دهد اسید سالیسیلیک در بذور غیر پیر همانند عامل تنش زا عمل می کند. برآیند تمام این تغییرات کاهش بنیه و جوانه زنی بود. اسید سالیسیلیک و *ACC* هنگامی که بر

نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج این پژوهش در مجموع می توان چنین استنباط کرد که زوال بذر و کاهش بنیه نتیجه برآیند فرآیندهای تخریبی متعدد و اختلال در فعالیت های فیزیولوژیکی بذر است. این پژوهش نشان داد که بیان ژن های دخیل در مسیر جوانه زنی دستخوش تغییر می شوند.

داشتند. در مجموع این دو هورمون نتوانستند سبب ترمیم بذر زوال یافته سویا شوند.

بذور غیر پیر استفاده شدند خود همانند عامل تنش‌زا عمل کردند ولی هنگامی که بر بذور پیر شده طبیعی و مصنوعی اعمال شدند تنها در برخی موارد اندازه‌گیری شده اثر مثبت

Reference

منابع

- Abeles, F.B. 1986.** Role of ethylene in *Lactuca sativa* cv 'Grand Rapids' seed germination. *Plant Physiol.* 81:780-787.
- Beaudoin, N., C. Serizet., F. Gosti, and J. Giraudat. 2000.** Interactions between Abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell.* 12: 1103- 1115.
- Bilecka, B., and J. Kepczynski. 2010.** Germination, α -, β - Amylase and total dehydrogenase activities of *Amaranthus caudatus* seed under water stress in the presence of ethephon or gibberellin A3. *ACTA Biol. Cracov Bot.* 52(1): 7-12.
- Chang, S., J. Puryear, and K. Cairney. 1993.** A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol.* 11: 113-116.
- El-Mergawi, R., and M. Abdel-Wahed. 2007.** Diversity in salicylic acid effects on growth criteria and different indoleacetic acid forms among faba bean and maize. *IPGSA., 19th Annu. Meet., Puerto Vallarta, Mexico* July. 21- 25.
- Forcella, F., R. L. Benech Arnold, R. Sanchez, and C. M. Ghera. 2000.** Modeling seedling emergence. *Field Crop Res.* 67(2): 123-139.
- Gharib F. A., and A. Z. Hegazi. 2010.** Salicylic acid ameliorates germination, seedling growth, phytohormone and enzymes activity in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under cold stress. *J. Am. Sci.* 6(10): 675- 683.
- Gorecki, R.J., H. Ashino, S. Satoh, and Y. Esashi. 1991.** Ethylene production in pea and cocklebur seeds of differing vigour. *J. Exp. Bot.* 42: 407-414.
- Gubler, F., D. Raventos, M. Keys, R. Watts, J. Mundy, and J. Jacobsen. 1999.** Target genes and regulatory domains of the GAMYB transcriptional activator in cereal aleurone. *Plant Physiol.* 17:1-3.
- Hampton, J. G., and D. M. Tekrony. 2005.** Handbook of vigour test methods (3rd.ed). *ISTA.* 70-72.
- International Seed Testing Association. 2009.** International Rules for Seed Testing. *Zurichtstr.50. CH 8303, Bassersdorf, Switzerland, Edition 2009/1.*
- Khan, A.A. 1994.** ACC-derived ethylene production, a sensitive test for seed vigor. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 119: 1083-1090.
- Kozarewa, I., D.J. Cantliffe, R.T. Nagata, and P. J. Stoffella. 2006.** High maturation temperature of lettuce seeds during development increased ethylene production and germination at elevated temperatures. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 131: 564-570.
- Kunkel, B.N. and D.M. Brooks. 2002.** Cross talk between signalling pathways in pathogen defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:325-331.
- Lee, G.J., X. Wu, J.G. Shannon, D.A. Sleper, and H.T. Nguyen. 2007.** Genome mapping and molecular breeding in plants. V.2, Pp 21-53. *In C. Kole (ed.). JCO. Springer, Berlin, Heidelberg.*
- Marshal, A. H., and D. N. Lewis. 2004.** Influence of seed storage conditions on seedling emergence, seedling growth and dry matter production of temperature forage grasses. *Seed Sci. Technol.* 32(2): 493-501.
- Matilla, A. J. 2000.** Ethylene in seed formation and germination. *Seed Sci. Res.* 10: 111-126.
- McDonald, M. B. 1999.** Seed deterioration: Physiology, repair and assessment. *Seed Sci. Technol.* 27(1):177-237.

- McDonald, M.B. 2004.** Orthodox seed deterioration and its repair. Pp 273–304. *In* R.L. Benech-Arnold, and R.A. Sanchez (eds.). Handbook of Seed Physiology Applications to Agriculture. Food Products Press, New York.
- Miransari, M., and D. L. Smith. 2013.** Plant hormones and seed germination. *Environ. Exp. Bot.* 99: 110-121.
- Murray F., P. Matthews, J. Jacobsen, and F. Gubler. 2006.** Increased expression of HvGAMYB in transgenic barley increases hydrolytic enzyme production by aleurone cells in response to gibberellins. *J. Cereal Sci.* 44:317–322.
- Nandi, S., G. Das, and S. Sen-Mandi. 1995.** β -Amylase activity as an index for germination potential in rice. *Ann Bot.* 75: 463–467.
- Okamoto, K., and T. Akazawa. 1980.** Enzymatic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds. *Plant Physiol.* 65:81–84.
- Pandey, K.K. 1988.** Priming induced repair in French bean seeds. *Seed Sci Technol.* 16: 527-532.
- Panobianco, M., and R. P. Vieira. 2007.** Electrical conductivity and deterioration of soybean seeds exposed to different storage conditions. *Rev. Bras. Sementes.* 29(2): 97-105.
- Pierik, R., D. Tholen, H. Poorter, J.W. E. Visser, and A.C.J. L. Voeselek. 2006.** The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends Plant Sci.* 11(4): 176- 183.
- Rajjou, L., M. Belghazi, R. Huguet, C. Robin, A. Moreau, C. Job, and D. Job. 2006.** Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on *Arabidopsis* seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiol.* 141: 910–923.
- Rivas-San Vicente, M., and J. Javier Plasencia. 2011.** Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and Development. *J. Exp. Bot.* 62(10): 3321–3338.
- Sharma, S., P. Viridi, S. Gambhir, and S. K. Munshi. 2005.** Changes in soluble sugar content and antioxidant enzymes in soybean seeds stored under different storage conditions. *J. Agric. Biochem.* 18:9–12.
- Shelar, V. R., R. S. Shaikh, and A. S. Nikam. 2008.** Soybean seed quality during storage: a review. *Agric. Rev.* 29(2): 125-131.
- Siriwitayawan, G., R. L. Geneve, and A. B. Dowine. 2007.** Seed germination of ethylene perception mutants of tomato and *Arabidopsis*. *Seed Sci. Res.* 13: 303-314.
- Van der Maarel, M.J.E.C., B. Van der Veen, J. C. M. Uitdehaag, H. Leemhuis, and L. Dijkhuizen. 2002.** Properties and applications of starch converting enzymes of the alpha-amylase family. *J. Biotechnol.* 94: 137–155.
- Vriezen, W.H., Z. Y. Zhou, and D. Van Der Straeten. 2003.** Regulation of submergence-induced enhanced shoot elongation in *Oryza sativa* L. *Ann Bot.* 91: 263–270.
- Yamasaki, Y. 2003.** Amylase in germinating millet seeds. *Phytochemistry.* 64: 935–939.