اثر پرایمینگ بر فعالیت و بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در بذرهای فرسوده برنج

طیبه سعادت[1*]، حمیده علیدوست[2]، محمد صدقی[3]

[1]دانشجوی دکتری، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
[2]دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زراعت، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
[3]استاد، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۶/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۱۰

چکیده

به منظور بررسی اثر پرایمینگ بر ویژگی‌های جوانه‌زنی، فعالیت و بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت بذور فرسوده برنج، آزمایشی در سال ۱۳۹۹ در دانشگاه محقق اردبیلی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٤ تکرار و ۱۲ تیمار شامل ۳ سطح فرسودگی (شاهد، ۸۷ و ۷۷٪ جوانه‌زنی) و ٤ سطح پرایمینگ (بدون پرایمینگ، هیدروپرایمینگ، پرایمینگ با جیبرلین (۲۰ میلی‌گرم در لیتر) و اسیدسالیسیلیک (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر)) انجام شد. پس از استخراج RNA و ساخت cDNA بررسی بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت با استفاده از qRT-PCR، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و برخی ویژگی‌های جوانه‌زنی سنجیده شد. نتایج نشان داد که بیش‌ترین سرعت جوانه‌زنی از تیمار پرایمینگ با جیبرلین و بدون فرسودگی و بیش‌ترین فعالیت آنزیم کاتالاز (۲۱/۸۷ میلی‌گرم/گرم در دقیقه)، پراکسیداز (٦٦/٤٧ میلی‌گرم/گرم در دقیقه) و سوپراکسیددیسموتاز (۱۵۲/۵۲ میلی‌گرم/گرم در دقیقه) در پیش تیمار جیبرلین و ۷۷٪ فرسودگی و کم‌ترین فعالیت این آنزیم‌ها مربوط به تیمار بدون پرایمینگ و بدون فرسودگی (به ترتیب ۱٤/۳۲، ٤۵/۰۲ و ۱۰۸/۹ میلی‌گرم/گرم در دقیقه) بود. همچنین آنالیز داده‌های qRT-PCR حاکی از آن بود که بیان ژن آنزیم پراکسیداز در پیش تیمار جیبرلین و سطح بدون فرسودگی، بیشتر از بیان سایر آنزیم‌ها بود. درکل، استفاده از پیش تیمار جیبرلین موجب تقویت فیزیولوژیکی بذرهای ضعیف برنج شد و از این تیمار میتوان جهت افزایش بنیه بذرهای ضعیف استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، بیان ژن، پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز

مقدمه

برنج یکی از مهم‌ترین غلات جهان بوده و اعتقاد بر این است که منشا *Oryza sativa* متداول‌ترین گونه برنج، قاره آسیا است (Nourmohammadi et al., 2004). فرسودگی بذر از پدیده‌های شایع در هنگام نگهداری بذر است. هرچه شرایط نگهداری از نظر رطوبت و دما نامناسب‌تر باشد، شدت فرسودگی بذرها بیشتر خواهد بود (Siadat et al., 2011). پرایمینگ بذر به اعمال هر نوع تیماری قبل از کاشت به منظور ارتقای مؤلفه‌هایی چون جوانه‌زنی و استقرار اولیه اطلاق می‌شود (Azarnia and Eisvand, 2013). گزارش‌های مختلف حاکی از آن است که استفاده از تیمارهای مختلف بذر، سبب افزایش در شاخص‌های جوانه‌زنی بذرهای زوال یافته، می‌شود (Alivand et al, 2012.; Ansari and Sharif Zadeh, 2012). یافته‌های سیادت و همکاران (Seiadat et al., 2012) در گیاه ذرت و همچنین انصاری و

*نویسنده مسئول: t.saadat@uma.ac.ir

شریف‌زاده (Ansari and Sharif Zadeh, 2013) در گیاه چاودار نشان دادند که فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در تیمار القاء پیری تسریع شده در بذر به علت افزایش رادیکال‌های آزاد، کاهش یافته است. واریر و همکاران (Varier et al., 2010) گزارش کردند که تیمارهای پرایمینگ باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در پنبه شده است. کنترل تظاهر ژن در واقع کنترل مقدار فرآورده ژنی مورد نیاز در سلول است. این مقدار به توازن بین دو عامل بستگی دارد: یکی میزان ساخته شدن (یعنی چند مولکول از فرآورده ژن در واحد زمان مورد نیاز است) و دیگری میزان تجزیه آن (یعنی چند مولکول در واحد زمان شکسته می‌شود). نتیجه این توازن، یک غلظت پایدار متفاوت برای هر فرآورده ژن در سلول ایجاد می‌کند. هر گاه میزان تولید یا تجزیه تغییر کند، غلظت حالت پایدار در این صورت تغییر خواهد کرد. در عمل تغییرات بحرانی در غلظت پایدار یک آنزیم به خاطر تغییر در میزان تولید آن به وجود می‌آید و به نظر می‌رسد که میزان تجزیه نسبتاً ثابت است (Yazdi Samadi and Valizadeh, 2007). اثرات همزمان بیان بیش از حد دو آنزیم آنتی‌اکسیدانت cu/zn SOD و APX در طول عمر بذر و جوانه‌زنی تحت شرایط تنش‌زا بر روی توتون مورد بررسی قرار گرفته است. بذرهای غیرتراریخته نسبت به بذرهای تراریخته دو سال انبارداری شده سطوح بالاتری از نشت یون نشان می‌دهد. بیان مازاد همزمان ژن‌های مربوط به آنزیم‌های SOD و آسکوربات پراکسیداز موجب بهبود ویژگی‌های جوانه‌زنی در شرایط تنش‌زای محیطی و انبارداری طولانی مدت می‌گردد (Pylee et al., 2010). انواع مختلفی از ژن‌ها و رونوشت آن‌ها در پاسخ به تنش‌های گوناگون و در نقش‌های مختلف دخالت دارند که درک این نقش‌ها به حل مشکلات مقاومت به تنش کمک بسیاری می‌کند (Wei, 2014). از جمله تکنیک‌های مورد استفاده در تجزیه و تحلیل بیان ژن هدف می‌توان به واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی اشاره کرد. Real Time PCR– یک روش قابل اعتماد، حساس و سریع برای اندازه گیری بیان ژن است. این روش به طور گسترده در تحقیقات مربوط به اسیدهای نوکلئیک و مطالعات بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Driscol, 2011).

هدف از انجام این تحقیق، بررسی تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بذر برنج در واکنش به فرسودگی و نقش پرایمینگ بذر در بهبود قدرت بذرهای ضعیف برنج و همچنین بررسی بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در بذور برنج می‌باشد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی تغییر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و بیان ژن آن‌ها تحت تاثیر پرایمینگ در بذرهای فرسوده برنج، آزمایشی به صورت فاکتوریل با ٤ تکرار و ١٢ تیمار شامل ٣ سطح فرسودگی (شاهد، ٨٧ و ٧٧٪ جوانه‌زنی) و ٤ سطح پرایمینگ (بدون پرایمینگ، هیدروپرایمینگ، پرایمینگ با جیبرلین و اسیدسالیسیلیک) انجام شد. طی آزمون پیری تسریع شده، بذرهای سطح اول فرسودگی (٨٧٪) به مدت ٥ روز و بذرهای سطح دوم فرسودگی (٧٧٪) به‌مدت ٧ روز درون آون با دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ٩٥±٢ درصد قرار گرفتند. پس از آن، بذرها در دمای ٢٥ درجه‌ی سانتی‌گراد و تیمارهای مختلف پرایمینگ شامل هیدروپرایمنگ، جیبرلین (٢٠میلی‌گرم در لیتر)، اسیدسالیسیلیک (١٠٠میلی‌گرم در لیتر) به مدت ٢٤ساعت بر روی آن‌ها اجرا شد. پس از اعمال پرایمینگ، آزمون جوانه‌زنی در ٣ تکرار ٥٠ بذری درون هر پتری انجام شد. سپس سرعت جوانه‌زنی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت با استفاده از روش qRT-PCR و با استفاده از آغازگرهای جدول ١ ارزیابی شد. به منظور تعیین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در برنج، در داخل ژرمیناتور در دمای ٢٥ درجه‌ی سانتی‌گراد گیاهچه‌ها

در پتری رشد داده شدند و پس از باز شدن برگ‌های اولیه از هر تیمار چند گیاهچه به تصادف انتخاب و پس از قرار در فویل آلومینیومی، تا زمان استخراج عصاره آنزیمی به یخچال با دمای ۲±۷۰- درجه منتقل گردیدند. جهت استخراج عصاره آنزیمی، ۰/۵ گرم نمونه از هر تیمار توزین و در داخلی هاون چینی (که از قبل در یخچال نگهداری شده بود) با استفاده از نیتروژن مایع هموژن گردید و پس از آن ۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات سرد (pH=۷) حاوی ۰/۵ میلی‌مولار EDTA به هاون اضافه شد. سپس، هموژن‌ها به اپندورف‌های ۲ میلی‌متری منتقل شدند و در۱۵۰۰۰ rpm با دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سوپرناتانت حاصل به سه قسمت تقسیم شد تا از اثر مضر انجماد و ذوب متوالی نمونه‌ها پیشگیری شود و سپس، تا زمان اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد (Sairam et al., 2002).

برای استخراج RNA کل از نمونه‌ها، از کیت استخراج RNX-plus شرکت سیناژن به منظور بیان ژن آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسمیوتاز استفاده گردید. کیفیت RNA استخراج شده در ژل آگارز ۱٪ ارزیابی شد. جهت تعیین درجه خلوص و غلظت نمونه‌های RNA از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودرآپ (Thermoscientific, 2000c) استفاده و کمیت نمونه‌ها بررسی شد. سپس نمونه‌های RNA با آنزیم DNase I (RNase-free, Fermentase) تیمار و به‌عنوان الگوی واکنش RT- RNA قرار گرفتند. پس از یکسان‌سازی غلظت نمونه‌های RNA، cDNA مربوط به هر نمونه با استفاده از کیت سنتز cDNA (Thermo scientific) طبق دستورالعمل کیت ساخته شد (Mahmodi Jaraghili et al, 2016). توالی‌های مربوطه جهت طراحی پرایمر با استفاده از شماره دسترسی ژن‌های مربوطه در سایت NCBI به‌دست آمد و با رعایت تمام اصول اساسی در طراحی پرایمر و با تعیین اندازه ۱۰۰تا ۲۰۰جفت بازی برای محصول PCR پرایمرها طراحی شدند بررسی بیان ژن با استفاده از دستگاه Real Time PCR مدل Light cycler 96 Rocheانجام شد. نرخ بیان ژن با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد (Livak and Schmittgen, 2001).

سرعت جوانه‌زنی از طریق فرمول زیر محاسبه شد:

$$GR = \Sigma n/\Sigma D \qquad \text{رابطه (۱)}$$

که در آن، D روز شمارش از اولین روز جوانه‌زنی و n تعداد بذر جوانه‌زده در روز D است.

جدول ۱: آغازگرهای استفاده شده برای بررسی بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در برنج

Gene name	Accession no.	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Product size
CAT	NC-008395	TAAGGCCAGACAATGTCAGTG	CAGTGGCATTAATACGCCAGTA	206
APX1	AC134232	AGTACATTGCCCGTGGTACTCT	CGCATTTCATACCAACACATCT	207
CuZnSOD1	L19435	TGGCAGAGCCGTCGTTGT	CGATGATCCCGCAAGCAA	110
UBQ5	AK062354	ACCACTTCGACCGCCACTACT	ACGCCTAAGCCTGCTGGGTT	69

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAD): فعالیت آنزیم کاتالاز براساس روش ابی (Aebi, 1984) اندازه‌گیری گردید. کمپلکس واکنش، شامل ۰/۵ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۷/۵ میلی‌مولار، ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷) و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود که حجم نمونه‌ها با اضافه کردن آب مقطر به ۳ میلی‌لیتر رسانده شد. با افزودن پراکسید هیدروژن واکنش آغاز گردید و کاهش در جذب نمونه‌ها در طول موج ۲٤۰ نانومتر در مدت یک دقیقه ثبت گردید. محلول جذب زمینه (blank) شامل تمام موارد استفاده شده به جز عصاره آنزیمی استخراج شده بود. فعالیت ویژه آنزیم براساس میکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه شده در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX): سنجش فعالیت آنزیم POX طبق روش مک‌آدام و همکاران (Macadam et al., 1992) انجام شد. در این روش ٤٥٠ میکرولیتر محلول پراکسید هیدروژن و ٤٥٠ میکرولیتر محلول گایاکول در دمای پایین (ظرف حاوی یخ) با هم مخلوط گردید و به آن ١٠٠ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی اضافه شد و تغییرات جذب در طول موج ٤٧٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر دنبال شد. در محلول بلانک به جای عصاره آنزیمی، ١٠٠ میکرولیتر از بافر فسفات (pH=٧) استفاده شد. فعالیت آنزیمی با استفاده از قانون لامبرت- بیر و ضریب خاموشی محصول واکنش گایاکول پراکسیداز (١٣/٣ $\mu M^{-1}c^{-1}m$) محاسبه شد. فعالیت آنزیم در نهایت بر حسب Unit mg $protein^{-1}$ min بیان گردید.

فعالیت آنزیم پراکسیداز ($Unit.\ mg^{-1}$) = POD/min/13/3

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیداز دیسمیوتاز (SOD): سنجش آنزیم ذکر شده به روش جیانوپلیتیس و ریز (Giannopolitis and Ries, 1977) انجام گردید. اساس سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز مهار واکنش رادیکال سوپراکسید با نیتروبلوتترازولیوم و ممانعت از تشکیل سوپراکسید- نیتروبلوتترازولیوم توسط آنزیم مذکور است. نمونه بلانک به مدت ١٥ دقیقه در تاریکی قرار گرفت و نمونه های شاهد و عصاره آنزیمی در محفظه نوری با دو لامپ فلورسنت ٢٠W به مدت ١٥ دقیقه و ١٠٠ دور در دقیقه برروی شیکر گذاشته شد. سپس، جذب در طول موج ٥٦٠ نانومتر ثبت شد. تفاوت بین جذب هر عصاره در مدت زمان روشنایی ١٥ دقیقه و جذب عصاره آنزیمی در همان مدت زمان روشنایی در واقع نشان دهنده باز داشتن واکنش خود به خودی و تشکیل فورمازان توسط SOD است.

100-[OD control- OD] / OD control ×100/50 = ($Unit.\ mg^{-1}$)

تجزیه‌های آماری

داده های به دست آمده از نظر نرمال بودن بررسی شد و سپس، تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار SAS9.1 انجام گردید. میانگین‌ها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ١ درصد مقایسه گردید. رسم نمودار مربوط به داده‌های Real time PCR در محیط Excel 2013 صورت گرفت.

نتایج و بحث

سرعت جوانه‌زنی: با توجه به مقایسه میانگین اثرات متقابل پرایمینگ و فرسودگی (جدول ٢)، بیش‌ترین سرعت جوانه‌زنی (٩/٧٥ بذر در روز) از پیش تیمار با هورمون جیبرلین و بذور بدون فرسودگی به دست آمد و کم‌ترین سرعت جوانه‌زنی (٢/٧٢ بذر در روز) بدون پرایمینگ با فرسودگی ٧٧٪ مشاهده شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAD): بیش‌ترین فعالیت آنزیم کاتالاز (٢١/٨٧ mg/gw/min) در پیش تیمار جیبرلین و ٧٧٪ فرسودگی و کم‌ترین آن (١٤/٣٢ mg/gw/min) مربوط به تیمار بدون پرایمینگ و بدون فرسودگی بود (جدول ٢).

فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX): بیش‌ترین فعالیت آنزیم پراکسیداز (٦٦/٤٧ mg/gw/min) در پیش تیمار جیبرلین و ٧٧٪ فرسودگی و کم‌ترین آن (٤٥/٠٢ mg/gw/min) مربوط به تیمار بدون پرایمینگ و بدون فرسودگی بود (جدول ٢).

فعالیت آنزیم سوپراکسیداز دیسمیوتاز (SOD): بیش‌ترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (mg/gw/min ۱۵۲/۵۲) در پیش تیمار جیبرلین و ۷۷٪ فرسودگی و کم‌ترین آن (mg/gw/min ۱۰۸/۹) مربوط به تیمار بدون پرایمینگ و بدون فرسودگی بود. (جدول ۲).

بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت: بیشترین میزان بیان نسبی ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در تیمار پرایمینگ با جیبرلین و سطح بدون فرسودگی بود. با افزایش فرسودگی بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت کاهش یافت. به طوری که کمترین میزان آن‌ها در تیمار بدون پرایمینگ و فرسودگی ۷۷ ٪ بود (شکل ۱).

فرسودگی سبب تغییرات مورفوفیزیولوژیک و بیوشیمیایی متعدد می‌شود. در بین تیمارهای بهبوددهنده، تاثیر جیبرلین بیشتر از هیدروپرایمینگ، اسید سالیسیلیک و بدون پرایمینگ بود. فرسودگی از طریق کاهش کیفیت بذر موجب کاهش در سرعت، زمان جوانه‌زنی و عملکرد دانه می‌شود (Hasstrup et al., 1993).

جدول۲: مقایسه میانگین اثر متقابل پرایمینگ و فرسودگی بر روی سرعت جوانه‌زنی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در برنج

اثر متقابل			سرعت جوانه‌زنی (بذر در روز)	فعالیت آنزیم کاتالاز (میلی‌گرم/گرم دردقیقه)	فعالیت آنزیم پراکسیداز (میلی‌گرم/گرم در دقیقه)	فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (میلی‌گرم/گرم در دقیقه)
p1a1	شاهد	بدون فرسودگی	4.55	14.32	45.02	108.9
p1a2	شاهد	فرسودگی ۸۷٪	4.1	16.42	50.55	120.77
p1a3	شاهد	فرسودگی ۷۷٪	2.72	17.65	56.52	129.75
p2a1	هیدروپرایمینگ	بدون فرسودگی	6.8	14.6	48.52	115.8
p2a2	هیدروپرایمینگ	فرسودگی ۸۷٪	5.37	17.6	53.92	127.7
p2a3	هیدروپرایمینگ	فرسودگی ۷۷٪	4.45	18.75	61.2	135.05
p3a1	جیبرلین	بدون فرسودگی	9.75	16.45	51.15	120.95
p3a2	جیبرلین	فرسودگی ۸۷٪	7.85	19.85	59.95	135.35
p3a3	جیبرلین	فرسودگی ۷۷٪	6.37	21.87	66.47	152.52
p4a1	اسیدسالیسیلیک	بدون فرسودگی	6	15.42	49.35	116.3
p4a2	اسیدسالیسیلیک	فرسودگی ۸۷٪	5.37	18.07	56.25	128.52
p4a3	اسیدسالیسیلیک	فرسودگی ۷۷٪	4.67	20.47	63.45	140.02

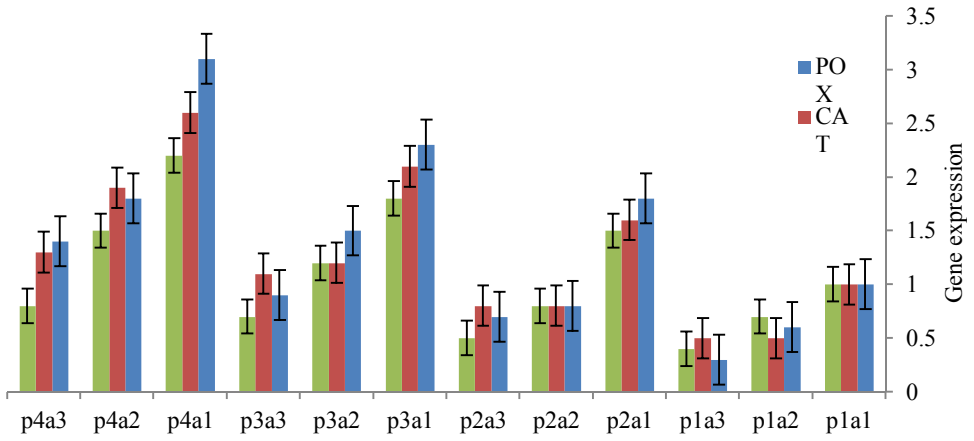
پرایمینگ با کاهش عوارض فرسودگی، موجب ترمیم بیان ژن‌های مربوطه به فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان می شود. همچنین پرایمینگ، موجب کاهش خسارت غشای سلولی شده و تولید رادیکال های آزاد اکسیژن را کاهش می‌دهد و از این طریق می‌تواند موجب افزایش جوانه‌زنی شود. در این پژوهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در پرایمینگ با جیبرلین و فرسودگی ۷۷٪ افزایش یافت. ویتوریا و همکاران (Vitoria et al., 2001) گزارش کردند که افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت ناشی از کاربرد جیبرلین می‌تواند ناشی از افزایش القای رونویسی ژن و سنتز پروتئین آنزیم و یا به واسطه تغییرات پس از ترجمه‌ی پروتئین آنزیم‌های موجود باشد. دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت تحت تنش‌ها در اثر پرایمینگ، می‌تواند در اثر ساخت DNA در جنین در مدت پرایمینگ و در غیاب سلول‌های تقسیم شونده و به دنبال افزایش سرعت سنتز DNA در بافت جنین باشد. به دنبال پرایمینگ بذر سنتز RNA، DNA و تقسیم سلولی افزایش می‌یابد، افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز نیز تحت تیمار پرایمینگ گزارش شده است (Abbasdokht and Edalat Pishe, 2008). تغییر در توزیع درون سلولی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در

رابطه با حساسیت ایزوزیم‌های مختلف ممکن است استراتژی محافظتی کاراتری نسبت به افزایش فعالیت آنزیم باشد (Foyer et al., 1994). آنتی اکسیدانت‌ها می‌توانند با کم کردن میزان رادیکال‌های آزاد، از فرسودگی بذر جلوگیری کرده و روند آن را کندتر کنند ولی کاهش مقدار آنتی اکسیدانت ها پس از ادامه یافتن روند فرسودگی، می تواند نشان‌دهنده شکست مکانیسم دفاعی سیستم‌های آنتی‌اکسیدانت بذر در برابر این رادیکال‌ها باشد. آنزیم‌های آنتی اکسیدانت بذر در روزهای اول فرسودگی افزایش می‌یابند ولی با افزایش روند فرسودگی، قابلیت دفاع را از دست می‌دهند و از مقدار آن‌ها کاسته می‌شود (Kaewnaree et al, 2011). محققان معتقدند که پس از پرایمینگ، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت افزایش می‌یابد و بیانگر بهبود مکانیسم‌های ترمیم در بذر است (Wahid et al., 2008; Lee et al., 2010; Bailey et al., 2000). نتایج حاصل از ارزیابی بیان ژن با استفاده از real-time PCR، نشان داد که میزان بیان نسبی ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در بذرهای تیمارشده با پرایمینگ نسبت به شاهد از یک روند افزایشی پیروی می‌کند، به‌طوری‌که در تیمار بدون پرایمینگ، بیان ژن این آنزیم‌ها کمترین مقدار را داشت. بیان اندک مشاهده شده ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در تیمار بدون پرایمینگ بیانگر نقش این ژن‌ها در متابولیسم ثانویه است. زیرا در شرایط طبیعی، نیازی به مقادیر بالای بیان ژن‌های دفاعی نیست (Nims et al., 2006). در این پژوهش، تحت تاثیر پرایمینگ با جیبرلین بیان نسبی ژن پراکسیداز نسبت به بیان نسبی ژن آنزیم‌های دیگر بالا بود. افزایش بیان این ژن به احتمال زیاد موید این مطلب است که بذر سطح بیان ژن پراکسیداز را برای مقابله با فرسودگی، بالا نگه می‌دارد و توان مهار عواملی فرسودگی را دارد. درحالی‌که بیان ژن آنزیم سوپراکسید دیسموتاز وکاتالاز در این تیمار نسبت به پراکسیداز در سطح پایین‌تری قرار داشت. کاهش فعالیت کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز منجر به افزایش پراکسید هیدروژن و سوپراکسید می‌شود که این امر سبب مهار آنزیم‌های حساسی چون CAT و SOD می‌گردد. با افزایش میزان فرسودگی، به موازات فعالیت POX و به دنبال آن تولید بیشتر پراکسید هیدروژن، CAT و SOD فعالیت خود را افزایش دادند و فعالیت آن‌ها نیز در فرسودگی ۷۷ درصد و تیمار پرایمینگ با جیبرلین به بیشترین مقدار خود رسید و در پی آن مهار پراکسیدهیدروژن موجود در محیط رخ داد. اما افزایش بیشتر فرسودگی موجب کاهش بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شد. این کاهش نیز می‌تواند به‌دلیل تخریب ساختارهای تولیدکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت توسط رادیکال‌های سمی یا به عبارتی عاملی برای غیر فعال شدن یا تخریب آنزیم ها باشد (Shim et al., 2003). در کل، سطح بیان ژن آنزیم‌ها در شرایط فرسودگی بالا بوده و پرایمینگ فعالیت این ژن‌ها را افزایش می‌دهد. در واقع تغییر بیوشیمیایی و فیزیولوژیک مانند سنتزماکرومولکول‌ها، افزایش قدرت جوانه‌زنی و شکست خواب و انتقال مواد ذخیره‌ای، فعالسازی و بازسازی برخی از آنزیم‌ها، سنتز DNA و RNA، تولید ATP و بهبود سیستم غشایی آسیب دیده در طی پیش‌تیمار کردن رخ می‌دهد (McDonald, 1998; Sung and Chang, 1993).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش با وجود اینکه اسیدسالیسیلیک توانست به جوانه‌زنی و رشد گیاهچه فرسوده کمک کند، اما تاثیر کاربرد جیبرلین بیشتر از این هورمون بود. بنابراین، در بذرهای فرسوده برنج می‌توان از پیش تیمار اسید جیبرلیک جهت تقویت بنیه بذر استفاده کرد. افزایش بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در شرایط فرسودگی و کاهش محتوای رادیکال‌های آزاد در سلول باعث بهبود قدرت بذر می‌شود.

.



شکل ۱: تغییرات میزان بیان ژن آنزیم‌های آنتی اکسیدانت ناشی از اعمال تیمار پرایمینگ و قرسودگی

P1 : شاهد، P2 : هیدروپرایمینگ، P3 : اسید سالیسیلیک، P4 : جیبرلین، A1: بدون فرسودگی، A2 : فرسودگی ٪ ۸۷ A3: فرسودگی ٪۷۷.

سپاسگزاری

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

References

Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. Methods of Enzymology. 105: 121-126.

Alivand, R., Tavakkol Afshari, R. and Sharif-zadeh, F. 2012. The study of deterioration in oil seed crops under different storage conditions. Msc. Thesis. University of Tehran, Iran.

Ansari, O. and Sharif Zadeh, F. 2012. Slow Moisture Content Reduction (SMCR) can improve some seed germination indexes in primed seeds of Mountain Rye (*Secale montanum*) under accelerated aging conditions. J. Seed Sci. Technol. 2(2): 68-76.

Ansari, O. and Sharif-Zadeh, F. 2013. Enzyme activity and germination characteristics improved with treatments that extend vigor of primed Mountain Rye Seeds under ageing. Theo. Exper Plant. Physio. 25(3): 1-6.

Azarnia, M. and Eisvand, H.R. 2013 (b). Priming is a method for improve seed quality for increase growth and yield crop. Res. field. horti. crops. 2: 277-287

Bailly, C., Benamer, A., Cornineau, F. and Come, D. 2000. Antioxidant systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds as affected by priming. Seed Sci. Res. 10: 35-42

Driscol, LO. 2011. Gene Expression profiling- Methods and Protocols, 2nd Edition. Humana Press. Sprin. Prot. P27

Foyer, C.H., Lelandais, M. and Kunert, K.J. 1994. Photooxidative stress in plants. Physiol. Plant. 92: 696-717.

Grilli, I., Bacci, E., Lombardi, T., Spano, C. and Floris, C. 1995. Natural Aging: Poly (A) polymerase in germination embryos of *Triticum durum* wheat. An. Bot. 76: 15–21.

Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. 1977. Suoeroxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. J.Plant Physiol. 59: 309-314

Hsu, C.C., Chen, C.L., Chen, J.J. and Sung, J.M. 2003. Accelerated aging-enhanced lipid peroxidation in bitter gourd seeds and effects of priming and hot water soaking treatments. Sci. Horti. 98: 201-212.

Kaewnaree, P., Vichitphan, S., Klanrit, P., Siri, B. and Vichitphan, K. 2011. Effect of accelerated Aging Process on Seed Quality and Biochemical Changes in Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L.). Seed Biot. 10(2): 175-182.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. Methods. 25: 402-408.

Mahmodi Jaraghili, P., Mohajl Shojah, H. and Mohajl Kazemi, E. 2016. Evaluation of the effect of salinity on germination rate and expression of antioxidant genes in two cultivars of tomato plant. Gen.Engin.. Biologi.Safety. 5(1): 51-59

MacDonald, M.B. 1999. Seed deterioration: physiology, repaired and assessment. Seed Sci.Technol. 27: 177-237.

MacAdam, J.W., Nelson, R. and Sharp, E. 1992. Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. Plant Physiol. 99: 872-878.

Nims, E., Dubois, C.P., Roberts, S.C. and Walker, E.L. 2006. Expression profiling of genes involved in paclitaxel biosynthesis for targeted metabolic engineering. Meta. Engin. 8: 385-394.

Nourmohammadi, A., Siadat, S.A. and Kashani, A. 2004. Grain Growing, Shahid Chamran University Press. 1(7): 307-241

Pylee, Y., Baek, K.H., Lee, H.S., Kwak, S.S., Bang, J.W. and Kwon, S.Y. 2010. Tobacco seeds simultaneously over-expressing Cu/Zn SOD and APX display enhanced seed longevity and germination rates under stress conditions. J. Exp. Bot. 61(9): 2499-2506.

Sairam, R.K., Rao K. V. and Srivastava, G.C. 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyteconcentration. Plant Sci. 163: 1037-1046.

Seiadat, A., Moosavi, A. and Sharafi-Zadeh, M. 2011. Effect of hormone priming on improvement of aged Corn seed. J. crop physiol. 10: 68-83.

Seiadat, S.A., Moosavi A. and Sharafizadeh, M. 2012. Effect of seed priming on antioxidant activity and germination characteristics of maize seeds under different aging treatments. Res. J. Seed. Sci. 5: 51-62.

Shim, I.S., Momose, Y., Yamamoto, A., Kim, D.W. and Usui, K. 2003. Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. Plant Growth Regul. 39(3): 285-292.

Sung, F.J. and Chang, Y.H. 1993. Biochemical activities associated with priming of sweet corn seeds to improve vigor. Seed Sci. Technol. 21: 97-105

Varier, A., Kuriakose, A. and Dadlani, M. 2010. The subcellular basis of seed priming. Current Sci. 99 (4): 450-456.

Wahid, A., Noreen, A., Basra, S.M.A., Gelani, S. and Farooq, M. 2008. Priming-induced metabolic changes sunflower (*Helianthus annuus*) achenes improve germination and seedling. growth. Bot. Stud. 49: 343-350.

Wei, S. 2014. Comparative Analysis of Gene Expression in Two Muskmelon Cultivars (*Cucumis melo* L.) under salt stress. J. Integr. Agric. 13: 2132-2140

Yazdi Samadi, B. and Valizadeh, M. 2007. Genetic from a molecular point of view. Tehran University Press. p 447

Journal of Seed Research, Vol. 11, No. 4, Winter 2022

The effect of priming on the activity and gene expression of antioxidant enzymes in rice

T. Saadat[1*], H. Alidoost[2], M. Sedghi[3]
[1]Ph.D. student, Ecology, University of Mohaghegh Ardabili Faculty of Agriculture and Natural
[2]Student of agricultural mastery of Mohaghegh Ardebili University
[3]Professor of Agriculture Department, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili

Abstract

In order to study the effect of priming on germination characteristics and activity of antioxidant enzymes of rice aged seeds, a factorial experiment was conducted in a completely randomized design with 4 replications and 12 treatments including 3 levels of aging (control with germination of 97% 87 and 77% germination) and 4 priming levels (control without priming, hydropriming, priming with gibberellin and salicylic acid). After RNA extraction and cDNA synthesis, gene expression of antioxidant enzymes was studied using qRT-PCR, activity of antioxidant enzymes and some of germination characteristics were measured. The results showed that the highest germination rate was obtained from priming treatment with gibberellin without aging, and the highest activity of catalase, peroxidase and superoxide dismutase enzymes observed in gibberellin pre-treatment and 77% aging and the least activity of these enzymes was related to non-priming treatment without aging. Also, analysis of qRT-PCR data showed that expression of the enzyme peroxidase gene in gibberellin pre-treatment and without aging level was higher than expression of other enzymes.

***Keywords*:** Antioxidant enzymes, Catalase, Gene expression, Peroxidase, Superoxide dismutase

[*]Corresponding author; t.saadat@uma.ac.ir