Crop Biotech.
Spring (2022) 11(3): 35-51 DOI: 10.30473/CB.2022.63466.187

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال یازدهم، شماره سوم، پیاپی سی‌وهفتم، بهار ۱۴۰۱ (۵۱-۳۵)

«مقاله پژوهشی»

بررسی الگوی بیان ژن‌های چرخه بیوسنتز جیبرلیک اسید و براسینواستروئید دخیل در جوانه‌زنی و تقویت‌کننده رشد و نمو کلزا در پاسخ به عصاره جلبک قهوه‌ای (*Ascophyllum nodosum*)

سپیده چرخ‌انداز[1]، کریم سرخه[2]*
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۲. استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
(تاریخ‌دریافت: ۱۴۰۱/۱/۱۰ - تاریخ‌پذیرش:۱۴۰۱/۳/۳۱)

Expression pattern of key gene(s) of GA biosynthesis and Brassinosteroid pathway influences in germination and growth-promoting in response to *Ascophyllum nodosum* extract

Sepideh Charkhandaz[1], Karim Sorkheh*[2]
1. M.Sc student of Plant Breeding, Department of Production Engineering and Plant Genetics, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Production Engineering and Plant Genetics, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.
(Received: Mar. 30, 2022 - Accepted: Jun. 21, 2022)

چکیده

عملکرد کلزا و کیفیت قابل‌قبول روغن، این گیاه را به عنوان یکی از مهم‌ترین گیاهان برای تأمین روغن خوراکی قرار داده‌است. با توجه به قرار گرفتن کشور ایران در اقلیم گرم و خشک و نیاز بذر برای جوانه‌زنی و استقرار مناسب گیاهچه‌ها به آب، ضرورت یافتن راهکاری در جهت بهبود جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه‌ها احساس می‌شود. استفاده از پرایمینگ بذر و نیز تیمار گیاهچه‌ها با عصاره‌ی جلبک دریایی *Ascophyllum nodosum* یکی از راهکارها برای بهبود یکنواختی سبز شدن و استقرار گیاهچه است. پژوهش حاضر به تأثیر کاربرد عصارهٔ جلبک دریایی بر جوانه‌زنی بذر کلزا و تغییرات الگوی بیان نسبی برخی ژن‌های چرخه بیوسنتز جیبرلیک اسید و براسینواستروئید دخیل در جوانه‌زنی و تقویت‌کننده رشد و نمو کلزا با استفاده از روش Real time-PCR پرداخته‌است. برای این منظور شاخص‌های جوانه‌زنی در اثر اعمال تیمار اندازه‌گیری شد، همچنین اعمال تیمار غلظت ۰/۱ درصد حجمی عصاره‌ی جلبک در چهار سطح تیمار زمانی (۰، ۱۰، ۱۵ و ۳۰ روز یک‌بار) تا زمان گل‌دهی گیاه صورت گرفت و نمونه‌برداری از برگ‌های گیاه مربوط برای هر تیمار در سه تکرار بیولوژیک در دو آزمایش جداگانه گلخانه‌ای و آزمایشگاهی انجام شد. نتایج این مطالعه، مؤثر بودن استفاده از تیمار عصارهٔ جلبک دریایی را بر افزایش درصد جوانه‌زنی و بنیه بذر نشان داد به‌گونه‌ای که صد در صد جوانه‌زنی بذرهای تحت تیمار در روز سوم صورت پذیرفت. در بخش ارزیابی میزان بیان نسبی کاربرد تیمار مذکور افزایش در بیان ژن‌های EXP، ATI، ENTKO، AEC و BINSP که همگی از جمله ژن‌های مهّم و کلیدی در فرآیند جوانه‌زنی هستند را نسبت به تیمار شاهد نشان داد. استفاده از تیمار عصارهٔ جلبک دریایی بیشترین میزان بیان نسبی را در ژن‌های ATI و ENTKO به‌ترتیب به میزان ۴/۳۹ و ۵/۷۰ در تیمار زمانی ۳۰ روز و کمترین میزان بیان برای ژن‌های GIB و EXP در هر سه تیمار زمانی ۱۰، ۱۵ و ۳۰ روز به‌دست آمد. همچنین، بیشترین میزان همبستگی مثبت در سطح احتمال ٪۵ بین ژن‌های XEN با GIB (همبستگی ۱) و ENTKO با BINSP (همبستگی ۰/۹۸) مشخص شد. همبستگی ژن‌های یاد شده در اثر کاربرد عصارهٔ جلبک در نهایت منجر به تأثیر مثبت بر فرایند جوانه‌زنی بذرهای کلزا داشت. همچنین ژن‌های GIB و ATI (همبستگی ۰/۵۰-) و نیز XEN با ATI (همبستگی ۰/۴۹-) دارای همبستگی منفی در سطح احتمال ٪۵ بودند و افزایش یکی، کاهش دیگری و برعکس کاهش بیان یک ژن، افزایش بیان ژن دیگر را به‌دنبال داشت و مشخص می‌کند که فعالیت فراورده پایانی هر کدام از این ژن‌ها قادر است بر فرآیند جوانه‌زنی و فرایندهای تقویت‌کننده رشد و نمو تأثیرگذار باشد.

واژه‌های کلیدی: بیان نسبی ژن، جوانه‌زنی، کلزا، *Ascophyllum nodosum*، qPCR

Abstract

The yield and acceptable quality of the oil of canola make this plant as one of the most important plants for providing edible oil. Due to the hot and dry climate in Iran and water necessary for seed germination, discovery of the solution to improve germination and seedling establishment is required. Seed priming and treatment of seedlings with the extract of the seaweed *Ascophyllum nodosum* is one of the solutions for uniform germination and establishment of seedlings. The currently study have been explore the effect of application of *Ascophyllum nodosum* seaweed extract on seed germination and changes in the relative expression pattern of some important key genes related to gibberellic acid and brassinosteroids biosynthesis pathway using qRT-PCR. For this purpose, germination indexes were measured by the application of treatment 1% v/v treatment of *Ascophyllum nodosum* extract in four levels of treatment (0, 10, 15 and 30 days) until flowering stage. The leaf of sampling in each treatment was performed in three biological replications. The results of this study showed the effectiveness of seaweed extract treatment on increasing germination and seed vigor percentage, so that 100% germination of treated seeds obtained on the 3-day. The relative expression of algae extract showed an increase in the expression of *EXP*, *ATI*, *ENTKO*, *AEC* and *BINSP* genes, which are all important and as the key genes in the germination process compared to the control treatment. The use of seaweed extract treatment showed the highest expression in *ATI* (4.39) and *ENTKO* (5.70) genes in 30-day treatment, respectively. The lowest expressions for GIB and EXP genes in all three treatments (10, 15 and 30 days) were obtained. Also, there was the highest positive correlation between *EEN* and *GIB* (1), *ENTKO* and *BINSP* (0.98), *AEC* and *BINSP* (0.96) genes at the 5% significantly level. The correlation of these genes due to the use of algae extract ultimately led to a positive effect on the germination process of rapeseed seeds. Also, the results of heat map showed the genes of *EXP* and *AEC* (-0.57), *GIB* and *ATI* (-0.50) genes and *XEN* and *ATI* (-0.49) have a negative correlation at an error level of 5% and the increase of one led to the decrease of the other. This indicates that's the activity of the final product of each of these genes is able to affect the germination process and promoting plant growth and development.

Keywords: *Brassica napus* L., Germination,Relative gene expression, qRT-PCR.

* نویسنده مسئول: کریم سرخه
E-mail: k.sorkheh@scu.ac.ir

مقدمه

کلزا با نام علمی *Brassica napus* گیاهی یک‌ساله است که مهم‌ترین گونه زراعی جنس براسیکا محسوب می‌شود (Wang *et al*., 2006). کلزا گیاه آمفی‌دیپلوئید طبیعی است و عملکرد اقتصادی آن به روغن این گیاه و تا حدی به کنجاله آن برمی‌گردد. علاوه بر بالا بودن درصد روغن در دانه‌های کلزا (در حدود ۴۰٪ تا ۴۸٪) روغن حاصل از کلزا به سبب نداشتن کلسترول و اسیدهای چرب اشباع از کیفیت تغذیه‌ای بالایی برخوردار است، همچنین کنجاله آن حاوی ۳۸٪ تا ۴۵٪ پروتئین می‌باشد (Ahmadi, 2010). کلزا با دارا بودن ارقام بهاره، زمستانه و حدواسط امکان کشت در شرایط مختلف آب و هوایی را دارد. از سوی دیگر، فصل کشت کلزا با سایر گیاهان دانه روغنی متفاوت است. از این رو زمانی که واحدهای روغن‌کشی کار کمتری دارند و یا به‌صورت تعطیل می‌باشند، می‌توان از ظرفیت آن‌ها جهت استحصال روغن کلزا بهره برد (Ghadami, 2012). در کشت محصولات زراعی جوانه‌زنی بذر و استقرار مناسب گیاهان از اهمیت به سزایی برخوردار است و در برخی مواقع برای افزایش درصد جوانه‌زنی از محرک‌های رشد نیز استفاده می‌گردد. از جمله این محرک‌ها می‌توان به عصارهٔ جلبک‌های دریایی اشاره کرد که با توجه به غنی بودن ایران از ذخایر عظیم جلبک دریایی، بهره‌وری و کاربرد آن‌ها در این زمینه حائز اهمیت است (Aminifard & Khandan,2019; Azarmehr *et al*., 2017; Ahmadpour, 2019).

جوانه زنی، رشد و عملکرد گیاهان به عوامل ژنتیکی و محیطی بستگی دارد(Graziano*et al*., 2019). تعادل هورمون‌های گیاهی در جوانه‌زنی اهمیت اساسی دارد. از این رو شواهدی وجود دارد که کاربرد کود زیستی از قبیل عصاره جلبک قهوه‌ای می‌تواند تنظیم جیبرلین، اکسین و براسینواستروئید را تحریک کرده و رشد گیاه را تقویت کند(French&Iyer-Pascuzzi, 2018). جیبرلین‌ها هورمون‌های رشدی هستند که باعث افزایش طول گیاه، جوانه‌زنی و گل‌دهی در گیاهان می‌شوند. French&Iyer-Pascuzzi (2018) مشاهده کردند که کودهای زیستی (بیوچار) رشد را تا حدی از طریق تحریک مسیر جیبرلین (GA) افزایش می‌دهند. اگرچه این موارد شواهدی از تأثیر بیوچار بر تولید محصول است، اما تأثیر بیوچار بر رشد گیاه و فعالیت آنزیم‌ها و هورمون‌های دخیل در رشد گیاه به‌طورکامل بررسی نشده است(Egamberdieva*et al*., 2016; Farhangi-Abriz& Torabian, 2018). مکانیسم این که آیا و چگونه کاربرد عصاره جلبک قهوه‌ای به‌عنوان کود زیستی بر هورمون‌ها و بیان ژن‌های دخیل در جوانه‌زنی محصول تأثیر می‌گذارد تا حد زیادی ناشناخته باقی‌مانده است. این نوع از بررسی الگوی بیان ژن تاکنون به‌طور جامع در گیاهان و به‌ویژه کلزا صورت نگرفته‌است. از این رو این مطالعه به‌عنوان اولین گزارش در زمینه کاربرد عصاره جلبک قهوه‌ای بر روی مسیرهای سیگنالینگ تحریک جوانه‌زنی و رشد گیاه در کلزا بوده‌است. بنابراین، تحقیقات بیشتری برای درک مسیرهای سیگنالینگ در گونه‌ها و ارقام مختلف گیاهی مورد نیاز است.

جلبک‌ها ساده‌ترین موجودات کلروفیل‌دار هستند در این بین جلبک‌های قهوه‌ای محتوای ذخیره‌ای بسیار با ارزشی دارند و *Ascophyllum nodosum* به سبب قابلیت بقا در طیف وسیع از درجه حرارت توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود معطوف ساخته‌است. این گروه از جلبک‌ها فواید و کاربردهای بسیاری در غنی‌سازی خوراک دام (Eltanahy& Torky, 2021) و کشاورزی دارند. مهم‌ترین اثرات جلبلک‌ها افزایش میزان کلروفیل، جوانه‌زنی و تقویت سیستم‌های دفاعی و رشد گیاه در کشاورزی ارگانیک می‌باشد (Sudhakar*et al*., 2019). عناصری چون نیتروژن، پتاسیم، کلسیم، منیزیم، آهن، روی، مس و

منگنز در عصاره جلبک قهوه‌ای شناسایی‌شده است، همچنین این جلبک دارای هورمون‌های اکسین، سیتوکنین و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، معدنی و ویتامین‌ها است که علاوه بر تأثیر مثبت بر خصوصیات مورفولوژی گیاه، در جوانه‌زنی بذر و یکنواختی سبزشدن نیز مؤثر می‌باشد (Ahmadpour*et al*., 2019). در پژوهشی به‌منظور بررسی جوانه‌زنی بذر نخود تحت تنش خشکی، کاربرد عصاره جلبک قهوه‌ای اثرات ناشی از تنش خشکی را به نحو مطلوبی کاهش داده است (Ahmadpour*et al*., 2019).

در گزارش Caffagni *et al*. (2015) نیز به اثرات مثبت کاربرد عصارهٔ جلبک قهوه‌ای بر افزایش خصوصیات رشدی گیاهان در کشت هیدروپونیک اشاره شد. تیمار با عصارهٔ جلبک در کشت گندم نیز به افزایش معنی‌دار شاخص‌های جوانه‌زنی، رشدی و عملکردی منجر گردید (Kumar & Sahoo, 2011).

از دیدگاه مولکولی در زمان جوانه‌زنی برخی هورمون‌ها در فرایند جوانه‌زنی و خواب بذر نقش دارند، جیبرلین از جمله این هورمون‌ها است (Amooaghaie, 2014). جیبرلین با تغییر در روند رونویسی ژن‌ها و آنزیم‌های مؤثر بر جوانه‌زنی بذر اثر خود را نمایان می‌کند در واقع وجود جیبرلین منجر به افزایش رونویسی و در نهایت افزایش فعالیت آنزیم‌های هیدرولیزکننده مولکول‌های ذخیره‌ای بذر از جمله آلفا آمیلاز می‌شود که در نتیجه فعالیت این آنزیم‌ها و دیگر آنزیم‌های مرتبط با جوانه‌زنی، فرایند جوانه‌زنی بذر القا می‌گردد (Amooaghaie, 2014; Naba'ee*et al*., 2013). علاوه بر جیبرلین‌ها براسینواستروئیدها نیز در القای جوانه‌زنی بذر نقش دارند (Naba'ee*et al*., 2013) و اثرات مهاری آبسزیک اسید بر جوانه‌زنی را حذف می‌کنند (Naba'ee*et al*., 2013). همچنین ثابت‌شده است که در بذرهای جهش‌یافته‌هایی از آرابیدوپسیس که دچار نقص در مسیر سنتز جیبرلین هستند، کاربرد براسینواستروئیدها منجر به جوانه‌زنی این بذرها گردید (Steber& McCourt, 2001).

استفاده همزمان ورمی‌کومپوست و عصارهٔ جلبک قهوه‌ای در کشت لوبیا چشم‌بلبلی تأثیر به‌سزایی بر عملکرد محصول دارد (Alizadeh*et al*., 2019). همچنین کاربرد عصارهٔ این جلبک نقش مؤثری بر صفات عملکردی کدوی تلخ (Aminifard& Khandan, 2019)، گوجه‌فرنگی (Jeshari*et al*., 2018) و فلفل (Sivritepe, 2008) داشته‌است. با شناسایی قابلیت‌های عصارهٔ جلبک‌ها و کاربرد آن‌ها می‌توان در آینده نزدیک در مناطقی که امکان جوانه‌زنی و بهره‌وری از محصولات کشاورزی به‌دلایل مشکلات محیطی، خاک و سایر عوامل دیگر به‌نحو مطلوبی وجود ندارد، زمینه بهبود سیستم‌های کشاورزی را فراهم آورد. از این رو زمینه رشد و آبادانی در بخش‌های مختلف را سبب گردد.

به‌منظور تعیین این که آیا عصاره جلبک قهوه‌ای در کلزا می‌تواند باعث تحریک اکسین یا تنظیم براسینواستروئید شود، بیان برخی از ژن‌های کلیدی دخیل در مسیر بیوسنتز جیبرلیک اسید و براسینواستروئید از قبیل اکسپنزین (*EXP*)، آکواپورین (*ATI*)، زیلوگلوکان اندوترانسگلیکوزیلاز (*XEN*)، ایندوکائورین اکسیداز (*ENTKO*)، حامل‌های اکسین (*AEC*)، جیبرلین (*GIB*) و براسینواستروئید (*BINSP*) مرتبط با جوانه‌زنی و رشد، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. بنابراین، پژوهش حاضر به‌منظور تحقق اهداف کشاورزی پایدار، عدم استفاده و یا کم کردن استفاده از نهاده‌های شیمیایی و نیل به استقلال در تولید محصولات کشاورزی و نیز ایجاد شناخت مکانیسم تأثیر و چگونگی اثرگذاری جلبک *A. nodosum* بر تغییر الگوی بیان نسبی ژن‌های درگیر در جوانه‌زنی بذر کلزا انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

این تحقیق با هدف بررسی جوانه‌زنی و ارزیابی تغییرات بیان نسبی ژن‌های دخیل در جوانه‌زنی و تقویت‌کننده رشد و نمو کلزا در پاسخ به تیمار عصارهٔ جلبک قهوه‌ای در دو بخش گلخانه‌ای و آزمایشگاهی در دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز در سال ۱۳۹۹ انجام شد. بدین‌منظور بذرهای کلزا رقم هایولا ۴۸۱۵ از کشت و صنعت رجایی دزفول تهیه و برای انجام آزمایش‌های مرتبط با جوانه‌زنی و کشت در گلدان، استفاده گردید.

اعمال تیمار عصارهٔ جلبک قهوه‌ای و تجزیه تحلیل شاخص‌های جوانه‌زنی

پس از ضدعفونی بذرها در محلول هیپوکلرید سدیم ۱٪ و شستشو با آب مقطر استریل برای انجام آزمون جوانه‌زنی، تعداد ۱۰۰ عدد بذر در ۳ تکرار جداگانه به ظرف‌های یک‌بار مصرف انتقال یافت و تیمار ۰/۱ درصد حجمی از عصارهٔ جلبک قهوه‌ای با نام تجاری اولترا بوستر (۱۰ درصد w/w، شرکت پخش کودی یزد، شماره ثبت کودک ۱۶۷۱۵) اعمال گردید. شرایط رطوبتی پتری‌دیش‌های کنترل و تیمار عصاره یکسان و نزدیک به ظرفیت زراعی بود. آزمایش جوانه‌زنی در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار، به‌مدت یک هفته ادامه داشت و هر ۲۴ ساعت پارامترهای مربوط به درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، بنیه جوانه‌زنی و شاخص بنیه جوانه‌زنی بذر با استفاده از روابط ۱ تا ۴ (Ahmadpour*et al.*, 2018) مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفت. پس از جمع‌آوری داده‌ها، تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹) انجام شد.

رابطه ۱) درصد جوانه‌زنی (Agrawal, 19991):

$$GP\% = \frac{\sum ni}{N} \times 100$$

رابطه ۲) سرعت جوانه‌زنی (Agrawal, 19991):

$$GS = \sum \frac{ni}{ti}$$

رابطه ۳) بنیه جوانه‌زنی (ISTA, 2009):

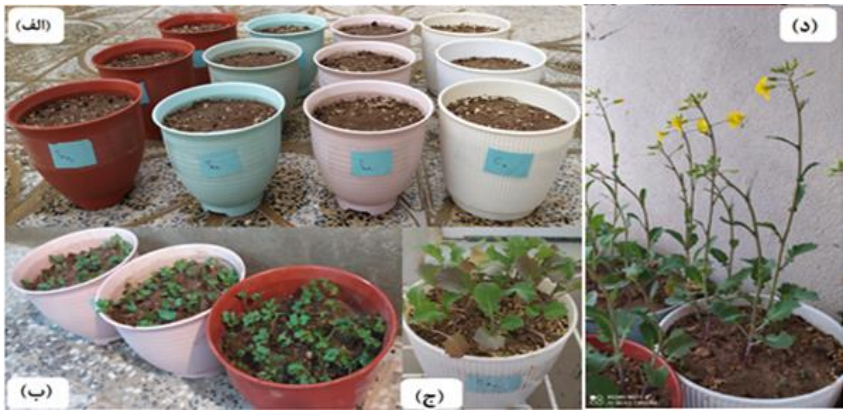
$$GV = \frac{GS \times mean\ (PL+RL)}{100}$$

رابطه ۴) شاخص بنیه بذر (ISTA, 2009):

$$SV = \frac{GP \times mean\ (PL+RL)}{100}$$

در روابط فوق، N: تعداد کل بذرها، ni: تعداد بذر شمارش‌شده در هر روز، ti: تعداد روز بعد از انجام آزمایش، PL: طول ساقه‌چه و RL: طول ریشه‌چه.

در بخش کشت گلدانی پس از کاشت بذرهای کلزا و رسیدن به مرحله ۸-۷ برگی گیاهچه‌ها اعمال تیمار با عصاره جلبکی با غلظت ۰/۱ درصد حجمی عصارهٔ جلبک در چهار سطح زمانی (صفر، ۱۰، ۱۵ و ۳۰ روز یک‌بار) تا زمان گل‌دهی گیاه صورت گرفت (شکل ۱).



شکل۱. مراحل رشد کلزا رقم ۴۸۱۵؛ الف) پیاده‌سازی طرح آزمایش و کشت بذر، ب) رشد گیاهچه، ج) مرحله چهار برگی و د) گل‌دهی کلزا

پس از اعمال تیمار، نمونه‌برداری از برگ‌های گیاه در مرحله ۸-۷ برگی و در حالت استقرار کامل گیاه مربوط به هر تیمار در سه تکرار بیولوژیک (سه گلدان برای هر تیمار زمانی) انجام و بلافاصله در فویل آلومینیوم بسته‌بندی و در نیتروژن مایع قرار داده شد و در ادامه برای انجام مراحل بعدی آزمایش‌ها در فریزر ۸۰°C- نگه‌داری شدند.

استخراج RNA و تیمار DNase I

از برگ‌های هر تیمار استخراج RNA کل بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (کیت ستونی استخراج RNA از بافت گیاهی شرکت دنازیست آسیا- مشهد به شماره دسترسی S1020) در سه تکرار بیولوژیک صورت گرفت. در ادامه جهت حذف آلودگی احتمالی ژنوم، نمونه‌های RNA استخراجی با آنزیم DNase I (شرکت سیناکلون، ایران؛ https://sinaclon.ir) براساس دستورالعمل شرکت سازنده تیمار شدند. ارزیابی کیفیت و کمیت RNA استخراجی با استفاده از ژل آگارز ۱٪ و دستگاه بیوفتومتر (اپندورف، آلمان) انجام شد.

سنتز cDNA

ساخت cDNA با استفاده از کیت Easy™ cDNA synthesis kit (شرکت پارس توس مشهد با شماره کالای A101161) از ۲ میکرولیتر نمونه RNA و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. طراحی آغازگر با استفاده از وب‌سایت Primer3 به آدرس برخط (https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) صورت پذیرفت، اطلاعات مربوط به آن‌ها در جدول ۱ ارائه شده است. توالی اولیه ژن‌های مورد مطالعه نیز از پایگاه اطلاعاتی NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) دانلود گردید. شماره دسترسی توالی ژن‌ها در جدول ۱ نشان داده‌شده است.

واکنش PCR در زمان واقعی، تجزیه تحلیل داده‌ها و آنالیز همبستگی ژن‌ها

در ادامه واکنش Real time- PCR با استفاده از کیت سایبرگرین High ROX(شرکت آمپلی‌کون،دانمارک) و دستگاه Step one (شرکت ABI، آمریکا) برای بررسی الگوی بیان نسبی برخی ژن‌های دخیل در مسیر جیبرلین و براسینواستروئید در پاسخ به کاربرد تیمار عصاره جلبک دریایی با استفاده از ژن مرجع اکتین در سه تکرار بیولوژیک و یک تکرار تکنیکی انجام شد. هر واکنش Real time-PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، شامل ۲ میکرولیتر از cDNA، ۰/۴ میکرومولار از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت و مسترمیکس سایبرگرین با غلظت ۱X بود. مرحله واسرشت‌سازی اولیه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۴۰ چرخه شامل مرحله واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه، مرحله اتصال (دمای بهینه آغازگر) به‌مدت ۳۰ ثانیه و مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه شرایط دمایی و زمانی Real time- PCR بود. در نهایت برای مشخص شدن میزان بیان نسبی ژن‌های مورد پژوهش از روش مقایسه‌ای $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد (Livak & Schmittgen, 2001). به این صورت که در اولین گام میزان CT برای هر نمونه نسبت به خط پایه (Baseline) مشخص گردید، در ادامه نرمال‌سازی بر اساس ژن مرجع برای CTتمام نمونه‌ها انجام و میزان بیان نسبی ژن هدف نسبت به شاهد محاسبه گردید. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار Excel صورت گرفت. برای ترسیم نقشه حرارتی و مشخص شدن همبستگی ژن‌ها به‌ترتیب از نرم‌افزار HemI_1.6_alpha_win32_86 و گراف پد (نسخه ۸) استفاده شد.

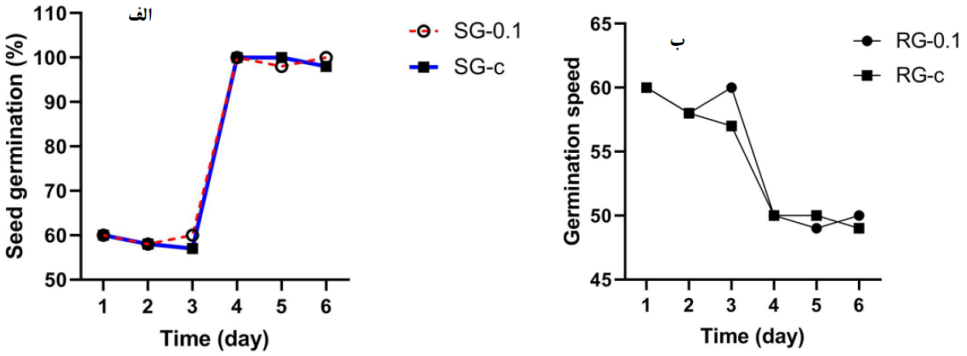
نتایج و بحث

ارزیابی میزان درصد و سرعت جوانه‌زنی و شاخص بنیه جوانه‌زنی نشان داد که استفاده از تیمار عصارهٔ جلبک قهوه‌ای تأثیر مثبتی بر شاخص‌های ذکر شده داشته به‌گونه‌ای که از نظر جوانه‌زنی در روز سوم به‌بعد با افزایش سرعت جوانه‌زنی، درصد جوانه‌زنی نیز افزایش‌یافته به‌طوری‌که در روز چهارم ۱۰۰ درصد (شکل ۲- الف) بذور کلزا جوانه زده‌اند.

جدول ۱. نام، توالی و دمای اتصال آغازگرها و طول تکثیر هر آغازگر

نام آغازگر	شماره دسترسی	توالی آغازگر	دمای اتصال (°C)	طول تکثیر (bp)
ENTKO[1]	XM_013788560.2	F: CACACAACTTCCATGCCCTC R:GCAAGTTCCCAATCAACGGA	۵۵	۱۳۸
AEC[2]	XM_013795054.2	F: GGTGGTGGAGGAGAACAGAA R: TTCCGGGTGTCTTGTTCTGT	۵۵	۲۰۸
ATIP[3]	XM_013806858.2	F: TCGCCATTGGTTTCATCGTC R: TAGATGATTCCGGCGAGTCC	۵۵	۱۷۲
BINSP[4]	XM_013816800.2	F: ATGGAAGTGTTGCCTCCTGT R: AAATCACCAACCACGGCTTC	۵۵	۱۵۰
EXP[5]	XM_013863504.2	F: CCATGCCACTTTCTACGGTG R: ACGATGATGGAACCAGGGAG	۵۵	۱۹۱
GIB[6]	XM_022698550.1	F: TACCCACAATGCAAGCAACC R: AGTGTCGCCTATGTTCACCA	۵۵	۱۶۲
XEN[7]	XM_022716180.1	F: CAGGAACCGTCACTGCTTTC R: TGGAACTCAGTGGTGGGATC	۵۵	۱۵۳
Actin[8]	XM_013858992.2	F: ACCCGGTTCTTCTCACTGAG R: AGGATAGCGTGAGGAAGAGC	۵۵	۲۹۹

ENTKO: ENT کائورن اکسیداز، *AEC*: حامل‌های اکسین، *ATIP*: آکوآ پورین، *BINSP*: براسینواستروئید، *EXP*: اکسپنزین، *GIB*: جیبرلیک اسید، *XEN*: زایلوکان اندو ترنس گلیکوزیلاز و *Actin-7*: اکتین.

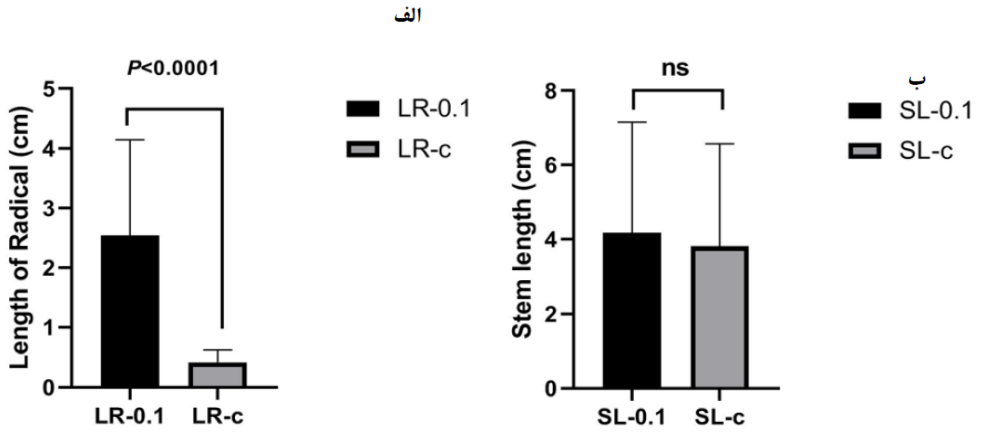


شکل ۲. نمودار مربوط به نتایج شاخص‌های جوانه‌زنی: الف) درصد جوانه‌زنی (درصد) و ب) سرعت جوانه‌زنی در شرایط کنترل (C) و استفاده از عصاره جلبک قهوه‌ای (۰/۱ درصد). SG[9]: درصد جوانه‌زنی، RG[10]: سرعت جوانه‌زنی.

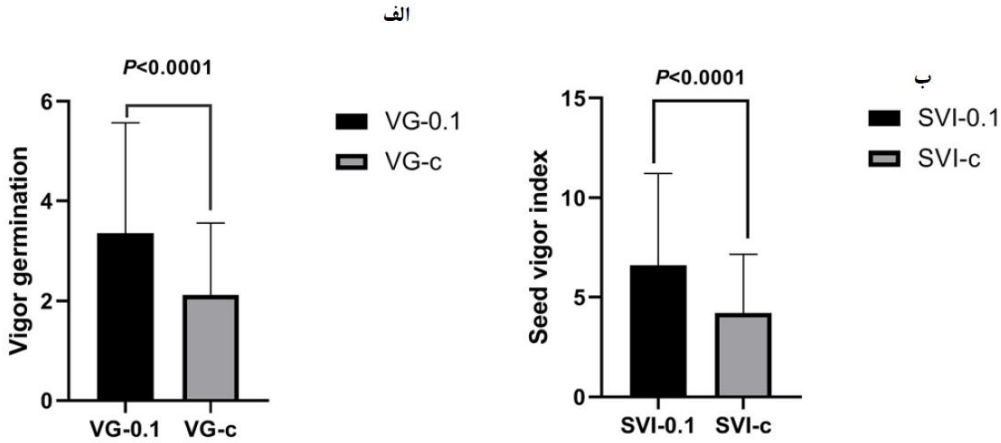
1. Ent-kaurene oxidase
2. Auxin efflux carrier
3. Aquaporin
4. Brassinosteroid-insensitive
5. Expansine
6. Gibberelic acid
7. Xyloglucan endotransglicosylase
8. Actin
9. Seed germination
10. Germination speed

همان‌طور که در شکل ۲- ب مشاهده می‌شود از روز چهارم به بعد سرعت جوانه‌زنی در شرایط کنترل و تیمار عصاره جلبک تغییرات زیادی نداشته و از نظر آماری هر یک از اجزا در حالت استفاده از عصاره جلبک با کنترل اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند، ولی با دیگر اجزای جوانه‌زنی در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار داشتند.

نتایج حاصل از تیمار عصاره جلبک قهوه‌ای بر روی طول ریشه‌چه بر خلاف ساقه‌چه در سطح p<۰/۰۰۰۱ اختلاف معنی‌داری از خود نشان دادند. این امر نشان‌دهنده تأثیر عصاره جلبک بر روی طول ریشه‌چه و ساقه‌چه بوده هرچند که طول ساقه‌چه در شرایط تیماری عصاره جلبک با شرایط کنترل اختلاف معنی‌داری نشان ندادند، ولی در ظاهر تأثیر استفاده از جلبک بر روی مراحل رشدی گیاه کلزا محرز و قابل‌مشاهده بود.



شکل ۳. نمودار مربوط به نتایج (الف) طول ریشه‌چه (سانتی‌متر) و (ب) طول ساقه‌چه (سانتی‌متر) در شرایط کنترل(C) و استفاده از عصاره جلبک قهوه‌ای (۰/۱ درصد).LR[1]: طول ریشه‌چه، SL[2]: طول ساقه‌چه.



شکل ۴. نمودار مربوط به نتایج (الف) بنیه جوانه‌زنی و (ب) شاخص بنیه بذر در شرایط کنترل (C) و استفاده از عصاره جلبک قهوه‌ای (۰/۱ درصد).VG[3]: بنیه جوانه‌زنی و SVI[4]: شاخص بنیه بذر.

1. Length of Radical
2. Stem length
3. Vigor germination
4. Seed vigor index

در طی فرآیند جوانه‌زنی تبادلات آبی از اهمیت بسیاری برخوردار هستند و در واقع اولین مرحله در جوانه‌زنی نفوذ آب به بافت بذر است (Vander Willigen*et al*., 2006). آکواپورین‌ها (Aquaporin tip1-2) کانال‌هایی را در تونوپلاست تشکیل می‌دهند که به عنوان تنظیم‌کننده‌های جریان آب درون سلولی نقش دارند، این گروه نه‌تنها مسئول حرکت آب هستند بلکه مسئول انتقال ترکیبات کوچک در سلول نظیر گلیسرول، اوره، آمونیاک، پراکسیدهیدروژن و فرمائید نیز می‌باشند. بیان این گروه از ژن‌ها در اثر تنش‌های محیطی از قبیل خشکی، شوری و سرما و نیز در اثر کاربرد برخی فیتوهورمون‌ها تحت‌تأثیر قرار می‌گیرد و مشخص‌شده است که دست‌کاری بیان ژن کد کننده آن‌ها می‌تواند منجر به افزایش تحمل گیاه نسبت به تنش گردد (Kurowska, 2020). براساس مطالعات صورت‌گرفته مشخص‌شده است که آکواپورین‌ها در فرآیند جوانه‌زنی بذر از طریق انتقالات آب نقش به سزایی دارند به این سبب بررسی الگوی تغییرات این ژن در اثر کاربرد عصاره جلبک دریایی از اهمیت بالایی برخوردار بوده که پژوهش حاضر به آن پرداخته‌است. در اثر کاربرد تیمار عصارهٔ جلبک دریایی *A. nodosum* الگوی بیان ژن *ATI* افزایش بیان نسبی را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد (شکل ۵- الف)، بیشترین میزان بیان نسبی در روز سی‌ام (۴/۳۹) پس از اعمال تیمار و سپس در روز دهم (۲/۶۵) در مقایسه با شاهد مشاهده شد. اختلاف مشاهده شده میان تیمار عصارهٔ جلبک و شاهد معنی‌دار بوده و نشان از تأثیر مثبت کاربرد این عصاره در مقایسه با شاهد دارد.

اکسپنزین‌ها[1] پروتئین‌هایی هستند که گسترش دیواره سلولی را با سست کردن پیوندهای غیرکوالانسی مثل پیوند هیدروژنی بین ترکیبات همی‌سلولز و میکروفیبریل‌های دیواره سلولی تسهیل می‌کنند و در فرآیندهایی مثل جوانه‌زنی بذر و کاستن سفتی آندوسپرم و یا فرایند رسیدگی دانه فعالیت دارند (Chen & Bradford, 2000; Marowa*et al*., 2016). از این رو، در مطالعات مرتبط با بررسی تغییرات بیان ژن‌های کلیدی در اثر کاربرد محرک‌هایی که بر جوانه‌زنی بذر تأثیرگذارند، ارزیابی میزان بیان ژن کدکننده اکسپنزین دارای اهمیت بالایی است. با این توضیح در پژوهش حاضر بررسی الگوی تغییرات بیان نسبی ژن *EXP* در اثر کاربرد تیمار عصارهٔ جلبک دریایی در مقایسه با شاهد بررسی گردید. براساس نتایج به‌دست‌آمده، استفاده از تیمار عصارهٔ جلبک منجر به افزایش میزان بیان این ژن شد (شکل ۵- ب)، به گونه‌ای که بیشترین بیان نسبی مشاهده‌شده در تیمار زمانی ۱۰ روز (۳/۱۵) عصارهٔ جلبک دریایی و در سطح معنی‌دار ۵٪ مشاهده گردید.

آنزیم (*XEN*)[2] از جمله آنزیم‌های کلیدی مرتبط با تجزیه‌ی زیلوگلوکان ذخیره‌شده در دانه‌های برخی گیاهان دولپه است که نقش مهمی در ضعیف و سست کردن بافت آندوسپرم بذر و گسترش جنین در طول جوانه‌زنی بذر ایفا می‌کند (Sulova*et al*., 1995; Dogra*et al*., 2016). ارزیابی تغییرات الگوی بیان نسبی ژن *XEN* در اثر کاربرد تیمار عصاره جلبک دریایی کاهش بیان نسبی این ژن را نسبت به تیمار شاهد نشان داد (شکل ۵- ج). کاهش بیان مشاهده‌شده در سطح اطمینان آماری ۹۹٪ معنی‌دار بود. با وجود کاهش میزان بیان نسبی این ژن در مقایسه با شاهد، کمترین میزان بیان ژن *XEN* در روز پانزدهم (۰/۰۱۵) پس از اعمال تیمار عصارهٔ جلبک دریایی مشاهده شد.

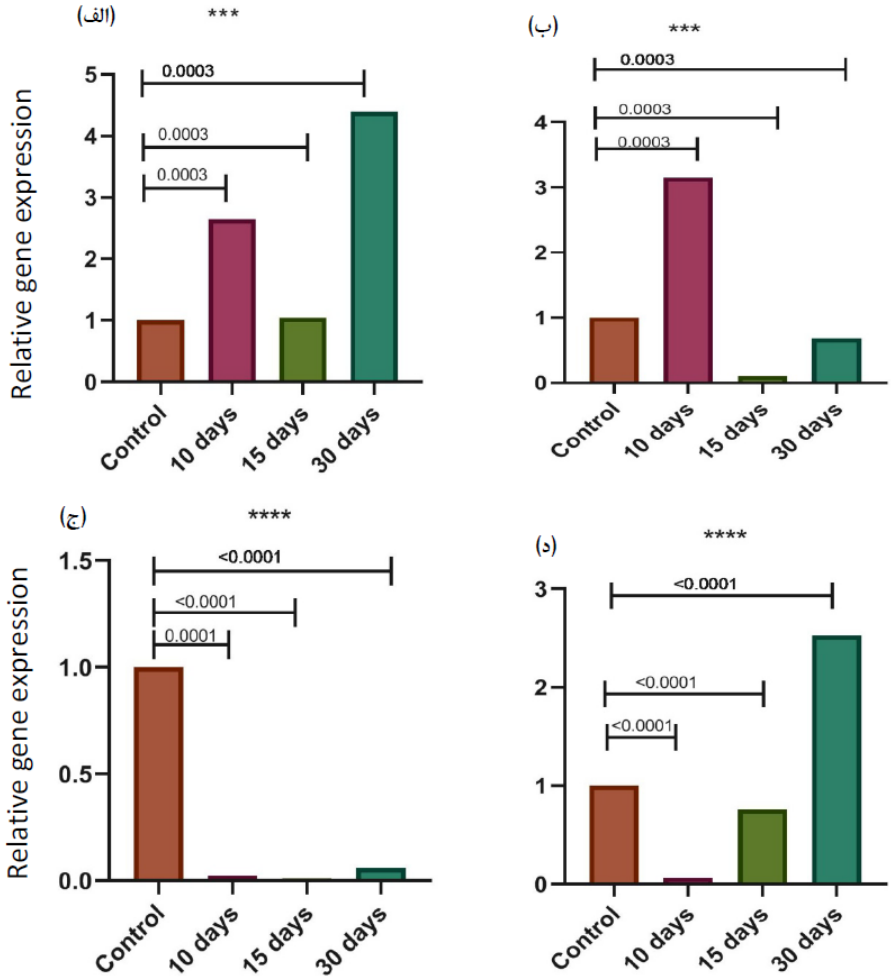
فیتوهورمون اکسین نقش بسیار مهمی در رشد و نمو گیاه و فعالیت‌هایی چون جنین‌زایی، تقسیم سلولی و

1. Expansins (EXP)

2. Xyloglucan endo-transglycosylase

افزایش طول، تمایز بافت‌های آوندی، افزایش طول ریشه و ساقه و جوانه‌زنی بذر دارد (Zhang *et al.*, 2012). در پژوهش حاضر تغییرات بیان نسبی ژن سنتزکننده اکسین در اثر تیمار عصارهٔ جلبک دریایی مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی الگوی بیان نسبی ژن *Auxin efflux carrier* (*AEC*) در اثر کاربرد تیمار عصارهٔ جلبک دریایی در طول زمان روند صعودی را نشان داد (شکل ۵– د) به‌نحوی‌که بیشترین میزان بیان نسبی این ژن در مقایسه با تیمار شاهد در روز سی‌ام پس از اعمال تیمار عصارهٔ جلبک دریایی در سطح معنی‌دار $p<۰/۰۰۰۱$ مشاهده شد.

جیبرلین با افزایش ضریب کشسانی دیواره سلولی، رشد سلول و در نتیجه طویل شدن آن را به دنبال دارد. جیبرلین منجر به هیدرولیز نشاسته می‌شود که این اتفاق کاهش پتانسیل آب سلول را سبب می‌گردد و به‌دنبال آن ورود آب به درون سلول تسهیل می‌شود (Naba'ee *et al.*, 2013). در اثر اعمال تیمار عصارهٔ جلبک دریایی الگوی بیان ژن *GIB* نسبت به شاهد کاهش بیان را نشان داد (شکل ۶– الف) و کمترین عدد بیان مربوط به تیمار زمانی ۱۰ روز پس از اعمال عصارهٔ جلبک دریایی بود.

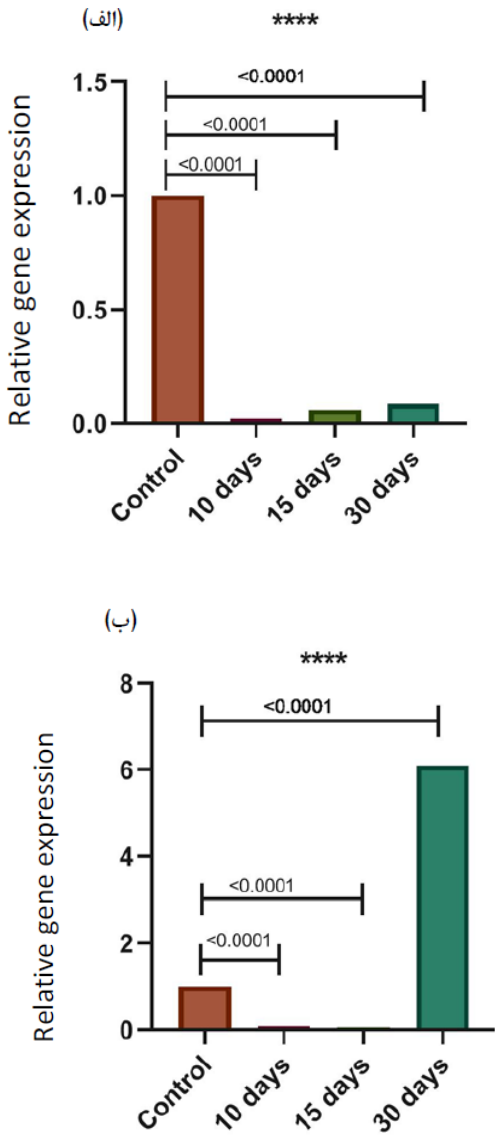


شکل ۵. تغییرات الگوی بیان نسبی ژن‌های؛ الف) *ATI*، ب) *EXP*، ج) *XEN* و د) *AEC* بعد از اعمال تیمار عصاره جلبک قهوه‌ای (هر تعداد روز از زمان کاشت) و شرایط کنترل

آنزیم *ENTKO*[1] اکسیداز است که در بیوسنتز جیبرلین نقش دارد (Mao & Sun, 2017). براساس مطالعات، مشخص‌شده که بازیگران کلیدی در واکنش‌های مرتبط با کاتالیز و اکسیداسیون جیبرلین *Ent-kaurene synthase* و *Ent-kaurene oxidase* هستند (Yamamura*et al*., 2018). از آنجا که در فرآیند جوانه‌زنی بیوسنتز جیبرلین و ژن‌های مرتبط با تولید آن از اهمیت بالایی برخوردار است، در پژوهش حاضر برای مطالعهٔ تأثیر استفاده از عصارهٔ جلبک دریایی بر جوانه‌زنی بذرهای کلزا، الگوی تغییرات بیان ژن *ENTKO* نیز مورد ارزیابی قرار داده شد. استفاده از تیمار عصارهٔ جلبک دریایی بر تغییر الگوی بیان ژن *ENTKO* منجر به افزایش معنی‌دار میزان بیان این ژن در روز سی‌ام کاربرد عصارهٔ جلبک دریایی گردید (شکل ۶-ب). هرچند بررسی بیان نسبی این ژن کاهش بیان را در روزهای دهم و پانزدهم در مقایسه با شاهد نشان داد.

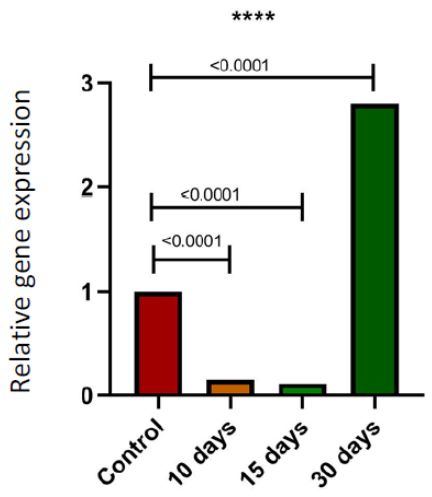
براسینواستروئیدها ترکیبات استروئیدی گیاهی با مهار اثرات اسید آبسزیک جوانه‌زنی را القا می‌کنند (Hu & Yu, 2014). مطالعهٔ تغییرات الگوی بیان ژن *BINSP* افزایش بیان این ژن را در اثر اعمال تیمار عصارهٔ جلبک دریایی *A. nodosum* در مقایسه با شاهد در طول زمان نشان داد (شکل ۷) و بالاترین میزان بیان این ژن مربوط به زمان ۳۰ روز پس از اعمال تیمار عصارهٔ جلبک دریایی بود.

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از تغییرات الگوی بیان ژن‌های مورد مطالعه، میزان بیان ژن‌های *EXP*، *ATI*، *ENTKO*، *AEC* و *BINSP* در اثر کاربرد تیمار عصارهٔ جلبک دریایی در مقایسه با شاهد، افزایش بیان را نشان داد که بیشترین میزان بیان در ژن‌های *ATI*، *ENTKO*، *AEC* و *BINSP* در روز سی‌ام و برای ژن *EXP* در روز دهم مشاهده گردید. بررسی میزان همبستگی ژن‌های فوق با در نظر گرفتن دامنه تغییرات ۱± نشان داد که میان میزان بیان ژن‌های *XEN* با *GIB* (همبستگی ۱)، *ENTKO* با *BINSP* (همبستگی ۰/۹۸) بیشترین میزان همبستگی مثبت در سطح خطای ۵٪ وجود دارد (شکل‌های ۸ و ۹).



شکل ۶. تغییرات الگوی بیان نسبی ژن‌های مسیر جیبرلین؛ الف) *GIB* و ب) *ENTKO* بعد از اعمال تیمار عصاره جلبک قهوه‌ای (هر تعداد روز از زمان کاشت) و شرایط کنترل

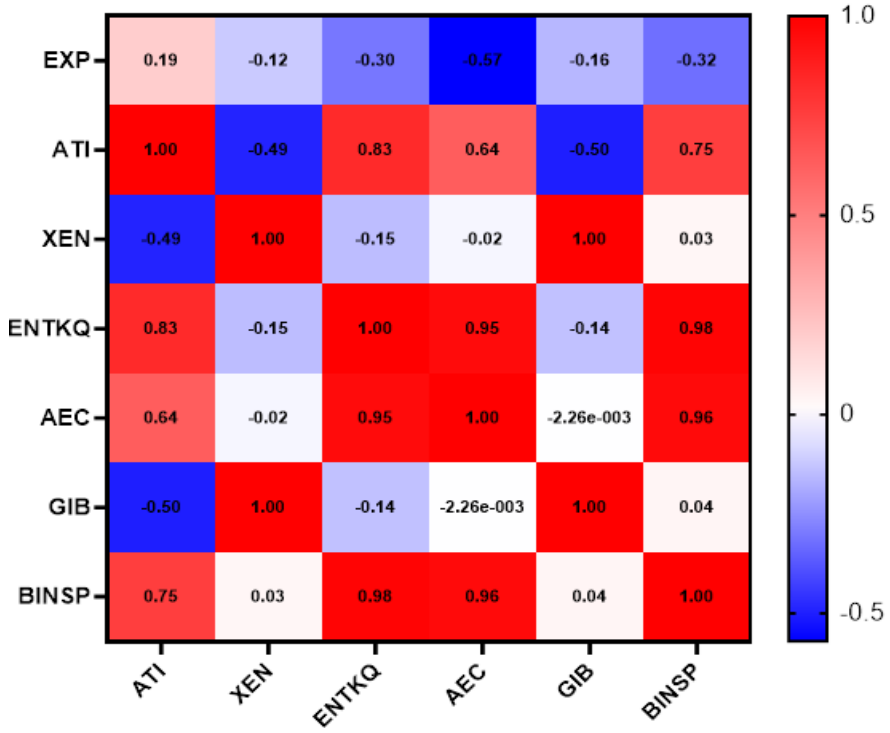
1. ENT-kaurene oxidase



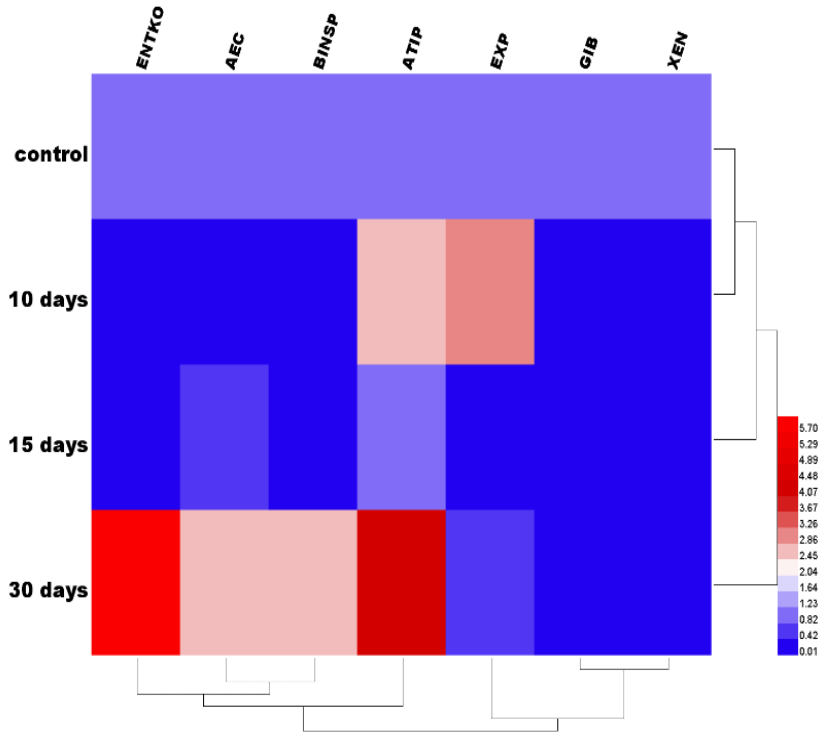
شکل ۷. تغییرات الگوی بیان نسبی ژن *BINSP* در مسیر براسینواستروئید بعد از اعمال تیمار عصاره جلبک قهوه‌ای (هر تعداد روز از زمان کاشت) و شرایط کنترل

در توضیحی دقیق‌تر افزایش میزان بیان این ژن‌ها و داشتن همبستگی نزدیک به ۱ (رنگ قرمز در نمودار حرارتی) نشان از این واقعیت دارد که میان این ژن‌ها ارتباط یا همبستگی شدیدی برقرار است و افزایش در میزان بیان یک ژن، افزایش در میزان بیان ژن دیگر را در پی خواهد داشت. در نمودار حرارتی حاصل ژن‌های *GIB* و *ATI* (همبستگی ۰/۵۰-) و نیز *XEN* با *ATI* (همبستگی ۰/۴۹-) دارای همبستگی منفی (رنگ آبی در نمودار حرارتی) در سطح خطای ۵٪ هستند و افزایش یکی، کاهش دیگری و برعکس کاهش یک ژن، افزایش ژن دیگر را به‌دنبال خواهد داشت.

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه کاربرد عصارهٔ جلبک قهوه‌ای بر پارامترهای جوانه‌زنی بذر کلزا اثر مثبت داشته است. در پژوهشی که به مطالعهٔ تأثیر کاربرد عصارهٔ جلبک سبز بر شاخص‌های رشد و فیزیولوژیکی گیاه کنجد، استفاده از این تیمار منجر به افزایش در صفات مورفولوژیکی از قبیل طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه، طول ساقه، قطر ساقه، سطح برگ و میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی گردید (Moradi *et al.*, 2019).



شکل ۸. نقشه حرارتی همبستگی ژن‌های مورد مطالعه در بافت برگ کلزا رقم هایولا ۴۸۱۵ در اثر اعمال عصارهٔ جلبک دریایی *A. nodosum*. رنگ قرمز همبستگی مثبت، رنگ آبی همبستگی منفی و رنگ سفید نداشتن همبستگی را نشان‌می‌دهد



شکل ۹. نقشه حرارتی نتایج حاصل از بیان ژن‌های مورد مطالعه در بافت برگ کلزا رقم هایولا ۴۸۱۵ در اثر اعمال عصارهٔ جلبک دریایی *A. nodosum* در زمان‌های مختلف در سه تکرار

در مطالعهٔ Azarmehr *et al.* (2017) نیز استفاده از عصارهٔ جلبک دریایی در گیاه کلزا منجر به افزایش تمامی صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیک و عملکردی مورد ارزیابی شد و میزان عملکرد دانه، درصد روغن، وزن خشک اندام هوایی، وزن هزار دانه، متوسط تعداد خورجین شاخه‌های فرعی، عملکرد زیستی و شاخص برداشت در اثر کاربرد عصاره جلبک دریایی در مقایسه با گیاه شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد. نتایج حاصل از پژوهش حاضر بر تأثیر مثبت استفاده از تیمار عصارهٔ جلبک دریایی با مطالعات ذکر شده هم‌خوانی داشت و تأییدی بر نتایج پژوهش فعلی و تأثیر مثبت کاربرد تیمار یاد شده داشت.

تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی علاوه بر کنترل فرآیندهای رشدی و فیزیولوژیکی در افزایش تحمل به تنش‌های زنده و غیرزنده و بهبود عملکرد گیاه نیز مؤثر هستند. اکسین‌ها، جیبرلین‌ها، سیتوکنین‌ها، اسید آبسزیک، براسینواستروئیدها، اسید سالیسیلیک و جاسمونات‌ها از جمله تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی می‌باشند که برخی از آن‌ها در فرایند جوانه‌زنی بذر گیاهان نقش به‌سزایی دارند (Rafeie*et al*., 2020). آکواپورین‌ها بر جوانه‌زنی و نیز ماندگاری بذر مؤثر بوده و در تبادلات آبی فرآیند جوانه‌زنی نقش دارند. اکسپنزین‌ها نیز با سست کردن پیوندهای غیرکووالانسی دیواره سلولی را سست می‌کنند، بررسی الگوی بیان نسبی هر دو ژن در مطالعهٔ ما افزایش بیان را در اثر کاربرد تیمار عصارهٔ جلبک قهوه‌ای نشان داد. بررسی تغییرات الگوی بیانی جهش‌یافته‌های آرابیدوپسیس برای ژن *ATIP3* نمایان کرد که این ژن در حفظ طول عمر بذر تحت کنترل بیانی آبسزیک اسید نقش دارد (Mao & Sun, 2015). میزان بیان آکواپورین‌ها در طی جوانه‌زنی بذر ماش افزایش نشان داد و منجر شد که ژن آکواپورین از جمله ژن‌های ابتدایی و دارای اهمیت در فرایند جوانه‌زنی ماش معرفی شود (Shusaku*et al*., 2021).

Yan *et al.* (2014) با هدف بررسی تأثیر ژن اکسپنزین بر جوانه‌زنی بذر، جهش یافته‌هایی را برای ژن *EXP2* در آرابیدوپسیس تولید کردند و نشان دادند که اکسپنزین در جوانه‌زنی با واسطه جیبرلین نقش ایفا می‌کند و از اهمیت بالایی برخوردار است. همچنین مطالعهٔ جوانه‌زنی بذرهای سویا نشان داد که اکسپنزین اولین و مهم‌ترین عامل در جوانه‌زنی و طویل شدن محور جنینی بذر سویا است. در این ارزیابی به سبب نقش پر رنگ اکسپنزین و میزان بیان بالا در زمان جوانه‌زنی، این آنزیم به‌عنوان کاندیدای هدف برای کنترل جوانه‌زنی بذر سویا مطرح شد (Montechiarini*et al*., 2021).

در پژوهش حاضر بررسی الگوی بیان ژن‌های *XEN* و *GIB* پس از اعمال تیمار عصاره جلبک نسبت به شاهد کاهش بیان نشان داد. بر اساس مطالعهٔ Chen *et al.* (2002) بر روی بذر گوجه‌فرنگی مشخص شد که بیان این ژن به‌شدت مرتبط با جیبرلین است و در تضعیف کلاهک آندوسپرم بذر که یک فرایند کلیدی برای تنظیم جوانه‌زنی بذر گوجه‌فرنگی است نقش دارد. از این رو به نظر می‌رسد کاهش بیان مشاهده‌شده با تغییرات بیان ژن‌های مرتبط با جیبرلین تعدیل‌شده باشد. با در نظر گرفتن این نکته بررسی الگوی بیانی آنزیم *ENTKO* که در بیوسنتز جیبرلین نقش دارد افزایش بیان نسبی را در مقایسه با شاهد نشان داد. در مطالعه روی بذر گیاه برنج مشخص شد که جهش در ژن *ent-kaurene oxidase 1* در نهایت منجر به تأخیر در فرآیند جوانه‌زنی بذر برنج شد و مشخص گردید که این ژن کاتالیز *ent-kaurene* به *ent-kaurene acid* را بر عهده داشته و در فرایند جوانه‌زنی اهمیت بالایی دارد (Zang *et al*., 2020). همچنین بر اساس نتایج Li *et al.*(2018) برای جوانه‌زنی بذر تنباکو به H_2O_2 و جیبرلیک نیاز است و جوانه‌زنی با تنظیم نسبت جیبرلیک به اسید آبسزیک تقویت می‌شود. در مطالعه‌ای که به فرایند اصلاح خاک با زغال زیستی پرداخت جوانه‌زنی دو گونه گندم برای بررسی میزان بیان ژن‌های کدکنندهٔ هورمون‌های اصلی در جوانه‌زنی (جیبرلین، اکسین و اسید آبسزیک) به‌روش Real time-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه مشخص شد که بیان ژن‌های هدف به‌ویژه ژن کدکنندهٔ جیبرلین در اثر کاربرد زغال زیستی افزایش یافت و در نهایت منجر به افزایش درصد جوانه‌زنی نسبت به شاهد گردید (Racioppi*et al*., 2020). علاوه بر آنزیم‌های ذکرشده و جیبرلین دو هورمون اکسین و براسینواستروئیدها نیز بر فرایند جوانه‌زنی بذر مؤثر هستند. اکسین نقش بسیار مهمی در رشد و نمو گیاه و فعالیت‌هایی چون جنین‌زایی، تقسیم سلولی و افزایش طول، تمایز بافت‌های آوندی، افزایش طول ریشه و ساقه دارد. همچنین این هورمون به‌عنوان سیگنال مهم در پاسخ به استرس‌های زنده و غیر زنده نیز نقش دارد و فعالیت خود را از طریق سیگنالینگ اکسین و یا انتقال اکسین انجام می‌دهد. توزیع فیتوهورمون اکسین تا حدود زیادی مرتبط است با اعضای خانواده‌ی PIN-FORMED (PIN) *auxin efflux carrier* و بیشتر در بافت‌های جوان حضور دارد (Zhang *et al*., 2012). این هورمون در فرایند جوانه‌زنی بذر از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. بررسی الگوی بیان نسبی ژن *Auxin efflux carrier* (*AEC*) در اثر کاربرد تیمار عصارهٔ جلبک دریایی در طول زمان روند صعودی نشان داد. مطالعهٔ الگوی بیان ژن AEC در قلمه‌های زیتون و تأثیر آن بر ایجاد ریشه‌های نابجا در قلمه‌ها نشان داد که بیان این ژن در انتهای قلمه و ریشه ژنوتیپ‌های با ریشه‌دهی بالا افزایش یافت. نتایج حاصل نشان دادند که ژن مورد مطالعه در ریشه‌دهی قلمه‌های زیتون مؤثر است (Hedayati*et al*., 2014). نویسندگان این مقاله عنوان کردند که این ژن نقش کلیدی در

تشکیل ریشه‌ی جانبی دارد و انتقال IAA از برگ‌های تازه نمو یافته را به پریموردیای ریشه‌های جانبی تحریک می‌کند. براسینواستروئیدها ترکیبات استروئیدی گیاهی هستند که از طریق تغییرات متابولیسمی و حفاظت گیاه در برابر تنش‌های محیطی توان افزایش عملکرد را در گیاهان دارند. این گروه از هورمون‌ها علاوه بر افزایش عملکرد قادرند تحمل گیاه در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده را نیز افزایش دهند. براسینواستروئیدها محرک رشد بوده و در تکثیر و توسعه سلول گیاهی نقش دارند و بر ویژگی‌های نفوذپذیری، پایداری و فعالیت آنزیم‌های غشای سلولی اثرگذار هستند (Gholami, 2018). براساس گزارش‌های موجود، این گروه از آنزیم‌ها با مهار اثرات اسید آبسزیک، جوانه‌زنی را القا می‌کنند (Hu & Yu, 2014). ارزیابی روند تغییرات الگوی بیان ژن *BINSP* در مطالعه حاضر افزایش میزان بیان این ژن را در مقایسه با شاهد نشان داد. بررسی تغییرات الگوی بیانی دو ژن *TaBES* و *TaBRI* در مسیر سیگنالی براسینواستروئیدها در اثر تنش خشکی نشان داد که با وجود تأثیر مثبت کاربرد این فیتوهورمون در میزان عملکرد دانه، پایداری غشاء سلولی، محتوای کلروفیل و کاتالاز تحت تنش خشکی، مسیر سیگنالی براسینواستروئید به کار رفته متفاوت از مسیر شناخته شده‌ای است که این دو ژن در آن جای دارند (Rafeie*et al*., 2020).

نتیجه‌گیری کلی

شرایط نامساعد محیطی و تأثیر آن‌ها بر توان جوانه‌زنی بذر گیاهان یکی از مشکلاتی است که علم کشاورزی با آن روبه رو می‌باشد. پرایمینگ بذر از جمله راهکارهایی است که تا به امروز مورد استفاده قرار گرفته‌است، با توجه به اثرات مثبت گزارش‌شده از کاربرد تیمار عصارۀ جلبک دریایی بر جوانه‌زنی بذر و استقرار گیاهچه پژوهش حاضر به مطالعۀ تأثیر این عصاره بر بذر کلزا و نیز بررسی تغییرات میزان بیان نسبی ژن‌های کلیدی و مؤثر بر جوانه‌زنی پرداخته‌است. اندازه‌گیری درصد و سرعت جوانه‌زنی و نیز شاخص بنیه بذر نشان از تأثیر مثبت عصارۀ یاد شده بر همه پارامترهای مورد مطالعه داشت. همچنین ارزیابی میزان بیان ژن‌های *EXP*، *ATI*، *XEN*، *ENTKO*، *AEC*، *GIB* و *BINSP* که از جمله ژن‌های مهم و کلیدی در فرایند جوانه‌زنی بذر هستند افزایش در بیان ژن‌های *EXP*، *ATI*، *ENTKO*، *AEC* و *BINSP* را در اثر کاربرد عصارۀ جلبک دریایی نسبت به شاهد نشان داد. همچنین مشخص شد که میان میزان بیان ژن‌های *ENTKO* و *AEC*، *ENTKO* و ATI، *ENTKO* و *BINSP* و نیز *BINSP* و *AEC* بیشترین میزان همبستگی مثبت در سطح خطای ۵٪ وجود دارد. همچنین در نمودار حرارتی حاصل ژن‌های *EXP* و *AEC*، *GIB* و *ATI* و دو ژن *XEN* و ATI دارای همبستگی منفی در سطح خطای ۵٪ هستند و افزایش یکی، کاهش دیگری و برعکس کاهش یک ژن، افزایش ژن دیگر را به‌دنبال خواهد داشت.

سپاسگزاری

از دانشگاه شهید چمران اهواز بابت حمایت مالی در به ثمر رساندن این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Agrawal, R.L. (1991) *Seed technology* Oxford and IBH Publishing. 658 pp.

Ahmadi, M. (2010) *Plant cultivation of oilseed* Mooad Eslam Puplisher Qum Pp. 123-245 (*in Persian*).

Ahmadpour, R., Salimi, A., Armand, N. & Hosseinzadeh, S.R. (2019) The effects of *Ascophyllum nodosum* extract on the stimulation of germination indices in chickpea (*Cicer arietinum*) under drought stress. *Nova Biologica Reperta*, 6: 206-216.

Alizadeh, H., Monem, R. & Hoseini Mazinani, S.M. (2019) Investigating the effect of vermicompost and Seaweed (*Ascophyllum nodosum*) spraying on yield and yield components of beans (*Vig*na *unguiculata* sppsinensis). *Plant and Ecology Quarterly, 15* (59): 15- 25 (*in Persian*).

Aminifard, M.H. & Khandan, S. (2019) The effect of different levels of Seaweed extract (*Ascophyllum nodosum*) on the growth yield and biochemical characteristics of Bitter Squash (*Momordica charantia* L.). *Journal of Plant Environmental Physiology*, 56-66. (*in Persian*)

Amooaghaie, R. (2014) The effect of some hormones and nitrogenous compounds on capacity velocity and synchrony of germination of *zygophyllum atriplicoides* seeds under salinity stress. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology),* 26 (4): 465- 475.

Azarmehr, A., Baghi, M. & Ziaeinasab, M. (2017) Effect of Seaweed extract (Basfoliar Kelp sl) and Sulphate (K-leaf) on yield and some yield components of winter rapeseed (*Brassica napus* L.) var Natalie'. *Agronomic Research in Semi Desert Regions,* 14(3): 155-165. (*in Persian*)

Caffagni, D., Camargo, E., Casali, C., Lombardi, A. & Lima, M. (2015) Coupling microalgal cultures with hydroponics: Prospection for clean biotechnology processes. *Journal of Algal Biomass Utility,* 6: 88-94.

Chen, F. & Bradford, K. J. (2000) Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. *Plant Physiology*, 124: 1265-1274.

Cen, F., Nonogaki, H. & Bradford, K. J. (2002) A gibberellins regulated xyloglucan endotransglycosylase gene is expressed in the endosperm cap during tomato seed germination. *Journal of Experimental botany,* 53: 215-223.

Dogra, V., Sharma, R. & Yelam, S. (2016) Xyloglucan endo-transglycosylase/hydrolase (XET/H) gene is expressed during the seed germination in *Podophyllum hexandrum*: a high altitude. *Himalayan plant Planta,* 244: 505-515.

Egamberdieva, D., Wirth, S., Behrendt, U., Abd-Allah, E.F. & Berg, G. (2016) Biochar treatment resulted in a combined effect on soybean growth promotion and a shift in plant growth promoting rhizobacteria. *Frontier in Microbiology,* 7: 209.

Eltanahy, E. & Torky, A. (2021) *Microalgae as Cell Factories*: Food and Feed-grade High-value Metabolites in Microalgal Biotechnology: Recent Advances Market Potential and Sustainability pp 1-35.

Farhangi-Abriz, S. & Torabian, S. (2018) Biochar increased plant growth-promoting hormones and helped to alleviates salt stress in common bean seedlings. *Journal of Plant Growth Regulation,* 37: 591-601.

French, E. A. & Iyer-Pascuzzi, A.S. (2018) A role for the gibberellin pathway in biochar-mediated growth promotion. *Scientific Reports,* 8: 1-10.

Ghadami, N. (2012) *Cultivation and breeding of rapeseed* (planting holding harvesting) Tehran Agricultural Education and Extension Publishing Pp.234. (*in Persian*)

Gholami, A. (2018) hormones Brassinososteroids effects of plant. Journal of Biosafety, 11 (1):23-32 (*in Persian*).

Graziano, S., Marando, S., Prandi, B., Boukid, F., Marmiroli, N., Francia, E., Pecchioni, N., Sforza, S., Visioli, G. & Gullì, M. (2019) Technological quality and nutritional value of two durum wheat varieties depend on both genetic and environmental factors. *Journal of*

Agriculture and Food Chemistry, 67: 2384-2395.

Hedayati,V., Mousavi, A., Alagna, F., Pandolfi, S., Razavi, K., Baldoni, L. & Hosseini Mazinani, S. (2014) Identification and gene expression analysis of AUX1 influencing adventitious root induction in olive cuttings (*Olea europaea* L.). Iranian Journal of Plant Biology, 6(22):127-133. (*in Persian*)

Hu, Y. & Yu, D. (2014) Brassinosteroid insensitive2 interacts with abscisic acid insensitive5 to mediate the antagonism of brassinosteroids to abscisic acid during seed germination in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26: 4394-4408.

ISTA: International Seed Testing Association (2009) International rules for seed testing-Seed Sci Tech, 49:86-41.

Jeshari, M., Zeinali, N. & Arvin, M.J. (2018) Study the changes of some physiological and antioxidant properties of *Lycopersicon esculentum* cv Teena affected by marmarine extract (*Ascophyllum nodosum*). *Journal Plant Proceeding and Function*, 7(23):273-282. (*in Persian*)

Kumar, G. & Sahoo, D. (2011) Effect of seaweed liquid extract on growth and yield of *Triticum aestivum* var Pusa Gold. *Journal of Applied Phycology*, 23: 251-255.

Kurowska, M.M. (2020) *TIP Aquaporins in Plants*: Role in Abiotic Stress Tolerance in Abiotic Stress in Plants Intech Open., 94165.

Li, Z., Gao,Y., Zhang,Y., Lin,C., Gong, D., Guan, Y. & Hu, J. (2018) Reactive oxygen species and gibberellin acid mutual induction to regulate tobacco seed germination. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1279.

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

Mao, H., Shen, Q. & Wang, Q. (2017) CYP701A26 is characterized as an ent-kaurene oxidase with putative involvement in maize gibberellin biosynthesis. *Biotechnology letters*, 39: 1709-1716.

Mao, Z. & Sun, W. (2015) *Arabidopsis* seed-specific vacuolar aquaporins are involved in maintaining seed longevity under the control of ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3. *Journal of Experimental Botany*, 66: 4781-4794.

Marowa, P., Ding, A. & Kong, Y. (2016) Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement. *Plant Cell Reports*, 35: 949-965.

Montechiarini, N.H., Delgado, L., Morandi, E.N., Carrillo, N.J. & Gosparini, C. O. (2021) The expansin EXP1 gene in the elongation zone is induced during soybean embryonic axis germination and differentially expressed in response to ABA and PEG treatments. *Seed Science Research*, 31: 60-68.

Moradi, F., Najafi, S. & Esmaeilzadeh Bahabadi, S. (2019) The effect of green algae (*Ulva fasciata* L.) extract on growth and physiological parameters of *Sesamum indicum*. Journal Plant Proceeding and function, 8 (33):1-14. (*in Persian*)

Naba'ee, M., Roshandel, P. & Mohammad Khani, A. (2013) The effects of Plant growth regulators on breaking seed dormancy in *Silybum marianum* L. Journal of Cell & Tissue, 4(1): 45-54. (*in Persian*)

Racioppi, M., Tartaglia, M., la Rosa, D., Mara, J., Marra, M., Lopez-Capel, E. & Rocco, M. (2020) Response of ancient and modern wheat varieties to biochar application: effect on hormone and gene expression involved in germination and growth. *Agronomy*, 10: 5.

Rafeie, M., Amerian, M.R., Sorkhi, B., Heidari, P. & Asghari, H.R. (2020) Effect of exogenous brassinosteroid application on grain yield some

physiological traits and expression of genes related to this hormone signaling pathway in wheat under drought stress. Plant Genetic Researches, 6(2): 157-172. (*in Persian*)

Shusaku, N., Masayasu, N. & Akifumi, I. (2021) Mechanism for enhancing the growth of *Mung bean* seedlings under simulated microgravity, NPJ. Microgravity, 7:26.

Sivritepe, N. (2008) Organic priming with seaweed extract (*Ascophyllum nodosum*) affects viability of pepper seeds. *Asian Journal of Chemistry*, 20:5689.

Steber, C. M. & McCourt, P. (2001) A role for brassinosteroids in germination in Arabidopsis. *Plant physiology*, 125: 763-769.

Sudhakar, M., Kumar B.R., Mathimani, T. & Arunkumar, K. (2019) A review on bioenergy and bioactive compounds from microalgae and macroalgae-sustainable energy perspective. *Journal of Cleaner Production*, 228: 1320-1333.

Sulova, Z., Lednicka, M. & Farkas, V. (1995) A colorimetric assay for xyloglucan-endotransglycosylase from germinating seeds. *Analytical Biochemistry*, 229: 80-85.

Vander Willigen, C., Postaire, O., Tournaire-Roux, C., Boursiac, Y. & Maurel, C. (2006) Expression and inhibition of aquaporins in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant and Cell Physiology*, 47: 1241-1250.

Wang, Y.P., Sonntag, K., Rudloff, E., Groeneveld, I., Gramenz, J. & Chu, C.C. (2006) Production and characterization of somatic hybrids between *Brassica napus* and *Raphanus sativus. Plant Cell Tissue Organ Culurer*, 86:279-283.

Yamamura, Y., Taguchi, Y., Ichitani, K., Umebara, I., Ohshita, A., Kurosaki, F. & Lee, J-B. (2018) Characterization of ent-kaurene synthase and kaureneoxidase involved in gibberellin biosynthesis from *Scoparia dulcis. Journal of Natural Medicines*, 72: 456-463.

Yan, A., Wu, M., Yan, L., Hu, R., Ali, I. & Gan, Y. (2014) AtEXP2 is involved in seed germination and abiotic stress response in *Arabidopsis*. *Plos One*, 9: e85208.

Zhang, H., Li, M., He, D., Wang, K.& Yang, P. (2020) Mutations on ent-kaurene oxidase 1 encoding gene attenuate its enzyme activity of catalyzing the reaction from ent-kaurene to ent-kaurenoic acid and lead to delayed germination in rice. *PLos Genetics*,16: e1008562.

Zhang, Q., Li, J., Zhang, W., Yan, S., Wang, R., Zhao, J., Li, Y., Qi, Z., Sun, Z. & Zhu, Z. (2012) The putative auxin efflux carrier OsPIN3t is involved in the drought stress response and drought tolerance. *The Plant Journal*, 72: 805-816.