تاثیر محرک‌های زیستی بر شاخص‌های جوانه‌زنی، رشد و متابولیسم در گیاهچه‌های کاهو تحت تنش گرمایی

مرضیه شاهوردی[۱]، لیلا شبانی[۱]، سمیه رئیسی[۲]

[۱]گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

[۲]گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

* نویسنده مسئول: لیلا شبانی، ایمیل: lshabani@gmail.com

چکیده

تیمار بذرها با محرک‌های زیستی، فناوری مهمی برای مقابله با تنش گرمایی در زمان کاشت و بهبود عملکرد است که همگی از جوانه‌زنی بذر شروع می‌شود. لذا پژوهش حاضر با هدف تاثیر دو محرک زیستی جلبکی (Algabon®) و اسیدآمینه‌ای (Bonamid®) بر بهبود تنش گرمایی در مرحله جوانه‌زنی بذر سرمادوست کاهو در آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی بصورت فاکتوریل با سه تکرار انجام شد. برای این منظور پیش تیمار بذرها به مدت ۲ ساعت در محلول آبی ۰/۵ گرم در لیتر Algabon® و ۲ گرم در لیتر Bonamid® انجام شد. سپس بذرها در شرایط تاریکی به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد (شاهد) و دمای ۳۵ درجه (تنش گرمایی) انکوبه شدند. در گیاهچه‌های سرمادوست کاهو پیش تیمار آلگابن و بنامید منجر به افزایش شاخص‌های درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، وزن تر، وزن خشک و همچنین فعالیت آنزیم‌های بتاآمیلاز، پروتئاز و میزان قندهای محلول تحت تنش گرمایی (دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد) شد. نتایج نشان داد تنش گرما شرایطی از تنش اکسیداتیو (تولید H_2O_2) در گیاهچه‌های کاهو را ایجاد کرده است، اگرچه پیش تیمار بذرها با آلگابن و بنامید منجر به کاهش تولید H_2O_2 تحت تنش گرمایی شد. از طرفی پیش تیمار بذر با آلگابن و بنامید توانایی بذرها برای افزایش پاکروبی رادیکال‌های آزاد تولید شده در طی تنش گرمایی را افزایش داده است. در مجموع به نظر می‌رسد پیش تیمار بذرها با آلگابن با تولید برخی ترکیبات اسمولیت‌های سازگار و تحریک فعالیت آنزیم‌های درگیر در جوانه‌زنی باعث افزایش عملکرد جوانه‌زنی و مقاوم شدن بذرهای کاهو در مقابل تنش گرمایی شده است.

کلمات کلیدی: آلگابن، بنامید، تنش گرمایی، محرک‌های زیستی

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت

مقدمه

یکی از عوامل مهم در رشد گیاه، دما است. تنش دما در گیاهان به معنی افزایش دما به بالاتر از سطح آستانه برای یک دوره زمانی گفته می‌شود که سبب آسیب و خسارت در رشد و نمو گیاه می‌شود. به عبارت دیگر افزایش دما بیشتر از دمای مطلوب، تنش گرما محسوب می‌شود و شدت تنش به مدت زمانی که گیاه در آن دما قرار می‌گیرد بستگی دارد. در میان پارامترهای همیشه در حال تغییر محیط، افزایش مداوم دمای محیط یکی از مخرب‌ترین تنش‌ها به حساب می‌آید. پیش بینی شده است که دمای هوای جهانی در هر دهه ۰/۲ درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد، که منجر به دمای ۱/۸–۴ درجه سانتی‌گراد بالاتر از سطح فعلی دما تا سال ۲۱۰۰ می‌شود (IPCC, 2007). پاسخ گیاه به تنش گرمایی با درجه دما، مدت زمان و نوع گیاه متفاوت است. در تنش گرمایی شدید، آسیب سلولی یا مرگ سلولی ممکن است در عرض چند دقیقه رخ دهد، که ممکن است با برهم‌زدن سازماندهی سلولی منجر به مرگ گیاه شود. تنش گرمایی بر تمام جنبه‌های فرآیندهای گیاهی مانند جوانه‌زنی، رشد، نمو، تولید مثل و عملکرد تأثیر دارد. تنش گرمایی به طور متفاوتی بر پایداری پروتئین‌های مختلف، غشاها، گونه‌های RNA و ساختارهای اسکلت سلولی تأثیر می‌گذارد و کارایی واکنش‌های آنزیمی در سلول را تغییر می‌دهد، که منجر به ممانعت انجام فرآیندهای فیزیولوژیکی مهم و عدم تعادل متابولیک سلول می‌شود (Suzuki *et al*., 2012).

نظر به اینکه یکی از مهم‌ترین و حساس‌ترین مراحل رشد گیاه مرحله جوانه‌زنی است و با توجه به تأثیر تنش‌های محیطی (خشکی، شوری، گرما و سرما) بر کاهش جوانه‌زنی بذر، می‌توان مقاومت گیاهان را با استفاده از روش پرایمینگ نسبت به انواع تنش‌ها افزایش داد. امروزه، کاربرد برون‌زای محافظ‌ها به شکل اسمزی، فیتوهورمون‌ها، مولکول‌های سیگنالینگ، پلی آمین‌ها، محرک‌های زیستی عناصر کمیاب و مواد مغذی در کاهش آسیب ناشی از تنش گرمایی در گیاهان مؤثر بوده‌اند (Hasanuzzaman *et al*., 2012; Waraich *et al*., 2012). محرک‌های زیستی موادی آلی یا میکروارگانیسم‌هایی هستند که باعث افزایش جذب عناصر غذایی، تحریک رشد، افزایش تحمل به تنش یا افزایش کیفیت محصول می‌شوند. این مواد شامل عصاره‌های جلبک دریایی، پروتئین هیدرولیز شده، اسیدهای هیومیک، فولیک و تمامی ترکیبات با منشأ طبیعی هستند که نقشی فراتر از تغذیه دارند و باعث افزایش رشد و کاهش تنش می‌شوند (Bulgari *et al*., 2019).

مطالعات اخیر نشان می‌دهد که مولکول‌های مختلف پتانسیل این را دارند که به عنوان یک محرک زیستی در برابر تنش‌های غیرزیستی مختلف عمل کنند. استفاده از اسیدهای آمینه، هورمون‌ها، گونه‌های فعال اکسیژن – نیتروژن –گوگرد یا فقط آب می‌تواند در افزایش تحمل گیاه به تنش‌های غیرزیستی مختلف موثر باشد. تحقیقات نشان داده است که جلبک‌های دریایی حاوی هورمون‌های گیاهی مانند اکسین، سیتوکینین و اسید آبسیزیک هستند. استفاده از عصاره جلبک دریایی در افزایش جوانه‌زنی بذر، بهبود رشد گیاه، افزایش عملکرد و قدرت گیاه در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده گزارش شده است (Fakhrabad and Abedi, 2019). بنابراین این مزایا بیشتر به دلیل ویژگی محرکی آنها است که منجر به تشکیل آبشاری از واکنش‌ها در گیاه می‌شود و در نتیجه سبب بهبود رشد و افزایش مقاومت در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌شود. گزارش‌های متعددی نیز وجود دارد که اسید آمینه به عنوان یک محرک زیستی اثرات مثبتی بر روی جوانه‌زنی بذر در مراحل اولیه دارد (Kunicki *et al*., 2010).

نقش مثبت محرک‌های زیستی در کاهش اثرات تنش گرمایی در مطالعات اندکی نشان داده شده است. Masondo و همکاران (۲۰۱۸) نقش بالقوه پرایمینگ بذر با محرک‌های زیستی دود–آب (SW) و کارریکینولید (karrikinolide) ترکیبی با دود (KAR1) را در شرایط تنش غیرزیستی در طی جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه *Ceratotheca triloba* مورد بررسی قرار دادند. دمای پایین (۱۰درجه سانتی‌گراد) جوانه‌زنی بذر را کاملاً مهار کرد. با این حال، تغییر دما به ۱۵درجه سانتی‌گراد جوانه‌زنی را بهبود بخشید. بذرهای پیش تیمار شده با محرک‌های زیستی دود–آب (SW) و کارریکینولید در دماهای پایین و غلظت بالای NaCl جوانه زدند و باعث بهبود رشد گیاهچه در شرایط مختلف تنش شدند. Campobenedetto و همکاران (۲۰۲۰) طی مطالعه‌ای تاثیر KIEM® (محرک زیستی ابتکاری مبتنی بر

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت

مشتقات لیگنین و حاوی اسیدهای آمینه مشتق شده از گیاه و مولیبدن) را به عنوان یک محرک زیستی بر روی جوانه‌زنی بذرهای خیار (*Cucumis sativus* L.) در دو دمای استاندارد (۲۸ درجه سانتی‌گراد) و دمای تنش (۳۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد تنش گرما شرایطی از تنش اکسیداتیو در بذرها ایجاد می‌کند که منجر به تولید بیش از حد ROS می‌شود. به این دلیل بذرهای خیار تیمار نشده با KIEM تحت تنش گرمایی افزایش H_2O_2 درون زا، در هر دو دما را نشان دادند و از سوی دیگر، بذرهای تیمار شده کاهش شدید سطوح H_2O_2 و کاهش اثرات تنش اکسیداتیو و افزایش تحمل به تنش گرمایی و در نهایت قادر به افزایش درصد جوانه‌زنی و بازگرداندن تعادل اکسیداتیو را نشان دادند.

کاهو با نام علمی (*Lactuca sativa* L.) گیاهی یکساله متعلق به خانواده مرکبان (کلاه پرک‌ها) است. کاهو حاوی مقدار زیادی مواد معدنی ضروری همچون کلسیم، فسفر، آهن، پتاسیم، سدیم و همچنین مقدار کمی منیزیم و گوگرد است و منبع غنی ویتامین‌ها است. طی دو دهه اخیر تولید جهانی کاهو افزایش چشم‌گیری داشته است. توسعه منابع ژنی، تولید ارقام متحمل به انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی، ارزش تغذیه‌ای و اهمیت فعالیت آنتی اکسیدانی کاهو از عمده ترین دلایل افزایش سطح زیرکشت این محصول در دنیا به شمار می‌رود (Puglis *et al.*, 2020). کاهو گیاهی سرمادوست است، بنابراین در نواحی معتدل سرد و تا اندازه‌ای مرطوب بهترین نتیجه از کاشت این محصول بدست می‌آید. با کاشت بذر در فصولی که رشد گیاه به گرمای شدید بر نخورد در کلیه نواحی می‌توان از آن استفاده نمود. کاهو جزء سبزی‌هایی است که در تمام طول سال به شرط دارا بودن آب و هوای مناسب قابل کشت است.

جوانه‌زنی بذر کاهو به شدت وابسته به دما است و در دماهای بالا، جوانه‌زنی اکثر ژنوتیپ‌ها می‌تواند نامنظم یا کاملاً مهار شود. با توجه به اینکه مطالعه‌ای درباره مقایسه تاثیر پیش تیمار محرک‌های زیستی آلگابن و بنامید بر کاهش اثرات تنش گرمایی در مرحله جوانه‌زنی در بذر گیاه سرمادوست کاهو صورت نگرفته، هدف از این پژوهش بررسی تاثیر محرک‌های زیستی جلبکی (آلگابن) و آمینواسیدی (بنامید) بر شاخص‌های جوانه‌زنی، رشد و متابولیسم در مقاومت به تنش گرمایی است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در دانشکده علوم دانشگاه شهرکرد در سال‌های ۱۴۰۰-۱۴۰۱ انجام شد. در این مطالعه، از دو محرک زیستی Algabon® و Bonamid® بنامید موجود در بازار (شرکت کشت بن آسیا) هر کدام با فرمولاسیون بسیار متفاوت استفاده شد. آلگابن، محرک زیستی مشتق شده از عصاره جلبک دریایی، حاوی ترکیباتی شامل: اسید آلژینیک (۱۸ درصد)، NO_3 (۱ درصد)، K_2O (۱۶ درصد)، H_2PO_4 (۱ درصد) و بنامید به عنوان محرک زیستی اسیدآمینه‌ای، حاوی اسیدآمینه (۸۵ درصد) و نیتروژن (۴ درصد) بودند. بذرهای کاهو (*Lactuca sativa var longifolia*) از شرکت پاکان بذر اصفهان خریداری شد. برای استریل سطحی، بذرها در سدیم هیپوکلریت ۵ درصد به مدت ۵ دقیقه قرار داده‌شدند و سپس بذرها با آب مقطر به مدت ۲ دقیقه شسته شدند. از بذرهای استریل در آزمایش استفاده شد. آزمایش با هدف بررسی نقش ۲ محرک زیستی بر کاهش اثرات ناشی از گرما بر شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد کاهو طراحی شد. برای این منظور بذرهای استریل کاهو در محلول آبی ۰/۵ گرم در لیتر آلگابن و ۲ گرم در لیتر بنامید (غلظت‌های پیشنهادی شرکت سازنده) به مدت ۲ ساعت (حسینی و همکاران، ۱۴۰۱) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد خیس شدند. پس از پیش تیمار، بذرها در دمای اتاق خشک شدند و سپس در ظروف پتری ۹ سانتیمتری با دو لایه کاغذ صافی مرطوب شده با آب مقطر قرار داده شدند. بذرهای تیمار شده با همان دستورالعمل، اما با آب مقطر به جای محرک‌های زیستی، به عنوان شاهد استفاده شدند. سپس ظروف پتری در تاریکی در شرایط بدون تنش (۲۸ درجه سانتی‌گراد) یا تنش حرارتی (۳۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۴ روز در دستگاه انکوباتور بطور جداگانه انکوبه شدند. در هر پتری دیش ۵۰ عدد بذر قرار داده شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل از سه تیمار محرک زیستی (آب، آلگابن و بنامید) و دو تیمار

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت

دمایی(بدون تنش (۲۸ درجه سانتی‌گراد) و تنش گرمایی (۳۵ درجه سانتی‌گراد)) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در هر تیمار، سازماندهی شد.

حاصل جمع بذور جوانه زده پس از ۴ روز برای هر پتری، درصد جوانه‌زنی نهایی در نظر گرفته شد (رابطه ۱).

$$GP = \frac{N'}{N} \times 100 \quad (۱)$$

GP: درصد جوانه‌زنی، N': تعداد بذر جوانه زده تا روز آخر، N: تعداد کل بذر

از هر پتری ۷ گیاهچه به طور تصادفی انتخاب و شاخص‌های طول، وزن تر و خشک گیاهچه اندازه‌گیری شد.

وزن تر گیاهچه‌ها در هر تکرار بلافاصله با ترازو اندازه‌گیری و ثبت شد. برای تخمین وزن خشک، گیاهچه‌هایی که وزن تر آنها ثبت شده بود در آون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. گیاهچه‌های خشک شده هر تکرار توزین و وزن خشک بر حسب میلی‌گرم بیان شد. برای محاسبه درصد وزن خشک به وزن کل گیاهچه، میانگین وزن خشک گیاهچه بر وزن تر گیاهچه تقسیم شد و در عدد ۱۰۰ ضرب شد.

سنجش میزان H_2O_2

برای اندازه‌گیری H_2O_2 از روش Alexieva و همکاران (۲۰۰۱) استفاده شد. برای عصاره‌گیری ۰/۱ گرم بافت تازه بذرهای جوانه زده در هاون سرد شده با ۱/۵ میلی‌لیتر TCA (تری کلرواستیک اسید) ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره تهیه‌شده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. برای به دست آوردن منحنی استاندارد H_2O_2، رقت‌های ۰، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱ و ۰/۱ (غلظت میلی‌مولار) تهیه گردید. ۵۰۰ میکرولیتر از استانداردها یا عصاره‌ها با ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH=7) و ۱ میلی‌لیتر محلول KI (۱ مولار) ترکیب شد و در ۳۹۰ نانومتر خوانش شد. از محلول TCA ۰/۱ درصد به‌عنوان بلانک استفاده شد.

تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (فعالیت پاکروبی DPPH)

ارزیابی ظرفیت مهار رادیکال DPPH (۱،۱–دی فنیل–۲–پیکریل هیدرازیل) با تهیه ۵۰۰ میکرولیتر عصاره اتانولی بذرهای جوانه زده (۰/۰۵ گرم) در یک لوله انجام شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر محلول DPPH به عصاره اضافه شد. محلول کاملاً مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. جذب نمونه اتانول شاهد (بلانک)، نمونه آب شاهد و نمونه‌های به دست آمده از عصاره‌های گیاهی در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد (Kulisic *et al.*, 2004). ظرفیت پاکروبی رادیکال‌های آزاد نمونه‌ها به صورت زیر محاسبه شد (رابطه ۲):

فعالیت پاکروبی رادیکال (درصد) = ۱۰۰ × [جذب شاهد/(جذب نمونه – جذب شاهد)]

.سنجش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز مطابق روش Roberts و White house (۱۹۷۶) انجام شد. ابتدا ۰/۵ گرم از بذرهای جوانه زده در ۱/۵ میلی‌لیتر آب مقطر سرد شده با یخ در یک هاون به‌خوبی سائیده و همگن شدند. سپس عصاره‌های حاصل در دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. به تعداد نمونه‌ها ۲ سری لوله آزمایش آماده شد. در سری اول لوله‌های آزمایش به ۲ میلی‌لیتر آب مقطر، ۲۵ میکرولیتر معرف ید و یدور پتاسیم ($KI-I_2$) افزوده شد. در سری دوم لوله‌های آزمایش به ۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر، مقدار ۱۵۰ میکرولیتر نشاسته محلول (S9765، سیگما–آلدریچ) با غلظت (۱٪) و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیم اضافه شد. پس از گذشت ۵ دقیقه، مقدار ۵۰ میکرولیتر از لوله‌های آزمایش سری اول به لوله‌های سری دوم اضافه شد. شدت رنگ آبی در نمونه‌ها با کمک دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۶۲۰ نانومتر خوانش شد. مقدار فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در نمونه‌ها با کمک رسم منحنی استاندارد نشاسته و برحسب میزان درصد نشاسته هیدرولیز شده محاسبه شد.

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت

سنجش فعالیت آنزیم پروتئاز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پروتئاز مطابق روش توصیف شده توسط Salmia و همکاران (۱۹۷۸) و Haroun و Hussein (۲۰۰۳) انجام شد. ابتدا ۰/۳ گرم از بذرهای جوانه زده با ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ میلی‌مولار (pH 7) در یک هاون به‌خوبی سائیده و همگن شدند. سپس عصاره‌های حاصل در دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. از محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده شد. به ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی مقدار ۱ میلی‌لیتر کازئین ۱ درصد (حل شده در بافر فسفات ۰/۲ میلی‌مولار (pH 6)) به عنوان سوبسترا اضافه شد و برای شروع واکنش مخلوط حاصل در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس واکنش با اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید (۱۰٪) پایان یافت. فعالیت پروتئولیتیک آنزیم پس از اضافه کردن معرف فولین به نسبت ۱ به ۲ به نمونه‌ها، و خوانش جذب در طول موج ۶۶۰ نانومتر برآورد شد. فعالیت آنزیم بر حسب میکرومول تایروزین آزاد شده در اثر تجزیه کازئین در گرم وزن تر گزارش شد.

اندازه‌گیری میزان کربوهیدرات‌های محلول

اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول با روش Poorter و Villar (۱۹۹۷) انجام شد. این روش بر اساس اسپکتروفتومتری و سنجش شدت رنگ ایجاد شده از واکنش قندها با معرف آنترون استوار است. معرف آنترون، از حل کردن ۰/۲ گرم پودر آنترون در ۸/۳ میلی‌لیتر اتانل، ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر و افزودن ۱۰۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۹۸٪ به دست آمد. بعدازاینکه آنترون در اسید به‌خوبی حل شد در یک ظرف شیشه‌ای روی یخ در تاریکی نگهداری شد.

ابتدا ۰/۱ گرم از بذرهای جوانه‌زده با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ در یک هاون به‌خوبی سائیده و همگن شدند. عصاره به‌دست‌آمده در حمام آب گرم با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. سپس عصاره‌های حاصل در دور ۴۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. رسوب حاصل در ۲/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ حل و در حمام آب گرم با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. پس از سانتریفوژ عصاره حاصل در دور ۴۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه، سوپرناتانت‌های جمع‌آوری‌شده به یک لوله فالکون جدید منتقل شدند. برای حذف کلروفیل و چربی، ۵ میلی‌لیتر کلروفرم و ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر به سوپرناتانت افزوده شد. پس از سانتریفوژ عصاره حاصل در دور ۴۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه، بخش اتانولی-آبی برای تعیین میزان قند محلول برداشته شد. ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه در لوله آزمایش ریخته شد و به هرکدام ۵ میلی‌لیتر معرف آنترون اضافه شد. پس از مخلوط شدن، نمونه‌ها به مدت ۷/۵ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و مقدار جذب نمونه‌ها پس از سرد شدن روی یخ در طول‌موج ۶۲۵ نانومتر خوانده شدند. سنجش کربوهیدرات‌های محلول در بذرهای جوانه زده با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز (۰، ۰/۰۲، ۰/۰۶، ۰/۰۸ و ۰/۱۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به دست آمد. مقدار کربوهیدرات نمونه‌ها برحسب میلی‌گرم در یک گرم وزن تر بذرهای جوانه زده محاسبه گردید.

داده‌ها بر اساس روش GLM نرم افزار آماری SAS (نسخه ۹/۴؛ SAS Institute Inc., Cary, NC, United States) تجزیه و تحلیل شدند. برای تعیین تفاوت معنی‌دار بین تیمارها از پس آزمون LSD استفاده شد. سطح معنی‌داری با $\alpha \leq 0.05$ تعیین شد.

نتایج

تجزیه واریانس صفات مختلف تحت مطالعه در گیاهچه‌های کاهو، اثرات معنی‌دار هر دو فاکتور محرک زیستی و دما را بر آنها نشان داد. برهمکنش محرک زیستی و دما فقط بر شاخص‌های جوانه‌زنی، وزن خشک و فعالیت آنزیم‌های آلفاآمیلاز و پروتئاز معنی‌دار بود (جدول ۱).

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت

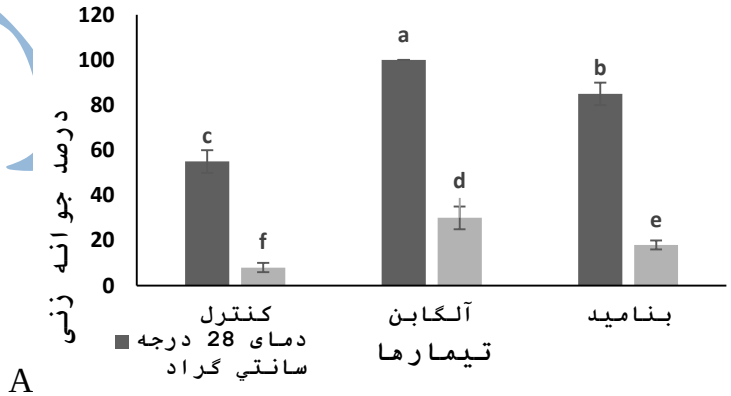
جدول ۳-۵: تجزیه واریانس (مقادیر میانگین مربعات) تأثیر محرک‌های زیستی و دما بر شاخص‌های رشد و متابولیسم در گیاه کاهو.

منابع تغییرات	درجه آزادی	جوانه‌زنی	طول ریشه چه	طول ساقچه	وزن تر	وزن خشک	فعالیت آنزیم آمیلاز	فعالیت آنزیم پروتئاز	محتوی قندهای محلول
محرک زیستی	۲	۱۷۰۴/۵۰*	۲۸/۲۲*	۱۳۵/۷۲*	۰/۱۶*	۰/۰۱*	۵۶/۲۹*	۴/۵۱*	۳۳۹۲۰۹۱۶/۷*
دما	۱	۱۶۹۲۸/۰۰*	۱۴۴/۵۰*	۵۵۵/۵۵*	۰/۷۴*	۰/۰۶*	۱۱۵/۲۶*	۸/۶۸*	۲۴۵۵۵۵۸۳۶/۱*
محرک زیستی *دما	۲	۲۳۴/۵۰*	۰/۶۶(ns)	۱/۰۵(ns)	۰/۰۰۵(ns)	۰/۰۰۲*	۱۲/۸۳*	۰/۸۸*	۲۲۵۶۰۰۳/۴(ns)
خطا	۱۲	۱۳/۸۳	۱/۰۰	۱/۲۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۴	۰/۲۰۷	۰/۰۴	۱۵۱۵۸۹۵
ضریب تغییرات		۷/۵۳	۱۵/۶۵	۹/۱۲	۱۳/۱۵	۲۰/۶۳	۵/۵۳	۱۱/۵	۱۷/۳۹

* بیانگر معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ و ns بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.

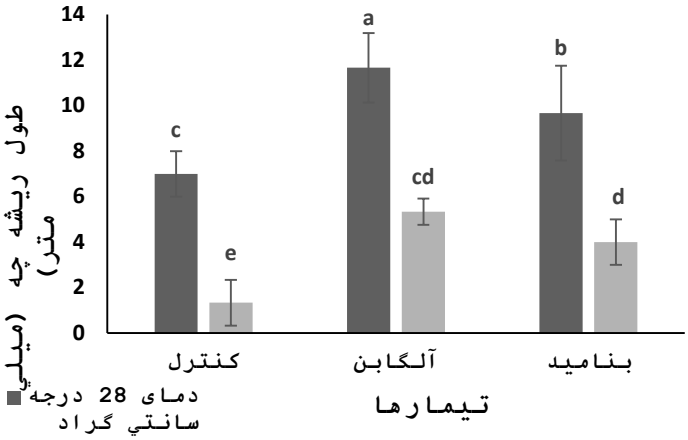
درصد جوانه‌زنی

نتایج نشان داد که تنش گرما (دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد) شاخص جوانه‌زنی بذرهای کاهو را به میزان ۸۵ درصد کاهش داد. ارزیابی شاخص جوانه‌زنی بذرهای کاهو نشان داد که در شرایط بدون تنش (۲۸ درجه سانتی‌گراد) بالاترین میزان جوانه‌زنی در بذرهای پیش تیمار شده با محرک زیستی آلگابن ۹۹ درصد (در مقایسه با بذرهای پیش تیمار شده با آب) مشاهده شد. همچنین در شرایط تنش گرما پیش تیمار بذرهای کاهو با محرک زیستی آلگابن سبب افزایش ۲۹ درصدی شاخص جوانه‌زنی در مقایسه با بذرهای پیش تیمار شده با آب شد (شکل ۱، A).

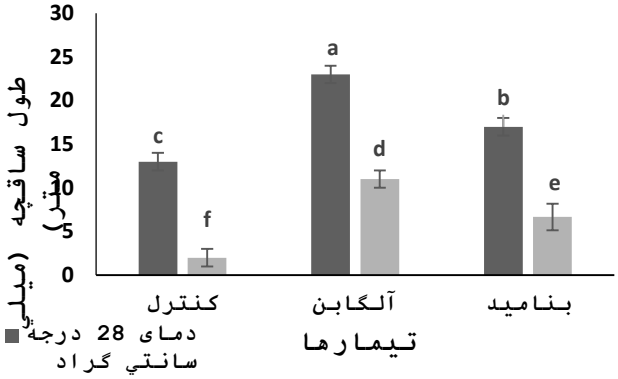


A

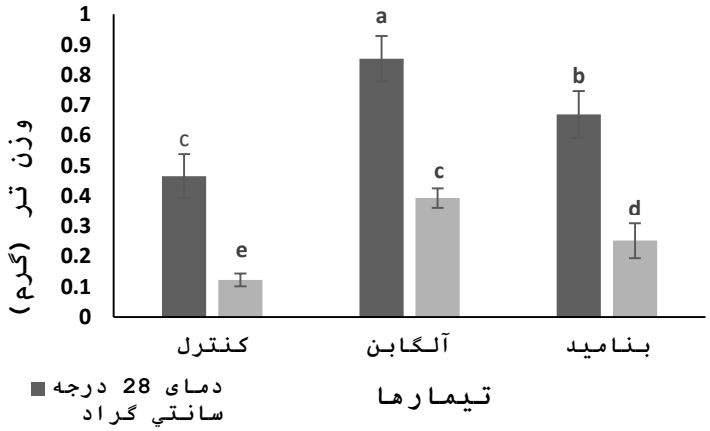
این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت


طول ریشه چه (میلی متر)
14
12
10
8
6
4
2
0
a
b
c
cd
d
e
کنترل
آلگابن
بنامید
تیمارها
دمای 28 درجه سانتی گراد

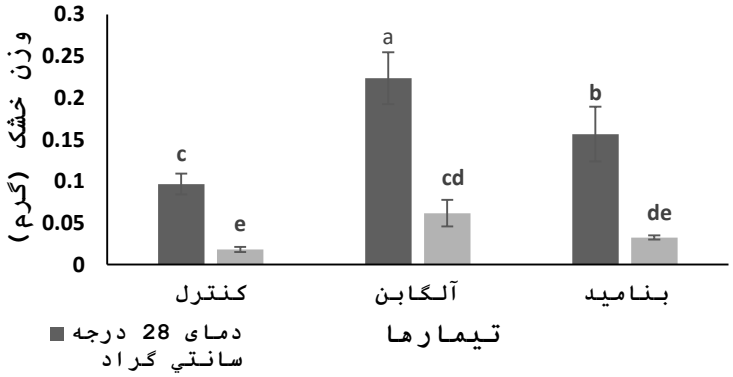
B


طول ساقچه (میلی متر)
30
25
20
15
10
5
0
a
b
c
d
e
f
کنترل
آلگابن
بنامید
تیمارها
دمای 28 درجه سانتی گراد

C


وزن تر (گرم)
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
a
b
c
d
e
کنترل
آلگابن
بنامید
تیمارها
دمای 28 درجه سانتی گراد

D


وزن خشک (گرم)
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
a
b
c
cd
de
e
کنترل
آلگابن
بنامید
تیمارها
دمای 28 درجه سانتی گراد

E

شکل ۱: درصد جوانه‌زنی (A)، طول ریشه‌چه (B)، طول ساقه‌چه (C)، وزن تر (D) و وزن خشک (E) در شرایط تنش گرمایی (۳۵ درجه سانتی‌گراد) و غیرتنش (۲۸ درجه سانتی‌گراد) در بذرهای کاهو پیش تیمار شده با محرک‌های زیستی. حروف مختلف بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P\leq$۰/۰۵). همه مقادیر به عنوان میانگین ± SE برای سه تکرار نشان داده شده است.

نتایج نشان داد که تنش گرما (دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد) طول ریشه‌چه و ساقه‌چه گیاهچه‌های کاهو را بترتیب به میزان ۸۰ و ۸۴ درصد کاهش داد. اندازه‌گیری طول ریشه‌چه و ساقه‌چه نشان داد که در شرایط بدون تنش (۲۸ درجه سانتی‌گراد) بیشترین اندازه طول ریشه‌چه و ساقه‌چه در گیاهچه‌های پیش تیمار شده با محرک زیستی آلگابن (در مقایسه با بذرهای پیش تیمار شده با آب) مشاهده شد. همچنین در شرایط تنش گرما پیش تیمار بذرهای کاهو با محرک زیستی آلگابن بترتیب سبب افزایش ۴ و ۵/۵ برابری اندازه طول ریشه‌چه و ساقه‌چه در مقایسه با بذرهای پیش تیمار شده با آب شد (شکل ۱، B و C).

نتایج نشان داد که تنش گرما (دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد) وزن تر و خشک گیاهچه‌های کاهو را به ترتیب به میزان ۷۳ و ۸۱ درصد کاهش داد. اندازه گیری وزن تر و خشک نشان داد که در شرایط بدون تنش (۲۸ درجه سانتی‌گراد) بیشترین اندازه وزن تر و خشک در گیاهچه‌های پیش تیمار شده با محرک زیستی آلگابن (در مقایسه با بذرهای پیش تیمار شده با آب) مشاهده شد. همچنین در شرایط تنش گرما پیش تیمار بذرهای کاهو با محرک زیستی آلگابن بترتیب سبب افزایش ۳/۲ و ۳/۳۶ برابری میزان وزن تر و خشک در مقایسه با بذرهای پیش تیمار شده با آب شد (شکل ۱، D و E).

تجزیه واریانس شاخص‌های محتوای آب و تنش اکسیداتیو در گیاهچه‌های کاهو، اثرات معنی‌دار هر دو فاکتور محرک زیستی (بجز شاخص محتوای آب) و دما را بر آنها نشان داد. برهمکنش محرک زیستی و دما فقط بر شاخص فعالیت پاکروبی رادیکالی معنی‌دار نبود.

جدول ۲: تجزیه واریانس (مقادیر میانگین مربعات) تأثیر محرک‌های زیستی و دما بر شاخص‌های محتوای آب، میزان پراکسیدهیدروژن و فعالیت پاکروبی رادیکالی (RSA) در گیاه کاهو.

منابع تغییر	درجه آزادی	محتوای آب	محتوای پراکسید هیدروژن	فعالیت پاکروبی رادیکالی
محرک زیستی	۲	۹/۲۴^{ns}	۰/۴۶*	۴۹۵/۰۹*
دما	۱	۳۰۹/۴*	۲/۳۴*	۱۱۳۴/۳*
محرک زیستی *دما	۲	۶۱/۳۴*	۰/۰۱۹*	۴/۴۲^{ns}
خطا	۱۲	۹/۳۳	۰/۰۰۴	۹/۰۳
ضریب تغییرات		۳/۸	۶/۵۱	۵/۳

* بیانگر معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ و ns بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است

نتایج نشان داد که تنش گرما (دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد) شاخص محتوای آب بذرهای کاهو را افزایش داد، هرچند از نظر آماری افزایش معنی‌دار نبود. همچنین در شرایط تنش گرما پیش تیمار بذرهای کاهو با هر دو محرک زیستی آلگابن و بنامید تغییری در محتوای آب در مقایسه با بذرهای پیش تیمار شده با آب ایجاد نکرد. نتایج نشان داد که تنش گرما (دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد) محتوای پراکسید هیدروژن بذرهای گیاهچه‌های کاهو را افزایش داد. در شرایط تنش گرما پیش تیمار بذرهای کاهو با محرک زیستی بنامید بیشترین تاثیر

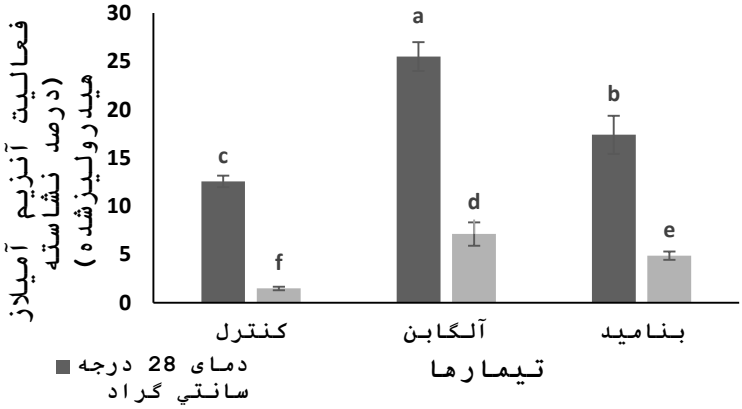
این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت

را بر کاهش محتوای این شاخص در مقایسه با بذرهای پیش تیمار شده با آب شد. نتایج نشان داد که تنش گرما (دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد) فعالیت پاکروبی رادیکالی بذرهای گیاهچه‌های کاهو را کاهش داد. در شرایط تنش گرما پیش تیمار بذرهای کاهو با محرک زیستی بنامید بیشترین تاثیر را بر افزایش فعالیت پاکروبی رادیکالی در مقایسه با بذرهای پیش تیمار شده با آب داشت (جدول ۳).

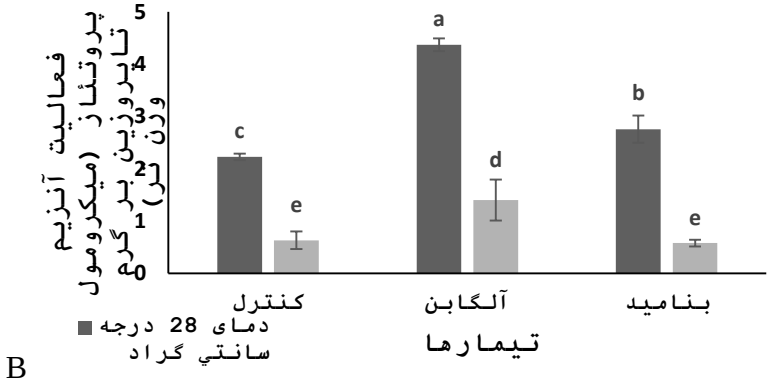
جدول ۳: درصد محتوای آب، محتوای پراکسید هیدروژن و فعالیت پاکروبی رادیکالی در شرایط تنش گرمایی (۳۵ درجه سانتی‌گراد) و غیرتنش (۲۸ درجه سانتی‌گراد) در بذرهای کاهو پیش تیمار شده با محرک‌های زیستی. حروف مختلف بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد (P≤۰/۰۵).

محرک‌های زیستی تیمارها	محتوای آب (درصد)		محتوای پراکسید هیدروژن (میلی‌مولار/گرم وزن تر)	
	°۲۸C	°۳۵C	°۲۸C	°۳۵C
شاهد	۸۱±۱/۴۲ b	۸۲/۰۹±۰/۵ ab	۰/۹± ۰/۰۸ d	۱/۷۵±۰/۰۸ a
آلگابن	۷۳/۸±۳/۰ c	۸۴/۴۵±۲/۷ ab	۰/۷۴±۰/۰۳ e	۱/۳۶±۰/۰۶ b
بنامید	۷۳/۴±۵/۰۵ c	۸۶/۵۸±۳/۳ a	۰/۴۲±۰/۰۹ f	۱/۱۲±۰/۰۵ c
	فعالیت پاکروبی رادیکالی (درصد)			
	°۲۸C	°۳۵C		
شاهد	۵۷/۱۹±۴/۷ c	۴۰/۰۹±۱/۴۶ e		
آلگابن	۶۳/۰۹±۰/۳۷ b	۴۶/۴۷±۴/۳ d		
بنامید	۷۳/۴۸±۲/۲۳ a	۵۹/۵۶±۲/۲۴ bc		

نتایج شاخص‌های متابولیسم جوانه‌زنی بذر نشان داد که تنش گرما (دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد) میزان فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و پروتئاز گیاهچه‌های کاهو را بترتیب به میزان ۸۸ و ۷۱ درصد کاهش داد. اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌ها نشان داد که در شرایط بدون تنش (۲۸ درجه سانتی‌گراد) بیشترین میزان فعالیت آنزیم آمیلاز در بذرهای پیش تیمار شده با محرک زیستی آلگابن (در مقایسه با بذرهای پیش تیمار شده با آب) مشاهده شد. همچنین در شرایط تنش گرما پیش تیمار بذرهای کاهو با محرک زیستی آلگابن بترتیب سبب افزایش ۶ و ۲/۲ برابری فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و پروتئاز در مقایسه با بذرهای پیش تیمار شده با آب شد (شکل ۲).



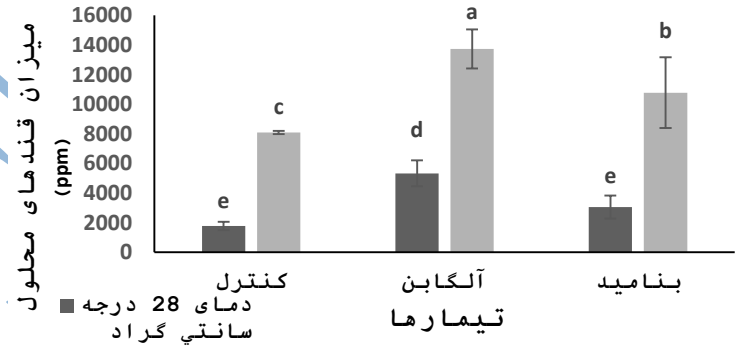
A



B

شکل ۲: فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز (A) و پروتئاز (B) در شرایط تنش گرمایی (۳۵ درجه سانتی‌گراد) و غیرتنش (۲۸ درجه سانتی‌گراد) در بذرهای کاهو پیش تیمار شده با محرک‌های زیستی. حروف مختلف بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P\leq$۰/۰۵). همه مقادیر به عنوان میانگین ± SE برای سه تکرار نشان داده شده است.

نتایج این تحقیق نشان داد که تنش گرما (دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد) میزان قندهای محلول بذرهای کاهو را به میزان ۴/۵ برابر افزایش داد. اندازه‌گیری میزان قندهای محلول بذرهای کاهو نشان داد که در شرایط بدون تنش (۲۸ درجه سانتی‌گراد) بیشترین میزان قندهای محلول در بذرهای پیش تیمار شده با محرک زیستی آلگابن (در مقایسه با بذرهای پیش تیمار شده با آب) مشاهده شد. همچنین در شرایط تنش گرما پیش تیمار بذرهای کاهو با محرک زیستی آلگابن سبب افزایش ۱/۷ برابری میزان قندهای محلول در مقایسه با بذرهای پیش تیمار شده با آب شد (شکل ۳).



شکل ۳: میزان قندهای محلول در شرایط تنش گرمایی (۳۵ درجه سانتی‌گراد) و غیرتنش (۲۸ درجه سانتی‌گراد) در بذرهای کاهو پیش تیمار شده با محرک‌های زیستی. حروف مختلف بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P\leq$۰/۰۵). همه مقادیر به عنوان میانگین ± SE برای سه تکرار نشان داده شده است.

بحث

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت

تاثیر محرک‌های زیستی برای مقابله با شرایط تنش‌زا به عوامل مختلفی از جمله زمان استفاده و نحوه عملکرد آنها بستگی دارد. استفاده از محرک‌های زیستی را می‌توان قبل از تأثیر تنش بر کشت، در طول تنش یا حتی پس از آن انجام داد. محرک‌های زیستی را می‌توان بر روی بذرها، زمانی که گیاهان در مراحل اولیه رشد هستند، یا زمانی که محصولات به طور کامل توسعه یافته‌اند، بسته به نتایج مورد نظر استفاده کرد (Kunicki *et al*., 2010). زمان مناسب کاربرد محرک زیستی در طول توسعه محصول از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت است و همچنین به بحرانی‌ترین مراحل برای بهره‌وری محصول بستگی دارد. در این تحقیق استفاده از محرک‌های زیستی آلگابن (جلبکی) و بنامید (اسیدآمینه‌ای) به صورت پیش تیمار روی بذرهای کاهو انجام شد. گیاهان را می‌توان در مراحل مختلف رشد (مثلاً مرحله رویشی یا زایشی) پیش تیمار کرد. با این حال، از دهه‌های گذشته توجه به تقویت بذر برای کاهش تنش‌های محیطی روی جوانه‌زنی و رشد اولیه گیاهچه اهمیت داشته است (Bulgari *et al*., 2019).

نتایج این تحقیق نشان داد که تنش گرمایی (دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد) سبب کاهش معنی‌دار همه شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد در گیاهچه‌های سرمادوست کاهو شد. در این گونه در شرایط کنترل، میزان شاخص‌های جوانه‌زنی، طول ریشچه، طول ساقچه، وزن تر و خشک متأثر از محرک زیستی آلگابن افزایش یافتند. همچنین نتایج نشان داد که در شرایط تنش گرمایی، میزان شاخص‌های جوانه‌زنی، طول ریشچه، طول ساقه‌چه، وزن تر و خشک تحت تأثیر محرک زیستی آلگابن در مقایسه با گیاهان شاهد تحت تنش گرما، افزایش معنی‌داری یافت. اگرچه در بذرهای کاهو تحت تنش گرمایی تفاوت معنی‌داری در طول ریشچه میان بذرهای پیش تیمار شده با آلگابن و بنامید مشاهده نشد. شاخص محتوای آب بذرهای کاهو و جو در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد تغییری نکرد. گزارش‌هایی وجود دارد که مناسب‌ترین دما برای جوانه‌زنی بذر کاهو ۱۸–۲۱ درجه سانتی‌گراد است (Wei *et al*., 2020). در این تحقیق جوانه‌زنی در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به طور قابل توجهی کاهش یافت که نشان دهنده نقش دما در فرآیند جوانه‌زنی است. اهمیت دما در رشد و نمو گیاه بیشتر از هر عامل محیطی دیگری است که آب محدود نباشد (Thuzar *et al*., 2010). مهار جوانه زنی بذر در پاسخ به دمای بالا که اغلب از طریق القای اسید آبسیزیک رخ می‌دهد به خوبی اثبات شده است (Toh *et al*., 2008; Essemine *et al*., 2010). قبلاً مشاهده شده بود که دمای بسیار بالا (۴۰–۴۵ درجه سانتی‌گراد) در طول جوانه‌زنی باعث مرگ سلول و جنین می‌شود و به شدت فرآیند جوانه‌زنی طبیعی را ممانعت می‌کند یا گاهی در بسیاری از گونه‌های گیاهی کشنده است (Blacklow, 1972).

استفاده از محرک‌های زیستی برای غلبه بر تنش گرمایی به یک روش مهم برای حفظ تولید و عملکرد نهایی محصول تبدیل شده است. پیش تیمار بذر باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و پروتئاز و همچنین باعث افزایش میزان آب جذب شده توسط بذر می‌گردد و در نهایت باعث افزایش درصد جوانه‌زنی شده و می‌تواند باعث کاهش تعداد روز تا سبز شدن شود. محرک‌های زیستی مشتق شده از پروتئین هیدرولیز شده با القای متابولیسم کربن و نیتروژن و همچنین تنظیم جذب نیترژن و با تداخل در فعالیت‌های هورمونی، مستقیما بر رشد گیاه تاثیر می‌گذارند که منجر به تحریک رشد ریشه و اندام هوایی و در نتیجه بهره‌وری محصول می‌شوند (Colla *et al*., 2017). همچنین محرک‌های زیستی از طریق کاهش اثرات تنش اکسیداتیو عمل می‌کنند. بررسی‌ها نشان می‌دهد استفاده از محرک‌های زیستی به عنوان پیش تیمار در شرایط تنش گرما سبب کاهش تولید H_2O_2 و جلوگیری از تجمع گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود و در نتیجه سبب کاهش اثرات مخرب تنش گرما خواهد شد (Campobenedetto *et al*., 2020). کاهش تولید H_2O_2 تحت تنش گرمایی در گیاهچه‌های کاهو پیش تیمار شده با آلگابن و بنامید در این مطالعه مشاهده شد. کودهای جلبک دریایی نه تنها به دلیل دارا بودن نیتروژن، فسفر و پتاس خود بلکه به دلیل داشتن عناصر کمیاب و متابولیت‌های ثانویه به عنوان تنظیم کننده‌های رشد گیاه هستند. عصاره جلبک ها تعدادی مسیر را برای افزایش تحمل در برابر تنش هدف قرار می‌دهند و به طورکلی در گیاهان سبب پاکروبی ROSها، پایداری غشاء و حفاظت اسمزی می‌شوند و در بخش هوایی سبب تنظیم روزنه‌ها و هدایت آبی آوند چوبی و در بخش ریشه‌ای سبب در دسترس بودن آب در ناحیه ریشه و تنظیم سطوح اکسین و اتیلن ریشه می‌گردند (Sudozai *et al*., 2013).

در این مطالعه، اثر وابسته به نوع ترکیب محرک زیستی در کاهش اثرات تنش گرمایی مشاهده شد، به طوری که محرک زیستی آلگابن مؤثرتر از بنامید بود. به نظر می‌رسد آلگابن به دلیل دارا بودن نیتروژن، فسفر، پتاس، عناصر کمیاب و متابولیت‌های ثانویه به عنوان تنظیم

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت

کننده رشد کاهو در طی تنش گرمایی عمل کرده است. همچنین پیش تیمار بذرها با آلگابن توانایی بذرها برای افزایش پاکروبی ROS های تولید شده در طی تنش گرما، افزایش پایداری غشاء و حفاظت اسمزی سلول‌ها از طریق افزایش کربوهیدرات‌های محلول را تقویت کرده است. افزایش توانایی پاکروبی رادیکال‌های DPPH تحت تنش گرمایی در گیاهچه‌های پیش تیمار شده با آلگابن و بنامید در این مطالعه مشاهده شد. اثر ارتقاء رشد بواسطه پیش تیمار آلگابن بر روی بذر کاهو تحت تنش گرمایی به سادگی با افزایش فعالیت آنزیم های آلفاآمیلاز و پروتئاز توضیح داده شد که منجر به افزایش راندمان جذب آب توسط بذر شده و در نهایت باعث افزایش درصد جوانه‌زنی و رشد شده است.

همان طور که در قسمت قبلی اشاره شد افزایش درصد جوانه‌زنی بذرها می‌تواند به علت افزایش فعالیت برخی آنزیم‌های درگیر در جوانه‌زنی باشد. به همین منظور در این تحقیق فعالیت برخی آنزیم‌های درگیر در جوانه‌زنی سنجش شد. تنش گرمایی (دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد) سبب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آلفاآمیلاز و پروتئاز در گیاهچه‌های سرمادوست کاهو شد. در این گونه در شرایط کنترل، فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز و پروتئاز متأثر از محرک زیستی آلگابن افزایش یافتند. همچنین نتایج نشان داد که در شرایط تنش گرمایی، میزان فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز و پروتئاز تحت تأثیر محرک زیستی آلگابن در مقایسه با گیاهان شاهد تحت تنش گرما، افزایش معنی‌داری یافت.

در پی تنش‌های محیطی مانند گرما و خشکی، و به دنبال آن تنش اکسیداتیو، گونه های فعال اکسیژن، لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک، سلول را تخریب و سازوکار طبیعی آن را مختل می‌کنند. درک خسارت‌های ناشی از تنش اکسیداتیو معمولا به وسیله سازوکارهای آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی خنثی می‌گردد. در تنش هنگامی که تعادل بین تولید و پاکسازی رادیکال‌های فعال مختل می‌شود، سطوح ROS از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی فراتر می‌رود که منجر به تغییر اکسیداتیو اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و پروتئین‌ها می‌شود. افزایش قابل توجه فعالیت آنزیم پروتئاز تحت تنش گرمایی، فرضیه آسیب اکسیداتیو را در این شرایط تقویت می‌کند. فعال‌سازی آنزیم پروتئاز در سلول‌های گیاهی در زمان تولید H_2O_2 ضروری است. بنابراین، می‌توان فرض کرد که افزایش فعالیت پروتئاز می‌تواند، حداقل تاحدی، به اختلالات در هومئوستازی ردوکس مرتبط باشد، که باعث می‌شود پروتئین‌ها به پروتئولیز حساس شوند. پروتئازها باعث شکستن پیوندهای پپتیدی شده و مانع فعالیت پروتئین‌ها و باعث تخریب آن‌ها می‌گردند. آنها همچنین در برنامه رشد و توسعه طبیعی گیاهان شرکت دارند. این آنزیم‌ها تنوع ساختاری و عملکردی بالایی از خود نشان می‌دهند. نواحی محرک ژن‌های کدکننده پروتئازهای نوع سیستئین در ذرت با عناصرتنظیمی پاسخ دهنده به تنش غنی شده‌اند که نشان دهنده دخالت فعال این پروتئازها در فرآیندهایی است که با تنش غیرزیستی مقابله می‌کنند.

آلفاآمیلاز آنزیم غالبی است که در طی جوانه‌زنی سنتز می‌شود و به متحرک‌سازی ذخایر نشاسته‌ای به آندوسپرم کمک می‌کند. در طول جوانه‌زنی غلات، برخی تغییرات بیوشیمیایی قابل توجهی رخ می‌دهد. جوانه‌زنی تأثیر مثبتی بر ترکیب اسید آمینه، در دسترس بودن پروتئین و محتوای برخی از ویتامین‌های گروه B دارد و ممکن است به کاهش سطح مواد ضد مغذی کمک کند. تغییرات تغذیه‌ای مطلوبی که در طول جوانه‌زدن رخ می‌دهد عمدتا به دلیل تجزیه ترکیبات پیچیده به اشکال ساده، تبدیل شدن به اجزای ضروری و تجزیه اجزای نامطلوب است (Hasanuzzaman *et al*., 2013). مشابه نتایج این تحقیق، برخی از محققان نشان دادند که با استفاده از محرک‌های زیستی، فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز و پروتئاز در گیاهان تحت تنش گرمایی افزایش می‌یابد. Reis و همکاران در سال (۲۰۲۱) در مطالعه‌ای تاثیر دما را بر روی جوانه‌زنی بذر (*Melanoxylon brauna*) پیش تیمار شده با آب مقطر در دو دمای ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار دادند. آنها دریافتند که در بذرهایی که تحت تنش گرمایی قرار گرفتند فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا آمیلاز و پروتئاز تحت تنش گرما افزایش یافت که منجر به از بین رفتن ظرفیت جوانه‌زنی بذر می‌شود. در تحقیقی دیگر مشخص شد که هیدروپرایمینگ بذر ذرت باعث افزایش سرعت رشد گیاهچه شد (Sudozai *et al*., 2013). طی چندین مطالعه اثر مثبت محرک‌های زیستی بر رشد گیاه در طیف وسیعی از ترکیبات مانند عصاره جلبک دریایی، پروتئین هیدرولیز شده و اسیدهای هیومیک تحت تنش گزارش کرده‌اند (Abdel Latef *et al*., 2017; Lucini *et al*., 2015).

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت

نتایج مقایسه میانگین میزان کربوهیدرات‌های محلول در این پژوهش نشان داد که تنش گرمایی منجر به افزایش میزان این شاخص در گیاهچه‌های سرمادوست کاهو شده است. در هر دو شرایط کنترل و تنش گرمایی، میزان کربوهیدرات‌های محلول تحت تأثیر محرک زیستی آلگابن در مقایسه با گیاهان شاهد متناظر با آنها افزایش معنی‌داری یافت. گزارش‌های متعددی نشان می‌دهد که در شرایط تنش‌های غیرزیستی محتوی قند افزایش می‌یابد (Roitsch *et al*., 1999; Kaur *et al*., 2021; Ozturk *et al*., 2021). مشخص شده است که تنش خشکی بر روی گیاهان منجر به افزایش معنی‌دار میزان قندهای محلول در ریشه و اندام هوایی می‌شود (Pandey *et al*., 2021). افزایش محتوای کربوهیدرات‌های محلول در این تحقیق با نتایج پژوهش‌های Masondo و همکاران (۲۰۱۸) روی گیاهچه (*Ceratotheca triloba*) و Fakhrabad و Abedi (۲۰۱۹) بر روی گیاهچه گوجه فرنگی مطابقت دارد. سطح قند بالاتر در گیاهان تیمار شده با محرک‌های زیستی در گونه‌های مختلف، همراه با پروتئین کل، فنول‌ها، اسید آسکوربیک و همچنین هورمون‌های محرک رشد بیشتر مشاهده شده است (Martinez Esteso *et al*., 2016; Arroussi *et al*., 2018). نقش و اهمیت تجمع قندها در زمان تنش به این دلیل می‌باشد که قندهای محلول گروهی از اسمولیت‌های سازگار می‌باشند که در شرایط تنش تجمع یافته و سبب تنظیم فشار اسمزی و کاهش از دست دادن آب سلول و نگهداری آماس می‌شوند و همچنین با پایدار کردن غشاها و پروتئین‌ها در ارتباط است (Bohnert *et al*., 1995; Reis *et al*., 2021).

دلیل آمادگی بهتر بذرهای پیش تیمار شده برای تنش‌های غیرزیستی ممکن است فعال شدن پاسخ سیستم‌های آنتی اکسیدانی از طریق پرایمینگ باشد و یا ممکن است نتیجه فعالیت هورمون‌های مانند اسید سالیسیلیک، اسید آبسیزیک و اتیلن باشد. گزارش‌های متعددی در مورد پرایمینگ بذرهای تحت تنش نشان می‌دهد که پرایمینگ سبب فعالیت آنزیم‌هایی در گیاهان می‌شود که این آنزیم‌ها وظیفه مهار تحریک ROS را برعهده دارند (Sudozai *et al*., 2013).

اثرات مثبت پیش تیمار محرک‌های زیستی را می‌توان به برخی ترکیبات اسمولیت‌های سازگار تولید شده در بذر کاهو پیش تیمار شده شامل کربوهیدرات‌های محلول و پروتئین‌ها ذکر کرد. که این ترکیبات در فعالیت‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه شرکت کرده و باعث افزایش قدرت رویشی گیاه در شرایط تنش گرمایی شدند. همچنین پیش تیمار بذرهای کاهو با آلگابن و بنامید توانایی بذرها برای افزایش پاکروبی ROSهای تولید شده در طی تنش گرمایی را افزایش داده است و از این طریق منجر به تقویت پایداری غشاءهای سلولی و حفاظت اسمزی آنها شده است.

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که پیش تیمار بذرها به‌عنوان یک تیمار مناسب باعث افزایش عملکرد جوانه‌زنی و مقاوم شدن بذرهای کاهو در مقابل تنش گرمایی شد. بنابراین با توجه به نتایج این تحقیق استفاده از کودهای عالی مانند عصاره جلبک دریایی برای جلوگیری از تخریب محیط زیست، کاهش هزینه‌های خرید کود شیمیایی و در نهایت افزایش عملکرد رشد توصیه می‌شود.

تقدیر و تشکر

این پژوهش در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد و با حمایت مالی دانشگاه شهرکرد (گرنت شماره 0GRD34M1032) انجام شده است، که بدین وسیله قدردانی می‌گردد.

منابع

حسینی سعید، شبانی لیلا، سبزعلیان محمد رضا. بررسی اثر محرک‌های زیستی بر میزان آب و عناصر کم‌مصرف و پرمصرف گیاه شورزی *Puccinellia distans* در شرایط تنش شوری. فرآیند و کارکرد گیاهی. ۱۴۰۱; ۱۱ (۴۸) :۱۷۷-۱۹۴.

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت

Abdel Latef, A. A., Srivastava, A. K., Saber, H., Alwaleed, E. A., & Tran, L. (2017). *Sargassum muticum* and *Jania rubens* regulate amino acid metabolism to improve growth and alleviate salinity in chickpea. *Scientific Reports*, *7*, 1-12. https://doi.org/10.1038/s41598-017-07692-w.

Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., & Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environment*, *24*, 1337-1344. https://doi.org/10.1046/j.1365-3040. 2001.00778.x.

Arroussi, H. E., Benhima, R., Elbaouchi, A., Sijilmassi, B., Mernissi, N. E., Aafsar, A., & Smouni, A. (2018). Dunaliella salina exopolysaccharides: a promising biostimulant for salt stress tolerance in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Applied Phycology*. *30*(5), 2929-2941. https://dx.doi.org/10.1007/s10811-017-1382-1.

Blacklow, W. M. (1972). Influence of Temperature on Germination and Elongation of the Radicle and Shoot of Corn (*Zea mays* L.). *Crop Science*, *12*, 647–650. https://doi.org/10.2135/cropsci1972.0011183X001200050028x.

Bohnert, K., Nelson, D., & Jensen, R. (1995). Adaptation to environment stresses. *The Plant Cell*, *7*, 1099-1111. https://doi.org/10.2307/3870060.

Bulgari, R., Franzoni, G., & Ferrante, A. (2019). Biostimulants application in horticultural crops under abiotic stress conditions. *Agronomy*, *9*, 306. https://doi.org/10.3390/agronomy9060306.

Campobenedetto, C., Grange, E., Mannino, G., van Arkel, J., Beekwilder, J., Karlova, R., Garabello, C., Contartese, V., & Bertea, C. M. (2020). A biostimulant seed treatment improved heat stress tolerance during cucumber seed germination by acting on the antioxidant system and glyoxylate cycle. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 836. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00836.

Colla, G., Hoagland, L., Ruzzi, M., Cardarelli, M., Bonini, P., Canaguier, R., & Rouphael, Y. (2017). Biostimulant action of protein hydrolysates: unraveling their effects on plant physiology and microbiome. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 2202. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02202.

Essemine, J., Ammar, S., & Bouzid, S. (2010). Impact of Heat Stress on Germination and Growth in Higher Plants: Physiological, Biochemical and Molecular Repercussions and Mechanisms of Defence. *Journal of Biological Sciences*, *10*, 565–572. https://doi.org/10.3923/jbs.2010.565.572.

Fakhrabad, M. S., & Abedi, B. (2019). Investigation of the Effect of Foliar Application of Seaweed Extract as growth biostimulants (*Ascophyllum nodosum*) on Quantitative and Qualitative Characteristics of Three Tomato Cultivars (*Solanum lycopersicon* Mill). *World Journal of Environmental Biosciences*, *8*, 19-22.

Haroun, S., & Hussein, M. (2003). The promotive effect of algal biofertilizers on growth, protein pattern and some metabolic activities of Lupinus termis plants grown in siliceous soil. *Asian Journal of Plant Sciences*, *2*, 944-951. https://doi.org/10.3923/ajps.2003.944.951.

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M. M., & Fujita, M. (2012). Exogenous nitric oxide alleviates high temperature induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings by modulating the antioxidant defense and glyoxalase system. *Australian Journal of Crop Science*, *6*, 1314-1323. https://doi.org/10.3316/informit.732190847330318.

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M. M., Roychowdhury, R., & Fujita, M, (2013). Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*, 9643-9684. https://doi.org/10.3390/ijms14059643.

IPCC, 2007: Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 996 pp.

Kaur, H., Manna, M., Thakur, T., Gautam, V., & Salvi, P. (2021). Imperative role of sugar signaling and transport during drought stress responses in plants. *Physiologia Plantarum*, *171*, 833-848. https://doi.org/10.1111/ppl.13364.

Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., & Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, *85(4)*, 633-640. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.024.

Kunicki, E., Grabowska, A., Sękara, A., & Wojciechowska, R. (2010). The effect of cultivar type, time of cultivation and biostimulant treatment on the yield of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Folia Horticulturae*, *22*, 9-13. https://doi.org/10.2478/fhort-2013-0153.

Lucini, L., Rouphael, Y., Cardarelli, M., Canaguier, R., Kumar, P., & Colla, G. (2015). The effect of a plant-derived biostimulant on metabolic profiling and crop performance of lettuce grown under saline conditions. *Scientia Horticulturae*, *182*, 124-133. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.11.022.

Pandey, K., Kumar, R. S., Prasad, P., Pande, V., Trivedi, P. K., & Shirke, P. A. (2022). Coordinated regulation of photosynthesis and sugar metabolism in guar increases tolerance to drought. *Environmental and Experimental Botany*, *194*, 104701. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104701.

Puglis, I., La Bella, E., Rovetto, E., Lo Piero, A., & Baglieri, A. (2020). Biostimulant effect and biochemical response in lettuce seedlings treated with a *Scenedesmus quadricauda* extract. *Plants*, *9(1)*, 123. https://doi.org/ 10.3390/plants9010123.

Martinez Esteso, M. J., Vilella Antón, M. T., Sellés Marchart, S., Martínez Márquez, A., Botta-Català, A., Piñol-Dastis, R., & Bru-Martínez, R. (2016). A DIGE proteomic analysis of wheat flag leaf treated with TERRA-SORB® foliar, a free amino acid high content biostimulant. *Journal of Integrated OMICS*, *6(1)*, 1-9. https://doi.org/10.5584/jiomics.v6i1.188.

Masondo, N., Kulkarni, M., Finnie, J., & Van Staden, J. (2018). Influence of biostimulants-seed-priming on Ceratotheca triloba germination and seedling growth under low temperatures, low osmotic potential and salinity stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *1*, 43-48. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.017.

Ozturk, M., Turkyilmaz Unal, B., García-Caparrós, P., Khursheed, A., Gul, A., & Hasanuzzaman, M. (2021). Osmoregulation and its actions during the drought stress in plants. *Physiologia Plantarum*, *172*, 1321-1335. https://doi.org/10.1111/ppl.13297.

Pooter, H., and R. Villar (1997). The fate of acquired carbon in plants: Chemical composition and construction costs, in Plant Resource Allocation (eds. Bazzaz, F. and Grace J.) Pp. 39–72. SPB Acad., The Hague, Netherlands.

Reis, L. P., de Lima E Borges, E., Brito, D., Bernardes, C., & dos Santos Araújo, R. (2021). Heat stress-mediated effects on the morphophysiological, biochemical, and ultrastructural parameters of germinating Melanoxylon brauna Schott. seeds. *Plant Cell Reports*, *40*, 1773 -1787. https://doi.org/10.1007/s00299-021-02740-2.

Roberts, J., & White house, D. G, (1976). Practical plant physiology. New York. Sciences. *25*, 402-407.

Roitsch, T. (1999). Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology*, *2*, 198-206. https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)80036-3.

Salmia, M. A., Nyman, S. A., & Mikola, J. J. (1978). Characterization of the proteinases present in germinating seeds of Scots pine, *Pinus sylvestris*. *Physiologia Plantarum*, *42*, 252-256. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1978.tb02556.x.

Sudozai, M. I, Tunio, S., Chachar, Q., & Rajpar, I. (2013). Seedling establishment and yield of maize under different seed priming periods and available soil moisture. *Sarhad Journal of Agriculture*, *29*, 515-5

Suzuki, N., Koussevitzky, S. H., Mittler, R., & Miller, G. (2012). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environment*, *35*, 259-270. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02336.x.

Thuzar, M., Puteh, A. B., Abdullah, N. A. P., Lassim, M. B. M., & Jusoff, K. (2010). The Effects of Temperature Stress on the Quality and Yield of Soya Bean [(*Glycine max* L.) Merrill.]. *Journal of Agricultural Science*, *2*, 172. https://doi.org/10.5539/jas.v2n1p172.

Toh, S., Imamura, A., Watanabe, A., Nakabayashi, K., Okamoto, M., Jikumaru, Y., Hanada, A., Aso, Y., Ishiyama, K., Tamura, N., *et al*. (2008). High Temperature-Induced Abscisic Acid Biosynthesis and Its Role in the Inhibition of Gibberellin Action in Arabidopsis Seeds. *Plant Physiology*, *146*, 1368–1385. https://doi.org/10.1104/pp.107.113738.

Waraich, E., Ahmad, R., Halim, A., & Aziz, T. (2012). Alleviation of temperature stress by nutrient management in crop plants: a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *12*, 221-244. http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162012000200003.

Wei, S., Yang, X., Huo, G., Ge, G., Liu, H., Luo, L., Hu, J., Huang, D., & Long, P. (2020). Distinct metabolome changes during seed germination of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in response to thermal stress as revealed by untargeted metabolomics analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*, 1481. https://doi.org/10.3390/ijms21041481.

Effect of biostimulants on germination, growth and metabolism indicators in *Lactuca sativa* seedlings under heat stress

Marzieh Shahverdi[1], Leila Shabani[1*], Somayeh Reiisi[2]

1- Department of Plant Sceince, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
2- Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

*Corresponding author; E-mail address: lshabani@gmail.com

Abstract

Treatment of seeds with biostimulants is an important technology to deal with heat stress during planting and improve yield, which all starts with seed germination Therefore, the current study aims to investigate the effect of seaweed and amino acid-derived biostimulants, on the improvement of heat stress in the seed germination stage of cool-season plants (lettuce). Experiment was set up in a completely randomized design with treatments repeated three times. For this purpose, seeds were pretreated for 2 hours in an aqueous solution of 0.5 g/L Algabon® and 2 g/L Bonamid®. Then the seeds were incubated in the dark for 72 hours at 28°C (control) and 35°C (heat stress). In cool-season seedlings (lettuce), pre-treatment with biostimulants Algabon and Bonamid led to an increase in indicators of germination percentage, root length, shoot length, fresh weight, dry weight, and also the activity of beta-amylase, protease and the amount of soluble sugars were under heat stress (temperature of 35°C). The results showed that heat stress has created conditions of oxidative stress (production of H_2O_2) in the seeds of cool-season plants, although pretreatment of cool-season seeds with Algabon and Bonamid led to a decrease in H_2O_2 production under heat stress. On the other hand, the pre-treatment of the lettuce seeds with Algabon has increased the ability of the seeds to increase the scavenging of free radicals produced during heat stress. In general, it seems that the pretreatment of seeds with Algabon by producing some compatible osmolyte compounds and stimulating the activity of enzymes involved in germination increases the germination performance and makes the seeds of lettuce resistant to thermal stress.

Key words: Algabon, Biostimulant, Bonamid, Heat stress

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت