

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

مرضیه شاهوردی<sup>۱</sup>، لیلا شبانی\*<sup>۱</sup> و سمیه رئیسی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

<sup>۲</sup> گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۰۵، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۰۸/۰۱)

### 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 تأثیر دو محرک زیستی جلبکی (Algabon®) و اسیدآمینوای (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 پیش‌تیمار بذرها به مدت دو 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 پیش‌تیمار 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) در گیاهچه‌های کاهو را ایجاد کرده است، اگرچه پیش‌تیمار بذرها با آلگابن و بنامید منجر به کاهش تولید H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> تحت تنش گرمایی شد. از طرفی پیش‌تیمار 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 پیش‌تیمار بذرها با آلگابن با تولید برخی ترکیبات اسمولیت‌های سازگار و تحریک فعالیت آنزیم‌های درگیر در جوانه‌زنی باعث افزایش عملکرد جوانه‌زنی و مقاوم شدن بذرها در مقابل تنش گرمایی شده است.

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

### مقدمه

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. پیش‌بینی شده است که دمای هوای جهانی در هر دهه ۰/۲ درجه

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

آمین، هورمون‌ها، گونه‌های فعال اکسیژن - نیتروژن - گوگرد یا فقط آب می‌تواند در افزایش تحمل گیاه به تنش‌های غیرزیستی مختلف مؤثر باشد. تحقیقات نشان داده است که جلبک‌های دریایی حاوی هورمون‌های گیاهی مانند اکسین، سیتوکینین و اسید آبسزیک 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 آبخاری 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 اسیدآمین 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 (KARI) را در شرایط تنش غیرزیستی در طی جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه *Ceratotheca triloba* مورد بررسی قرار دادند. دمای پایین (۱۰ درجه سانتی‌گراد) جوانه‌زنی بذر را کاملاً مهار کرد. با این حال، تغییر دما به ۱۵ درجه 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 تأثیر KIEM® (محرک زیستی ابتکاری مبتنی بر مشتقات لیگنین و حاوی اسیدهای آمینه مشتق شده از گیاه و مولیدن) 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

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، پلی‌آمین‌ها، 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 میکروارگانیزم‌هایی 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

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. آگابن، محرک زیستی مشتق شده از عصاره جلبک دریایی، حاوی ترکیباتی شامل: اسید آلزینیک (۱۸ درصد)،  $\text{NO}_3$  (۱ درصد)،  $\text{K}_2\text{O}$  (۱۶ درصد)،  $\text{H}_2\text{PO}_4$  (۱ درصد) و بنامید به عنوان محرک زیستی اسیدآمینوای، حاوی اسیدآمینو (۸۵ درصد) و نیتروژن (۴ درصد) بودند. بذره‌های کاهو (*Lactuca sativa* var *longifolia*) از شرکت پاکان بذرافشان خریداری شد. برای استریل سطحی، بذرها در سدیم هیپوکلریت ۵ درصد به مدت پنج دقیقه قرار داده شدند و سپس بذرها با آب مقطر به مدت دو دقیقه شسته شدند. از بذره‌های استریل در آزمایش استفاده شد. آزمایش با هدف بررسی نقش دو محرک زیستی بر کاهش اثرات ناشی از گرما بر شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد کاهو طراحی شد. برای این منظور بذره‌های استریل کاهو در محلول آبی ۰/۵ گرم در لیتر آگابن و ۲ گرم در لیتر بنامید (غلظت‌های پیشنهادی شرکت سازنده) به مدت دو ساعت (حسینی و همکاران، ۱۴۰۱) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد خیس شدند. پس از پیش‌تیمار، 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. بذره‌های 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 چهار روز در دستگاه انکوباتور بطور جداگانه انکوبه شدند. در هر پتری‌دیش ۵۰ عدد بذر قرار داده شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل از سه تیمار محرک زیستی (آب، آگابن و بنامید) و دو تیمار دمایی (بدون تنش ۲۸ درجه سانتی‌گراد) و تنش گرمایی (۳۵ درجه سانتی‌گراد) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در هر تیمار، سازمان‌دهی شد. حاصل جمع بذور جوانه‌زده پس از چهار روز برای هر

شرایطی از تنش اکسیداتیو در بذرها ایجاد می‌کند که منجر به تولید بیش از حد ROS می‌شود. به این دلیل بذره‌های خیار تیمار نشده با KIEM تحت تنش گرمایی افزایش  $\text{H}_2\text{O}_2$  درون‌زا، در هر دو دما را نشان دادند و از سوی دیگر، بذره‌های تیمار شده کاهش شدید سطوح  $\text{H}_2\text{O}_2$  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 آنتی‌اکسیدانی کاهو از عمده‌ترین 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 تأثیر پیش تیمار محرک‌های زیستی آگابن و بنامید بر کاهش اثرات تنش گرمایی در مرحله جوانه‌زنی در بذر گیاه سرمادوست کاهو صورت نگرفته، هدف از این پژوهش بررسی تأثیر محرک‌های زیستی جلبکی (آگابن) و آمینواسیدی (بنامید) بر شاخص‌های جوانه‌زنی، رشد و متابولیسم در مقاومت به تنش گرمایی است.

مواد و روش‌ها

پتری، درصد جوانه‌زنی نهایی در نظر گرفته شد (رابطه ۱).  
(رابطه ۱):

$$GP = \frac{N'}{N} \times 100$$

GP: درصد جوانه‌زنی، N': تعداد بذر جوانه‌زده تا روز آخر،

N: تعداد کل بذر

از هر پتری هفت 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 آن 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** برای اندازه‌گیری H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> از روش Alexieva و همکاران (۲۰۰۱) استفاده شد. برای عصاره‌گیری ۰/۱ گرم بافت تازه بذرهای جوانه‌زده 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>، رقت‌های صفر، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱ و ۰/۱ (غلظت میلی‌مولار) تهیه گردید. ۵۰۰ میکرولیتر از استانداردها یا عصاره‌ها با ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH=۷) و ۱ میلی‌لیتر محلول KI (۱ مولار) ترکیب شد و در ۳۹۰ نانومتر خوانده 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 جوانه‌زده (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 (%). = [جذب شاهد/ (جذب نمونه - جذب شاهد)] × ۱۰۰

**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 جوانه‌زده 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 سانتریفیوژ شدند. به تعداد نمونه‌ها دو سری لوله آزمایش آماده شد. در سری اول لوله‌های آزمایش به ۲ میلی‌لیتر آب مقطر، ۲۵ میکرولیتر معرف ید و یدور پتاسیم (KI-I<sub>2</sub>) افزوده شد. در سری دوم لوله‌های آزمایش به ۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر، مقدار ۱۵۰ میکرولیتر نشاسته محلول (S9765، سیگما-آلدریج) با غلظت (۱٪) و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیم اضافه شد. پس از گذشت پنج 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 خوانده شد. مقدار فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در نمونه‌ها با کمک رسم منحنی استاندارد نشاسته و برحسب میزان درصد نشاسته هیدرولیز شده محاسبه شد.

**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 جوانه‌زده با ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ میلی‌مولار (pH=۷) در یک هاون به‌خوبی سائیده و همگن شدند. سپس عصاره‌های حاصل در دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. از محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده شد. به ۵۰۰

شد و به هر کدام 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 طول موج ۶۲۵ نانومتر خوانده شدند. سنجش کربوهیدرات‌های محلول در بذره‌های جوانه زده با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز (صفر، 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 بذره‌های جوانه‌زده محاسبه گردید.

داده‌ها براساس روش GLM نرم‌افزار 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).

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

نتایج نشان داد که تنش گرما (دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد) طول ریشه‌چه و ساقه‌چه گیاهچه‌های کاهو را به ترتیب به

میکرولیتر از عصاره آنزیمی مقدار ۱ میلی‌لیتر کازئین ۱ درصد (حل شده در بافر فسفات ۰/۲ میلی‌مولار (pH=۶)) به عنوان سوستر 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

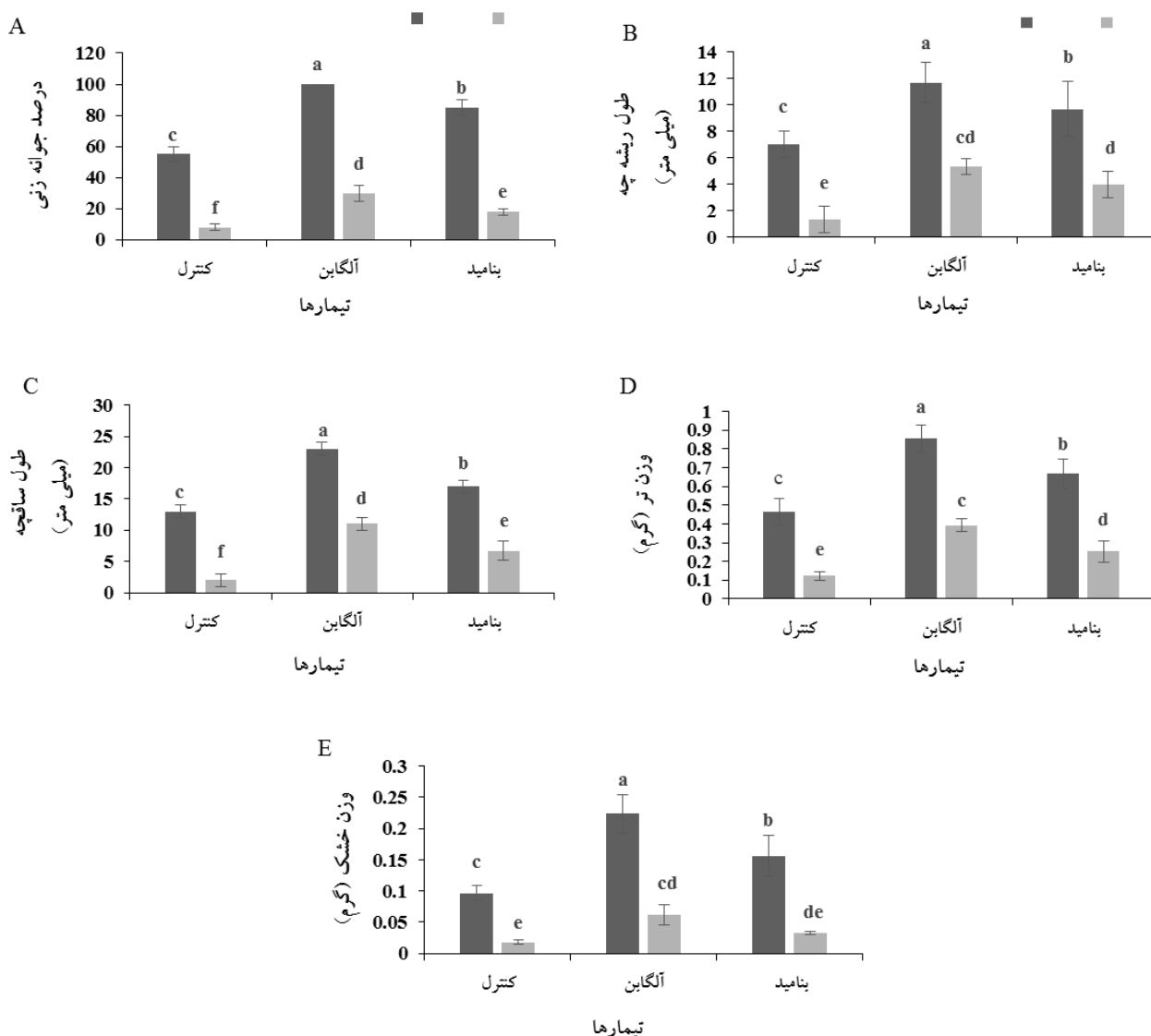
کربوهیدرات‌های محلول با روش Villar و Poorter (۱۹۹۷) انجام شد. این روش براساس اسپکتروفتومتری و سنجش شدت رنگ ایجاد شده از واکنش قندها با معرف آنترون استوار است. معرف آنترون، از حل کردن ۰/۲ گرم پودر آنترون در ۸/۳ میلی‌لیتر اتانول، ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر و افزودن ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸٪ به دست آمد.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

ابتدا ۰/۱ گرم از بذره‌های جوانه‌زده با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ در یک هاون به خوبی سائیده و همگن شدند. عصاره به دست آمده 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 جمع‌آوری شده به یک لوله فالكون 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

جدول ۱- 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 آمیلاز	فعالیت 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 <sup>ns</sup>	۱/۰۵ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۵ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۲*	۱۲/۸۳*	۰/۸۸*	۲۲۵۶۰۰۳/۴ <sup>ns</sup>
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 <sup>ns</sup> بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.



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 بذره‌های کاهو پیش‌تیمار شده با محرک‌های زیستی. حروف مختلف بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد (P < ۰/۰۵). همه مقادیر به عنوان میانگین  $\pm$  SE برای سه تکرار نشان داده شده است.

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

نتایج شاخص‌های متابولیسم جوانه‌زنی بذر نشان داد که تنش گرما (دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد) میزان فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و پروتئاز گیاهچه‌های کاهو را به ترتیب 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 بذره‌های پیش‌تیمار شده با محرک زیستی آگابن (در مقایسه با بذره‌های پیش‌تیمار شده با آب) مشاهده شد. همچنین در شرایط تنش گرما پیش‌تیمار بذره‌های کاهو با محرک زیستی آگابن به ترتیب سبب افزایش ۶ و ۲/۲ برابری فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و پروتئاز در مقایسه با بذره‌های پیش‌تیمار شده با آب شد (شکل ۲).

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

#### بحث

تأثیر 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

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 پیش‌تیمار شده با محرک زیستی آگابن (در مقایسه با بذره‌های پیش‌تیمار شده با آب) مشاهده شد. همچنین در شرایط تنش گرما پیش‌تیمار بذره‌های کاهو با محرک زیستی آگابن بترتیب سبب افزایش ۴ و ۵/۵ برابری اندازه طول ریشه‌چه و ساقه‌چه در مقایسه با بذره‌های پیش‌تیمار 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. اندازه‌گیری وزن تر و خشک نشان داد که در شرایط بدون تنش (۲۸ درجه سانتی‌گراد) بیشترین اندازه وزن تر و خشک در گیاهچه‌های پیش‌تیمار شده با محرک زیستی آگابن (در مقایسه با بذره‌های پیش‌تیمار شده با آب) مشاهده شد. همچنین در شرایط تنش گرما پیش‌تیمار بذره‌های کاهو با محرک زیستی آگابن به ترتیب سبب افزایش ۳/۲ و ۳/۳۶ برابری میزان وزن تر و خشک در مقایسه با بذره‌های پیش‌تیمار 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).

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

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

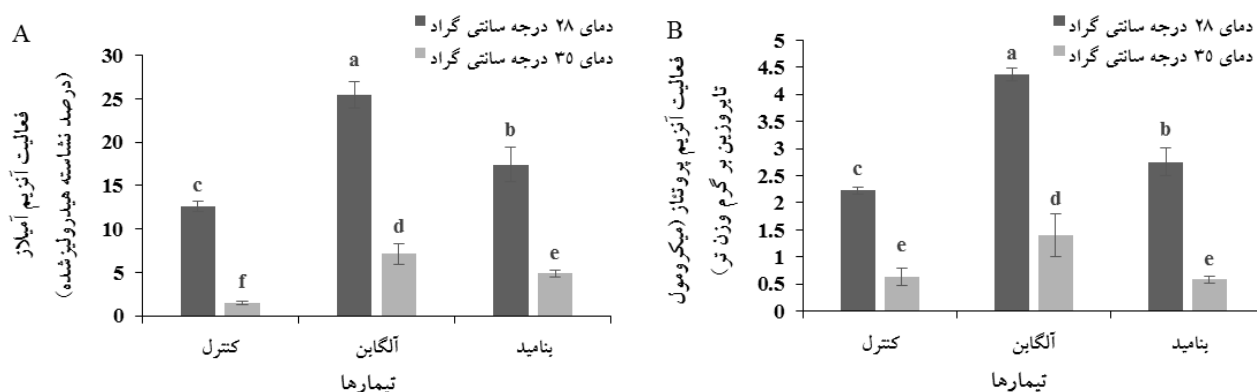
منابع تغییر	درجه آزادی	محتوای آب	محتوای پراکسید هیدروژن	فعالیت پاکروبی رادیکالی
محرک زیستی	۲	۹/۲۴ <sup>ns</sup>	۰/۴۶*	۴۹۵/۰۹*
دما	۱	۳۰۹/۴*	۲/۳۴*	۱۱۳۴/۳*
محرک زیستی × دما	۲	۶۱/۳۴*	۰/۰۱۹*	۴/۴۲ <sup>ns</sup>
خطا	۱۲	۹/۳۳	۰/۰۰۴	۹/۰۳
ضریب تغییرات		۳/۸	۶/۵۱	۵/۳

\* بیانگر معنی دار بودن در سطح ۰/۰۵ و <sup>ns</sup> بیانگر عدم اختلاف معنی دار است.

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 بذره‌های کاهو پیش‌تیمار شده با محرک‌های زیستی.

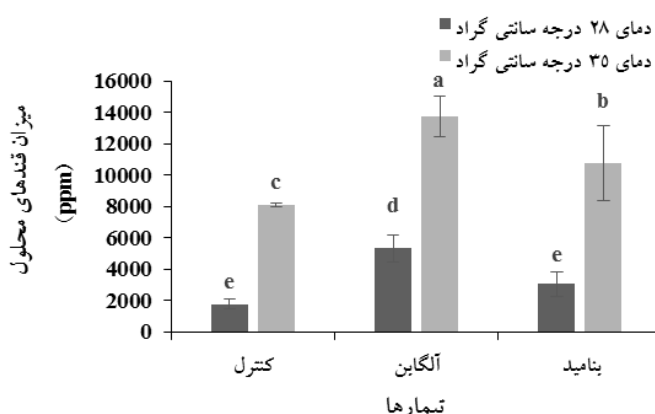
تیمارها	محتوای آب (درصد)		فعالیت پاکروبی رادیکالی (درصد)		محتوای پراکسید هیدروژن (میلی مولار/گرم وزن تر)	
	۲۸C	۳۵C	۲۸C	۳۵C	۲۸C	۳۵C
شاهد	۸۱±۱/۴۲ <sup>b</sup>	۸۲/۰۹±۰/۵ <sup>ab</sup>	۵۷/۱۹±۴/۷ <sup>c</sup>	۴۰/۰۹±۱/۴۶ <sup>e</sup>	۰/۹±۰/۰۸ <sup>d</sup>	۱/۷۵±۰/۰۸ <sup>a</sup>
آلگابن	۷۳/۸±۳/۰ <sup>c</sup>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

حروف مختلف براساس آزمون LSD تفاوت معنی داری را نشان می‌دهد ( $P \leq 0/05$ ).



شکل ۲- فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز (A) و پروتئاز (B) در شرایط تنش گرمایی (۳۵ درجه سانتی‌گراد) و غیرتنش (۲۸ درجه سانتی‌گراد) در بذره‌های کاهو پیش‌تیمار شده با محرک‌های زیستی. حروف مختلف براساس آزمون LSD تفاوت معنی داری را نشان می‌دهد ( $P \leq 0/05$ ). همه مقادیر به عنوان میانگین  $\pm$  SE برای سه تکرار نشان داده شده است.

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



شکل ۳- میزان قندهای محلول در شرایط تنش گرمایی (۳۵ درجه سانتی‌گراد) و غیرتنش (۲۸ درجه سانتی‌گراد) در بذره‌های کاهو پیش‌تیمار شده با محرک‌های زیستی. حروف مختلف براساس آزمون LSD تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد ( $P \leq 0.05$ ). همه مقادیر به عنوان میانگین  $\pm$  SE برای سه تکرار نشان داده شده است.

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 نشان‌دهنده 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 جوانه‌زنی بذر در پاسخ به دمای بالا که اغلب از طریق القای اسید آبسزیک 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. پیش‌تیمار بذر باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و پروتاز و همچنین باعث افزایش 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 مشتق‌شده از پروتئین هیدرولیز شده با القای متابولیسم کربن و نیتروژن و همچنین تنظیم جذب نیتروژن و با تداخل در فعالیت‌های هورمونی،

و همچنین به بحرانی‌ترین مراحل برای بهره‌وری محصول بستگی دارد. در این تحقیق استفاده از محرک‌های زیستی آلگابین (جلبکی) و بنامید (اسیدآمینوای) به صورت پیش‌تیمار روی بذره‌های کاهو انجام شد. گیاهان را می‌توان در مراحل مختلف رشد (مثلاً مرحله رویشی یا زایشی) پیش‌تیمار 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 ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، وزن تر و خشک متأثر از محرک زیستی آلگابین افزایش یافتند. همچنین نتایج نشان داد که در شرایط تنش گرمایی، میزان شاخص‌های جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، وزن تر و خشک تحت تأثیر محرک زیستی آلگابین در مقایسه با گیاهان شاهد تحت تنش گرما، افزایش معنی‌داری یافت. اگرچه در بذره‌های کاهو تحت تنش گرمایی تفاوت معنی‌داری در طول ریشه‌چه میان بذره‌های پیش‌تیمار شده با آلگابین و بنامید مشاهده نشد. شاخص محتوای آب بذره‌های کاهو و جو در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد تغییری نکرد. گزارش‌هایی وجود دارد که مناسب‌ترین دما برای

بواسطه پیش‌تیمار آلگابن بر روی بذر کاهو تحت تنش گرمایی به سادگی با افزایش فعالیت آنزیم‌های 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.

همان‌طور 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 سرمدوست کاهو شد. در این گونه در شرایط کنترل، فعالیت آنزیم‌های آلفا‌آمیلاز و پروتئاز متأثر از محرک زیستی آلگابن افزایش یافتند. همچنین نتایج نشان داد که در شرایط تنش گرمایی، میزان فعالیت آنزیم‌های آلفا‌آمیلاز و پروتئاز تحت تأثیر محرک زیستی آلگابن در مقایسه با گیاهان شاهد تحت تنش گرمای، افزایش معنی‌داری یافت.

در پی تنش‌های محیطی مانند گرما و خشکی، و به دنبال آن تنش اکسیداتیو، گونه‌های فعال اکسیژن، لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک، سلول را تخریب و سازوکار طبیعی آن را مختل می‌کنند. درک خسارت‌های ناشی از تنش اکسیداتیو معمولاً 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 تا حدی، به اختلالات در هومئوستازی ردوکس مرتبط باشد، که باعث می‌شود پروتئین‌ها به پروتئولیز حساس شوند. پروتئازها باعث شکستن پیوندهای پپتیدی شده

مستقیماً بر رشد گیاه تأثیر 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 پیش‌تیمار 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 پیش‌تیمار 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 تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه هستند. عصاره جلبک‌ها تعدادی مسیر را برای افزایش تحمل در برابر تنش هدف قرار می‌دهند و به‌طور کلی در گیاهان سبب پاکروبی ROSها، پایداری غشاء و حفاظت اسمزی می‌شوند و در بخش هوایی سبب تنظیم روزه‌ها 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، به‌طوری‌که 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 تنظیم‌کننده رشد کاهو در طی تنش گرمایی عمل کرده است. همچنین پیش‌تیمار بذرها با آلگابن توانایی بذرها برای افزایش پاکروبی ROSهای 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 پیش‌تیمار شده با آلگابن و بنامید در این مطالعه مشاهده شد. اثر ارتقاء رشد

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 آگابن در مقایسه با گیاهان شاهد متناظر با آنها افزایش معنی‌داری یافت. گزارش‌های متعددی نشان می‌دهد که در شرایط تنش‌های غیرزیستی محتوی قند افزایش می‌یابد (Kaur et al., 2021; Ozturk et al., 2021; Roitsch, 1999). 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., 2022). افزایش محتوای کربوهیدرات‌های محلول در این تحقیق با نتایج پژوهش‌های Masondo و همکاران (۲۰۱۸) روی گیاهچه (*Ceratotherca triloba*) و Fakhrabad و Abedi (۲۰۱۹) بر روی گیاهچه گوجه‌فرنگی 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 Estesio et al., 2016; Arroussi et al., 2018). نقش و اهمیت تجمع قندها در زمان تنش به این دلیل است که قندهای محلول گروهی از اسمولیت‌های سازگار هستند 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 پیش‌تیمار شده برای تنش‌های غیرزیستی ممکن است فعال شدن پاسخ سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی از طریق پرایمینگ باشد و یا ممکن است نتیجه فعالیت هورمون‌های مانند اسید سالیسیلیک، اسید آسبزیک 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 بر عهده دارند (Sudozai et al., 2013).

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 پروتئین‌های نوع سیستمین در ذرت با عناصر تنظیمی پاسخ دهنده به تنش غنی شده‌اند که نشان‌دهنده دخالت فعال این پروتئین‌ها 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 عمدتاً 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 تأثیر دما را بر روی جوانه‌زنی بذر (*Melanoxylon brauna*) پیش‌تیمار 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).

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 پایان‌نامه کارشناسی ارشد و با حمایت مالی دانشگاه شهرکرد (گرنه شماره 0GRD34M1032) انجام شده است، که بدین وسیله قدردانی می‌گردد.

اثرات مثبت پیش‌تیمار محرک‌های زیستی را می‌توان به برخی ترکیبات اسمولیت‌های سازگار تولید شده در بذر کاهو پیش‌تیمار 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 پیش‌تیمار 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. به‌طورکلی نتایج این تحقیق نشان داد که پیش‌تیمار بذرها به‌عنوان یک تیمار مناسب باعث افزایش عملکرد جوانه‌زنی و

#### منابع

- 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., & Berteza, 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>

- 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. In: Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (eds. Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K. B., Tignor, M. and Miller, H. L.). Pp.996. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- 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>
- Kulusic, 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., Roupheal, 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 Estesio, M. J., Vilella Anton, M. T., Selles Marchart, S., Martinez Marquez, A., Botta-Catala, A., Pinol-Dastis, R., & Bru-Martinez, 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 *Ceratotherca 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., Garcia-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>
- Poorter, H., & Villar, R. (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 Araujo, 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. Sciences, New York.
- 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](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<sup>1</sup>, Leila Shabani<sup>1\*</sup>, Somayeh Reisi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Plant Science, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

<sup>2</sup> Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

(Received: 2023/03/27, Accepted: 2023/10/23)

### 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). The 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 under heat stress (temperature of 35°C). The results showed that heat stress has created conditions of oxidative stress (production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in the seeds of cool-season plants, although pre-treatment of cool-season seeds with Algabon and Bonamid led to a decrease in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 pre-treatment 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.

**Keywords:** Algabon, Biostimulant, Bonamid, Heat stress

Corresponding author, Email: lshabani@gmail.com