اثر جلبک‌های سبز-آبی و سبز *Spirulina*، *Chlorella*، *Dunaliella* و عناصر معدنی بر تحریک فرایندهای متابولیکی و بیوشیمیایی جوانه‌زنی بذر زرین‌گیاه (*Dracocephalum kotschyi* Boiss.)

رضوان قناد، فروغ اکبری و مریم مددکار حق‌جو *

دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲۵ / پذیرش: ۱۳۹۵/۹/۲۵ / چاپ: ۱۳۹۵/۱۲/۲۸

گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
*مسئول مکاتبات: madadkar.m@lu.ac.ir

چکیده. در این مطالعه، تأثیر پیش تیمارهایی متشکل از جلبک‌های سبز-آبی و سبز و نیز مواد معدنی، بر تحریک فعالیت‌های بیوشیمیایی و متابولیکی جوانه‌زنی بذر زرین‌گیاه (*Dracocephalum kotschyi* Boiss.) بررسی شد. پرایمینگ با سه نوع جلبک، سبز-آبی *Spirulina platensis* Geitler، جلبک سبز *Chlorella vulgaris* Beyerinck و جلبک سبز *Dunaliella bardawil* UTEX-2538 and/or *IR-1* (Isolated from Gave-Khooni) و نیز محیط کشت غذایی تغییریافته جانسون، به‌صورت تیمار با سوسپانسیون فیلتر شده جلبکی یا تیمار با جلبک زنده در درون محیط کشت، اعمال شد. چون گونه‌های *Dunaliella* ویژهٔ آب‌های شور هستند، لذا از محیط کشت غذایی حاوی ۰/۶ درصد NaCl برای آنها و برای *Spirulina* از محیط کشت حاوی ۰/۱ درصد NaCl، استفاده شد. پس از خاتمهٔ پرایمینگ، فعالیت‌های آنزیمی و محتوای قندها در بذور ارزیابی و پس از کشت بذور پرایم شده درون پلیت، برخی شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد دانه رست‌ها اندازه‌گیری شدند. فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتاآمیلاز، دهیدروژناز، قند کل و احیاکننده و پروتئین کل بذر، در محیط کشت فاقد نمک (استفاده‌شده برای *Chlorella*) و در رتبهٔ بعدی در حضور ۰/۱ درصد نمک (برای *Spirulina*)، از بقیهٔ تیمارها بیشتر بود. در محیط کشت واجد نمک ۰/۶ درصد، حضور جلبک قادر به بهبود شاخص‌ها نبود اما در محیط بدون نمک، تأثیر مثبت جلبک‌ها بیشتر شد. سوسپانسیون فیلتر شده *Spirulina* به‌تنهایی یا در محیط کشت دارای ۰/۱ درصد نمک، بیشترین مقادیر فعالیت آنزیم‌های آمیلاز، قندکل و درصد جوانه‌زنی و *Chlorella* سبب افزایش فعالیت آنزیم دهیدروژناز و بیشترین طول ریشه‌چه شد. سوسپانسیون فیلتر شده *Dunaliella* در محیط کشت فاقد نمک، سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و نیز مقدار قندهای احیاکننده شد.

واژه‌های کلیدی. جلبک، زرین‌گیاه، فرایندهای بیوشیمیایی، شاخص‌های رشد

Effect of blue-green and green algae *Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella*, and minerals on the stimulation of metabolic and biochemical processes of germination in *Dracocephalum kotschyi* Boiss. seeds

Rezvan Ghannad, Forough Akbari & Maryam Madadkar Haghjou*

Received 15.01.2016/ Accepted 15.12.2016/ Published 18.03.2017

Department of Biology, Faculty of Science, Lorestan University, Khorramabad, Iran
*Correspondent author: madadkar.m@lu.ac.ir

Abstract. The effects of some pretreatments including blue-green and green algae and minerals on the induction of metabolic and biochemical process of germination were studied in *Dracocephalum kotschyi* Boiss. seeds. The seeds were pretreated with green algae *Spirulina platensis, Chlorella vulgaris* and *Dunaliella bardawil* or *D. IR-1* (Isolated from Gave-Khooni-salt marsh) and modified Johnson nutrient medium. *Dunaliella* species belong to salt marshs and waters, hence their medium was prepared by means of 0.6 % NaCl. *Spirulina*'s nutrient medium (NM) included 0.1% NaCl. The activities of α-amylase, ß-amylase, dehydrogenase, content of total sugar, reducing sugars and total protein (all were measured after priming) increased in comarsion with control. Treatment without NaCl and the treatment with 0.1 % NaCl caused the highest amount of the parameters mentioned. In the presence of salt (often at 0.6 % NaCl), algae could not improve and increase the parameters. In contrast, in the absence of salt, the positive effects of algae increased. Germination indices and length of shoots and roots which were measured after sowing the seeds into Petri-dishes, showed some positive effects regarding the pretreatments. *Spirulina* cells filteration with or without NM (including 0.1% NaCl) caused the highest activities in α-amylase and ß-amylase and the highest amount of total sugar and FGP. *Chlorella* filteration led to the increment of dehydrogenase activity and also the root's lenght. *Dunaliella* cells filteration in NM (without salt) increased α-amylase and ß-amylase activities and the reducing sugars.

Keywords. algae, *Dracocephalum*, growth indices, metabolic processes

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.4.4.4]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.4.295]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.4.4.4]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.4.295]

مقدمه

بذرهای گیاهی در واقع منابع فشرده‌ای از کربوهیدرات‌ها، پروتئین و چربی‌ها هستند که به سهولت قابل انبارداری و ذخیره بوده و اگر بوسیلهٔ جانوران مصرف شوند نیز به خوبی قابل هضم و جذب هستند. بذور همچنین میتوانند اصلاحات و دستکاری‌های ژنتیکی محققان اصلاح نباتات را به گیاهان نسل بعد منتقل سازند. خواب بذر پدیده‌ای فیزیولوژیک است که بذرهای بسیاری از گیاهان زراعی، مرتعی و علف‌های هرز با آن مواجه‌اند. این پدیده به گیاهان امکان میدهد که ازطریق طولانی تر کردن زمان جوانه-زنی، از امکان مناسب تر شدن موقعیت و شرایط جوانه‌زنی برخوردار شده، بقا و حیات خود را برای سال‌های طولانی تضمین کنند و در اوضاع نامساعد محیطی زنده بمانند (Allen & Meyer, 2002). البته بایست در نظر داشت که برای تکثیر و زراعت گیاهان مهم و دارویی و حتی برخی بذور گیاهان جنگلی، رهایی از خواب و جوانه‌زنی یکنواخت، ضروری است. از عوامل مؤثر در ایجاد خواب بذر میتوان به ترکیبی از عوامل مورفولوژیک و فیزیولوژیک اشاره کرد. میزان خواب بذر متأثر از عوامل مختلفی است که از جمله آنها میتوان به تعداد لایه‌های پوششی بذر و نوع اپیدرم، فرابر میوه، موقعیت دانه روی گیاه، اندازه و وزن بذر، سن گیاه، طول مدت روز و زمان برداشت اشاره کرد (De-Castro *et al*., 2000; Debeaujion *et al*., 2000; Gealy & Yong, 1985; Egley, 1984; Bebawi *et al.,* 1984; Kohli *et al*., 1997). برخی هورمون‌ها و آنزیم‌ها نظیر جیبرلین و آمیلازها، در حذف خواب و جوانه‌زنی بذور نقش اساسی دارند (Xie *et al*., 2007; Ogawa *et al*., 2003). آلفاآمیلاز و بتاآمیلاز دو آنزیم تجزیه‌کنندهٔ نشاسته‌اند و مقدار قند در بذور در حال جوانه‌زنی را افزایش میدهند و انرژی لازم برای رشد جنین را فراهم میکنند (Lu & Sharkey; 2004; Kashem *et al.*, 1995). آنزیم آلفاآمیلاز ابتدا زنجیرهٔ نشاسته را تجزیه و الیگوساکاریدهایی تولید میکند که دارای بقایای آلفا ۱و۴-گلوکز هستند، سپس، آنزیم بتاآمیلاز با تجزیهٔ این الیگوساکاریدها، از انتهای غیر احیاکنندهٔ زنجیره، به‌صورت یک‌درمیان اتصالات α-1,4 را میشکند و دی‌ساکارید مالتوز تولید میکند. پس از این مرحله، آنزیم مالتاز میتواند موجب تبدیل مالتوز به مونوساکارید گلوکز شود (Niittyla *et al*., 2004; Kossmann & Lloyd, 2000; Beck & Ziegler, 1989). تولید آنزیم آلفاآمیلاز در لایهٔ آلورون توسط هورمون جیبرلین کنترل شده و این مورد برای جوانه‌زنی بذر ضروری است (Xie *et al*., 2007; Ogawa *et al*., 2003). دهیدروژنازها آنزیم‌هایی هستند که با استفاده از NADH، NADPH یا ریبوفلاوین در هر دو فرایند هوازی و بی‌هوازی تنفس و تولید انرژی مشارکت میکنند (Robert *et al*., 2009). براساس تحقیقات Jones و همکاران (1999)، فرایندهای تنفس بی‌هوازی در طی مراحل استراحت دانه و نیز مراحل ابتدایی جوانه‌زنی در دانه انجام میشوند؛ زیرا در بذور خشک، به‌علت ممانعت پوشش دانه از نفوذ اکسیژن، تجزیه و آزادسازی ذخایر غذایی صورت نمیگیرد و در مراحل آغازین جوانه‌زنی نیز بررسی-ها انجام فرایندهای بی‌هوازی در تولید انرژی را تأیید میکنند. در طی جذب آب، با نرمتر شدن پوشش دانه و امکان ورود اکسیژن، فرایندهای هوازی تقویت میشوند. اندازه‌گیری فعالیت دهیدروژنازها در ابتدای کاشت بذر Cawpea به کوشش Oaikhena و همکاران (2013)، نشان داد که فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز، در همان روز اول کاشت، بسیار بالاست ولی پس از آن به‌شدت، افت کرده و پس از روز ششم کاشت، مجدداً افزایش مییابد و این فعالیت‌ها، انرژی لازم فرایندهای جوانه‌زنی و رشد را تأمین میکنند.

زرین‌گیاه یا بادرنجبویه دنایی (*Dracocephalum kotschyi* Boiss.) گیاهی دارویی از تیره نعنائیان (Labiateae) است که به‌علت پراکنش وسیع در ایران با اسامی مختلف نظیر زرّابی در منطقهٔ بختیاری، بالنگ‌بو در الموت و در برخی مناطق دیگر پلنگ‌مشک خوانده میشود. این گیاه چندساله، نیمه‌چوبی به‌طول ۲۰-۱۰ سانتیمتر با ساقه‌های چوبی، برگ‌های دمبرگ‌دار، تخم-مرغی‌شکل دندانه‌دار و گل‌های سفید متمایل به زرد است که از اوایل اردیبهشت ماه ظاهر شده و تا تیر ماه باقی میمانند. این گیاه انحصاری ایران بوده و خاستگاه آن شمال، غرب و مرکز ایران است (Rechinger, 1986). زرین‌گیاه درواقع در شمار گیاهان مهم و در معرض انقراض ایران است (Jalali & Jamzad, 1999). برداشت بی‌رویه این گیاه توسط افراد بومی در مرحله گلدهی، مانع از به بذر نشستن آن شده و در نتیجه باعث کاهش جمعیت این گیاه شده است. تحقیقات انجام شده در سال‌های اخیر

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.4.4.4]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.4.295]

نشان داده که این گیاه دارای ترکیبات دارویی ارزشمند بوده و به‌علت اثرات درمانی در کاهش تب، اثرات ضد درد، ضد التهاب، ضد قارچ، ضد باکتری و درمان درد مفاصل و رماتیسم از قدیم مورد توجه مردم مناطق تحت رویش آن بوده است (Cox & Balick, 1994; Cordell *et al.,* 1991). در برگ‌های این گیاه ترکیبی به نام Spinal-z وجود دارد که از گذشته در درمان سرطان کاربرد داشته است (Jahaniani *et al*., 2005). شناخت و استخراج ۹ ترکیب فلاونوئیدی چون کومارین و فلاونوئیدها که در پزشکی استفاده دارند، از این گیاه گزارش شده است (Gohari *et al*., 2003). از اندام‌های این گیاه نیز دو مونوترپن گلیکوزید جدید به‌همراه ۷ ترپنویید و فیتواسترول جدا شده است (Saeidnia *et al*., 2004) که به‌مثابهٔ ترکیبات دارویی ضد درد در موش آزمایشگاهی بررسی شدند (Golshani *et al*., 2004). ترکیب لیمونن، که یکی از اجزای اصلی اسانس زرین‌گیاه است، به‌مثابهٔ مهارکنندهٔ آنزیم مبدل آنژیوتانسین، ضد تومور، ضد ویروس و باکتری، خلط‌آور، عامل پیشگیری‌کنندهٔ از سرطان و رشد قارچ‌ها، ضد اسپاسم و مسکنی مؤثر است (Zargari, 1990). بذر این گیاه دارای خواب است که علیرغم رسیده و سالم بودن، در محیط مناسب جوانه نمیزند (Chang *et al*., 2009). مطالعات محققان نشان داده که مرحلهٔ جوانه‌زنی بذور مرحله‌ای حساس است که تراکم و جمعیت گیاه کشت‌شده را تحت تأثیر قرار میدهد. به‌عبارت دیگر، مراحل ابتدایی جوانه‌زنی، رشد گیاهچه و استقرار آن، حساس‌تر از مراحل بعدی هستند (Keiffer & Ungar, 1997)، زیرا طولانی بودن خروج ریشه‌چه و استقرار گیاهچه در زمین، سبب هجوم قارچ‌ها و عوامل بیماری‌زا به بذر به منزلهٔ یک منبع غذایی و نابودی آن میشود (Extension, 2015). بنابراین، در تحقیق حاضر از تکنیک پرایمینگ به‌منظور شکستن خواب بذر زرین‌گیاه استفاده شد. اساس پرایمینگ آن است که بذور با استفاده از آب یا محلول‌های برخی مواد شیمیایی تیمار می‌شوند، تا رویدادهای اولیهٔ جوانه‌زنی در آنها القا و آغاز شود، ولی قبل از خروج ریشه‌چه، تیمارهای مزبور خاتمه میابد و بذور تا رسیدن به رطوبت اولیه، خشک میشوند (Guttridge & Bright, 1978).

پرایمینگ بذور درواقع روشی مهم و اقتصادی است که میتواند در سطح گسترده‌ای به‌منظور کمک به تسریع جوانه‌زنی و بهبود یک‌نواختی رشد گیاهچه‌ها، به‌ویژه در محیط نامساعد از جمله وضعیت تنش به‌کار گرفته شود (Halmer, 2000). در تحقیقات مختلف، موارد زیادی از تأثیر مثبت نمک‌ها و یون‌های معدنی نظیر KNO_3، $MgSO_4$، $CuSO_4$، KH_2PO_4 و $CuCl_2$ به‌صورت یک ماده یا ترکیبی از دو ماده یا به‌شکل مجموعه‌ای از عناصر میکروالمان برای پرایمینگ بذر یا پوشش‌دادن سطحی بذور، استفاده‌شده و در بهبود شاخص‌های جوانه‌زنی مؤثر بوده‌اند (Farooq & Kadambot, 2017; Dewir *et al*., 2011; Yaklich & Orzolek, 1977; Younis & Hatata, 1971).

بنابراین، به‌نظر می‌رسد اسموپرایمینگ (خیساندن بذور در محلول‌های دارای پتانسیل آبی پایین) و هالوپرایمینگ (پیش‌تیمار بذور با محلول‌های نمکی غیرآلی) به‌صورت منبع کامل عناصر کم‌مصرف و پرمصرف، یعنی محیط کشت غذایی، بتواند تأثیر مثبتی بر بهبود فعالیت‌های متابولیکی بذور و جوانه‌زنی آنها اعمال کند. در دستهٔ دیگری از تحقیقات، از نوع دیگری از پرایمینگ به نام بیوپرایمینگ، یعنی تأثیر عوامل زنده و بیولوژیک (نظیر قارچ *Trichoderma* و باکتری *Pseudomonas*) بهره‌گیری میشود. به‌طورکلی، میتوان گفت تیمارهای بیولوژیک رشد گیاه را افزایش میدهند و ساز وکارهای مقاومت در گیاه را فعال میکنند (Singh *et al.,* 2007). امروزه، جلبک‌ها به منزلهٔ منبع بسیار ارزشمندی از نمک‌های معدنی، ویتامین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، هورمون‌ها و دیگر متابولیت‌های مهم مغذی مورد توجه فراوان هستند (Brune, 2011; Mani *et al*., 2008). برخی بررسی‌ها نشان داده تلقیح جلبک‌ها در محیط‌های غذایی کشت گیاهان میتواند در بهبود رشد گیاه مؤثر باشد (Caffagni *et al*., 2015).

در این تحقیق، از تیمار جلبک‌های سبز-آبی و سبز *Spirulina platensis* و *Chlorella vulgaris* و دو گونه جلبک سبز *Dunaliella*-IR-1 و *Dunaliella bardawil* UTEX-2538 به‌همراه محیط کامل غذایی کشت جلبک یا صرفاً با استفاده از سوسپانسیون فیلترشده (سانتریفوژکردن و خالی کردن محلول محیط کشت رویی) سلول‌های جلبکی (بدون محیط کشت)، برای پرایمینگ بذور زرین‌گیاه استفاده شد. پس از خاتمهٔ تیمارهای پرایمینگ و خشک‌کردن بذور، فعالیت‌های آنزیمی آلفاآمیلاز، بتاآمیلاز، دهیدروژناز، مقادیر قند کل، قند احیاکننده و مقدار پروتئین اندازه‌گیری شد و نیز نتایج بررسی شاخص‌های

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.4.4.4]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.4.295]

جوانه‌زنی بذور کشت شده در پلیت و رشد گیاهچه‌های حاصل از آنها در طی یک دورهٔ ۱۵ روزه، یادداشت شد.

بنابراین به‌عنوان جمع‌بندی مطالب فوق و نیز نوآوری تحقیق حاضر میتوان گفت که اهمیت دارویی و اقتصادی گیاهان تیرهٔ نعنائیان، باعث شده که بسیاری از گونه‌های متعلق به این تیره در معرض برداشت بی‌رویه، تخریب و انقراض قرار بگیرند. از سوی دیگر وجود انواع خواب در بذور این تیره عملیات کشت آنها را با مشکل مواجه کرده است. بنابراین احیا، توسعه و به‌کارگیری اصولی گیاهان باقیمانده در طبیعت به‌منظورکشت این گیاهان ضروری است که در این تحقیق از تأثیر سلول‌های جلبکی و نیز عناصر معدنی محیط کشت برای این منظور استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ بذور، آماده‌سازی محیط کشت‌های غذایی جلبک‌ها و طراحی تیمارها

بذور زرین‌گیاه از مرکز پاکان بذر اصفهان و نمونه‌های جلبکی *Spirulina platensis*، *Chlorella vulgaris* و دو گونه جلبک *Dunaliella*-IR1 و *Dunaliella bardawil* (UTEX-2538) جداسازی‌شده از مرداب گاوخونی اصفهان و نیز هدیه دانشگاه تگزاس به کلکسیون جلبکی دانشگاه اصفهان بودند که توسط دانشگاه لرستان، تهیه شدند. کلیهٔ مواد لازم برای تهیهٔ محیط‌های کشت جلبکی از شرکت سیگما یا مرک تهیه شدند. محیط کشت تغییر یافتهٔ (Johnson *et al.*, 1968, Shariati & Lilley, 1994) حاوی KNO_3 (5 mM), $MgSO_4$ (5 mM), $CaCl_2$ (0.2 mM), KH_2PO_4 (0.2 mM), $FeCl_3$ (2 µM), NaEDTA (5 µM), $MnCl_2$ (7µM), $ZnCl_2$ (1µM), $CuCl_2$ (1 µM), $CoCl_2$ (1 µM) و $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ (1 µM) تهیه شد و سپس مقادیر $NaHCO_3$ (16 mM) و ۰/۱ درصد نمک NaCl به‌منظور کشت *S. platensis* (تحت عنوان محیط کشت N. M. (A)) و $NaHCO_3$ (2 mM) و ۰/۶ درصد نمک NaCl جهت کشت *Dunaliella* (تحت عنوان محیط کشت N. M. (B)) استفاده شدند. برای کشت *C. vulgaris* و نیز برخی تیمارهای فاقد نمک، صرفاً از محیط کشت اصلی(تحت عنوان محیط کشت N. M. (C)) بهره‌گیری شد. تذکر آنکه به‌منظور سهولت، از حروف اولیهٔ کلمات Nutrient Medium و نیز حروف A ، B و C برای تفکیک محیط کشت‌های غذایی مورد استفاده برای هر جلبک استفاده شد. میزان pH محیط‌ها روی ۷/۲-۷ تنظیم شد. سلول‌های جلبکی به تعداد $۲-۳\times۱۰^۶$ از جلبک‌های *Chlorella* و *Dunaliella* و مقدار ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی *Spirulina* در محیط کشت ویژه و استریل تلقیح شدند و به‌منظور رشد در محیط مناسب نوری $۱۰۰\ \mu mol.m^{-2}s^{-1}$ به‌مدت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای $۱۷/۲۵\pm۲^{\circ}C$ رشد قرار گرفتند. تمام نمونه برداری‌ها در مرحله لگاریتمی رشد (روزهای هشتم تا دهم) انجام شد و پس‌از این مرحله، بلافاصله سلول‌های جلبکی همراه با محیط کشت یا بدون آن در تیمار ۳ ساعته روی بذور زرین‌گیاه تأثیر داده شدند.

در مورد تیمارهای پرایمینگ، که شامل جلبک به‌همراه محیط کشت بوده اند، جلبک به‌همراه همان محیط کشتی که در آن رشد کرده، مورد استفاده قرار گرفته است و در تیمارهایی که بایست جلبک به‌صورت جداگانه و بدون محیط کشت (به‌صورت فیلترشده) بر بذور تأثیر داده شود، ابتدا مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی برداشت شد و پس‌از سانتریفوژ در g ۱۰۰۰ و تخلیهٔ کامل محیط کشت رویی، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر (جهت تهیهٔ یک محلول یکنواخت)، به آن اضافه و به آرامی مخلوط شد. این محلول سپس به‌منزلهٔ تیمار پرایمینگ استفاده شد. در مواردی که صرفاً محیط کشت، به‌عنوان تیمار استفاده شده، از محلول تازه و فاقد هرگونه سلول استفاده شد. در تمام موارد پرایمینگ، حجم تیمار اعمال‌شده معادل ۱۰ میلی‌لیتر و زمان آن ۳ ساعت بوده است.

بررسی آماری

طراحی آزمایش درقالب طرحی کاملاً تصادفی انجام شد. تیمارها شامل فاکتور پرایمینگ با سه نمونه جلبک‌های سبز-آبی *Spirulina platensis* و سبز *vulgaris*، *Chlorella*، *Dunaliella-IR-1* و *Dunaliella bardawil* UTEX-2538 در داخل محیط کشت خود، یا صرفاً سوسپانسیون فیلترشدهٔ جلبکی در داخل آب مقطر یا محیط کشت فاقد جلبک، هریک در چهار تکرار بود. محاسبه و دسته‌بندی داده‌های آزمون با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد، سپس نتایج با کمک نرم‌افزار SPSS مورد تحلیل آماری واریانس ANOVA و مقایسهٔ میانگین چند دامنه‌ای دانکن قرار گرفت.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-29]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.4.4.4]

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.4.295]

آماده‌سازی بذور و انجام تکنیک پرایمینگ

در آماده سازی بذور به‌منظور اعمال تیمارهای پرایمینگ، ابتدا بذور با محلول ویتاواکس ۰/۲درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند.سپس با آب دو بار تقطیر شست و شو داده شده و چندین خراش سطحی نیز برای کاهش قدرت پوسته ایجاد شد. به‌منظور اعمال پرایمینگ، تعداد ۵۰ عدد بذر سالم درون پتری‌دیش‌هایی با قطر ۱۰ سانتیمتر دارای دو عدد کاغذ صافی (زیر و روی بذور) قرار داده شدند و مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از هریک از تیمارهای مزبور به بذور داخل هریک از پلیت‌ها اضافه شد. ۴ پتری‌دیش به‌عنوان ۴ تکرار و هر یک حاوی ۵۰ بذر نیز شاهد درنظر گرفته شد. در مرحلهٔ بعد، کلیهٔ پتری‌دیش‌های حاوی بذور (تیمارها و نیز شاهد فاقد پرایمینگ) در دمای ۱۶°C در تاریکی به‌مدت ۳ ساعت قرار گرفتند. در پایان زمان فوق الذکر تیمارهای پرایمینگ قطع و بذور به‌منظور خشک شدن به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۶°C و تاریکی قرار گرفتند. به‌منظور اطمینان، توزین بذور پس از پرایمینگ و مقایسهٔ آن با اوزان قبل از پرایمینگ، نیز صورت گرفت.

سنجش فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز

برای بررسی فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز از روش Black و همکاران (1996) استفاده شد و نمونهٔ استاندارد آنزیم آلفاآمیلاز از شرکت سیگما تهیه شد. بذور پرایم‌شده، در حضور بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH=۷/۴ که حاوی ۲ میلی‌مولار $CaCl_2$ بود، در درون هاون ساییده شد و پس‌از سانتریفوژ و افزودن نشاسته و معرف ید یدوره، تغییرات جذب نمونه درمقابل بلانک در طول موج ۶۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Microtiter plate reader، Biotec مدل Epoch) خوانده شد. گفتنی است که در کلیه اندازه‌گیری‌های ذیل نیز از دستگاه اسپکتروفوتومتر ذکر شده استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم بتاآمیلاز

بررسی فعالیت آنزیم بتاآمیلاز، براساس روش Bernfeld (1955) با اندکی تغییرات انجام شد و برای ساخت استاندارد از ۳۰ میلی‌گرم D-مالتوز محصول شرکت سیگما استفاده شد. بذور پرایم‌شده در آب مقطر، در درون هاون ساییده و سپس سانتریفوژ شدند. عصارهٔ بدست‌آمده با بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH=۷/۴ و نشاستهٔ ۰/۲ درصد و ۱۵۰ میکرولیتر دی‌نیترو سالیسیلیک اسید (DNS) مخلوط شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه در درون بن‌ماری قرار گرفت. تغییرات جذب نمونه‌ها، سپس در مقابل بلانک در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد.

سنجش فعالیت آنزیم دهیدروژناز

سنجش فعالیت آنزیم دهیدروژناز طبق روش Kittock & Law (1968) انجام شد. بذور پرایم شده با بافر Trizma Base با pH=۷/۶، حاوی ۰/۰۵ گرم تری‌فنیل تترازولیوم کلراید (TTC) مخلوط شد و سپس در درون آون در دمای ۳۰ درجه به‌مدت ۳ ساعت قرار گرفتند و پس‌از آن با محلول متیل سلوسولو حاوی ۰/۲۵ گرم تری‌کلرو استیک اسید (TCA)، ساییده شد. تغییرات جذب نمونه درمقابل بلانک در طول موج ۴۸۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

سنجش قند کل

سنجش قند کل مطابق روش Albalasmeh و همکاران (2013) صورت گرفت و ساخت استاندارد با استفاده از D-گلوکز محصول شرکت سیگما صورت گرفت. بدین‌منظور، از ۱/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۶۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک برای استخراج عصاره از بذور استفاده شد. بعد از مخلوط‌کردن مواد لازم، تغییرات جذب نمونه درمقابل بلانک در طول موج ۳۱۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

سنجش قندهای احیا کننده

سنجش قند احیاکننده مطابق روش Miller و همکاران (1959) انجام شد و از D-گلوکز محصول شرکت سیگما به‌عنوان نمونهٔ استاندارد، استفاده شد. برای سنجش قند احیاکننده، از ۱/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲۰۰ میکرولیتر دی‌نیترو سالیسیلیک اسید (DNS) برای عصاره گیری بذور استفاده شد. سپس، نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه قرار گرفتند. پس‌از خروج نمونه‌ها از بن ماری، تغییرات جذب نمونه در مقابل بلانک در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

سنجش پروتئین کل

اندازه‌گیری مقدار پروتئین محلول کل به‌روش Bradford (1976) و با استفاده از محلول کوماسی برلیانت بلو و خواندن جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه از

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.4.4.4]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.4.295]

اسپکتروفتومتر صورت گرفت. سرم آلبومین گاوی (BSA) برای ترسیم منحنی استاندارد استفاده شد.

ارزیابی شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد

به‌منظور بررسی و ارزیابی شاخص‌های جوانه‌زنی، ۵۰ بذر از هر یک از گروه‌های پرایم‌شده یا نشده (شاهد)، در داخل پتری‌دیش قرار داده شد و ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به آن اضافه شد. پتری‌دیش‌های محتوی بذور در شرایط فتوپریودیک و دمایی قبلی قرار داده شدند و ارزیابی جوانه‌زنی بطور مرتب و هر ۲۴ ساعت یک‌بار انجام گرفت. خروج ریشه‌چه به اندازه ۱ میلی‌متر به‌عنوان معیار جوانه‌زنی در نظر گرفته شد (Castro *et al*., 2000) و به‌منظور آن‌که بیومس کافی برای ارزیابی شاخص‌های مورفولوژیک رشد فراهم شود، شمارش بذور جوانه‌زده تا روز پانزدهم صورت گرفت. در روز پانزدهم، برداشت بخش‌های هوایی و زیرزمینی گیاهچه‌های حاصل (با جداسازی از منطقهٔ یقه)، به‌منظور اندازه‌گیری طول و وزن خشک ساقه‌چه و ریشه‌چه انجام شد.

مؤلفه‌ها و شاخص‌های جوانه‌زنی براساس فرمول‌های ذیل محاسبه شد.

رابطهٔ ۱) درصد جوانه‌زنی نهایی، (Kader, 2005).

FGP= (تعداد کل بذر/تعداد نهایی بذر جوانه‌زده) ×۱۰۰

رابطهٔ ۲) شاخص نرخ جوانه‌زنی، (Hosseini *et al*., 2013).

$GRI= \sum n/\sum dn$

n: تعداد بذرهای جوانه زده در هر روز/ تعداد روزها از آغاز آزمایش

رابطهٔ ۳) شاخص بنیه یک، (Abbasian & Moemeni, 2013)

Vigour Index (I) =(ارتفاع ساقه چه + ارتفاع ریشه چه) × درصد جوانه‌زنی

رابطهٔ ۴) شاخص بنیه دو، (Abbasian & Moemeni, 2013).

Vigour Index (II) =(وزن خشک + وزن خشک ریشه چه) ×(ساقه چه درصدجوانه‌زنی

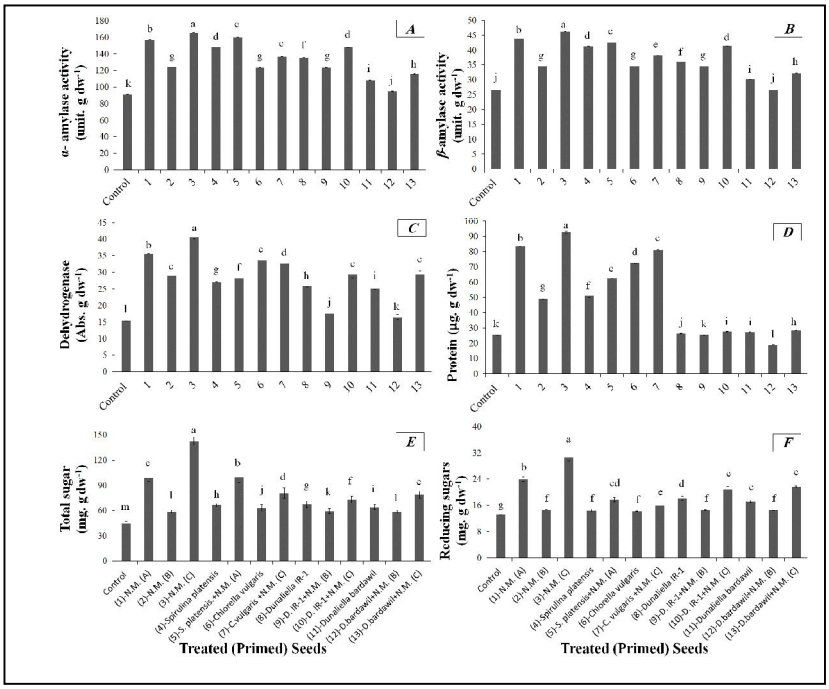
به‌منظور رعایت اختصار، در قسمت نتایج و بحث، صرفاً به ذکر شمارهٔ تیمارها به‌شرح زیر اکتفا شد.

(Control) بذر پرایم نشده، (شاهد)، (۱) بذر پرایم‌شده با محیط کشت غذایی N. M. (A) (استفاده‌شده برای رشد جلبک *Spirulina platensis* حاوی ۰/۱ درصد نمک NaCl)، (۲) بذر پرایم‌شده با محیط کشت غذایی N. M. (B) (استفاده‌شده برای رشد جلبک *D. IR-1* و *D. bardawil* حاوی۰/۶ درصد نمک NaCl)، (۳) بذر پرایم‌شده با محیط کشت غذایی N. M. (C) (استفاده‌شده برای رشد جلبک *Chlorella vulgaris*، فاقد نمک NaCl)، (۴) بذر پرایم‌شده صرفاً با سوسپانسیون فیلترشده جلبکی *S. platensis* (رشدیافته در محیط کشت غذایی N. M. (A))، (۵) بذر پرایم شده با سلول‌های جلبک *S. platensis* + محیط کشت غذایی N. M. (A)، (۶) بذر پرایم‌شده صرفاً با سوسپانسیون فیلترشده جلبکی *C. vulgaris*(رشدیافته در محیط کشت غذایی N. M. (C))، (۷) بذر پرایم‌شده با سلول‌های جلبک *C. vulgaris* + محیط کشت غذایی N. M. (C)، (۸) بذر پرایم‌شده صرفاً با سوسپانسیون فیلترشده جلبکی *D. IR-1* (رشدیافته در محیط کشت غذایی N. M. (B))، (۹) بذر پرایم شده با سلول‌های جلبک *D. IR-1* + محیط کشت غذایی N. M. (B)، (۱۰) بذر پرایم‌شده با سوسپانسیون فیلترشده جلبکی *D. IR-1* + محیط کشت غذایی N. M. (C)، (۱۱) بذر پرایم‌شده صرفاً با سوسپانسیون فیلترشده جلبکی *D. bardawil* (رشد یافته در محیط کشت غذایی N. M. (B))، (۱۲) بذر پرایم‌شده با سلول‌های جلبک *D. bardawil*+ محیط کشت غذایی N. M. (B)، (۱۳) بذر پرایم‌شده با سلول‌های جلبک *D. bardawil* + محیط کشت غذایی N. M. (C).

نتایج

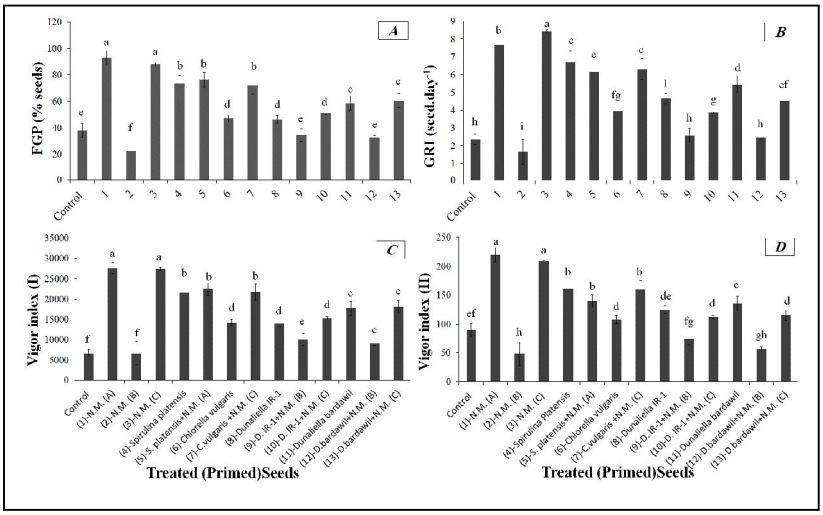
بررسی تأثیر تیمارهای طراحی‌شده بر میزان فعالیت آنزیم‌های آلفاآمیلاز، بتاآمیلاز و دهیدروژناز

بررسی اثر تیمارهای مختلف پرایمینگ بر فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز در شکل A-۱ نشان میدهد که تمام تیمارها پس از گذشت ۳ ساعت، سبب افزایش فعالیت آنزیم نسبت به شاهد شدند، اما بیشترین مقدار فعالیت از تأثیر تیمار شمارهٔ ۳ یعنی محیط کشت غذایی فاقد نمک N. M. (C)، بر بذور زرین‌گیاه، بدست آمد. تیمار شمارهٔ ۱، یعنی محیط کشت N. M. (A) و تیمار شمارهٔ ۵،



شکل ۱- میزان فعالیت آنزیم‌های مرتبط با جوانه‌زنی و مقادیر پروتئین، قند کل و قند احیاکننده در بذور پرایم‌نشده (شاهد) و پرایم‌شده، یک روز پس‌از خاتمه پرایمینگ و خشک‌شدن بذور. **A:** آلفاآمیلاز، **B:** بتاآمیلاز، **C:** دهیدروژناز، **D:** پروتئین، **E:** قند کل و **F:** قندهای احیاکننده در بذور زرین‌گیاه. مقادیر، میانگین چهار تکرار± StD بوده و حروف غیر یکسان مبین وجود اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح $p<0.05$ هستند.

Fig. 1. Activities of enzymes involved in germination, and the content of protein, total sugar and reducing sugers in non-primed seeds (control) and primed seeds, one day after priming and drying the seeds. **A:** Alfa-Amylase, **B:** Beta-Amylase, **C:** Dehydrogenase, **D:** Protein, **E:** Total sugar and **F:** Reducing sugars in *Dracocephalum kotschy* Boiss seeds. Data are the means of four replicates with error bars representing St.D values. Data with different letters are significantly different, as measured by Duncan's test ($p\leq 0.05$).



شکل ۲- ارزیابی شاخص‌های جوانه‌زنی در بذور پرایم‌نشده (شاهد) و پرایم‌شده، در طول دورهٔ رشد ۱۵ روزه. **A:** درصد جوانه‌زنی، **B:** سرعت جوانه‌زنی، **C:** ویگور (1) و **D:**ویگور (2)، در بذور زرین‌گیاه (*Dracocephalum kotschyi* Boiss.). مقادیر، میانگین چهار تکرار± StD بوده و حروف غیریکسان مبین وجود اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن در سطح $p<0.05$ هستند.

Fig. 2. Evaluating germination indices in non-primed seeds (control) and primed seeds, after fifteen days growth period. **A:** Final germination percentage, **B:** Germination rate index, **C:** Vigor index I and **D:** Vigor index II in *Dracocephalum kotschy* Boiss seeds. Data are the means of four replicates with error bars representing StD values. Data with different letters are significantly different, as measured by Duncan's test ($p\leq 0.05$).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.4.4.4]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.4.295]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.4.4.4]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.4.295]

یعنی محیط کشت مزبور، به‌همراه جلبک *Spirulina*، از نظر تأثیر بر افزایش فعالیت آنزیم، در رتبه‌های بعدی اهمیت قرار داشتند. تیمار شمارهٔ ۱۲، که مربوط به محیط کشت دارای نمک و حاوی جلبک *D. IR-1* بود، کمترین مقدار فعالیت آنزیم در میان نمونه‌های تیمار شده را نشان داد، اگرچه نسبت به شاهد موجب مقداری افزایش شد. تغییرات بوجودآمده در میزان فعالیت آنزیم بتاآمیلاز بر اثر اعمال تیمارهای پرایمینگ (شکل B-۱)، الگویی مشابه با فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز را نشان داد و تیمار شمارهٔ ۳، موجب بیشترین افزایش در فعالیت آنزیم نسبت به شاهد شد. بذور تیمار شدهٔ شمارهٔ ۴ و ۱۰ که به‌ترتیب مربوط به تأثیر جلبک‌های *Spirulina* و جلبک *D. IR-1*، بودند، نسبت به تیمارهای ۱ و ۵ در مراتب بعدی قرار داشتند. بررسی اثر پرایمینگ بر فعالیت دهیدروژناز در شکل C-۱، نتایجی تاحدودی مشابه با فعالیت آنزیم‌های آلفاآمیلاز و بتاآمیلاز نشان داد، به‌نحوی که بیشترین تأثیر مربوط به تیمار محیط کشت بدون نمک و فاقد جلبک شمارهٔ ۳ بود. تأثیر محیط کشت دارای نمک (۰/۶ درصد) به‌همراه جلبک‌های *Dunaliella* (هر دو گونه) به‌مثابهٔ تیمارهای ۹ و ۱۲، به‌صورت کمترین مقدار افزایش فعالیت آنزیم دهیدروژناز در میان تیمارها مشاهده شد. این نشان میدهد که تأثیر منفی نمک محیط کشت، زمانی که جلبک‌های *Dunaliella* به آن افزوده شدند، نسبت به وضعیت بدون جلبک (تیمار شمارهٔ ۲) بیشتر بوده و درواقع به میزان کمتری سبب افزایش فعالیت آنزیم دهیدروژناز نسبت به شاهد شده است.

بررسی تأثیر تیمارهای پرایمینگ بر مقدار پروتئین کل بذر

سنجش مقدار پروتئین (شکل شمارهٔ D-۱)، بالاترین مقدار پروتئین بذر را دوباره در تیمار ۳ و سپس در تیمار ۱ نشان داد، اگرچه محیط کشت فاقد نمک به‌همراه جلبک *Chlorella* نیز مبین وجود مقدار قابل‌ملاحظهٔ پروتئین بودند. کمترین مقادیر پروتئین در تیمارهای ۸ تا ۱۳،که مربوط به تیمارهای جلبک *Dunaliella* بود، ملاحظه شد.

بررسی تأثیر تیمارهای پرایمینگ بر مقدار قند کل و قندهای احیاکننده

سنجش مقادیر قند کل و قندهای احیاکننده (شکل‌های شمارهٔ E-۱ و F-۱)، شباهت نمودار آنها را با الگوی فعالیت آنزیم‌های آلفاآمیلاز و بتاآمیلاز نشان‌دهندهٔ برتری مقدار قند در تیمار شمارهٔ ۳ و سپس تیمار ۱ است. باقی تیمارها مقادیر کمتر، اما بیشتر از شاهد، را به خود اختصاص دادند. این مسئله نشان میدهد که افزایش فعالیت آنزیم‌های آمیلازی بر اثر تیمارهای پرایمینگ، موجب تجزیهٔ نشاسته و افزایش قند قابل استفاده در فرایندهای جوانه‌زنی میشود.

بررسی تأثیر تیمارهای پرایمینگ بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذور و رشد گیاهچه

بررسی نتایج حاصل از تأثیر تیمارهای پرایمینگ بر شاخص‌های جوانه‌زنی (شکل ۲)، نشان داد که از میان تمام تیمارها، به‌طورکلی تیمار بذور با محیط کشت‌های فاقد نمک و دارای ۰/۱ درصد نمک (یعنی با مقدار نمک کم)، سبب افزایش چشمگیر شاخص‌های مزبور شد. درعین‌حال، تیمار با جلبک *Chlorella* و به‌همراه محیط کشت و نیز تیمار با *Spirulina* بدون یا به‌همراه محیط کشت، نیز تأثیر مثبت قابل توجهی بر شاخص‌های جوانه‌زنی ارزیابی‌شده نظیر درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و بنیه بذر ۱ و ۲ داشتند (شکل ۲). طول ساقه‌چه و ریشه‌چهٔ گیاهچه‌های حاصل از بذور پرایم‌شده در کلیه تیمارها، نسبت به نمونهٔ شاهد افزایش یافت (جدول ۱)، اما وزن خشک ساقه‌چه افزایش اندکی نشان داد و وجود نمک در محیط کشت به‌همراه تیمار با جلبک *D. bardawil*، نیز سبب کاهش وزن خشک ساقه شد. وزن خشک ریشه‌چه، در نمونهٔ شاهد از دیگرین بیشتر بود و در اثر تیمارهای پرایمینگ کاهش یافت (جدول ۱).

بحث

به‌رغم پراکنش زرین‌گیاه در مرکز و غرب ایران، این گیاه به دلایلی نظیر جوانه‌زنی نامنظم به‌علت خواب بذر، به‌عنوان گونهٔ در حال انقراض یا گونهٔ نادر (Jalali & Jamzad, 1999) معرفی شده است. با توجه به گزارش‌های فراوان در زمینهٔ وجود ترکیبات مهم مغذی، آنتی‌اکسیدانی و عناصر معدنی موجود در جلبک‌های *Spirulina*، *Chlorella* و *Dunaliella* (Tang & Suter, 2011) و نیز تأثیر عناصر مغذی کم‌مصرف و پرمصرف بر بذور گیاهان پیش از جوانه‌زنی (Farooq & Kadambot, 2012)، در این تحقیق از تکنیک بیوپرایمینگ با جلبک‌های سبز-آبی، سبز و محیط‌کشت مغذی رشد جلبک‌ها (به‌عنوان اسمو و هالوپرایمینگ) به‌عنوان رویکردی جدید در جهت تسریع فرایندهای متابولیکی و

جدول ۱- مقایسه‌های میانگین اثر نوع تیمارهای پرایمینگ بر شاخص‌های رشد دانه رست‌های زرین‌گیاه. مقادیر، میانگین چهار تکرار بوده و حروف غیریکسان براساس آزمون دانکن، بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $p<0.05$ هستند.

Table. 1. Comparison of means from the effect of priming treatments on germination and growth in *Dracocephalum kotschy* Boiss. seeds. Data are the means of four replicates with error bars representing St.D values. Data with different letters are significantly different, as measured by Duncan's test ($p\leq0.05$).

Root length (mm)	Shoot length (mm)	Root DW (mg)	Stem DW (mg)	Treatment Number
۱۲۱^{h}	۵۵^{h}	۰/۶^{a}	۱/۸^{c}	Control
۱۶۳^{ef}	۱۳۴^{d}	۰/۳۲^{cd}	۱/۹^{ab}	شمارهٔ ۱
۱۶۱^{fg}	۱۳۵^{cd}	۰/۲۸$^{d-f}$	۱/۹^{b}	شمارهٔ ۲
۱۶۸^{a}	۱۴۲^{a}	۰/۳۸^{b}	۲/۰^{a}	شمارهٔ ۳
۱۶۳^{de}	۱۳۲^{e}	۰/۲۸$^{d-f}$	۱/۹^{ab}	شمارهٔ ۴
۱۶۱^{fg}	۱۳۳^{e}	۰/۲۷^{ef}	۱/۷^{c}	شمارهٔ ۵
۱۶۷^{ab}	۱۳۶^{bc}	۰/۳۴^{bc}	۲/۰^{ab}	شمارهٔ ۶
۱۶۷^{ab}	۱۳۶$^{b-d}$	۰/۳۰$^{d-f}$	۱/۹^{ab}	شمارهٔ ۷
۱۶۶$^{a-c}$	۱۳۷^{b}	۰/۳۱$^{c-e}$	۲^{ab}	شمارهٔ ۸
۱۶۲^{ef}	۱۳۰^{f}	۰/۲۷$^{d-f}$	۱/۹^{b}	شمارهٔ ۹
۱۶۵$^{b-d}$	۱۳۵^{cd}	۰/۲۹$^{d-f}$	۱/۹^{ab}	شمارهٔ ۱۰
۱۶۶$^{a-c}$	۱۳۷^{b}	۰/۳۱$^{c-e}$	۲/۰^{ab}	شمارهٔ ۱۱
۱۶۰^{g}	۱۲۴^{g}	۰/۲۵^{f}	۱/۵^{d}	شمارهٔ ۱۲
۱۶۴$^{c-d}$	۱۳۵^{cd}	۰/۲۷^{ef}	۱/۶^{ab}	شمارهٔ ۱۳

شاخص‌های ارزیابی شده در جدول، به ترتیب از راست به چپ عبارتند از: وزن خشک ساقه چه، وزن خشک ریشه‌چه، طول ساقه چه و طول ریشه چه.
Evaluated indices in the table (right to left) are: shoot dry weight, root dry weight, shoot length and root length.

بیوشیمیایی در بذر زرین‌گیاه استفاده شد. نتایج حاصل نشان داد که تکنیک‌های پرایمینگ به‌کارگرفته شده، سبب تحریک فعالیت‌های متابولیکی و افزایش جوانه‌زنی در بذرهای زرین‌گیاه میشود. براساس منابع، در طی جوانه‌زنی بذور، آمیلازها قادرند به‌مثابهٔ اندوآنزیم (آلفاآمیلاز) یا اگزوآنزیم (بتاآمیلاز) با اتصال به باندهای ارتوگلیکوزیدی آمیلوز، که یک پلی ساکارید ذخیره‌ای در بذور انواع گیاهان است، نقشی کلیدی را در متابولیسم کربوهیدرات‌های بذور درحال جوانه‌زنی ایفا کنند (Farooq *et al.*, 2007; Muralikrishna & Nirmala, 2005; Kossmann & Lloyd, 2000). این فرایندها تجزیهٔ نشاسته را میسر و انرژی لازم برای جوانه‌زنی و متعاقب آن رشد ساقه و ریشه را تأمین میکنند (Dehghanpour *et al.*, 2011). تحقیقات De Lespinay و همکاران (2010) نشان داد که پرایمینگ سبب افزایش سنتز پروتئین، تولید و فعال شدن آنزیم‌هایی نظیر آلفاآمیلاز و بتاآمیلاز در جنین می‌شود.

در تحقیق حاضر، افزایش پروتئین کل، در اغلب تیمارهای پرایمینگ اعمال‌شده، مشاهده شد. این امر نشان‌دهندهٔ اثر تیمارهای پرایمینگ در به‌راه انداختن فرایندهای سنتز پروتئین درجهت جوانه‌زنی و خروج ریشه‌چه است. تیمار بذور که با محیط کشت N. M. (C)، که فاقد نمک بوده است، در افزایش مقدار پروتئین کل سلولی از دیگر تیمارها مؤثرتر بود و اثر محیط کشت N. M. (A) با مقدار نمک ۰/۱ درصد NaCl، از این نظر، در مرتبه بعدی قرار داشت. محیط کشت حاوی ۰/۶ درصد نمکNaCl ، چه درحضور جلبک‌ها و چه در غیاب آنها (تیمارهای ۲، ۹ و ۱۲)، بر مقدار پروتئین کل سلول و نیز فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتاآمیلاز تأثیر افزایشی کمتری نسبت به شاهد اعمال کرد. بیشترین مقدار فعالیت آنزیم‌های آلفاآمیلاز و بتاآمیلاز در پرایمینگ بذور با تیمار شمارهٔ ۳ و پس‌از آن، بر اثر اعمال تیمار شمارهٔ ۱ مشاهده شد. دهیدروژنازها آنزیم‌هایی از گروه اکسیدورداکتازها هستند که از هر دو طریق هوازی و بی‌هوازی در تأمین انرژی برای حیات بذر و نیز فرایندهای جوانه‌زنی مشارکت می‌کنند. مقدار فعالیت دهید-

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.4.4.4]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.4.295]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.4.4.4]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.4.295]

روژنازها میتواند معیاری برای viability یا فعالیت‌های حیاتی بذر به‌شمار آید (ISTA, 1985). نتایج حاصل از این تحقیق، میزان فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز در بذور پرایم‌شده را در تمام تیمارها بالاتر از شاهد نشان داد و در باب میزان تأثیر تیمارها نیز الگویی مشابه با آنزیم‌های آمیلازی مشاهده شد.

درصورتی‌که بیان فعالیت آنزیم‌های ارزیابی‌شده به‌منزلهٔ بخشی از مجموعهٔ پروتئینی کل سلول، برحسب واحد بر میکروگرم پروتئین صورت گیرد، برتری قابل توجه مقادیر فعالیت آنزیم‌ها در تیمارهای ۸ تا ۱۳ یعنی مجموعهٔ تیمارها با گونه‌های جلبکی *Dunaliella*، نسبت به شاهد و نیز نسبت به تمام تیمارهای دیگر مشاهده میشود (داده‌ها نشان داده نشده‌اند) این امر درواقع نتیجهٔ منطقی کم‌بودن مقدار پروتئین کل در این تیمارها (شکل D) است و انتظار میرود که با بالا بودن فعالیت آنزیم‌های آمیلازی در تیمارهای ۸ تا ۱۳ و در نتیجهٔ عملکرد آنها، مقدار قند کل و قندهای احیاکنندهٔ تولید شده نیز بیشتر از تیمارهای شمارهٔ ۳ و ۱ باشد. بررسی نتایج به‌دست آمده (شکل‌های E و F) این نظر را تأیید نمیکند، به‌نحوی که مقادیر قندکل و قندهای احیاکننده، در تیمار ۳ بیش از همه و سپس در تیمار شمارهٔ ۱ مشاهده میشود. بنابراین به‌نظر میرسد که در این مورد، بیان فعالیت آنزیم برحسب یونیت فعالیت آنزیم بر وزن خشک، بتواند امکان استدلال‌های صحیح‌تری را فراهم کند (شکل‌های A، B و C).

مقایسهٔ نمودارهای فعالیت آنزیم‌های آمیلاز (برحسب یونیت بر گرم وزن خشک) با مقدار قند احیاکننده و نیز قند کل حاکی از آن است که تفاوت میان تیمارها در مقدار قند، بیشتر از تفاوت موجود میان آنها در فعالیت آنزیم‌های آمیلاز است. یک دلیل احتمالی آن است که آنزیم‌های دخیل دیگر در تجزیهٔ نشاسته، که در این تحقیق ارزیابی نشده‌اند (مثلاً آلفاگلوکوزیدازها)، از راه‌های متفاوتی تحت تأثیر تیمارهای پرایمینگ واقع شده باشند و در نهایت تفاوت‌های بیشتری در مقدار قند تولید شده مشاهده شود.

به‌هرحال برتری تیمار شمارهٔ ۳ و سپس شمارهٔ ۱، دال بر تأثیر مثبت محیط کشت‌های فاقد نمک و نیز تأثیر مثبت عناصر کم‌مصرف و پرمصرف بر بذور است که قادر به ایجاد پتانسیل اسمزی مشخص در محیط پرایمینگ بذور نیز بوده‌اند. بررسی منابع نشان میدهد که درمورد گیاهان زراعی، استفاده از عناصر کم‌مصرف، به‌صورت پرایمینگ بذر، اسپری کردن سطحی برگ و نیز استفاده در خاک میسر است که روش اول از همه مقرون به صرفه‌تر و مؤثرتر ارزیابی میشود (Farooq & Kadambot, 2012).

از نظر نوع جلبک استفاده‌شده در پرایمینگ نیز برخی تفاوت‌ها میان فاکتورهای ارزیابی‌شده مشاهده شد، به‌نحوی که افزایش فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتاآمیلاز بر اثر تیمار با جلبک *Spirulina* با یا بدون محیط کشت و افزایش فعالیت آنزیم دهیدروژناز و نیز پروتئین کل سلولی بر اثر تیمار با جلبک *Chlorella* (در هر دو حالت) ملاحظه شد. همچنین، جلبک‌های *Dunaliella* نیز در افزایش مقدار قند احیاکننده به‌همراه محیط کشت بدون نمک، مؤثرتر از دیگر تیمارها بودند. بنابراین، به‌طورکلی، به‌نظر میرسد که ازنظر نوع جلبک، تأثیری یک‌نواخت و مشابه بر کلیهٔ شاخص‌های ارزیابی‌شده وجود نداشته و این شاخص‌ها به‌صور مختلفی از تیمارهای جلبکی تأثیر پذیرفته‌اند. آزمایش‌های Haroun و Hussein در سال 2003، در پرایمینگ بذور *Lupinus termis* با سلول‌های دو نوع جلبک سبز-آبی نیز حاکی از وجود تفاوت میان دو نوع جلبک در افزایش فعالیت آنزیم‌های پروتئاز و آمینوترانسفراز بود، گرچه فعالیت آلفاآمیلاز بوسیلهٔ هر دو جلبک بطور یکسان افزایش یافت.

بررسی شاخص‌های جوانه‌زنی نیز دال بر برتری و تأثیر مثبت جلبک *Spirulina* در هر دو حالت جداشده یا در درون محیط کشت نسبت به دیگر تیمارها بوده، درحالی‌که درمورد شاخص‌های ارزیابی‌شده در گیاهچه‌های ۱۵ روزهٔ حاصل از بذور پرایم‌شده (طول و وزن خشک اندام‌ها)، این نتیجه به‌دست نیامد. در زمینهٔ تأثیر سلول‌های زندهٔ جلبک (در درون محیط کشت)، که در واقع شاید بتوان آن را نوعی بیوپرایمینگ دانست، تاکنون گزارشی ثبت نشده، اما برخی محققان تأثیرات مثبت عوامل زنده‌ای نظیر قارچ‌ها و باکتری‌ها یا در یکی دو مورد، تأثیر سوسپانسیون فیلتر شدهٔ جلبک سبزآبی یا کلاً عصارهٔ جلبکی را بر جوانه‌زنی بذور گیاهی بررسی و افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی را گزارش کرده‌اند (Kumar & Sahoo, 2011; Zhang & Ervin, 2004, 2008; Haroun & Hussein, 2003). در واقع، سرعت جوانه‌زنی شاخصی است که در صورت بالا رفتن، میتواند در سبز شدن یکنواخت کشت و نیز استقرار موفق گیاهچه‌های تولیدشده از بذر مؤثر باشد (Harris, 1996). بنابراین، افزایش سرعت

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.4.4.4]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.4.295]

جوانه‌زنی در اکثر تیمارهای اعمال شده در این تحقیق، میتواند نتیجه‌ای مثبت ارزیابی شود.

تأثیر پرایمینگ بر طول ساقه‌چه و ریشه‌چه در همهٔ موارد به‌صورت تأثیر مثبت و افزایشی نسبت به شاهد، نمایان شد که در تیمار شمارهٔ ۳، در اکثر موارد برتری نشان داد. اما وزن خشک ریشه‌چه تحت تأثیر تیمارها کاهش یافت و در ساقه‌چه نیز علیرغم افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد، مقدار افزایش‌ها بسیار اندک بود. به‌نظر میرسد علاوه‌بر وجود تفاوت در میزان حساسیت ساقه و ریشه به عوامل محیطی، احتمالاً تسریع رشد طولی ساقه و ریشه بتواند عاملی برای وقوع پدیدهٔ رقت ترکیبات درحین تقسیمات سلولی به حساب آید و سبب عدم افزایش وزن خشک ریشه و ساقه باشد (Kleinegris *et al*., 2011; Alvarado, *et al*., 2006).

در غالب مواردی که مقدار زیادی نمک، یعنی ۰/۶ درصد، در محیط کشت وجود داشت (تیمارهای ۹ و۱۲)، حضور جلبک در تیمار پرایمینگ به‌همراه محیط کشت، سبب کاهش آثار منفی نمک، بر فعالیت آنزیم‌ها و نیز شاخص‌های ارزیابی شدهٔ بذر نشد، بلکه در مواردی نیز آن را تشدید کرد (شکل ۱ و جدول ۱، تیمارهای ۹ و ۱۲ در قیاس با تیمار ۲). در این زمینه، تأثیر منفی جلبک *D. bardawil* بیشتر از *D. IR-1* بود. در واقع، بررسی‌ها نشان داده‌اند سلول‌های جلبکی قادر به ترشح برخی ترکیبات نظیر پلی‌پپتیدها، پلی‌ساکاریدها، هورمون‌ها و ویتامین‌ها به درون محیط کشت غذایی هستند که بسته به نوع سلول و ویژگی‌های محیطی به‌ویژه موقعیت تنشی نظیر حضور نمک، میتوانند متفاوت باشند و به طرق متفاوتی نیز عمل کنند (Marsalek & Rojickova, 1996). این ترکیبات حتی ممکن است برخی عناصر معدنی را از دسترس بذر خارج کنند.

اما نتایج نشان می‌دهد که در غیاب نمک، تیمارهایی که حاوی جلبک به‌علاوهٔ محیط کشت بوده‌اند، نسبت به تیمار با صرفاً سلول‌های جلبکی، تأثیر مثبت بیشتری در افزایش فعالیت آنزیم‌ها و مقدار قندها داشته‌اند (شکل ۱). به‌عبارتی حضور جلبک در این وضعیت سبب بهبود و تشدید تأثیرات مثبت محیط کشت شده است. این موارد را میتوان در تیمار ۵ نسبت به ۴، تیمار ۷ نسبت به ۶، تیمار ۱۰ نسبت به ۸ و تیمار ۱۳ نسبت به ۱۱ مشاهده کرد. بررسی‌ها نشان داده که جلبک‌های سبز-آبی ممکن است بتوانند به‌واسطهٔ تولید ترکیبات تسریع‌کنندهٔ رشد موجب تحریک جوانه‌زنی و رشد گیاهان عالی شوند (Misra & kaushik, 1989). شاخص‌های جوانه‌زنی (شکل ۲) جز در باب تیمار جلبک *Chlorella* (تیمار ۷ نسبت به ۶) این برتری را نشان ندادند.

نتیجه‌گیری

با وجود آنکه سوابق استفاده از قارچ‌ها و باکتری‌ها در پیش‌تیمار بذور در برخی گزارش‌ها وجود دارد، اما در زمینهٔ استفاده از جلبک‌ها به‌منظور پرایمینگ، تعداد بسیار معدودی گزارش موجود است. در این تحقیق، از جلبک‌ها به‌عنوان منابع غذایی و معدنی و نیز از مجموعه‌ای از عناصر پرمصرف و کم‌مصرف در قالب محیط کشت کامل برای پرایمینگ بذور زرین‌گیاه و شکست خواب آن استفاده شد. نتایج به‌دست آمده تأثیر مثبت تیمارها را بر فعالسازی و تحریک فعالیت‌های متابولیکی و آنزیمی مرتبط با جوانه‌زنی در بذر نشان داد. تأثیر محیط کشت فاقد نمک از بقیهٔ تیمارها بیشتر بود و تیمارهای جلبکی نیز به طرق مختلفی بر بذر تأثیرات محرک داشتند. افزایش نمک در محیط کشت سبب کاهش فعالیت‌های آنزیمی شد و حضور جلبک در برخی موارد آن را تشدید کرد. در موقعیت فقدان نمک، تأثیر مثبت حضور جلبک در محیط کشت از تأثیر سوسپانسیون فیلترشدهٔ جلبکی بیشتر بود.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه لرستان به جهت پشتیبانی مالی پروژه تشکر می‌گردد.

REFERENCES

Abbasian, A. and Moemeni, J. 2013. Effects of salinity stress on seed germination and seedling vigor indices of two halophytic plant species (*Agropyron elongatum* and *A. pectiniforme*). – Int. J. Agri. Crop Sci. 5: 2669-2676.

Albalasmeh, A.A., Berhe, A.A. and Ghezzehei, T.A. 2013. A new method for rapid determination of carbohydrate and totalcarbon concentrations using UV-spectrophotometry. – Carbohyd. Poly. 97, 253-261.

Allen, P.S. and Meyer, S.E. 2002. Ecology and ecological genetics of seed dormancy in downy brome. –Weed Sci. 50: 241-247.

Alvarado, C., Álvarez, P., Puerto, M., Gausserès, N., Jiménez, L. and De la Fuente, M. 2006. Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely ageing mice. – Nutr. 27: 767-777.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.4.4.4]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.4.295]

Bebawi, F.F., Eplee, R.E. and Norris, R.S. 1984. Effects of seed size and weight on witch weed (*Striga asiatica*) seed germination emergence and host parasitization. – Weed Sci. 32: 202-205.

Beck, E. and Ziegler, P. 1989. Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. – Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. 40: 95-117.

Bernfeld, P. 1955. Amylases: alpha and beta methods. – Method. Enzymol. 1: 149-158.

Black, M., Corbineau, F., Grzesik, M., Guy, P. and Come, D. 1996. Carbohydrate metabolism in the developing and maturing wheat embryo in relation to its desiccation tolerance. – J. Exp. Bot. 295: 161-169.

Bradford, M. 1979. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. – Anal. Biochem. 72: 248-254.

Brune, D.E. 2011. Aquaculture, algae and biofuels; three decades of microalgae lessons. – Southeast Bioenergy Conference.

Caffagni, d.e., Camargo, E., Casali, C.A., Lombardi, A.T. and Lima, M.I.S. 2015. Coupling microalgal cultures with hydroponics: Prospection for clean biotechnology processes. – J. Algal. Biomass. Util. 6: 88-94.

Castro, R.D., van Lammeren, A.A., Groot, S.P., Bino, R.J. and Hilhorst, H.W. 2000. Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmatic stress but DNS synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. – Plant Physiol. 122: 327-335.

Chang, Y.D., Lee, C.H., Song, J.S. and Hwang, J.K. 2009. Several factors affecting on seed germination of *Dracocephalum argunen* Fischer ex Link. – Korean J. Plant Res. 22: 236-241.

Cordell, G.A., Beecher, C.W.W. and Pezzuuto, J.M. 1991. Can ethnopharmacology contribute to the development of new anticancer drugs? – J. Ethnopharmacol. 32: 117-133.

Cox, P.A. and Balick, M.J. 1994. The ethnobotanical approach to drug discovery. – Scient. Amer. 270: 82-87.

Debeaujion, L., leon kloosterziel, K., Kloosterziel, M. and Koornneef, M. 2000. Influence of the testa on seed dormancy. Germination and longevity in *Arabidopsis*. – Plant Physiolol. 122: 403-413.

Dehghanpour, A., Farashah, H., Tavakkol-Afshari, R., Sharifzadeh, F. and Chavoshinasab, S. 2011. Germination improvement and [alpha]-amylase and [Brta]-1,3-glucanase activity in dormant and nondormant seeds of Oregano (*Origanum vulgare*). – Aust. J. Crop Sci. 5: 421-427.

De Lespinay, A., Lequeux, H., Lambillotte, B. and Lutts, S. 2010. Protein synthesis is differentially required for germination in *Poa pratensis* and *Trifolium repens* in the absence or in the presence of cadmium. – Plant Growth Regul. 61: 205-214.

Dewir, Y.H., El-Mahrouk, M.E. and Naidoo, Y. 2011. Effects of some mechanical and chemical treatments on seed germinat ion of *Sabal palmetto* and *Thrinax morrisii* palms. – Aust. J. Crop Sci. 5: 245-250.

Egley, G.H. 1984. Ethylene, nitrate and nitrite interactions in the promotion of dark germination of seeds. – Ann. Bot. 53: 833-840.

Extension, A. 2015. Organic seed treatments and coatings. Available on: http://www.extension.org:80/pages/18952/organic-seed-treatments-and-coatings.

Farooq, M., Basra S.M. and Ahmad, A.N. 2007. Imporoving the performance of transplanted rice by seed priming. – Plant Growth Regul. 51: 129-137.

Farooq, A.W. and Kadambot, H.M.S. 2012. Micronutrient application through seed treatments-a review. – J. Soil Sci. Plant Nutr. 12: 125-142.

Gealy, D.R. and Young, F.L. 1985. Germination of may weed (*Anthemis cotula*) achenes and seed. – Weed Sci. 33: 69-73.

Gohari, A., Saeidnia, S., Matsuo, K., Uchiyama, N., Yagura, T. and Michiho, K. 2003. Flavonoid constituents of *Dracocephalum kotschy* growing in Iran and their trypanocidal activity. – J. Nat. Med. 2003: 57: 250-252.

Golshani, S., Karamkhani, F., Monsef Esfehani, H.R. and Abdollahi, M. 2004. Antinociceptive effects of the essential oil of *Dracocephalum kotschy* in the mouse writhing test. – J. Pharmaceutical. Sci. 7: 76-9.

Guttridge, C.G. and Bright, S.E. 1978. Accelerating and synchronising germination of strawberry seeds by osmotic pretreatment. – Euphytica 27: 843-848.

Halmer, P. 2000. Commercial seed treatment technology. In: Black, M. and Bewley, J. D (Eds.) Seed Technology and its Biological Basis. – Sheffield Academic Press, Sheffield 257-286.

Haroun, S.A and Hussein, M.H. 2003. The Promotive effect of algal biofertilizers on growth, protein pattern and some metabolic activities of *Lupinus termis* plants grown in siliceous soil. – Asian J. Plant Sci. 2: 944-951.

Harris, D. 1996. The effects of manure, genotype, seed priming, depth and date of sowing on the emergence and early growth of *Sorghum bicolor* L. Moench in semi-arid Botswana. – Soil Tillage Res. 40: 73-88.

Hosseini, H.R., Chehrazi, M., Mahmoodi Sorestani, M., Nabati Ahmadi, D. and Sorkhe, K. 2013. Autotetraploidy induction and seed quality comparison between diploid and tetraploid Madagascar periwinkle (*Catharanthus ro-seus* cv. *rosea*) seedlings. – Int. J. Agronomy. Plant Production 4: 212-216.

ISTA, 1985. International seed testing association. –ISTA Handbook on Seedling Evaluation.

Jalali, A. and Jamzad, Z. 1999. Red data book of Iran. – Research Institute of Forests and Rangelands Iran, Tehran. 748p.

Jahaniani, F., Ebrahimi, S.A., Rahbar, R.N. and Mahmoudian, M. 2005. Xanthomicrol is the main cytotoxic component of *Dracocephalum kotschyii* and a potential anticancer agent. – Phytochem. 66: 1581-1592.

Johnson, M.K., Johnson, E.J., Macelroy, R.D., Speer, H.L. and Bruff, B.S. 1968. Effects of salts on halophilic alga *Dunaliella viridis*. – J. Bacteriol. 95: 1461-1468.

Jones, J.D., Burneth, P. and Zollman, P. 1999. The glyoxylate cycle does it function in the dormant or active seed. – Comparative Biochem. Physiolol. B- Bioc-hem. Mol. Bio. 124: 177-179.

Kader, M.A. 2005. A comparison of seed germination calculation formulae and the associated of re-sulting data.– Royal Society of New South Wales 135: 65-75.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-29]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.4.4.4]

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.4.295]

Kashem, M.A., Sultana, N., Samanta, S.C. and Kamal, A.M.A. 1995. Starch, sugar, amylase and invertase activity in the germinating seeds of modern Wheat varieties. – J. National. Sci. Council of SriLanka 23: 55-61.

Kleinegris, D.M.M., Janssen, M., Brandenburg, W.A. and Wijffels, R.H. 2011. Continuous production of carotenoids from *Dunaliella salina*. – Enzym. Microbial. Technol. 48: 253-259.

Keiffer, C. and Ungar, I. 1997. The effect of extended exposure tohypersaline conditions on the germination of five inland halophytespecies. – Am. J. Bot. 84: 104-111.

Kittock, D.L. and Law, A.G. 1968. Relationship of seedling vigour to respiration and tetrazolium chloride reduction by germinating wheat seeds. – Agronomy 60: 286-288. 169-202.

Kohli, R.K., Batish, D. and Singh, H.P. 1997. Allelopathy and its implications in agroecosystems. – J. Crop Prod. 1: 169-202.

Kossmann, J. and Lloyd, J. 2000. Understanding and influencing starch biochemistry. – Critical Rev. Biochem. Mol. Biol. 35: 141-196.

Kumar, G. and Sahoo, D. 2011. Effect of seaweed liquid extract on growth and yield of *Triticum aestivum* var. Pusa Gold. – J. App. Phycol. 23: 251-255.

Lu, Y. and Sharkey, T.D. 2004. The role of amylomaltase in maltose metabolism in the cytosol of photosynthetic cells. – Planta 218: 466-473.

Mani, U.V., Iyer, U.M., Dhruv, S.A., Mani, I.U. and Sharma, K.S. 2008. Therapeutic utility of *Spirulina*. In *Spirulina* in Human Nutrition and Health. Edited by: Gershwin ME, Belay A. Boca Raton. – CRC Press 71-99.

Marsalek, B. and Rojickova, R. 1996. Stress factors enhancing production of algal exudates: a potential self-protective mechanism? – Verlag der zeitscrift fur Naturforschung 51: 9-10.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent determination reducing sugar. – Anal. Chem. 31: 426-428.

Misra, S. and Kaushik, B.D. 1989. Growth promoting substances of cyanobacteria I. Vitamins and their influence on rice plant. Proc. Indian Natl Sci. Acad. 55: 295-300.

Muralikrishna, G. and Nirmala, M. 2005. Cereal alpha amylases: an overview. – Carbohyd. Polym. 60: 163-173.

Niittyla, T., Messerli, G., Trevisan, M., Chen, J., Smith, A.M. and Zeeman, S.C. 2004. A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. – Sci. 303: 87-89.

Oaikhena, E.E., Ajibade, G.A. and Bello, J.A.M. 2013. Dehydrogenase enzyme activities in germinating Cowpea (*Vigna Unguiculata* (L) Walp). – J. Biol. Agri. Health 3: 32-36.

Ogawa, M, Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwahara, A. and Kamiya, Y. and Yamaguchi S. 2003. Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. – The Plant Cell 15: 1591-1604.

Rechinger, K.H. 1986. Labiatae in Flora Iranica. Akademische Druck Verlagsantalt, Graz, Aust. 150.

Robert, K.M., David, A.B., Katheleen, M.B, Peter, J.K., Victor, W.R. and Weil P.A. 2009. Harper's illustrated biochemistry. – Biol. Oxidation. 28th Edition 12: 99-100.

Saeidnia, S., Gohari, A.R., Uchiyama, N., Ito, M., Honda, G. and Kiuchi, F. 2004. Two new monoterpene glycosides and trypanocidal terpenoids from *Dracocephalum kotschyi*. – Chem. and Pharmaceut. Bullt 52: 1249-1250.

Shariati, M. and Lilley R.M. 1994. Loss of intracellular glycerol from *Dunaliella* by electroporation at constant osmotic pressure - subsequent restoration of glycerol content and associated volume changes. – Plant Cell Environ. 17: 1295-1304.

Singh, A., Srivastava, S. and Singh, H.B. 2007. Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases. – Bioresource Technol. 98: 470-473.

Tang, G. and Suter, P.M. 2011. Vitamin A, nutrition, and health values of algae: *Spirulina*, *Chlorella*, and *Dunaliella*. – J. Pharmacy. Nutr. Sci. 1: 111-118.

Xie, X., Zhang, Z. and Hanzlik, S. 2007. Salicylic acid inhibits gibberellin-induced alpha-amylase expression and seed germination pathway involving an abscisicacid inducible WRKY gene. – Plant Mol. Biol. 64: 293-303.

Younis, A.F. and Hatata, M.A. 1971. Studies on the effects of certain salts on germination, on growth of root and on metabolism. I. Effects of chlorides and sulfates of sodium, potassium and magnesium on germination of wheat grains. – Plant and Soil 34: 183-200.

Yaklich, R.W. and Orzolek, 1977. Effect of poly ethylene glycol-6000 on pepper seed. – Hort Sci. 12: 263-264.

Zargari, A. 1990. Medicinal Plants. 4th ed. – Tehran University Publications, Tehran 42-45.

Zhang, X.Z. and Ervin, E.H. 2004. Cytokinin–containing seaweed and humic acid extracts associated with creeping bentgrass leaf cytokinins and drought resistance. – Crop Sci. 44: 1737-1745.

Zhang, X.E. and Ervin, H. 2008. Impact of seaweed extract-based cytokinins and zeatin riboside on creeping bentgrass heat tolerance. – Crop Sci. 48: 364-370.

*****

Ghannad, R., Akbari, F. and Madadkar Haghjou, M. 2017. Effects of blue-green and green algae *Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella* and minerals on the stimulation of metabolic and biochemical processes of germination in *Dracocephalum kotschyi* Boiss. seeds. – Nova Biol. Rep.: 3: 295-307.

قناد، ر.، اکبری، ف. و مددکارحق جو، م. ۱۳۹۵. اثر جلبک‌های سبز-آبی و سبز *Spirulina*، *Chlorella*، *Dunaliella* و عناصر معدنی بر تحریک فرایندهای متابولیکی و بیوشیمیایی جوانه‌زنی بذر زرین‌گیاه (*Dracocephalum kotschyi* Boiss.). – یافته‌های نوین در علوم‌زیستی ۳: ۳۰۷-۲۹۵.