

تأثیر محلول پاشی گاما-آمینو بوتیریک اسید بر ویژگی های فیزیولوژیکی گوجه فرنگی

رقم نامیب تحت تنش شوری

لولو زارعی^۱، محمود کوشش صبا^{۲*}، یاور وفایی^۳ و تیمور جوادی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

۲- نویسنده مسئول: دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران (m.saba@uok.ac.ir)

۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

۴- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۴/۱۰

چکیده

تنش شوری و تجمع املاح در سطح خاک، یکی از مهم ترین تنش های غیرزیستی محدودکننده تولید محصولات کشاورزی در مناطق خشک و نیمه خشک ایران می باشد. یکی از روش های به حداقل رساندن اثرات مضر تنش شوری استفاده از محلول پاشی برگی برخی مواد شیمیایی مانند گاما-آمینو بوتیریک اسید (گابا) برای افزایش تحمل به شوری گیاه است. این پژوهش با هدف بررسی تغییرات فیزیولوژیکی گوجه فرنگی تحت تنش شوری و تیمار گابا صورت گرفت. تیمار شوری در دو سطح صفر (شاهد) و ۵۰ میلی مولار و تیمار گابا در سه غلظت صفر، ۱۰ و ۲۰ میلی مولار به صورت محلول پاشی برگی اعمال شد. خصوصیات فیزیولوژیکی شامل محتوای نسبی آب برگ، شاخص پایداری غشاء سلولی، پرولین، پروتئین محلول کل و فعالیت آنزیم ها، کلروفیل a، b و کل و میزان قندهای محلول اندازه گیری شدند. گابا سبب افزایش در محتوای نسبی آب برگ، پایداری غشاء سلولی، میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل، کاروتنوئید، کربوهیدرات های محلول کل، پرولین، فعالیت آنزیم های پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز نسبت به گوجه فرنگی تیمار شاهد گردید. بنابراین، در شرایط تنش شوری استفاده از گابا به عنوان یک اسمولیت سازگار که موجب بهبود خصوصیات فیزیولوژیکی گوجه فرنگی شده، توصیه می شود.

کلید واژه ها: فعالیت آنزیمی، کربوهیدرات های محلول کل، محتوای نسبی آب برگ، میزان پرولین آزاد

مقدمه

(and Davenport, 2003). مطالعات بیوشیمیایی و مولکولی نشان داده اند که تنش شوری در گیاهان باعث افزایش قابل توجه گونه های فعال اکسیژن (ROS)، شامل سوپراکسید (O_2^-)، رادیکال هیدروکسیل (OH) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می شود (Tanou et al., 2009). تنش شوری سرعت فتوسنتز را از طریق راه های مختلفی، از جمله کاهش عرضه CO_2 به روزنه ها، سمیت نمک، کاهش نفوذپذیری غشاء سلول به CO_2 و افزایش پیری کاهش می دهد (Kafi and Rahimi, 2011). در شرایط تنش شوری میزان پرولین و قندهای محلول افزایش

تنش شوری یکی از جدی ترین عوامل محدودکننده رشد محصول و تولید در مناطق خشک است به طوری که حدود ۲۳ درصد اراضی کشاورزی جهان شور و ۳۷ درصد سدیمی است و به طور میانگین آب های موجود در کره زمین حاوی ۳۰ گرم در لیتر نمک می باشند (Sotriopoulos, 2007; Khan and Duke, 2001). شوری می تواند بر رشد گیاه تأثیر بگذارد زیرا غلظت بالای نمک در محلول خاک در جذب متعادل عناصر ضروری توسط گیاهان تداخل ایجاد می کند (Tester

تنش شوری نقش دارد. در گیاهان چند نقش سیگنالی از جمله دخالت در تنظیم pH، ذخیره سازی نیتروژن، رشد گیاه و دفاع در برابر تنش های غیرزنده مانند خشکسالی، تنش اکسیداتیو، شوری و تنش سرمایی به گابا نسبت داده شده است (Shelp et al., 2012). تیمار خارجی گابا آسیب اکسیداتیو ناشی از سمیت H^+ و Al_3 در جو و آسیب سرمایی در میوه هلو را توسط القای تجمع پرولین و افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی کاهش داده است (Shang et al., 2011; Song et al., 2010). نقش گابا در رابطه با واکنش های تنشی به دلیل تجمع آن در گیاه پس از قرار گرفتن در معرض طیف وسیعی از تنش ها از جمله آسیب های مکانیکی، شوری، گرما، سرما و خشکی پیشنهاد شده است (Kinnersley and Turano, 2000). هدف از انجام این آزمایش بررسی تیمار گابا بر خصوصیات فیزیولوژیکی گوجه فرنگی رقم نامیب تحت تنش شوری می باشد.

مواد و روش ها

مواد گیاهی

بذر گوجه فرنگی رقم نامیب در گلخانه تحقیقاتی گروه علوم باغبانی دانشگاه کردستان در ظرف های یکبار مصرف در مخلوطی از پرلیت، ورمی کولیت و کوکوپیت به نسبت ۱:۱:۱ در ماه خرداد ۱۳۹۴ کاشته شد. نشای دو ماهه با ۱۵ سانتی متر طول به گلدان های ۱۰ لیتری حاوی محیط کشت کوکوپیت و پرلایت به نسبت ۱ به ۱ منتقل شد. نشاها به صورت یک روز در میان آبیاری (۵۰۰ میلی لیتر) و یا با محلول غذایی هوگلند (۵۰۰ میلی لیتر) تغذیه شدند. دو هفته بعد از استقرار بوته ها و با ظهور اولین خوشه گل تیمار شوری در دو سطح صفر (شاهد) و ۵۰ میلی مولار و تیمار گابا در سه غلظت صفر، ۱۰، ۲۰ میلی مولار به صورت محلول پاشی برگ (به صورت یکنواخت و به گونه ای که تمام سطح برگ ها را فرا گیرد) در سرتاسر بوته ها اعمال شد. جهت تهیه تیمار محلول پاشی مقدار مشخص گابا توزین و در آب مقطر حل گردید و به همه محلول ها ۰/۵ درصد توین-۲۰ اضافه گردید. محلول پاشی گابا به فاصله دو هفته یک بار سه بار انجام شد. از برگ ها در اواخر شهریور ۱۳۹۴

می یابد (Houimli et al., 2010). یکی از روش های به حداقل رساندن اثرات مضر تنش شوری استفاده از محلول پاشی برخی مواد شیمیایی برای افزایش تحمل به شوری گیاه با کاهش سدیم و کلر است (El-Fouly et al., 2000).

گوجه فرنگی با نام علمی *Lycopersicon esculentum* متعلق به خانواده سولاناسه^۱ می باشد. تولید جهانی این محصول در حال حاضر ۱۶۳ میلیون تن میوه تازه از ۴/۷ میلیون هکتار است (FAO, 2013). گوجه فرنگی یکی از سبزیجات مورد علاقه و پرمصرف در ایران است که میوه آن سرشار از مواد معدنی، ویتامین ها و ترکیبات آنتی اکسیدانی بوده و از مهم ترین محصولات باغبانی جهان در ارتباط با سلامت انسان به شمار می آید (Dorais et al., 1998). در حال حاضر این محصول ۲۵ درصد از کل تولیدات سبزی جهان را به خود اختصاص داده است. گوجه فرنگی می تواند برای مطالعه تأثیر زمین های شور و استفاده از آب های دارای املاح از طریق بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی و ژنتیکی این گونه مورد استفاده قرار گیرد.

گاما-آمینو بوتیریک اسید^۲ (گابا) یک آمینواسید چهار کربنه است که در باکتری ها، گیاهان و جانوران مشاهده شده است (Fait et al., 2006). چندین مطالعه گزارش کرده اند که گابا اغلب در گیاهان در پاسخ به تنش های زنده و غیرزنده شامل خشکی، شوری، زخم، کمبود اکسیژن، شوک گرمایی و آلودگی عوامل بیماری زا سریعاً تجمع می یابد (Deewatthanawong et al., 2010). گابا یک سیگنال مولکولی خارجی است که نقش مهمی در تنظیم پاسخ به تنش، رشد و توسعه گیاه دارد (Song et al., 2010). تجمع گابا در پاسخ به CO_2 بالا و یا O_2 پایین انبار در توت فرنگی و گوجه فرنگی گزارش شده است (Yin et al., 2005). Shi et al. (2010) گزارش کردند که گابا در تولید اتیلن و پراکسید هیدروژن در ریشه های *Caragana intermedia* تحت

1- Solanaceae

2- Gamma-aminobutyric acid

نمونه‌گیری شد و در یخچال منفی ۷۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند، هم‌چنین خصوصیات فیزیولوژیکی شامل محتوای نسبی آب برگ، شاخص پایداری غشاء سلولی، پرولین، پروتئین محلول کل و فعالیت آنزیم‌ها، کلروفیل a، b و کل و میزان قندهای محلول در نمونه‌های برگ‌ی اندازه‌گیری شد.

$$MSI = (1 - (C1 - C2)) \times 100$$

C1 = هدایت الکتریکی پس از قرار گرفتن در معرض دمای ۴۰ درجه و C2 = هدایت الکتریکی پس از قرار گرفتن در معرض دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس

اندازه‌گیری میزان کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید

جهت اندازه‌گیری میزان کلروفیل، ۰/۱ گرم نمونه برگ وزن کرده و با ازت مایع پودر شدند سپس در هاون چینی حاوی ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد (حجمی) و ۰/۱ گرم منیزیم اکسید کاملاً ساییده شدند و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ (HERMLE Z206A) قرار داده شدند. سپس توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-S2100) میزان جذب آن‌ها در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر قرائت گردید و با استفاده از روابط زیر میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید محاسبه شدند. میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و میزان کاروتنوئید برحسب میلی‌گرم در گرم وزن تازه بیان شد (Lichtenthaler and Buschmann, 2001).

$$Chl_a (mg mL^{-1}) = (12.25 \times A_{663}) - (2.79 \times A_{646})$$

$$Chl_b (mg mL^{-1}) = (21.21 \times A_{646}) - (5 \times A_{663})$$

$$Ch_{total} (mg mL^{-1}) = Chl_a + Chl_b$$

$$Cartenoid (mg mL^{-1}) = ((1000 \times A_{470}) - (1.8 \times Chl_a) - (85.02 \times Chl_b)) / 198$$

میزان پرولین آزاد

برای اندازه‌گیری میزان پرولین آزاد بافت برگ ابتدا ۰/۵ گرم از بافت تازه برگ توزین شده و در هاون چینی در ۱۰ میلی‌لیتر محلول آبی اسید سولفوسالیسیلیک ۳ درصد به خوبی سائیده شد و سپس مخلوط هموژنیزه شده به مدت ۵ دقیقه با دور ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول روشن‌ور را به لوله‌های درب‌دار منتقل نموده و به تمام لوله‌ها ۲ میلی‌لیتر معرف ناین هیدرین و ۲

به منظور اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ، برگ‌های کاملاً توسعه یافته را قطع کرده و پس از توزین تکه‌های برگ به کمک ترازوی دیجیتال (با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم)، وزن تر آن‌ها محاسبه شد. تکه‌های برگ وزن شده به پتری‌دیش‌های درب‌دار حاوی آب مقطر منتقل شده و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) و در تاریکی قرار داده شدند. پس از خارج کردن نمونه‌های برگ‌ی از آب مقطر جهت حذف رطوبت اضافی، آن‌ها را در بین دو لایه دستمال کاغذی خشک نموده و سپس برای به دست آوردن وزن آماس، دوباره وزن شدند. پس از تعیین وزن آماس، قطعات برگ‌ی را به آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد منتقل کرده و پس از ۲۴ ساعت، وزن خشک آن‌ها تعیین شد. در نهایت محتوای نسبی آب برگ با استفاده از رابطه زیر به صورت درصد محاسبه شد (Galmes et al., 2007).

محتوای نسبی آب برگ (RWC)

محتوای نسبی آب برگ (RWC) = [(وزن خشک - وزن تر) / (وزن خشک - وزن تورژسانس $\times 100$)]

شاخص پایداری غشاء سلولی (MSI)

به منظور اندازه‌گیری شاخص پایداری غشاء سلولی، دیسک‌هایی از برگ قطع شده و ۰/۴ گرم از دیسک‌ها با آب مقطر شسته شده و در لوله‌های حاوی ۱۰ میلی‌متر آب مقطر قرار داده شدند. لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۴۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند و هدایت الکتریکی آن‌ها پس از سرد شدن تا دمای ۲۵ درجه سلسیوس با دستگاه هدایت‌سنج قرائت شد (C1). سپس فالکن‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در آب ۱۰۰ درجه

1- Relative Water Content (RWC)

2- Membrane Stability Index (MSI)

میلی لیتر اسید استیک گلاسیال اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند و بلافاصله پس از خارج کردن از حمام آب به مدت چند دقیقه در حمام یخ قرار گرفتند. سپس به هر لوله آزمایش ۴ میلی لیتر تولوئن اضافه شده و نمونه‌ها تکان داده شدند تا کاملاً یکنواخت شوند. سپس در داخل لوله آزمایش ۲ فاز روئی و زیرین کاملاً از هم قابل تشخیص شده و فاز روئی را که به رنگ قرمز و حاوی پرولین محلول در تولوئن بود برداشته و در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد (Bates et al., 1973). غلظت پرولین بر حسب میلی گرم بر گرم بافت تازه برگ بیان شد.

کربوهیدرات‌های محلول کل برگ

جهت اندازه گیری کربوهیدرات‌های محلول کل برگ، ۰/۱ گرم از بافت برگ توزین شده و با ازت مایع در هاون چینی پودر کرده و با ۵ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد کاملاً ساییده شد و سپس عصاره روئی را در فالکن ریخته و ته مانده برگی دوباره با ۱۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد ساییده و به فالکن اضافه گردید. سپس در دستگاه سانتریفیوژ با ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۱ میلی لیتر از عصاره الکلی را برداشته و در لوله فالکن ریخته و ۳ میلی لیتر آنترون تازه تهیه شده (۱۵۰ میلی گرم آنترون + ۱۰۰ میلی لیتر اسید سولفوریک ۷۲ درصد) به آن افزوده شد. جهت ایجاد فاز رنگی، لوله‌های فالکن به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند و بعد از سرد شدن ۱/۵ میلی لیتر از فاز روئی با ۱/۵ میلی لیتر محلول کالیبره (۱ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد + ۳ میلی لیتر آنترون) را در کووت ریخته و میزان جذب در طول موج ۶۲۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت گردید (Irigoyen et al., 1992). غلظت کربوهیدرات‌های محلول کل بر حسب میلی گرم بر گرم بافت تازه برگ بیان شد.

اندازه گیری پروتئین‌های محلول کل

به منظور سنجش غلظت پروتئین‌های محلول کل، ۰/۲ گرم نمونه برگی را وزن کرده در هاون چینی ریخته و

همزمان ازت مایع اضافه شد؛ و در حین خرد کردن برگ ۲۰ میلی گرم (پلی وینیل پروپیلیدین) PVP به آن اضافه شد و در حین هم زدن ۱/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم (pH=7) حاوی سدیم متابی سولفیت (۰/۰۱۹ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر بافر) به آن اضافه شد. ترکیب حاصله به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور و در دمای ۴ درجه سانتی گراد در سانتریفیوژ یخچال دار (HETTCH, MICRO, Germany) سانتریفیوژ گردید. پس از اتمام سانتریفیوژ، فاز روئی را که حاوی پروتئین‌های محلول نمونه بود، با سمپلر خارج نموده و ۵۰۰ میکرو لیتر از عصاره با ۱۷۵ میکرو لیتر گلیسرول ۵۰ درصد مخلوط شد. برای اندازه گیری غلظت پروتئین، ۳۰ میکرو لیتر عصاره استخراج شده را به همراه ۷۲۰ میکرو لیتر محلول برادفورد مخلوط نموده و پس از ۵ دقیقه، میزان جذب نوری محلول در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-2100 قرائت شد. جهت رسم منحنی استاندارد از سرم آلومین گاوی (BSA) استفاده شد (Bradford, 1976). با توجه به منحنی استاندارد و میزان جذب نوری در طول موج ۵۹۵ نانومتر، پروتئین نمونه‌ها بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر ارائه شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

به منظور سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز از مواد زیر استفاده شد: ۷۸۰ میکرو لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار pH=6/6، ۹۰ میکرو لیتر گایاکول ۱ درصد، ۹۰ میکرو لیتر پراکسید هیدروژن ۰/۳ درصد. مواد فوق را در بستر یخ در یک کووت (۱ میلی لیتری) باهم مخلوط کرده و بلافاصله ۲۰ میکرو لیتر عصاره پروتئینی استخراج شده از برگ گوجه‌فرنگی که حاوی آنزیم‌های گیاهی است به کووت اضافه گردید (Hemeda and Kelin, 1990). منحنی تغییرات جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Analytik JENA, SPECIRD210) در مدت ۶۰ ثانیه قرائت شده و در نهایت فعالیت آنزیم پراکسیداز بر حسب میکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه شده در میلی گرم پروتئین در دقیقه گزارش شد.

نتایج و بحث

محتوای نسبی آب برگ (RWC)

اثر متقابل تنش شوری و گابا بر محتوای نسبی آب برگ در این آزمایش معنی‌دار بود، به گونه‌ای که بیشترین محتوای نسبی آب برگ مربوط به تیمارهای گابا ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار بدون تنش شوری و کمترین مقدار آن مربوط به تیمار شوری ۵۰ میلی‌مولار بدون گابا بود (شکل A-۱). محتوای نسبی آب، وضعیت روزنه‌ها و تعرق برگ‌ها را بهتر نشان می‌دهد. گیاهان تیمار شده با گابا دارای محتوای نسبی آب برگ بیشتری نسبت به تیمارهای شاهد در شرایط تنش شوری بودند. قبلاً نیز گابا به‌عنوان یک اسمولیت سازگار تحت تنش اسمزی گزارش شده است (Shelp et al., 1990). در نتیجه، تجمع این اسمولیت در سلول‌های گیاهی منجر به حفظ تورژسانس سلولی و هم‌چنین محافظت از غشای سلولی، پروتئین و سوخت‌وساز گیاه از طریق جلوگیری از هدر رفت آب سلول می‌گردد. تحقیقات روی آراییدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) نشان داد که گابا به‌عنوان یک مولکول سیگنال دهنده در هماهنگی با هورمون‌های گیاهی مانند اسید آبسزیک و اتیلن عمل می‌کند (Krishnan et al., 2013)؛ بنابراین می‌توان اظهار داشت که گابا با افزایش تجمع آبسزیک اسید می‌تواند باعث کاهش اندازه منافذ روزنه در عکس‌العمل به تنش گردد و در نهایت موجب کاهش هدر رفت آب، کاهش هدایت روزنه‌ای و تحمل بیشتر تنش گردد.

شاخص پایداری غشاء سلولی (MSI)

اثر متقابل تنش شوری و گابا بر شاخص پایداری غشاء سلولی معنی‌دار بود، به طوری که بیشترین میزان آن مربوط به تیمار گابا ۲۰ میلی‌مولار بدون شوری و گابا ۲۰ میلی‌مولار به علاوه شوری ۵۰ میلی‌مولار بود و کمترین مقدار آن در تیمار شوری ۵۰ میلی‌مولار مشاهده گردید (شکل B-۱). تنش خشکی باعث کاهش محتوای نسبی آب برگ و افزایش میزان مالون دی‌آلدئید در گیاهان چچم چند ساله گردیده و کاربرد خارجی گابا (با غلظت ۵۰ میلی‌مولار)

$$\text{Activity (u/ml)} = \Delta A_{290} \times 0.5 \times Vt \times df / \varepsilon \times l \times t \times Vs$$

ضریب مولکولی اجزای واکنش = ۰/۵

Vt = حجم مخلوط واکنش، df فاکتور رقیق‌کننده (آب مقطر استریل)، Vs = حجم عصاره آنزیمی، ε = ضریب خاموشی ($8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)، t = زمان (۶۰ ثانیه) و l = طول مسیر عبور نور از مخلوط واکنش

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

به منظور سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، ۲۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار $\text{pH} = 7.8$ را تهیه نموده سپس ۰/۰۳۵ گرم ال-متیونین، ۰/۰۰۴ گرم NBT و ۷/۵ میکرولیتر تریتون ۱۰۰X را به آن اضافه نموده و به‌طور جداگانه ۰/۰۰۱۱ گرم ریوفلاوین را در ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل نمودیم، سپس ۱ میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم، ۱۰ میکرولیتر ریوفلاوین و ۲۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی استخراج شده را باهم مخلوط و در میکرو تیوب ریخته شدند. میکرو تیوب‌ها در فاصله ۳۵ سانتی‌متری از لامپ فلورسنت ۱۵ وات به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. در این آزمایش یک نمونه شاهد مورد استفاده قرار گرفت که بدون عصاره آنزیمی بود. جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Beyer and Fridovich, 1987). میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر حسب واحد در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

$$\text{SOD فعالیت} = \left[\left(\frac{A_{max} - A_{560}}{A_{max}} \times 100 \right) \right] / \text{protein}$$

A_{max} = جذب در نمونه شاهد

تجزیه و تحلیل اطلاعات

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل با دو عامل شوری (در دو سطح) و گاما-آمینوبوتریک اسید (در سه سطح) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد و آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار MSTATC، مقایسه میانگین‌ها با روش حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) صورت گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2016 استفاده شد.

اکسایشی، باعث حذف رادیکال‌ها و مانع از تخریب بافت غشای سلولی و از جمله غشاء کلروپلاست می‌گردد.

میزان پرولین آزاد

نتایج حاصل نشان داد که اثر متقابل تنش شوری و تیمار گابا بر میزان پرولین آزاد معنی‌دار بود. بیشترین مقدار پرولین در تیمار ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار گابا تحت تنش شوری مشاهده گردید و بین سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل A-۳). در شرایط تنش شوری میزان پرولین و قندهای محلول افزایش می‌یابد (Houimli *et al.*, 2010). پرولین منبعی برای ذخیره کربن، نیتروژن و تصفیه‌کننده رادیکال‌های آزاد می‌باشد، همچنین سبب حفظ ساختار غشای سلول و پروتئین‌ها می‌گردد (Jalili marandi *et al.*, 2009). در تنش خشکی و شوری آنزیم گلوتامات لیگاز^۱ برای تبدیل گلوتامین به پرولین فعال می‌گردد، پرولین در حفظ فشار اسمزی و آنزیم‌های سیتوپلاسمی، نقش اصلی دارد و با حذف رادیکال‌های آزاد، مانع آسیب رسیدن به غشاء سلولی می‌شود (Kavikishore *et al.*, 2005). Shang *et al.* (2011) گزارش کردند که تیمار پس از برداشت میوه هلو با گابا موجب افزایش فعالیت OAT (اورنیتین گاما آمینو ترانسفراز)، P5CS (پرولین-۵-کربوکسیلاز سنتتاز) و کاهش فعالیت PDH (پرولین دی‌هیدروژن)، در میوه هلو و افزایش در میزان پرولین می‌گردد. متابولیت‌هایی مانند گابا و سایر قندها یا قندهای الکلی مانند سوربیتول و مانیتول، اسیدهای آمینه و آمین‌ها، تحت تنش در گونه‌های گیاهی مختلف تجمع می‌یابند. این متابولیت‌ها می‌توانند به‌عنوان اسمولیت‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها به گیاهان برای تحمل تنش کمک کنند (Krishnan *et al.*, 2013).

کربوهیدرات‌های محلول کل

اثر متقابل تنش شوری و گابا بر میزان کربوهیدرات‌های محلول کل معنی‌دار بود. نتایج آزمایش نشان داد که تنش شوری سبب افزایش مقدار کربوهیدرات‌های محلول کل می‌شود، به‌طوری‌که بیشترین میزان کربوهیدرات در تیمار ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار گابا تحت تنش شوری

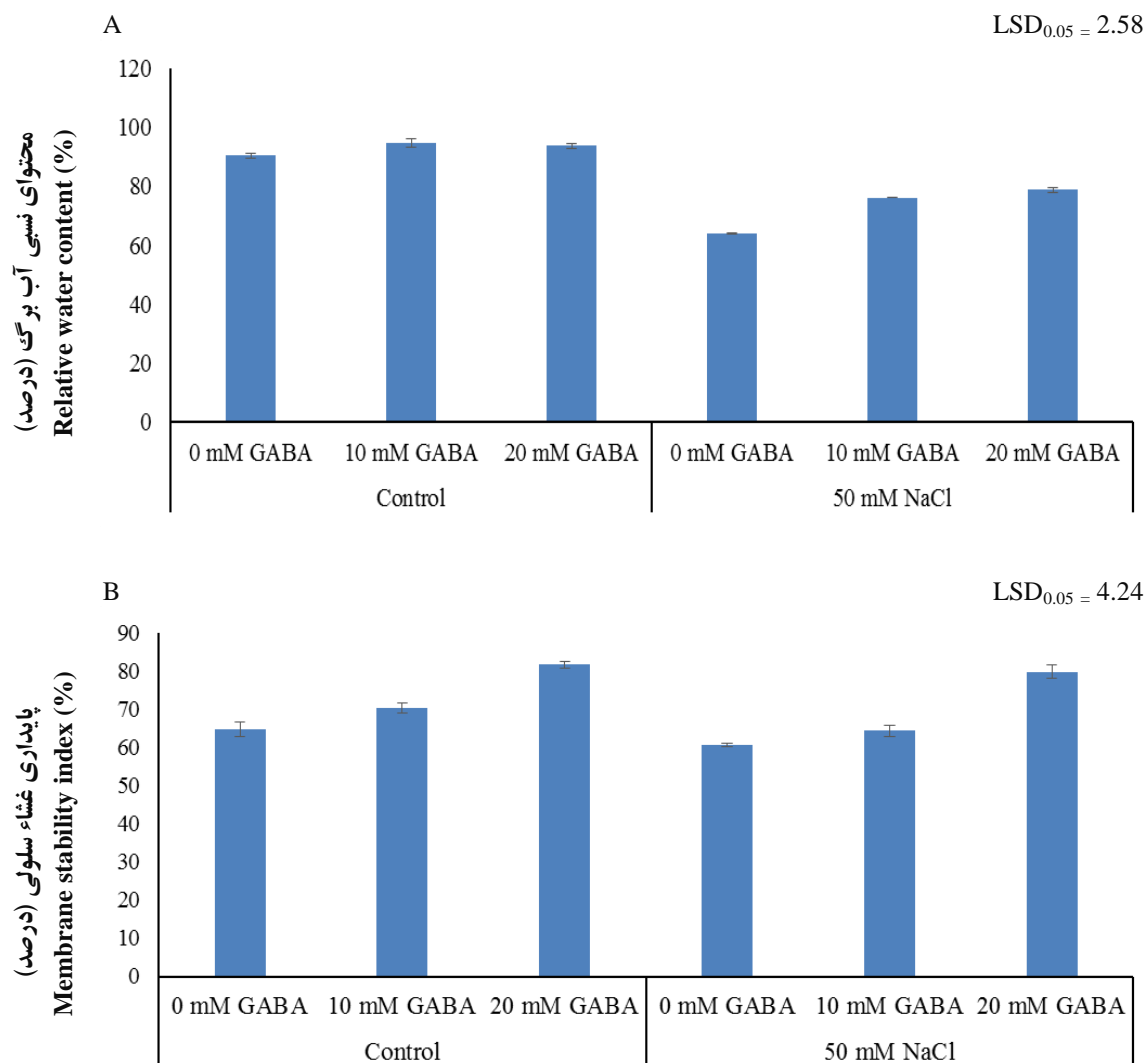
باعث افزایش محتوای نسبی آب برگ و کاهش میزان مالون دی‌آلدئید از طریق حفظ پایداری غشاء گردیده است (Krishnan *et al.*, 2013). گابا احتمالاً از طریق افزایش آنزیم‌های ضد اکسایشی همانند پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش داده و در نتیجه سبب افزایش پایداری غشاء سلولی می‌شود. نتایج نشان داد که محلول پاشی گابا به‌طور قابل توجهی از کاهش پایداری غشاء سلولی تحت تنش شوری جلوگیری کرده است.

میزان کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید

اثر متقابل تنش شوری و محلول پاشی گابا بر میزان کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود، به‌طوری‌که بیشترین میزان کلروفیل a (شکل A-۲) و کاروتنوئید (شکل D-۲) در تیمار شاهد و غلظت ۱۰ میلی‌مولار گابا بدون تنش شوری و کمترین مقدار آن‌ها در تنش شوری ۵۰ میلی‌مولار بدون کاربرد گابا مشاهده گردید. بیشترین میزان کلروفیل b در تیمار بدون شوری با غلظت ۱۰ میلی‌مولار گابا مشاهده شد و بین سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل B-۲). کلروفیل کل در تیمار ۱۰ میلی‌مولار گابا بدون تنش شوری بیشترین مقدار را داشت و بین سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (شکل C-۲). نتایج نشان می‌دهد که محلول‌های غذایی شامل نمک به خصوص کلرید سدیم می‌تواند باعث کاهش غلظت کلروفیل برگ شود. در اثر تنش شوری و خشکی میزان کلروفیل کاهش می‌یابد، زیرا گلوتامات که ماده پیش ساخته کلروفیل و پرولین می‌باشد، صرف تولید پرولین می‌شود (Molazem *et al.*, 2010). دلیل دیگر کاهش کلروفیل مصرف نیتروژن در سنتز پرولین است. پرولین در حفظ فشار اسمزی و آنزیم‌های سیتوپلاسمی، نقش اصلی دارد و با حذف رادیکال‌های آزاد، مانع آسیب رسیدن به غشاء سلولی می‌شود (Sivritepe *et al.*, 2010). افزایش در تولید اتیلن در رابطه با افزایش نمک سبب کاهش سنتز کلروفیل می‌شود (Shaha, 2007). تأثیر گابا را چنین می‌توان توجیه کرد که گابا با افزایش سطوح آنتی‌اکسیدانی در گیاه و بالا بردن ظرفیت ضد

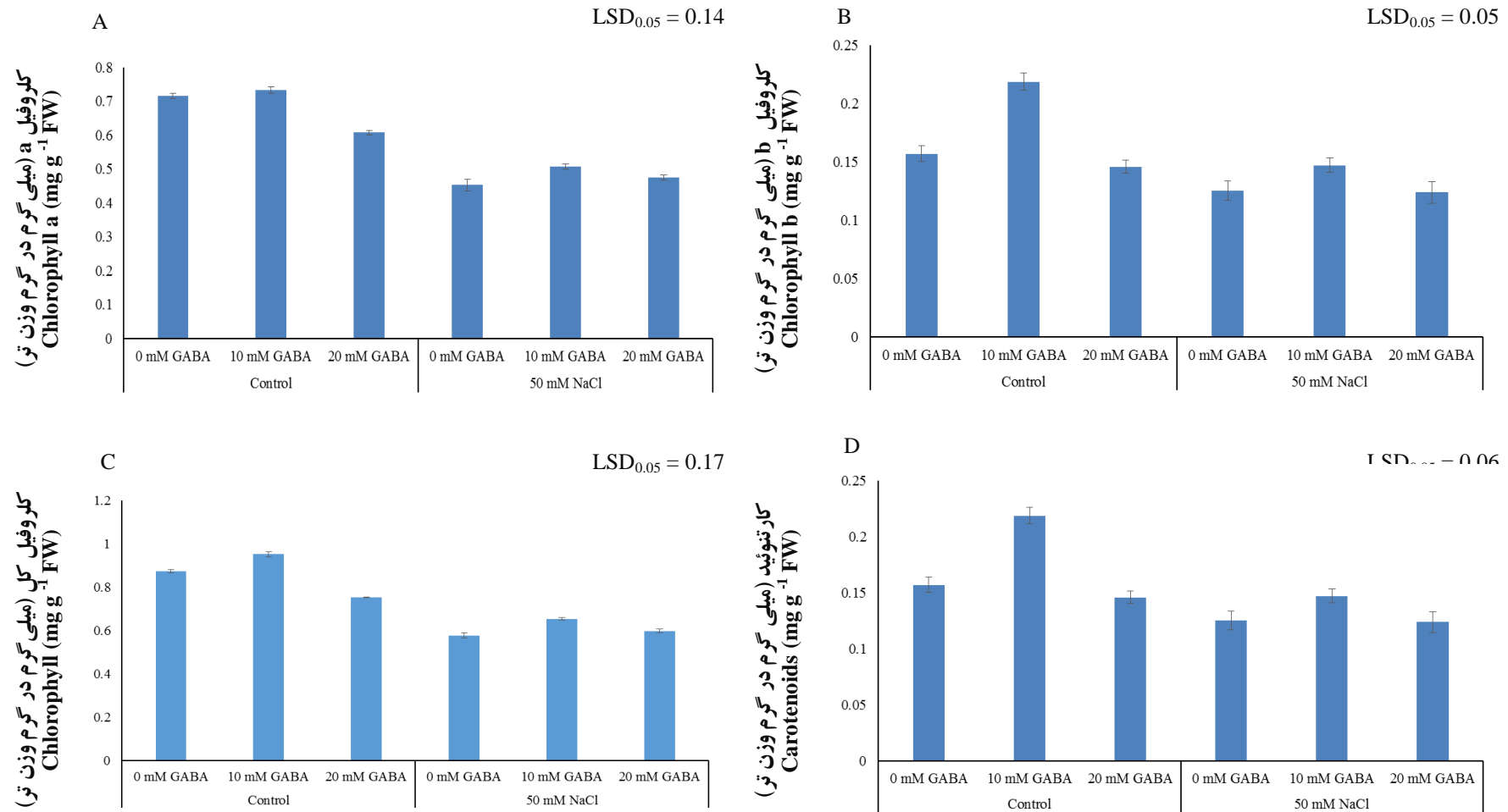
(Jalili marandi *et al.*, 2009). تنش‌های محیطی مانند شوری و خشکی موجب افزایش قندهای محلول نظیر ساکارز، گلوکز و فروکتوز در برگ‌ها می‌شود (Sotriopoulos, 2007)، زیرا قندها از اسمولیت‌های سازگار هستند و در تنظیم اسمزی، برای حفظ آماس سلول‌ها و پایداری پروتئین‌ها و غشاء سلولی نقش عمده دارند (Ashraf, 2004). تجمع کربوهیدرات‌های محلول در پاسخ به تنش‌های محیطی در ارتباط با حفاظت غشاهای سلولی و یا احتمالاً تنظیم اسمزی می‌باشد.

و کمترین مقدار آن در تیمار بدون شوری با غلظت‌های صفر، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار گابا مشاهده شد (شکل B-۳). در سلول‌های گیاهان برای جلوگیری از پلاسمولیز و برقراری آماس سلولی، تحت شرایط تنش‌های محیطی مانند شوری و خشکی، مولکول‌های درشت مانند نشاسته و ساکارز به مولکول‌های کوچک‌تر نظیر گلوکز و فروکتوز شکسته می‌شوند که سبب منفی‌تر شدن پتانسیل آب در سلول‌ها و تنظیم اسمزی می‌شود. عامل دیگر افزایش غلظت قند در سلول کاهش مصرف قند می‌باشد



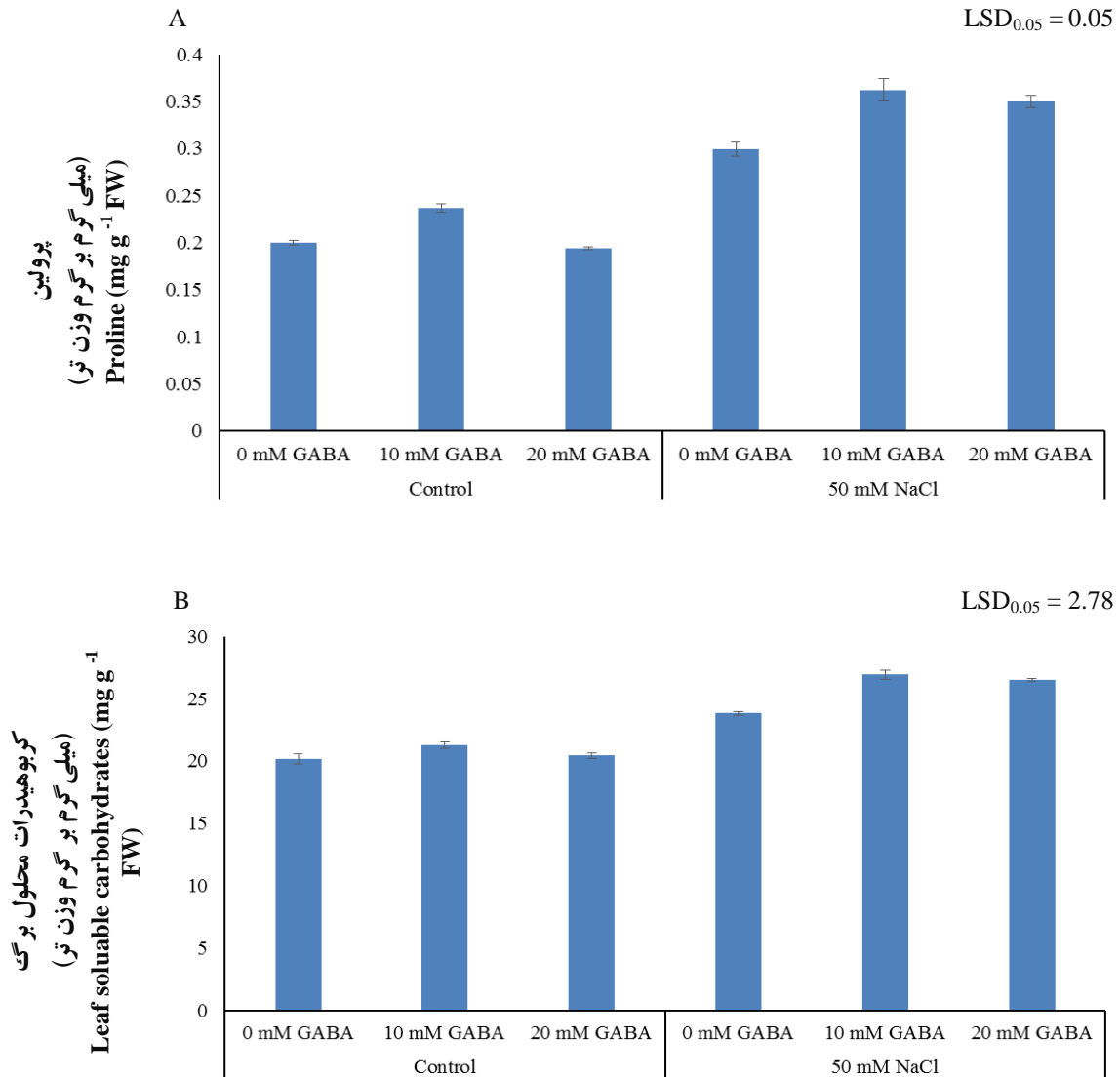
شکل ۱- تغییرات محتوای نسبی آب برگ (A) و شاخص پایداری غشاء سلولی (B) در برگ‌های گوجه‌فرنگی رقم نامیب تیمار شده با گابا (صفر، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار) تحت تنش شوری (صفر و ۵۰ میلی‌مولار). داده‌ها بیانگر میانگین \pm خطای استاندارد (n=3)

Figure. 1 Relative water content (A) and membrane stability index (B) changes in tomato CV Namib leaf treated with 0, 10 and 20 mM GABA under salinity condition (0 and 50 mM NaCl). Data represent means \pm SE (n=3)



شکل ۲- تغییرات میزان کلروفیل a (A)، کلروفیل b (B)، کلروفیل کل (C) و میزان کاروتنوئید (D) در برگ‌های گوجه‌فرنگی رقم نامیب تیمار شده با گابا (صفر، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار) تحت تنش شوری (صفر و ۵۰ میلی‌مولار). داده‌ها بیانگر میانگین \pm خطای استاندارد (n=3)

Figure 2. Chlorophyll a (A), chlorophyll b (B), total chlorophyll (C) and carotenoids (D) changes in tomato CV Namib leaf treated with 0, 10 and 20 mM GABA under salinity condition (0 and 50 mM NaCl). Data represent means \pm SE (n=3)



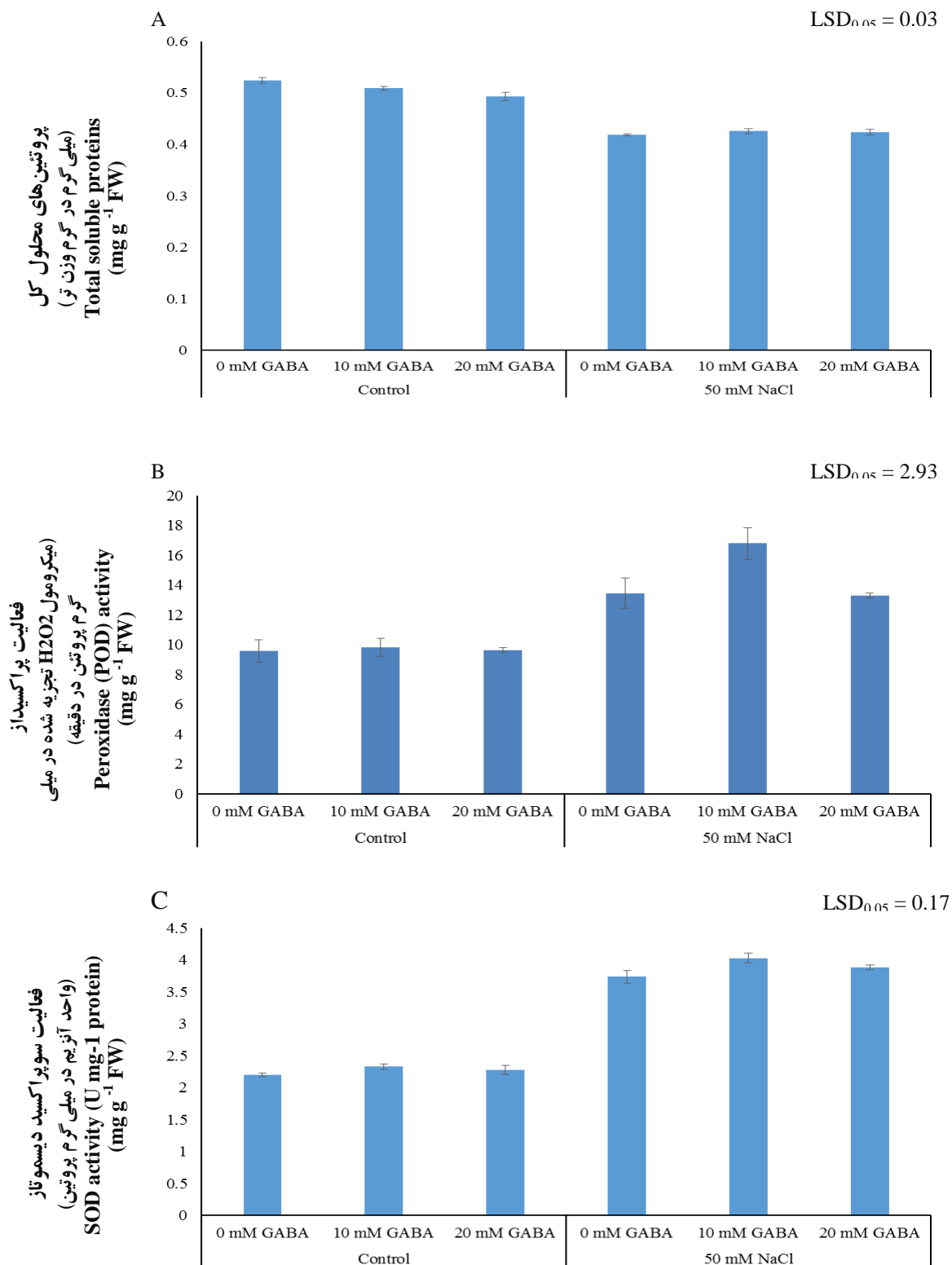
شکل ۳- تغییرات میزان پرولین (A) و کربوهیدرات‌های محلول برگ (B) در برگ‌های گوجه‌فرنگی رقم نامیب تیمار شده با گابا (صفر، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار) تحت تنش شوری (صفر و ۵۰ میلی‌مولار). داده‌ها بیانگر میانگین \pm خطای استاندارد (n=3)

Figure 3. Proline (A) and total soluble carbohydrates (B) changes in tomato CV Namib leaf treated with 0, 10 and 20 mM GABA under salinity condition (0 and 50 mM NaCl). Data represent means \pm SE (n=3)

مقدار آن در تیمار ۱۰ میلی‌مولار گابا مشاهده شد و در تیمار بدون شوری بین تیمارها اختلاف معنی‌داری یافت نشد (شکل B-۴). تنش شوری سبب افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز شد و بیشترین میزان آن در غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار گابا تحت تنش شوری مشاهده گردید و در شرایط بدون شوری بین غلظت‌های گابا تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (شکل C-۴).

میزان پروتئین‌های محلول کل و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تنش شوری و محلول‌پاشی گابا، بر میزان پروتئین، آنزیم پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز معنی‌دار بوده است. میزان پروتئین تحت تنش شوری کاهش یافت و بین غلظت‌های گابا تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (شکل A-۴). تحت تنش شوری میزان فعالیت پراکسیداز افزایش یافت و بیشترین



شکل ۴- تغییرات مربوط به پروتئین‌های محلول کل (A)، فعالیت پراکسیداز (B) و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (C) در برگ‌های گوجه‌فرنگی رقم نامیب تیمار شده با گابا (صفر، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار) تحت تنش شوری (صفر و ۵۰ میلی‌مولار). داده‌ها بیانگر میانگین \pm خطای استاندارد (n=3)

Figure 4. Total soluble proteins (A), peroxidase (POD) activity (B) and SOD activity (C) changes in tomato CV Namib leaf treated with 0, 10 and 20 mM GABA under salinity condition (0 and 50 mM NaCl). Data represent means \pm SE (n=3)

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که تنش شوری و گابا بر خصوصیات فیزیولوژیکی گوجه فرنگی رقم نامیب مؤثر بودند. گاما-آمینو بوتریک اسید می تواند باعث افزایش تحمل گیاهان به تنش های محیطی از جمله تنش شوری گردد. در این پژوهش کاربرد گابا سبب افزایش در محتوای نسبی آب برگ، پایداری غشاء سلولی، میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل، کاروتنوئید، کربوهیدرات های محلول کل، پرولین، فعالیت آنزیم های پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز نسبت به گوجه فرنگی بیمار شاهد گردید. بنابراین در شرایط تنش شوری استفاده از این ماده به عنوان یک اسمولیت سازگار از طریق بهبود خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی توصیه می شود.

کاربرد گابا در غلظت ۵۰ میلی مولار باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم های پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در گیاهان چچم چندساله تحت تنش خشکی شد (Krishnan *et al.*, 2013). گابا می تواند در مهار رادیکال های آزاد برای محافظت از غشاء نقش داشته باشد که علت این امر، فعال کردن آنزیم های آنتی اکسیدانی می تواند باشد. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با تولید پراکسید هیدروژن، آنیون سوپراکسید را حذف می کند. سپس پراکسید هیدروژن تولید شده توسط آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز حذف شده و سلول، سم زدایی می گردد. این آنزیم ها در کاهش آسیب های اکسیداتیو ناشی از تنش (پراکسیداسیون لیپیدی غشاء و پراکسید هیدروژن) مداخله می کنند و به همین علت پروتئین در بهبود اثرات تنش در گیاه مؤثر است.

References

- Ashraf, M. (2004). Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora*, 199(5), 362-376.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205-207.
- Beyer, W. F. and Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical biochemistry*, 161(2), 559-566.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Journal of Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Deewatthanawong, R., Nock, J. F. and Watkins, C. B. (2010). γ -Aminobutyric acid (GABA) accumulation in four strawberry cultivars in response to elevated CO₂ storage. *Postharvest Biology and Technology*, 57(2), 92-96.
- Dorais, M., Dorval, R., Demers, D., Micevic, D., Turcotte, G., Hao, X., Papadopoulos, A. P., Ehret, D. L. and Gosselin, A. (1998). Improving tomato fruit quality by increasing salinity: effects on ion uptake, growth and yield. XXV International Horticultural Congress, Part 1: Culture Techniques with Special Emphasis on Environmental Implications, 511, 185-196.
- El-Fouly, M. M., Moubarak, Z. M. and Salama, Z. A. (2000). Micronutrient foliar

- application increases salt tolerance of tomato seedlings. International Symposium on Techniques to Control Salination for Horticultural Productivity, 573, 467-474.
- Fait, A., Yellin, A. and Fromm, H. (2006). GABA and GHB neurotransmitters in plants and animals. In Baluska, F., Mancuso, D., Volkmann, D. Communication in plants (pp. 171-185). Berlin: Springer.
- FAO. (2013). Statistics for Perennial Crops and Fruits. FAO Publication, Rome, Italy.
- Galmes, J., Flexas, J., Save, R. and Medrano, H. 2007. Water relations and stomatal characteristics of Mediterranean plants with different growth forms and leaf habits: responses to water stress and recovery. Journal of Plant and Soil, 290(1-2), 139-155.
- Hemeda, H. M. and Kelin, B. P. (1990). Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetables extracts. Journal of Food Science, 55(1), 184-185.
- Houimli, S. I. M., Denden, M. and Mouhandes, B. D. (2010). Effects of 24-epibrassinolide on growth, chlorophyll, electrolyte leakage and proline by pepper plants under NaCl-stress. EurAsian Journal of BioSciences, 4, 96-104.
- Irigoyen, J. J., Einerich, D. W. and Sanchez-Diaz, M. (1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. Journal of Physiologia Plantarum, 84(1), 55-60.
- Jalili marandi, R., Jalil doost ali, P. and Hasani, A. (2009). Determination of tolerance of two apple rootstocks to different concentrations of sodium chloride under in vitro conditions. Iranian Journal of Horticultural Sciences, 40(2), 29-36. [In Farsi]
- Kafi, M. and Rahimi, Z. (2011). Effect of salinity and silicon on root characteristics, growth, water status, proline content and ion accumulation of purslane (*Portulaca oleracea* L.). Soil Science and Plant Nutrition, 57(2), 341-347.
- Kavikishore, P. B., Songam, S., Amr, R. N. and Naidu, S. (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant grow than abiotic stress tolerance. Current Science, 88(3), 424-438.
- Khan, M. A. and Duke, N. C. (2001). Halophytes—A resource for the future. Wetlands Ecology and Management, 9(6), 455-456.
- Kinnersley, A. M. and Turano, F. J. (2000). Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. Critical Reviews in Plant Sciences, 19(6), 479-509.
- Krishnan, S., Laskowski, K., Shukla, V. and Merewitz, E.B. (2013). Mitigation of drought stress damage by exogenous application of a non-protein amino acid γ -aminobutyric acid on perennial ryegrass. Journal of the American Society for Horticultural Science, 138(5), 358-366.
- Lichtenthaler, H. K. and Buschmann, C. (2001). Extraction of photosynthetic tissues:

- Chlorophylls and carotenoids. Current Protocols in Food Analytical Chemistry: John Wiley & Sons, Inc.
- Molazem, D., Qurbanov, E. M. and Dunyamaliyev, S. A. (2010). Role of proline, Na and chlorophyll content in salt tolerance of corn (*Zea mays* L.). American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science, 9(3), 319-324.
- Sairam, R. K., Rao, K. V. and Srivastava, G. C. (2002). Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Science, 163(5), 1037-1046.
- Shaha, S. H. (2007). Effects of salt stress on mustard as affected by gibberellic acid application. General and Applied Plant Physiology, 33(1-2), 97-106.
- Shang, H., Cao, S., Yang, Z., Cai, Y. and Zheng, Y. (2011). Effect of exogenous γ -aminobutyric acid treatment on proline accumulation and chilling injury in peach fruit after long-term cold storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(4), 1264-1268.
- Shelp, B. J., Bown, A. W. and McLean, M. D. (1999). Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. Trends in Plant Science, 4(11), 446-452.
- Shelp, B. J., Bozzo, G. G., Trobacher, C. P., Chiu, G. and Bajwa, V. S. (2012). Strategies and tools for studying the metabolism and function of γ -aminobutyrate in plants. I. Pathway Structure. Botany, 90(8), 651-668.
- Shi, S. Q., Shi, Z., Jiang, Z. P., Qi, L. W., Sun, X. M., Li, C. X., Liu, J. F., Xiao, W. F. and Zhang, S. G. (2010). Effects of exogenous GABA on gene expression of *Caragana intermedia* roots under NaCl stress: Regulatory roles for H₂O₂ and ethylene production. Plant, Cell and Environment, 33(2), 149-162.
- Sivritepe, N., Sivritepe, H. O., Celik, H. and Katkat, A.V. (2010). Salinity responses of grafted grapevines: Effects of scion and rootstock genotypes. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 38(3), 193-201.
- Song, H., Xu, X., Wang, H., Wang, H. and Tao, Y. (2010). Exogenous γ -aminobutyric acid alleviates oxidative damage caused by aluminium and proton stresses on barley seedlings. Journal of the Science of Food and Agriculture, 90(9), 1410-1416.
- Sotriopoulos, T. E. (2007). Effect of NaCl and CaCl₂ on grown and contents of minerals, chlorophyll, proline and sugar in the apple rootstock M4 cultured in vitro. Biologia Plantarum, 51(1), 177-180.
- Tanou, G., Molassiotis, A. and Diamantidis, G. (2009). Induction of reactive oxygen species and necrotic death-like destruction in strawberry leaves by salinity. Environmental and Experimental Botany, 65(2), 270-281.
- Tester, M. and Davenport, R. (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. Annals of Botany, 91(5), 503-527.

Yin, C., Wang, X., Duan, B., Luo, J. and Li, C. (2005). Early growth, dry matter allocation and water use efficiency of two sympatric *Populus* species as affected by water stress. *Environmental and Experimental Botany*, 53(3), 315-322.

Effect of Gamma-Amino-Butyric Acid Foliar Application on Physiological Characters of Tomato (cv. Namib) under Salinity Stress

L. Zarei¹, M. Koushesh Saba^{2*}, Y. Vafae³ and T. Javadi⁴

- 1- M.Sc. Student of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
- 2- ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran (m.saba@uok.ac.ir)
- 3- Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
- 4- Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

Received: 30 June, 2016

Accepted: 17 May, 2017

Abstract

Background and Objectives

Salinity and salt accumulation in the soil surface is one of the most important abiotic stresses that limit agricultural crop production in the arid and semi-arid regions of Iran. Thus, finding an alternative production technique or materials to alleviate stress condition is a research priority. One way to decrease the harmful effects of salinity is the foliar application of some chemicals such as Gamma-amino butyric acid (GABA) to increase plant tolerance to salinity. GABA is often accumulated in plants in response to live and non-live stresses such as drought, salinity, oxygen deficit, heat shocks and contamination of pathogens.

Materials and Methods

The current study was carried out to monitor the GABA effects on tomato physiological changes under salinity stress. The plants were grown in hydroponic system and received 0 and 50 mM NaCl as control and salinity stress, respectively. GABA at three concentrations 0, 10 and 20 mM was applied as a foliar application in either control or salinity treatments. Physiological characteristics of relative water content (RWC), membrane stability index (MSI), proline, total soluble protein (TSP) and enzymes activity, chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and total soluble carbohydrates (TSC) were measured.

Results

The results showed that salinity stress and GABA were effective on the physiological characteristics of tomato. GABA can increase the tolerance of plants to environmental stresses, including salinity stress. MSI, chlorophyll a, total chlorophyll, carotenoids in salinity treatments were lower than control while TSC, proline, peroxidase and SOD increased. RWC, MSI, proline, TSC of GABA treated plant were greater than untreated in either salinity or control conditions. Also, SOD and peroxidase activity elevated in GABA treated plant under salinity stress.

Discussion

GABA increased antioxidant capacity in the plant and thus might eliminate radicals and prevents the destruction of cell membrane tissue, including the chloroplast membrane. In general, the results showed that in salinity stress conditions, GABA application as a compatible osmolytes might improve the tomatoes physiological performance and alleviate salinity stress.

Keywords: *Enzyme activity, Free proline, Relative water content, Total soluble carbohydrates*