اثر تنش شوری و بر همکنش آن با ۵-آمینولوولینیک اسید (ALA) بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در گیاه گوجه فرنگی (*Lycopersicun esculentum* Mill.)

فاطمه دانشمند[1*] و حکیمه علومی[2]

[1*] گروه علمی زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷ -۱۹۳۹۵ تهران، ایران [2] گروه اکولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پشرفته، کرمان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۵/۰۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۱۹)

چکیده:

۵-آمینولوولینیک اسید پیش ساز ضروری برای بیوسنتز تمام ترکیبات تتراپیرولی نظیر هم، کلروفیل، باکتریوکلروفیل، فیتوکروم و ویتامین B_{12} می‌باشد. در این مطالعه تأثیر ۵-آمینولوولینیک اسید بر کاهش خسارت تنش شوری در گیاه گوجه فرنگی (*Lycopersicum esculentum* Mill.) مورد مطالعه قرار گرفت. فاکتورهای مورد بررسی در این تحقیق شامل دو فاکتور، تنش شوری در سه سطح (۰، ۵۰ و ۷۵ میلی مولار کلرید سدیم) و تیمار ۵-آمینولوولینیک اسید در سه سطح (۰، ۱ و ۲ میلی مولار) بود. تنش شوری در هر دو سطح موجب کاهش پارامترهای رشد، افزایش مقدار مالون دآلدئید و سایر آلدئیدها، نشت یونی، کاهش ترکیبات فنلی، فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز و افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گلوتاتیون رداکتاز و گایاکل پراکسیداز شد. کاربرد ALA باعث بهبود پارامترهای رشد، کاهش مقدار مالون دآلدئید و سایر آلدئیدها، نشت یونی و افزایش ترکیبات فنلی و افزایش فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گلوتاتیون رداکتاز و گایاکل پراکسیداز شد. نتایج این مطالعه نشان داد کاربرد ALA با تقویت سیستم آنتی اکسیدان آنزیمی در کاهش خسارت تنش شوری در گیاه گوجه فرنگی مؤثر است.

کلمات کلیدی: ۵-آمینولوولینیک اسید، آنزیم‌های آنتی اکسیدان، تنش شوری، ترکیبات فنلی و گوجه فرنگی.

مقدمه:

۵-آمینولولینیک اسید (ALA) یک کتوآمینواسید با وزن ملکولی ۱۳۱ می‌باشد (Watanab *et al.*, 2006). ALA پیش ساز ضروری برای بیوسنتز همه ترکیبات تتراپیرولی نظیر هم، کلروفیل، باکتریوکلروفیل، فیتوکروم و ویتامین B_{12} می‌باشد که در همه گیاهان، جانوران، قارچ‌ها، جلبک ها، و باکتری‌ها وجود دارد. ALA یک ماده طبیعی است که دارای قابلیت زیست تجزیه نیز می‌باشد، بنابراین به عنوان یک ماده سازگار با محیط زیست می‌تواند کاربردهای زیادی در حوزه زیست شناسی، کشاورزی و پزشکی داشته باشد (Zhang *et al.*, 2008). ALA در موجودات از دو راه به وجود می‌آید یکی پیوستن گلیسین به سوکسینیل کوآنزیم A توسط آنزیم ALA سینتاز و راه دیگر تبدیل ماده ۵ کربنی گلوتامیک اسید به ALA می‌باشد. در گیاهان

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: f.daneshmand@yahoo.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.8.7.2]

ALA بیشتر از گلوتامیک اسید و از طریق حدواسط گلوتامیل-tRNA به وجود می‌آید و برای ساخته شدن به ATP و NADPH به عنوان کوفاکتور نیاز دارد (Beale and Castelfranco, 1974). بیوسنتز ALA در موجودات به دقت تنظیم می‌شود. در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های بالای ALA (بالاتر از ۱۰ mM) این ترکیب به عنوان علف کش فتودینامیک عمل می‌کند. برای مثال، هنگامی که گیاهان با غلظت‌های بالای ALA تیمار شدند، تجمع حد واسط‌های بیوسنتز کلروفیل نظیر پروتوکلروفیلید و پروتوپورفیرین IX در حد غیر طبیعی رخ می‌دهد. بنابراین اگر در این موقع این گیاهان در معرض نور قرار بگیرند این تتراپیرول‌های زیادی، به عنوان حساس کننده نوری (Photosensitizer) عمل کرده و در نتیجه موجب آسیب های فتودینامیک در گیاه می‌شوند. این ترکیبات با جذب انرژی نور خورشید موجب تولید اکسیژن یکتایی شده که خود به عنوان یک گونه فعال اکسیژن برای گیاه بسیار آسیب رسان خواهد بود (Hotta *et al.,* 1998; Chakraborty and Tripathy, 1992; Jung *et al.,* 2008 a, b).

مطالعات مختلفی با استفاده از ترکیبات تنظیم کننده رشد انجام شده است تا بتوان مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی نظیر شوری را افزایش داد. ۵-آمینولولینیک اسید (ALA) یکی از این ترکیبات می‌باشد. اما در استفاده از این ترکیب، نوع گیاه، مرحله نموی گیاه، مقدار و زمان به کارگیری این ماده و نحوه تیماردهی (به صورت محلول پاشی و یا آبیاری ریشه‌ای) باید مورد بررسی دقیق قرار گیرد (Averina *et al.,* 2010). همان گونه که ذکر شد، ALA در غلظت‌های بالا به عنوان علف کش فتودینامیک و یا آفت کش عمل می‌کند، اما مطالعات مختلف نشان داده است که این ماده در غلظت‌های کم، به عنوان یک تنظیم کننده رشد گیاهی و یا برای افزایش محصول و یا افزایش مقاومت به تنش مؤثر است (Sun *et al.,* 2009, Bindu Roy and Vivekanandan, 1998a, b). به عنوان مثال ALA موجب افزایش رشد و تولید محصول در گیاهان جو، سیر، سیب زمینی و لوبیا گردید (Hotta *et al.,* 1997). در انگور نیز ALA موجب افزایش رشد، فتوسنتز و تولید محصول گردید (Watanab *et al.,* 2006). ALA در غلظت‌های کم برای افزایش مقاومت به گرما (Zhang *et al.,* 2012)، تنش نوری (Sun *et al.,* 2009) و شوری (Zhen *et al.,* 2012; Zhang *et al*. 2006; Naeem *et al.,* 2010; Watanab *et al.,* 2000) مورد استفاده قرار گرفته و نتایج مثبتی هم به دست آمده است. اما مکانیسم‌هایی که با آن ALA روی افزایش رشد، تولید محصول و مقاومت به تنش‌ها تأثیر می گذارد هنوز به خوبی شناخته نشده است. بعضی گزارش‌ها نقش محرک ALA روی رشد گیاهان را به دلیل تأثیر آن روی فتوسنتز و یا تنفس (Watanab *et al.,* 2006) و برخی به دلیل تأثیر بر فعالیت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی (Sun *et al.,* 2009) می‌دانند.

شوری آب و خاک، موجب القای پاسخ‌های متنوع بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در گیاه می‌گردد و تقریباً همه عملکردهای گیاه را از فتوسنتز گرفته تا رشد و نمو و تولید محصول تحت تأثیر قرار می‌دهد. یکی از اثرات شوری تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) می‌باشد. ROS موجب بر هم زدن متابولیسم طبیعی سلول از طریق آسیب اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می شود. برای مقابله با ROS موجودات زنده سیستم دفاع آنتی اکسیدانی را که شامل آنتی اکسیدان‌هایی غیر آنزیمی نظیر آسکوربات، گلوتاتیون و ترکیبات فنلی و آنزیم‌های آنتی اکسیدان نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آنزیم‌های چرخه آسکوربات -گلوتاتیون نظیر آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون رداکتاز را فعال می‌سازند (Zhen *et al.,* 2012).

از آنجا که ALA یک ترکیب طبیعی و سازگار با محیط زیست است که در همه موجودات و گیاهان وجود دارد و دارای قابلیت زیست تجزیه نیز می‌باشد، هدف از این مطالعه بررسی چگونگی تأثیر ALA خارجی بر افزایش مقاومت گیاه گوجه فرنگی (به عنوان یک گیاه مدل) به تنش شوری می‌باشد. در این مطالعه نقش این ترکیب بر آسیب اکسیداتیو حاصل از تنش شوری و سیستم دفاع آنتی اکسیدان در گیاه گوجه فرنگی مورد مطالعه قرار گرفته است.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.8.7.2]

مواد و روش‌ها:

گیاه مورد آزمایش در این پژوهش گیاه گوجه فرنگی *Lycopersicun esculentum* Mill رقم Falcato بود و آزمایش به صورت گلخانه‌ای انجام گرفت. طی آزمایشات مقدماتی غلظت ۵-آمینولوولینیک اسید و زمان تیمار و نحوه اعمال تیمار بهینه گردید. بذرها در گلدان‌های پلاستیکی با گنجایش ۱ کیلوگرم خاک حاوی خاک مزرعه: ماسه: پیت ماس با نسبت‌های (۲:۱:۱) کاشته شد و آبیاری تا زمان اعمال تنش شوری به صورت یک روز در میان با توجه به ظرفیت نگهداری آب خاک برای همه گلدان‌ها به طور یکسان انجام شد. در شروع مرحله سه برگی، برای اعمال پیش تیمار ۵-آمینولوولینیک اسید، غلظت‌های ۰ و ۱ و ۲ میلی مولار ۵-آمینولوولینیک اسید در سه نوبت به صورت یک روز در میان روی برگ‌های گیاهان اسپری شد (روی گیاهان شاهد آب مقطر اسپری گردید). سپس تنش شوری در سه سطح (۰ ، ۵۰ و ۷۵ میلی مولار کلرید سدیم) به صورت آبیاری اعمال گردید (۳ تکرار برای هر تیمار) و ۱۰ روز پس از اعمال تنش شوری گیاهان برداشت شده و پس از اندازه‌گیری پارامترهای ریخت شناسی، برگ سوم (شمارش از پایین به بالا) در نیتروژن مایع فریز شد و در ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

پارامترهای رشد: طول ساقه و وزن خشک اندام هوایی گیاهان اندازه گیری شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌ها در فویل آلومینیومی پیچیده شده و به مدت ۷۲ ساعت درآون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. سپس وزن خشک نمونه‌ها بر حسب میلی گرم بر گیاه گزارش گردید.

پراکسیداسیون لیپید: برای سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، غلظت مالون‌دآلدئید (MDA) و سایر آلدئیدها (پروپانال، بوتانال، هگزانال، هپتانال و پروپانال دی متیل استال) که محصول پراکسیداسیون اسید های چرب غیراشباع می‌باشد اندازه‌گیری گردید. اندازه گیری مالون دآلدئید به روش Packer و Heath (۱۹۶۹) و اندازه گیری غلظت سایر آلدئیدها با روش Meirs و همکاران (۱۹۹۲) انجام شد و نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر حسب نانومول بر گرم وزن‌تر محاسبه گردید.

نشت یونی: برای سنجش میزان آسیب به غشا، میزان نشت یونی از روش Ben Hamed و همکاران (۲۰۰۷) استفاده شد و نتایج بر اساس درصد گزارش گردید.

مقدار ترکیبات فنلی: اندازه گیری ترکیبات فنلی کل با استفاده از روش Sonald و Laima (۱۹۹۹) انجام و غلظت ترکیبات فنلی کل با استفاده از منحنی استاندارد ترسیم شده با اسید گالیک محاسبه بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر گزارش گردید.

فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD)(EC 1.15.1.1): سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز با استفاده از سنجش مهار احیای نوری نیتروبلوتترازولیم (NBT) در ۵۶۰ نانومتر انجام گرفت. یک واحد آنزیمی سوپراکسیددیسموتاز مقدار آنزیمی است که موجب ۵۰ درصد ممانعت از احیاء نوری احیای نیتروبلوتترازولیم (با جلوگیری از تبدیل آن به فورمازان) می‌گردد. با استفاده از روش Giannopolotis و Ries (۱۹۷۷)، واحد آنزیمی نمونه‌ها محاسبه و فعالیت آنزیمی برحسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) در عصاره (به دست آمده از روش Bradford, 1976)، بیان گردید (Giannopolotis and Ries, 1977).

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)(EC 1.11.1.6): سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از محاسبه کاهش جذب H_2O_2 (کاهش مقدار H_2O_2) در ۲۴۰ نانومتر و با روش Dhindsa و همکاران (۱۹۸۱) انجام شد. فعالیت آنزیم به صورت واحد آنزیمی بر حسب مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در عصاره (به دست آمده از روش Bradford, 1976)، در یک دقیقه محاسبه گردید. یک واحد آنزیمی کاتالاز مقدار آنزیمی است که ۱ میلی‌مول H_2O_2 را در یک دقیقه تجزیه می‌کند.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) (EC1.11.1.1): فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با استفاده از روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) اندازه گیری

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.8.7.2]

شد. یک واحد آنزیمی آسکوربات‌پراکسیداز مقدار آنزیمی است که یک میلی‌مول آسکوربات را در یک دقیقه اکسید می‌کند. فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در عصاره (به دست آمده از روش Bradford, 1976)، گزارش شد.

فعالیت آنزیم گلوتاتیون رداکتاز (GR) (EC 1.6.4.2): فعالیت آنزیم GR به وسیله اکسیداسیون NADPH توسط روش Foyer و Halliwell (۱۹۷۶) تعیین شد. یک واحد فعالیت آنزیمی مقدار آنزیمی است که برای اکسیداسیون یک نانومول NADPH در یک دقیقه لازم است.

فعالیت آنزیم پراکسیداز (GPOD)(EC 1.11.1.7): سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از گایاکل و اندازه‌گیری میزان جذب تتراگایاکل تشکیل شده از گایاکل در نتیجه فعالیت پراکسیداز، در ۴۷۰ نانومترانجام گرفت (Plewa *et al.*, 1991). فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در عصاره (به دست آمده از روش Bradford, 1976) گزارش شد.

فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز(PAL) (EC 4.3.1.5): فنیل آلانین آمونیالیاز واکنش تبدیل فنیل آلانین به سینامیک اسید را کاتالیز می‌کند. برای اندازه گیری فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز، از روش Wang و همکاران (۲۰۰۶) استفاده گردید. در این روش از فنیل آلانین به عنوان سوبسترای آنزیمی استفاده شده و فعالیت آنزیم PAL بر اساس سرعت تشکیل اسید سینامیک تعیین می‌گردد. یک واحد از فعالیت PAL معادل ۱ میکرومول از سینامیک اسید تولید شده در یک دقیقه می‌باشد (Wang *et al.*, 2006).

بررسی‌های آماری: تجزیه و تحلیل‌های آماری در این مطالعه با آزمایش فاکتوریل و طبق طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار صورت گرفته و داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS تحت آنالیز واریانس قرار گرفته و اختلاف میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ مقایسه شدند.

نتایج:

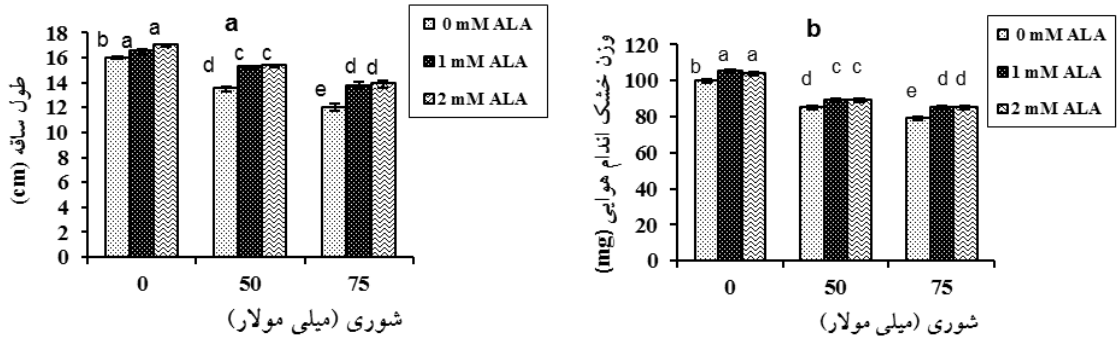
تنش شوری در هر دو سطح باعث کاهش معنی دار طول ساقه و وزن خشک اندام هوایی در گیاه گوجه فرنگی شد (شکل ۱ a و b). افزایش شدت تنش نیز موجب کاهش بیشتر گردید. تیمار گیاهان با ۵-آمینولوولینیک اسید (ALA) باعث افزایش معنی دار طول ساقه و وزن خشک اندام هوایی در شرایط تنش و غیر تنش گردید، اما تفاوت معنی‌داری بین غلظت ۱ و ۲ میلی مولار ALA در شرایط تنش و غیر تنش مشاهده نگردید

در گیاه گوجه فرنگی مقدار مالون دآلدئید و سایر آلدئیدها در تنش شوری (در هر دو سطح) افزایش پیدا کرد (شکل ۲ a و b). و با افزایش شدت تنش نیز مقدار این پارامترها بیشتر افزایش یافت. کاربرد ALA باعث کاهش معنی دار مقدار مالون دآلدئید و سایر آلدئیدها در تنش شوری گردید. در شکل مالون دآلدئید در شوری ۵۰ میلی مولار بین غلظت ۱ و ۲ میلی مولار ALA تفاوت معنی داری مشاهده نشد، اما در شوری ۷۵ میلی مولار غلظت ۲ میلی مولار در کاهش مالون دآلدئید موثرتر عمل نمود. اما در مورد سایر آلدئیدها تفاوت معنی داری بین غلظت ۱ و ۲ میلی مولار ALA در شرایط تنش مشاهده نگردید.

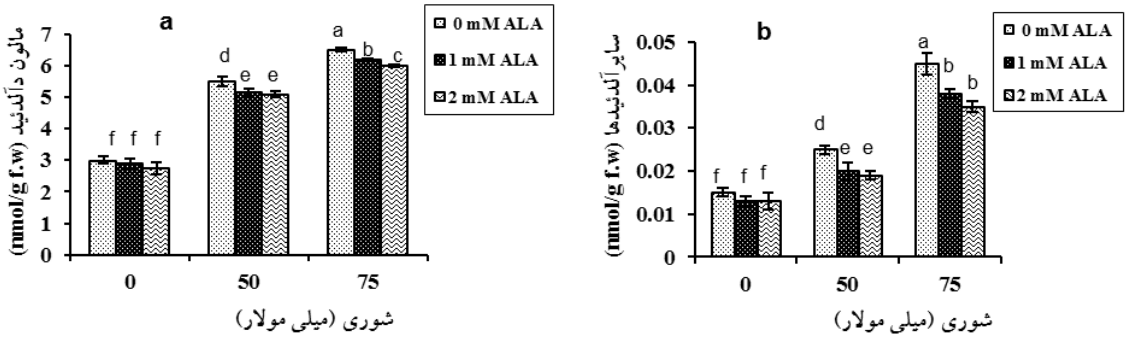
شوری ۵۰ و ۷۵ میلی مولار موجب افزایش معنی دار درصد نشت یونی شد و این افزایش در شوری ۷۵ میلی مولار بیشتر از شوری ۵۰ میلی مولار بود. کاربرد ALA باعث کاهش معنی دار درصد نشت یونی در شرایط تنش گردید و تفاوت معنی داری بین غلظت ۱ و ۲ میلی مولار ALA در شرایط تنش مشاهده نگردید (شکل ۳ a). هر دو سطح تنش شوری باعث کاهش معنی دار مقدار ترکیبات فنلی در گیاه گوجه فرنگی شد و افزایش شدت تنش نیز مقدار ترکیبات فنلی را بیشتر کاهش داد. استفاده از ALA باعث افزایش معنی دار مقدار ترکیبات فنلی در شرایط تنش و غیر تنش گردید و در شوری ۵۰ میلی مولار بین غلظت ۱ و ۲ میلی مولار ALA تفاوت معنی دار مشاهده گردید و غلظت ۲ میلی مولار موثرتر از غلظت ۱ میلی مولار عمل نمود (شکل ۳ b).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]

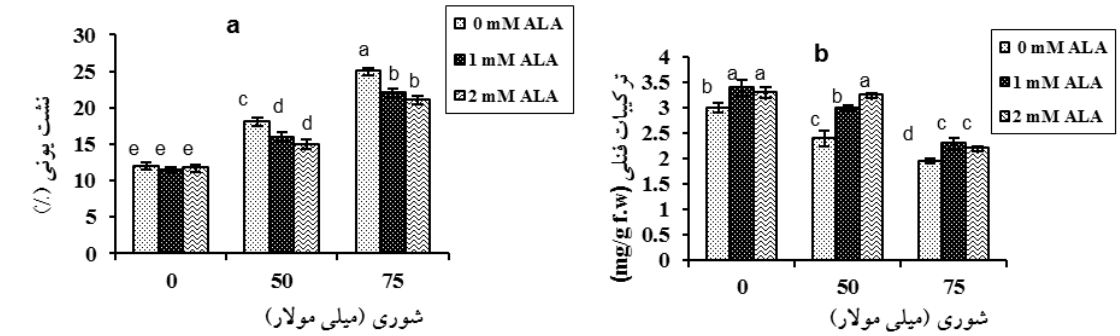
[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.8.7.2]



شکل ۱- اثر تنش شوری و تیمار ۵-آمینولوولینیک اسید (ALA) بر طول ساقه (a) و وزن خشک اندام هوایی (b) در گیاه گوجه فرنگی (داده‌ها میانگین ۳ تکرار و علائم روی ستون‌ها خطای معیار(SE) را نشان می‌دهد. حروف غیر یکسان نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد.).



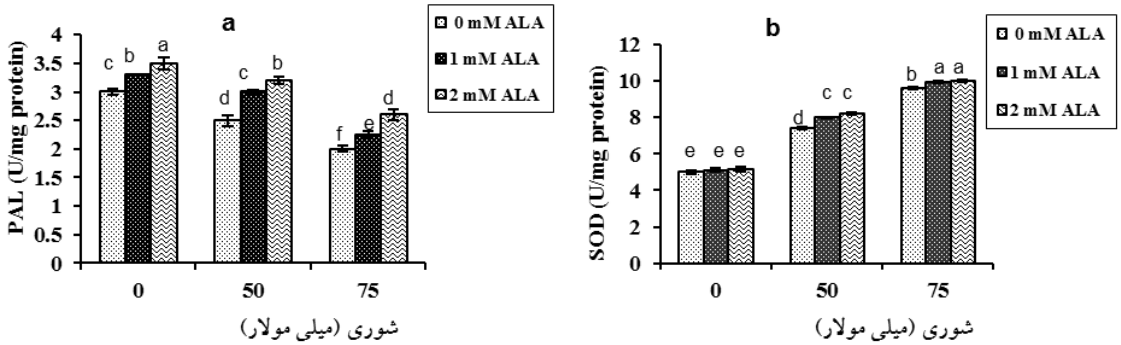
شکل ۲- اثر تنش شوری و تیمار ۵-آمینولوولینیک اسید (ALA) بر مقدار مالون دآلدئید (MDA) (a) و مقدار سایر آلدئیدها (b) در گیاه گوجه فرنگی (داده‌ها میانگین ۳ تکرار و علائم روی ستون‌ها خطای معیار(SE) را نشان می‌دهد. حروف غیر یکسان نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد.).



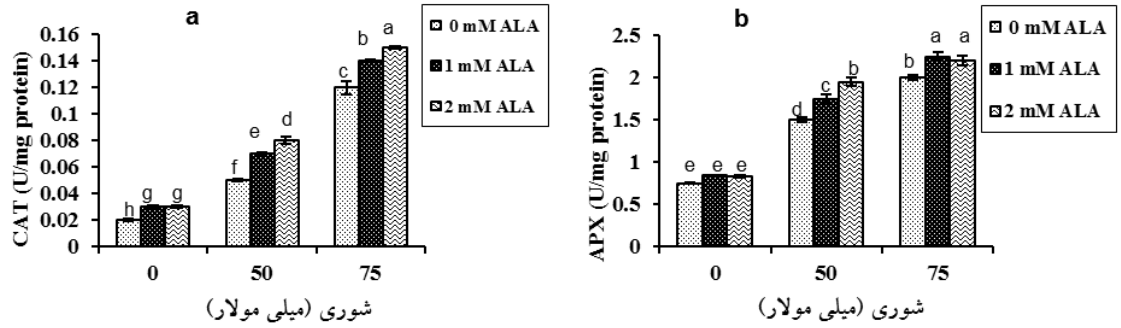
شکل ۳- اثر تنش شوری و تیمار ۵-آمینولوولینیک اسید (ALA) بر درصد نشت یونی (a) و مقدار ترکیبات فنلی (b) در گیاه گوجه فرنگی (داده‌ها میانگین ۳ تکرار و علائم روی ستون‌ها خطای معیار(SE) را نشان می‌دهد. حروف غیر یکسان نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد.).

فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز در هر دو سطح تنش شوری کاهش یافت. با افزایش شدت تنش مقدار فعالیت این آنزیم بیشتر کاهش یافت. به کار بردن ALA موجب افزایش معنی دار مقدار فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.8.7.2]



شکل ۴- اثر تنش شوری و تیمار ۵-آمینولولینیک اسید (ALA) بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) (a) و سوپر اکسیددیسموتاز (SOD) (b) در گیاه گوجه فرنگی (داده‌ها میانگین ۳ تکرار و علائم روی ستون‌ها خطای معیار(SE) را نشان می دهد. حروف غیر یکسان نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد.).



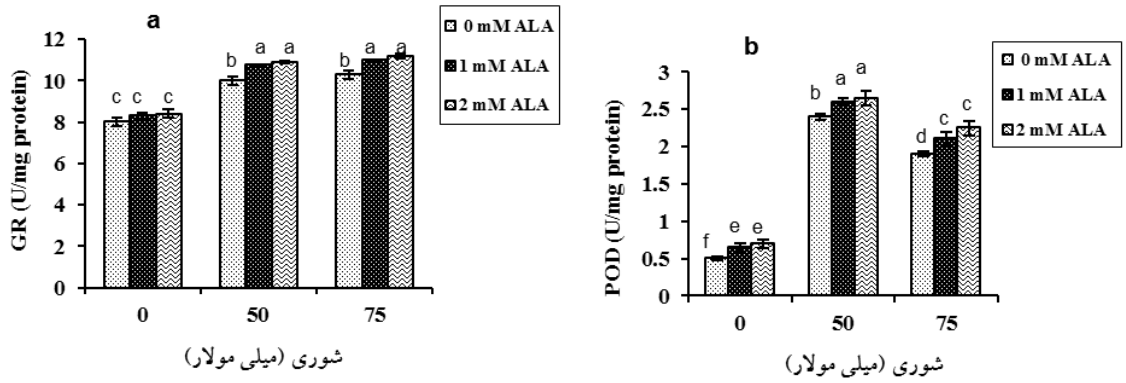
شکل ۵- اثر تنش شوری و تیمار ۵-آمینولولینیک اسید (ALA) بر فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) (a) و آسکوربات پراکسیداز (APX) (b) در گیاه گوجه فرنگی (داده‌ها میانگین ۳ تکرار و علائم روی ستون‌ها خطای معیار(SE) را نشان می‌دهد. حروف غیر یکسان نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد.).

شرایط تنش و غیر تنش گردید و غلظت ۲ میلی مولار ALA هم در شرایط تنش و هم در شرایط غیر تنش مؤثرتر از غلظت ۱ میلی مولار بود (شکل ۴ a). هر دو سطح تنش شوری موجب افزایش معنی دار مقدار فعالیت سوپراکسیددیسموتاز در گیاه گوجه فرنگی شد. و با افزایش شدت تنش نیز مقدار فعالیت سوپراکسیددیسموتاز بیشتر افزایش یافت. تیمار گیاهان با ALA باعث افزایش معنی دار مقدار فعالیت سوپراکسیددیسموتاز در شرایط تنش گردید و تفاوت معنی داری بین دو غلظت ALA مشاهده نگردید (شکل ۴ b).

مقدار فعالیت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در گیاه گوجه فرنگی در تنش شوری افزایش پیدا کرد (شکل ۵ a و b). افزایش شدت تنش نیز مقدار فعالیت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز را بیشتر افزایش داد. استفاده از ALA باعث افزایش معنی دار مقدار فعالیت کاتالاز در شرایط تنش و غیر تنش گردید و در شرایط تنش غلظت ۲ میلی مولار موثرتر از غلظت ۱ میلی مولار بود. اما تیمار گیاهان با ALA باعث افزایش معنی دار مقدار فعالیت آسکوربات پراکسیداز فقط در شرایط تنش گردید و در شوری ۵۰ میلی مولار غلظت ۲ میلی مولار ALA موثرتر از غلظت ۱ میلی مولار عمل نمود.

شوری مقدار فعالیت گلوتاتیون رداکتازو گایاکل پراکسیداز را افزایش داد (شکل ۶ a و b). تیمار ALA باعث افزایش معنی دار مقدار فعالیت گلوتاتیون رداکتاز فقط در شرایط تنش گردید و بین دو غلظت ALA تفاوت معنی داری مشاهده نگردید. تیمار گیاهان با ALA باعث

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.8.7.2]



شکل ۶- اثر تنش شوری و تیمار ۵-آمینولوولینیک اسید (ALA) بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون رداکتاز (GR) (a) و گایاکل پراکسیداز (GPOD) (b) در گیاه گوجه فرنگی (داده‌ها میانگین ۳ تکرار و علائم روی ستون‌ها خطای معیار(SE) را نشان می دهد. حروف غیر یکسان نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد.).

افزایش معنی دار مقدار فعالیت گایاکل پراکسیداز در شرایط تنش و غیر تنش گردید و تفاوت معنی داری بین دو غلظت ALA مشاهده نگردید.

بحث:

در مطالعات مختلف، گوجه فرنگی در گروه گیاهان نیمه حساس به شوری قرار داده شده است(Foolad, 2004)، در این مطالعه نیز تنش های شوری متوسط اعمال شده (۵۰ و ۷۵ میلی مولار کلرید سدیم) بر پارامترهای رشد تأثیر منفی گذاشت و موجب افزایش تنش اکسیداتیو در گیاهان گردید و با افزایش مقدار نمک پارامترهای رشد کاهش بیشتر و تنش اکسیداتیو نیز افزایش بیشتری نشان داد. گیاهان مقدار ROS تولید شده توسط تنش‌های محیطی را با کمک آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی کنترل می نمایند. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان تحت تنش‌هایی نظیر تنش شوری نشان دهنده القای مکانیسم‌های دفاعی برای کاهش تنش اکسیداتیو در سلول می باشد هرچند که این مکانیسم‌ها قادر نباشند کاملا این تنش‌ها را از بین ببرند.

در این مطالعه مقدار تنش اکسیداتیو و میزان مالون دآلدئید و سایر آلدئیدها و نشت یونی در شرایط تنش شوری افزایش یافت. کاربرد ALA تنش اکسیداتیو را کاهش داد که نتیجه آن کاهش مقدار پراکسیداسیون لیپیدها و نشت یونی بود. در گیاهان تیمار شده با ALA فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان نظیر SOD،CAT، POD، APX و GR افزایش یافت. در گیاهان خیار تحت تنش گرما نیز کاربرد ALA موجب کاهش مقدار MDA ، انیون سوپراکسید و H_2O_2 گردید. ALA در این گیاهان موجب افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان نظیر SOD ، CATو GR و سایر آنزیم‌های چرخه آسکوربات-گلوتاتیون گردید (Zhang *et al.*, 2012).

ALA در گیاهان هندوانه نیز منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD، POD و APX گردید (Sun *et al.*, 2009). در این گیاهان تیمار ALA با افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و تشویق متابولیسم گونه‌های فعال اکسیژن موجب کاهش تجمع آنیون سوپراکسید گردید و بازدارندگی نوری PSI نیز کاهش یافت و سرعت انتقال الکترون افزایش یافت و در نتیجه کارآیی فتوشیمیایی فتوسیستم‌ها افزایش یافت (Sun *et al.*, 2009). تجمع آنیون سوپراکسید در برگ منجر به تشکیل رادیکال هیدروکسیل از طریق واکنش فنتون می‌گردد و رادیکال هیدروکسیل می تواند به PSI آسیب برساند و منجر به مهار نوری PSII نیز شود. تحریک حذف گونه‌های فعال اکسیژن از طریق سیستم دفاع آنتی اکسیدانی از جمله چرخه آب-

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.8.7.2]

آب (به عنوان یک راه فرعی زنجیره انتقال الکترون) برای جذب و پراکنش انرژی نوری در کلروپلاست مفید است، زیرا می تواند مانع از آسیب نوری گردد (Sun *et al.*, 2009).

در گیاه *Brassica campestris* نیز کاربرد ALA موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان SOD، CAT و POD گردید (Memon *et al.*, 2009). در گیاهان کلزای تحت تنش علف کش نیز ALA موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و POD گردید. در گیاهان خیار تحت تنش شوری نیز کاربرد ALA موجب کاهش مقدار H_2O_2 و افزایش بیان ژن‌های مربوط به آنزیم‌های APX CAT و GR و افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در گیاهان تحت تنش شوری گردید. اما ALA روی فعالیت SOD تأثیری نداشت (Zhen *et al.*, 2012). در گیاهان سیب زمینی تحت تنش شوری در شرایط درون شیشه ای نیز، ALA در غلظت‌های کم موجب کاهش آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش شوری، حفاظت از غشاهای زیستی، کاهش مقدار MDA و افزایش فعالیت آنزیم‌هایی نظیر پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز گردید، اما غلظت‌های بالای ALA خود موجب القای تنش اکسیداتیو و تجمع پورفیرین‌های فتواکسیداتیو گردید (Zhang *et al.*, 2006). کاربرد ALA در گیاهان کلزا (Naeem *et al.*, 2010, 2011) و جو (Averina *et al.*, 2010) در شرایط تنش نیز موجب افزایش فعالیت سیستم دفاع آنتی اکسیدان در این گیاهان شد که نتیجه آن بهبود پارامترهای رشد ذکر شده است.

از آن جا که ALA پیش ساز ضروری ترکیبی مانند هم می باشد و هم جزو ضروری ساختار سیتوکروم می باشد (سیتوکروم ها نیز از اجزای ضروری اندامک‌های مختلف سلولی شامل میتوکندری، کلروپلاست و سیتوپلاسم می باشند.)، به علاوه هم گروه پروستتیک آنزیم هایی نظیر پراکسیدازها و کاتالاز می باشد (Memon *et al.*, 2009, Sun *et al.*, 2009)، بنابراین به نظر می رسد افزایش فعالیت آنزیم هایی نظیر آسکوربات پراکسیداز، گایاکل پراکسیداز و کاتالاز در گیاهان تیمار شده با ALA قابل توجیه باشد. بررسی ها نیز نشان داده است که تیمار گیاهان با ALA نشاندار، بعد از یک دوره ۱۶ ساعته موجب ورود ترکیبات نشاندار در ملکول های پراکسیداز و سایر ترکیبات پورفیرینی نظیر سیتوکروم شده است (Memon *et al.*, 2009). گیاهان تیمار شده با ALA دارای مقدار هم بیشتری نسبت به گیاهان شاهد بودند (Sun *et al.*, 2009). بنابراین به نظر می رسد که تشکیل هم نیز یک فاکتور مهم در تنظیم رشد گیاه توسط ALA باشد (Sun *et al.*, 2009). Xie و همکاران (۲۰۱۳) گزارش نمودند که اثرات مثبت ALA بر افزایش مقاومت به تنش به این بستگی دارد که ALA بتواند به تتراپیرول ها تبدیل شود زیرا کاربرد لوولینیک اسید که مهار کننده آنزیم ALA دهیدراز می باشد موجب مهار کامل اثرات ضد تنش ALA گردید.

ترکیبات فنلی، آنتوسیانین ها و فلاونوئیدها نیز دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بوده و در گروه آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی قرار می گیرند. در این مطالعه کاربرد ALA موجب افزایش مقدار ترکیبات فنلی در گیاهان گوجه فرنگی گردید. همه ترکیبات فنلی از مسیر فنیل پروپانوئید سنتز می شوند و در آغاز این مسیر آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز فعالیت می کند که اسید آمینه فنیل آلانین را به سینامیک اسید تبدیل می کند (Xie *et al.*, 2013). در این مطالعه کاربرد ALA موجب افزایش فعالیت این آنزیم گردید. مشابه با نتایج این مطالعه Xie و همکاران (۲۰۱۳) نیز گزارش نمودند که در گیاهان سیب کاربرد ALA موجب افزایش تولید ترکیبات فنلی از جمله آنتوسیانین، در پوست میوه سیب قبل از برداشت گردید. این محققین گزارش نمودند که دلیل این امر تأثیر ALA بر افزایش بیان ژن‌های مربوط به مسیر بیوسنتز آنتوسیانین نظیر ژن‌های فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و ژن چالکون سنتتاز (CHS) می باشد. این محققین افزایش فعالیت این آنزیم‌ها را دلیل افزایش مقدار آنتوسیانین دانسته‌اند. در مورد مکانیسم و چگونگی تأثیر ALA برافزایش بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز آنتوسیانین در گزارش این محققین آمده است که کاربرد لوولنیک اسید که بازدارنده آنزیم ALA دهیدراز می

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.8.7.2]

باشد (مانع وارد شدن ALA به مسیر بیوسنتز تتراپیرول‌ها و پورفیرین‌ها می گردد)، موجب مهار اثر تحریکی ALA بر افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین گردید. این محققین نتیجه گیری کرده‌اند که تبدیل ALA به پورفیرین‌ها برای افزایش بیان این ژن‌ها ضروری است. این محققین گزارش نموده‌اند که تیمار ALA موجب افزایش هم می‌شود و هم به عنوان یک فاکتور نسخه برداری موجب افزایش بیان ژن‌های مورد نظر و در نتیجه افزایش مقدار آنتوسیانین می‌گردد (Xie *et al.,* 2013).

نتیجه‌گیری:

نتایج این مطالعه نشان داد که کاربرد ALA در غلظت های ۱ و ۲ میلی مولار به صورت محلول پاشی روی برگ و اندام هوایی موجب کاهش اثرات تنش شوری و تنش اکسیداتیو ناشی از آن روی گیاه گردید. ظرفیت حذف کردن گونه‌های فعال اکسیژن با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان نظیر SOD، CAT، APX و GR و افزایش مقدار آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی نظیر ترکیبات فنلی افزایش یافت و در نتیجه آسیب به غشاهای زیستی و نشت یونی کاهش و پارامترهای رشد بهبود یافت. بنابراین تیمار ALA راهکار مناسبی برای بهبود مقاومت گیاهان گوجه فرنگی نسبت به تنش شوری می‌باشد.

سپاسگزاری:

نویسندگان بدینوسیله از پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی جهت تامین اعتبار مالی این پروژه با شماره قرارداد (۱/۳۴۵۱) قدردانی می‌نمایند.

منابع:

Averina, N. G., Gritskevich, E. R., Vershilovskaya, I. V., Usator, A. V. and Yaronskaya, E. B. (2010) Mechanisms of salt stress tolerance development in barley plants under the influence of 5-aminolevulinic acid. Russian Journal of Plant Physiology 57: 792-798.

Beale, S. I. and Castelfranco, P. A. (1974) The biosynthesis of δ-aminilevulinic acid in higher plants. Plant Physiology 53: 291-296.

Ben Hamed, K., Castagna, A., Salem, E., Ranieri, A. and Abdelly, C. (2007) Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) under salinity conditions: a comparison of leaf and root antioxidant responses. Plant Growth Regulation 53: 185-194.

Bindu Roy, C. and Vivekanadan, M. (1998b) Role of aminolevulinic acid in improving biomass production in *Vinga catjing, V. mungo* and *V. radiate*. Biologia Plantarum 41: 211-215.

Bindu Roy. C. and Vivekanandan M. (1998a) Hormonal activities of 5-aminolevulinic acid in callus induction and micropropagation. Plant Growth Regulation 26: 15-18.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annals of Biochemistry 72: 248-254.

Chakraborty, N. and Tripathy, B. C. (1992) 5-Aminolevulinic acid induced photodynamic reactions in thylakoid membranes of cucumber (*Cucumis sativus* L.) cotyledons. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 1: 65-68.

Dhindsa, R. S. and Motowe, W. (1981) Drought tolerance in two mosses: correlation with enzymatic defense against lipid peroxidation. Journal of Experimental Botany 32: 79-91.

Foolad, M. R. (2004) Recent advances in genetics of salt tolerance in tomato. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 76**:** 101–119.

Foyer, C. H. and Halliwell, B. (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast: a proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta 133: 21-25.

Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutase. I. occurrence in higher plants. Plant Physiology 59: 309-314.

Heath, R. L. and Packer, L. (1969) Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemisry and Biophysics 125: 189-198.

Hotta, Y., Tanaka. T., Takaoka. H., Takeuchi. Y. and Konnai. M. (1997) Promotive effects of 5-aminolevulinic acid on the yield of several crops. Plant Growth Regulation 22: 109-114.

Jung, S., Back, k., Yang, K., Kuk, Y. I. and Chon, S. U. (2008a) Defense response produced during photodynamic damage in transgenic rice over expressing 5-aminolevulinic acid synthase. Photosynthetica 46: 3-9.

Jung, S., Lee, H. J., Lee, Y., Kang, K., Kim, Y. S., Grimm, B. and Back, K. (2008b) Toxic tetrapyrrole accumulation in protoporphyrinigen IX oxidase-

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.8.7.2]

grown under shade condition. Photosynthetica 47: 347-354.

Wang, J. W., Zheng, L. P., Wu, J. Y. and Tan, R. Y. (2006) Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. Nitric Oxide 15: 351-358.

Watanab, K., Nishihara, E., Watanab, S., Tanaka, T., Takahashi, K. and Takeuchi, Y. (2006) Enhancement of growth and fruit maturity in 2-year-old grapevines cv. Delavare by 5-aminolevulinic acid. Plant Growth Regulation 49: 35-42.

Watanab, K., Tanaka, T., Hotta, Y., Kuramochi, H. and Takeuchi, Y. (2000) Improving salt tolerance of cotton seedlings with 5-aminolevulinic acid. Plant Growth Regulation 32: 99-103.

Xie, L., Wang, Z. H., Cheng, X. H., Gao, J. J., Zhang, Z. P. and Wang, L. J. (2013) 5-Aminolevulinic acid promotes anthocyanin accumulation in Fuji apples. Plant Growth Regulation 69(3): 295-303.

Zhang, J., Li, D. M., Gao, Y., Yu, B., Xia, C. X. and Bai, J. G. (2012) Pretreatment with 5-aminolevulinic acid mitigates heat stress of cucumber leaves. Biologia Plantarum 56: 4: 780-784.

Zhang, W. F., Zhang, F., Raziuddin, R., Gong H. J., Yang, Z. M., Lu, L., Ye. Q. F. and Zhou W. J. (2008) Effects of 5-aminolevulinic acid on oilseed rape seedling growth under herbicide toxicity stress. Journal of Plant Growth Regulation 27: 159-169.

Zhang, Z. J., Li, H. Z., Zhou, W. J., Takeuchi, Y. and Yoneyama, K. (2006) Effect of 5-aminolevulinic acid on development and salt tolerance of potato (*Solanum tuberosum* L.) microtubers *in vitro*. Plant Growth Regulation 49: 27-34.

Zhen, A., Bie, Z. I., Huang, Y., Liu, Z. Y. and Fan, M. I. (2012) Effects of 5-aminolevulinic acid on the H_2O_2 content and antioxidative enzyme gene expression in NaCl–treated cucumber seedlings. Biologia Plantarum 56: 566-570.

overexpressing transgenic rice plants. Plant Molecular Biology 67: 539-546.

Meirs, S., Philosophhadas, S., Aharoni, N. (1992) Ethylene increased accumulation of fluorescent lipid peroxidation products detected during senescence of parsley by a newly developed method. Journal of American Society for Horticultural Science 117:128-132.

Memon, S. A., Hou, X., Wan, G. L., Li, Y. (2009) Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on chlorophyll, antioxidative enzymes and photosynthetic of Packchoi (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. communis Tsen et Lee). Acta Physiologia Plantarum 31: 51-57.

Naeem, M. S., Rashed, M., Liu. D., Jin. Z. L., Ming, D. F., Yoneyama, K., Takeuchi, Y. and Zhou, W. J. (2011) 5-Aminolevulinic acid ameliorates salinity-induced metabolic, water related and biochemical changes in *Brassica napus* L. Acta Physiologia Plantarum 33: 517-528.

Naeem, M. S., Jin, Z. I., Wan, G. L., Liu, P., Liu, H. B., Yonegama, K. and Zhoa, W. J. (2010) 5-Aminolevulinic acid improves photosynthetic gas exchange capacity and ion uptake under salinity stress in oilseed rape (*Brassica napus* L.). Plant and Soil 332: 405-415.

Nakano, Y. and Asado, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology 22: 867-880.

Plewa, M. J., Smith, S. R. and Wanger, E. D. (1991) Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. Mutation Research 247: 57-64.

Soland, S. F. and Laima, S. K. (1999) Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. Plant Agriculture 1: 1-5.

Sun, Y. P., Zhang, Z. P. and Wang, L. J. (2009) Promotion of 5-aminolevulinic acid treatment on leaf photosynthesis is related with increase of antioxidant enzyme activity in watermelon seedlings

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1393.3.8.7.2]