

مقاله پژوهشی

تأثیر گاما آمینو بوتیریک اسید بر شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برگ دو رقم انگور (*Vitis vinifera* L.) تحت تنش سرما

مریم زائری بهروز^۱، روح الله کریمی^{۱،۲*}، موسی رسولی^۳ و مجید رستمی^۱

^۱ گروه به‌زراعی و به‌نژادی انگور، پژوهشکده انگور و کشمش، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

^۲ گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

^۳ گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی قزوین، قزوین، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۱۲، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۳/۰۶/۱۷)

چکیده

در این پژوهش، اثر کاربرد برگی گاما آمینوبوتیریک اسید (گابا؛ صفر، ۱/۵ و ۳ میلی‌مولار) بر محتوای آبسیزیک اسید، قندهای محلول، پلی-آمین‌ها، فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و شاخص پایداری غشاء برگ دو رقم انگور (خلیلی و پرلت) تحت دو تیمار دمایی (۲۰°C و ۲۴°C) به صورت فاکتوریل (۳×۲) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط گلخانه بررسی شد. تاک‌ها در مرحله ۱۵ برگی با غلظت‌های مختلف گابا محلول‌پاشی شدند. بعد از ۲۴ ساعت، نیمی از تاک‌های تیمار شده با گابا به همراه گیاهان شاهد به مدت ۱۲ ساعت تحت دمای ۲۰°C (شرایط تنش سرما) قرار گرفتند و بقیه تاک‌ها (تیمار شده با گابا و شاهد) در دمای ۲۴°C (شرایط عادی) نگهداری و بعد از ۱۲ ساعت نمونه‌برداری شدند. کاربرد گابا در شرایط تنش سرما سبب حفظ کلروفیل و کاهش نشت یونی، مالون دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن و افزایش پروتئین، پرولین و آبسیزیک اسید نسبت به گیاهان شاهد در هر دو رقم شد. مقدار ساکارز، فروکتوز و گلوکز برگ در رقم خلیلی تیمار شده در مقایسه با رقم پرلت تحت تنش سرما بیشتر بود. همچنین کاربرد گابا منجر به افزایش مقدار پلی‌آمین‌های پوترسین، اسپرمین و اسپرمیدین در دمای ۲۰°C شد. تحت تنش سرما، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در غلظت ۳ میلی‌مولار و آسکوربات پراکسیداز در غلظت ۱/۵ میلی‌مولار گابا بیشترین فعالیت آنزیمی را نسبت به گیاهان شاهد نشان دادند. گابا از طریق افزایش آبسیزیک اسید، قندهای محلول و سیستم آنتی‌اکسیدانی، باعث حفظ پایداری غشاء و تحمل به سرمای تاک‌ها شد. تأثیر گابا بر تحمل به سرمای رقم خلیلی بیشتر از رقم پرلت بود.

واژه‌های کلیدی: آبسیزیک اسید، پلی‌آمین‌ها، گلوکز، کاتالاز، نشت یونی

مقدمه

فرهنگ‌های مصرف انگور، در کنار سازگاری به انواع اقلیم‌ها و خاک‌ها، باعث توسعه کشت آن در بیش از ۹۰ کشور جهان شده است. متغیرهای محیطی به عنوان مؤثرترین عوامل در تولید انگور و کیفیت میوه شناخته می‌شوند. در میان متغیرهای

انگور (*Vitis vinifera* L.) از میوه‌های مهم در مناطق معتدله است که علاوه بر مصرف تازه‌خوری دارای فرآورده‌های جانبی متعددی از قبیل کشمش، شیر و آب‌میوه است. تنوع

*نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: r.karimi@malayeru.ac.ir

هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال‌های هیدروکسیل (OH^-) و اکسیژن منفرد (O^-) را تسهیل می‌کند (Foyer and Noctor, 2003). به منظور کاهش یا جلوگیری از صدمات تنش اکسیداتیو ناشی از دمای پایین، گیاهان مجهز به سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی (مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز) و غیرآنزیمی (فنول‌ها و فلاونوئیدها) هستند (Foyer and Noctor, 2003) که افزایش آنها باعث بازدارندگی فعالیت گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن شده و در بیشتر گونه‌های گیاهی از دستگاه فتوسنتزی در برابر صدمات تنش اکسیداتیو محافظت می‌کنند (Karimi et al., 2016).

تاکنون از روش‌های مختلفی از قبیل پوشانیدن بوته‌ها (Khanizadeh et al., 2005)، کاربرد عناصر گیاهی (Karimi, 2017)، انتخاب ارقام مناسب (Ershadi et al., 2016) و مدیریت اقلیم تاکستان (Montes et al., 2012) برای کاهش سرمازدگی در درختان میوه استفاده شده است. با توجه به اینکه تنش سرما از نظر شدت کاهش دما، مدت تنش و چگونگی روند کاهش دما طیف گسترده‌ای می‌تواند داشته باشد (Ershadi et al., 2016) بنابراین منطقی است که گیاهان نیز از طریق روش‌های متفاوتی، از واکنش در سطح دیواره سلولی، غشا سلولی، غشا اندامک‌ها، ریزمولکول‌ها و نهایتاً بیان ژن‌ها به تنش پاسخ دهند (Mazzucotelli et al., 2006). یکی از مسیرهای پاسخ گیاهان افزایش سطح اسیدهای آمینه است. گاما آمینوبوتیریک اسید (گابا) یک اسید آمینه با ساختار چهار کربنه است که به طور گسترده در بخش‌های مختلف سلول گیاهی مانند میتوکندری، سیتوپلاسم، واکوئل‌ها، پراکسی‌زوم‌ها و پلاستیدها توزیع شده است. گابا دارای بارهای مثبت و منفی است و آن را قادر می‌سازد با مولکول‌های دیگر برهم‌کنش داشته باشد و در فرآیندهای فیزیولوژیکی متعدد شرکت کند (Ahmad and Qazi, 2024). در میان مجموعه‌ای از عوامل تسهیل‌کننده سازگاری گیاهان با تنش‌های غیرزیستی، گابا یک عملکرد محوری به عنوان یک مولکول پیام‌رسان درون‌زاد بر عهده می‌گیرد. شواهد تجربی دخالت گابا را در تنظیم ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی متنوع در گیاهان در

محیطی، دمای هوا بیشترین اثر را روی رفتار فیزیولوژیکی تاک و کیفیت انگور دارد (Montes et al., 2012). اغلب تاکستان‌های کشور در مناطق سرد احداث شده‌اند. در برخی نقاط از قبیل استان همدان گاهی دما تا $-23^{\circ}C$ در زمستان و تا $-4^{\circ}C$ در طول بهار کاهش می‌یابد و باعث خسارت به برگ‌ها، شاخه‌های سبز و خوشه‌های گل انگور در اوایل فصل رشد می‌شود (Ershadi et al., 2016). لذا سرمازدگی از مهمترین عوامل کاهش‌دهنده محصول باغات انگور در تاکستان‌های واقع در اقلیم‌های معتدله به شمار می‌رود که در برخی سال‌ها باعث تحمیل زیان‌های اقتصادی کلانی به تاک‌داران می‌شود. بنابراین، به‌کارگیری روش‌های کاهش آسیب تنش سرما یکی از الزامات کلیدی در مدیریت تاکستان‌ها و تولید پایدار انگور در مناطق مستعد با شرایط آب‌وهوایی سرد است.

تحت تنش سرما تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مشخصی از قبیل کاهش محتوای آب بافت‌ها، تجمع محلول‌های سازگار از قبیل کربوهیدرات‌های محلول، آمینو اسیدها (پرولین، بتائین‌گلايسین و گابا) و ترکیبات ضدانجماد از قبیل پروتئین‌های ضدانجماد و فیتوهورمون آبسزیک اسید در گیاه ایجاد می‌شود (Lukatkin, 2002; Malekzadeh et al., 2014; Karimi, 2017; Rashmi et al., 2018). این تغییرات ضمن محافظت از ساختار سلول در برابر آب‌کشی‌دگی ناشی از یخ‌زدگی، باعث کاهش نقطه انجماد می‌شود. در طی تنش سرما قندها با اتصال به فسفولیپیدهای و ایجاد پیوندهای هیدروژنی با پروتئین‌های غشا، باعث پایداری سلول‌ها در مواجهه با دمای پایین می‌شوند و بدین ترتیب سبب کاهش تلفات آب و حفظ تورژسانس سلول در این شرایط می‌شوند (Kasuga et al., 2007). همچنین قندها با کاهش نقطه انجماد شیره سلولی سبب محافظت در برابر سرما می‌شوند (Karimi, 2017). تحت شرایط تنش سرما به دلیل تغییر در موازنه بین نور دریافت شده و کارایی جذب نور، معمولاً تنش اکسیداتیو رخ می‌دهد (Ramalho et al., 2003). تنش اکسیداتیو با افزایش نشت الکترون‌ها به مولکول‌های اکسیژن، تشکیل گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن از قبیل سوپراکسید (O_2^{2-})، پراکسید

ویژگی‌های متفاوت تحمل به سرما انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۴۰۲ روی تاک‌های گلدانی دو ساله تهیه‌شده از ایستگاه تحقیقات انگور ملایر انجام شد. تاک‌ها در گلدان‌های ۷ لیتری حاوی محیط‌کشت پرلیت و کوکوپیت (با نسبت حجمی مساوی) و در شرایط گلخانه ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) قرار گرفتند. گلدان‌ها سه بار در هفته آبیاری و با کود NPK 20-20-20 (مرسین‌کشت، کرج) با غلظت ۰/۵ گرم در لیتر تغذیه شدند. عملیات مراقبت و نگهداری تا مرحله ۱۵ برگی تاک‌ها ادامه یافت.

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار (دو گلدان در هر تکرار) انجام شد. فاکتور اول دارای سه سطح محلول‌پاشی گاما آمینو بوتیریک اسید (گابا، سیگما-آلدریچ، آمریکا) در سه غلظت صفر، ۱/۵ و ۳ میلی‌مولار، فاکتور دوم دو رقم انگور خلیلی (متحمل به سرما) و پرلت (حساس به سرما) و فاکتور سوم شامل دو تیمار دمایی (۲ و ۲۴ درجه سلسیوس) بود (Ershadi et al., 2016).

برای اعمال تیمارهای مورد نظر ابتدا پودر گابا با ۲ میلی‌لیتر اتانول حل و سپس در آب‌مقطر به همراه توئین ۲۰ (سیگما، آلمان) ۰/۵ درصد به حجم مورد نظر رسانده شد. محلول گابا آماده‌شده در غلظت‌های مختلف (۱/۵ و ۳ میلی‌مولار) در اول شهریورماه و دو بار در انتهای روز و تکرار با فاصله ۱۲ ساعت توسط یک پمپ ۲/۵ لیتری دستی تا مرحله آب چک روی تاک‌ها محلول‌پاشی شد. تاک‌های شاهد (غلظت صفر گابا) با آب‌مقطر و توئین ۲۰ محلول‌پاشی شدند. دو روز بعد از محلول‌پاشی، تاک‌های گلدانی تیمارشده با غلظت‌های مختلف گابا به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول به گلخانه با دمای روز $24 \pm 1^\circ\text{C}$ درجه منتقل و پس از ۱۲ ساعت نمونه‌برداری شدند. درگروه دوم (تنش سرما) ابتدا گلدان‌ها با پشم شیشه عایق‌بندی و به اتاقک سرماساز (راد الکترونیک، تهران) با شدت نور حدود ۲۰۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه منتقل شدند. دمای شروع تیمار سرمایی در اتاقک سرماساز بر اساس دمای تقریبی

مواجهه با تنش‌های غیرزنده ثابت می‌کند (Bhattacharjee et al., 2018; Kumar et al., 2019). کاربرد گابا ضمن افزایش غلظت گابای درون‌زاد، از طریق تقویت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی منجر به پایداری غشای سلولی در گیاهان مختلف تحت تنش سرما شده است (Mazzucotelli et al., 2006; Malekzadeh et al., 2014; Aghdam et al., 2016). برای مثال کاربرد گابا با غلظت ۲ میلی‌مولار در مرحله گلدهی گوجه فرنگی تحت تنش سرما نشان داد که گابا از طریق محافظت از یکپارچگی غشا سلولی سبب کاهش مالون دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن شد، همچنین تیمارهایی که گابا دریافت کرده بودند بالاترین سطح فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز را نشان دادند (Abd Elbar et al., 2021). همین‌طور در گیاه چای کاربرد غلظت ۰/۵ میلی‌مولار گابا به طور مؤثر سبب افزایش تحمل به سرما شد و محتوای گابای درون‌زاد، آنتوسیانین و پلی‌آمین‌ها نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت (Zhu et al., 2019). محلول‌پاشی نهال‌های پرتقال با غلظت ۱۰ میلی‌مولار گابا سبب افزایش محتوای اسیدهای آمینه گابا و هورمون‌های گیاهی شد و نشان داد گابا در هماهنگی با فیتوهورمون‌ها عمل می‌کند و می‌تواند نقش کلیدی در کاهش تنش داشته باشد (Hijaz et al., 2018). محلول‌پاشی گابا سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و حفظ یکپارچگی غشا و افزایش تحمل به سرمای دانهال‌های گوجه‌فرنگی شده است (Malekzadeh et al., 2014). همچنین نقش گابا در کاهش آسیب تنش دمای کم در مطالعات متفاوتی مثل موز (Wang et al., 2016) و هلو (Shang et al., 2011) نیز گزارش شده است.

براساس اطلاعات ما، تا کنون اثر کاربرد گابا بر فیزیولوژی تحمل به سرما، به ویژه اثرات این ترکیب بر تغییرات هورمونی انگور گزارش نشده است. لذا این پژوهش با هدف ارزیابی کاربرد برگی گابا بر محتوای برخی هورمون‌های گیاهی، قندهای محلول، فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و شاخص پایداری غشا در دو رقم انگور خلیلی و پرلت با

محیط در زمان انتقال گلدان‌ها (18°C) در نظر گرفته شد و سرعت کاهش دمای اتاق 2°C در ساعت بود. بعد از اینکه دمای اتاق سرماساز به 2°C رسید، تاک‌ها به مدت ۱۲ ساعت در این درجه حرارت نگهداری شدند. پس از گذشت این مدت، دمای اتاق سرماساز به تدریج افزایش و ظرف ۵ ساعت به دمای محیط رسانده شد. در ادامه تاک‌های سرما دیده از اتاق سرمایی خارج و به منظور بهبودی مجدد به مدت سه روز در گلخانه قرار داده شدند. سپس برگ‌های کاملاً توسعه یافته تاک‌ها برای اندازه‌گیری شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ذیل مورد استفاده قرار گرفتند (Karimi et al., 2016).

صفات اندازه‌گیری شده شامل محتوای کلروفیل (شاخص SPAD)، نشت یونی، پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، پرولین، پروتئین محلول، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز)، قندهای محلول (گلوکز، فروکتوز و ساکاروز)، پلی‌آمین‌ها (پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین)، آبسزیک اسید و گابای درون‌زاد بود.

محتوای کلروفیل (شاخص SPAD) برگ از برگ‌های میانی شاخه‌های یکساله اطراف تاک با استفاده از دستگاه کلروفیل‌متر مدل SPAD-CL01 (آتاگو، ساخت ژاپن) اندازه‌گیری شد. مقدار نشت یونی بافت برگ با استفاده از دستگاه هدایت‌سنج الکتریکی و در دو مرحله قبل از اتوکلاو (EC_1) و پس از آن (EC_2) اندازه‌گیری شد. مقدار نشت یونی (EL) از طریق رابطه $\text{EL} = (\text{EC}_1/\text{EC}_2) \times 100$ محاسبه گردید (Ershadi et al., 2016). اندازه‌گیری مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشا به وسیله تست تیوباربتوریک اسید (TBAT) با سنجش مقدار مالون دی‌آلدئید انجام شد (Heath and Packer, 1968). اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به روش Loreto و Velikova (۲۰۰۱) صورت گرفت. غلظت پراکسید هیدروژن نمونه‌ها به وسیله مقایسه جذب آن‌ها در طول‌موج ۳۹۰ نانومتر و منحنی استاندارد آن در طیفی از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرومول بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

برای اندازه‌گیری پرولین برگ مقدار جذب نوری نمونه‌ها در طول‌موج ۵۱۸ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Spekol 2000، ساخت آلمان) قرائت و غلظت پرولین بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر برگ تعیین شد (Bates et al., 1973). سنجش غلظت پروتئین محلول با معرف رنگی بریلینت‌بلو (G-250) در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر انجام شد (Bradford, 1976) با استفاده از منحنی استاندارد تهیه‌شده از غلظت‌های مختلف آلبومین گاوی، غلظت پروتئین محلول بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر بیان شد.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، نمونه‌های تازه برگ (۲۰۰ میلی‌گرم) در ازت مایع سائیده و پودر شد و تا زمان سنجش در دمای -80°C نگهداری شدند. فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (Fridovich and Bergmeyer, 1971)، کاتالاز (Nakano and Asada, 1981) به ترتیب در طول‌موج‌های ۵۶۰، ۲۴۰ و ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. هر یک واحد فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به عنوان مقداری از آنزیم منظور گردید که در طول‌موج ذکرشده موجب ۵۰ درصد کاهش احیای فتوشیمیایی نیتروبلو تترازولیوم در مقایسه با نمونه شاهد می‌گردد. هر یک واحد از فعالیت آنزیم کاتالاز به عنوان مقداری از این آنزیم‌ها در نظر گرفته شد که موجب کاهش یک میکرومول H_2O_2 در هر دقیقه می‌شود. هر واحد فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به عنوان مقداری از آنزیم در نظر گرفته شد که موجب اکسید شدن یک میکرومول آسکوربات در هر دقیقه می‌شود. میزان فعالیت هر سه آنزیم بر حسب واحد در میلی‌گرم پروتئین برگ بیان شد.

قندهای محلول براساس روش Comis و همکاران (۲۰۰۱) با تزریق ۱۰ میکرولیتر از عصاره اتانولی برگ تهیه‌شده به دستگاه HPLC (مدل Unicam-Crystal-200 ساخت کشور انگلیس) اندازه‌گیری شد. ستون به کار گرفته‌شده Spherisorb C8-ODS₂ به ابعاد طول ۱۵۰ میلی‌متر و قطر ۴/۶ میلی‌متر و قطر ذرات ۰/۳ میکرون بود. فاز متحرک شامل بافر سترات سدیم $\text{pH} = 5/5$ و استونیتریل فوق خالص با نسبت ۹۹:۱ و با

دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام شد و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel رسم گردید.

نتایج و بحث

کلروفیل: اثر ساده رقم، دما، گابا و اثر متقابل گابا و دما بر محتوای کلروفیل برگ در سطح احتمال پنج درصد معنی دار شد. بر اساس نتایج جدول ۱، کاهش دما به طور معنی داری سبب کاهش کلروفیل شد. این کاهش در تیمارهای دریافت کننده گابا کمتر بود. کمترین مقدار کلروفیل در غلظت صفر میلی مولار هر دو رقم تحت دمای 20°C و بیشترین مقدار کلروفیل در غلظت ۳ میلی مولار رقم خلیلی تحت دمای $24^{\circ}\text{C} +$ مشاهده شد. در بین گیاهانی که تحت تنش سرما قرار گرفتند با افزایش غلظت گابا مقدار کلروفیل به طور معنی داری کاهش کمتری نشان دادند. درحالی که افزایش محتوای کلروفیل در بین تیمارهای فاقد تنش سرمایی کمتر تحت اثر غلظت گابا قرار گرفت. در واقع اثر گابا بر سطح کلروفیل در شرایط تنش بیشتر از شرایط بدون تنش بود (جدول ۱). محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی به عنوان یکی از مهمترین شاخص‌های فیزیولوژیکی مرتبط با فعالیت فتوسنتزی گیاه به شدت وابسته به شرایط محیطی هستند. گابا به صورت مستقیم با افزایش کلروفیل و به دنبال آن افزایش ظرفیت فتوسنتزی گیاه سبب افزایش تحمل گیاه نسبت به تنش‌های محیطی می شود. در واقع گلوتامیک اسید پیش ماده مشترک گابا و کلروفیل است کاربرد خارجی این متابولیت سبب سوق دادن گلوتامیک اسید به سمت تولید کلروفیل و اسید آمینه پرولین آزاد می شود علاوه بر این گابا با افزایش انسجام غشاهای پلاسمایی و غشاهای تیلکوئیدی و خاصیت آنتی اکسیدانی سبب کاهش آسیب به دستگاه فتوسنتزی در زمان تنش می شود (Shelp et al., 2012). اثر گابا بر محافظت و افزایش عملکرد فتوسنتزی و ممانعت از تخریب کلروفیل در شرایط تنش‌های مختلف زیستی در فلفل (Li et al., 2017) گزارش شده است که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد.

شاخص‌های آسیب دیدگی غشا (نشت یونی، پراکسید

سرعت عبور 0.1 میلی لیتر بر دقیقه بود. بر اساس زمان بازداری و با استفاده از استانداردهای گلوکز، فروکتوز و ساکاروز، نوع و مقدار قندهای محلول در نمونه‌های مجهول مشخص و به صورت میکرومول بر گرم وزن تر بیان شد (Comis et al., 2001).

برای اندازه گیری غلظت پلی آمین‌ها (پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین) مقدار 10 میکرولیتر از محلول پایانی مرحله جداسازی به دستگاه HPLC با ستون کوچک با طول 10 سانتی متر و قطر داخلی 3 میلی متر فاز معکوس از نوع Chorompack-Nederland تزریق گردید. فاز متحرک شامل مخلوط استو نیتریل فوق خالص و آب دیونیزه به ترتیب با نسبت 72 به 28 حجم به حجم است که با سرعت 2 میلی لیتر بر دقیقه حرکت آن با سیستم ایزوکرایک انجام می شود. آشکارساز دستگاه از نوع UV و در طول موج 337 نانومتر تنظیم شد (Walter and Geuns, 1987).

برای اندازه گیری آبسزیک اسید از دستگاه HPLC مجهز به آشکارساز UV-Vis SPD MLOAD از نوع Photodiod array و یک ستون Diamonsic-C18 (قطر ذرات 5 میکرومتر، 250 میلی متر $\times$ $4/6$ میلی متر در روز) استفاده شد. فاز متحرک از متانول 20 تا 75% در اسید استیک 1% با نرخ جریان $1/2$ میلی لیتر در دقیقه تشکیل شده بود. بر اساس زمان بازداری طبق نمونه استاندارد آبسزیک اسید و سطح زیر منحنی، مقدار آبسزیک اسید در طول موج 260 نانومتر مشخص و به صورت نانوگرم در گرم وزن تر بیان شد (Yurekli et al., 2001).

سنجش مقدار گابا درون زاد برگ با استفاده از دستگاه HPLC انجام شد. مقدار 5 میکرولیتر به ستون C18 ($50\text{mm} \times 2/1$) تزریق شد. فاز متحرک شامل مخلوط متانول و آب دیونیزه به ترتیب با نسبت 60 به 40 حجم به حجم می باشد که با سرعت 0.8 میلی لیتر بر دقیقه حرکت آن انجام می شود. آشکارساز دستگاه UV از نوع Photodiod array و در طول موج 254 نانومتر تنظیم شد (Hayat et al., 2015).

تجزیه داده‌ها با نرم افزار آماری SAS 9.4 (دستورالعمل GLM) و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای

جدول ۱- برهمکنش گاما آمینو بوتیریک اسید (گابا؛ صفر، ۱/۵ و ۳ میلی مولار) و دما (۲۴°C و ۲°C) بر محتوای کلروفیل (SPAD) و شاخص‌های آسیب دیدگی غشا (نشت یونی، پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدئید) برگ‌های دو رقم انگور (خلیلی و پرلت).

رقم انگور	تیمارها		کلروفیل (SPAD)	نشت یونی (%)	مالون دی آلدئید ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{ FW}$)	پراکسید هیدروژن ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{ FW}$)
	گابا (mM)	دما (°C)				
خلیلی	۰	۲۴	8.6 ± 0.13^{abc}	25.3 ± 1.57^d	3.43 ± 0.19^f	2.46 ± 0.01^{cd}
	۱/۵	۲۴	9 ± 0.13^{ab}	25.6 ± 1.7^d	3.6 ± 0.15^f	1.6 ± 0.10^{cde}
	۳	۲۴	9.3 ± 0.26^a	29 ± 1.20^e	3.4 ± 0.16^f	2.3 ± 0.06^{cd}
	۰	۲	4.1 ± 0.3^g	67.6 ± 2.45^a	11.5 ± 0.15^a	5.5 ± 0.13^a
	۱/۵	۲	6.8 ± 0.13^e	53 ± 1.20^{bc}	8.4 ± 0.21^{cd}	3.6 ± 0.15^b
	۳	۲	8.2 ± 0.13^{bcd}	47.2 ± 1.3^c	6.5 ± 0.17^e	3.7 ± 0.18^b
پرلت	۰	۲۴	7.3 ± 0.15^{de}	30 ± 1.6^d	4.03 ± 0.35^f	2.1 ± 0.20^{cde}
	۱/۵	۲۴	7.8 ± 0.12^{cd}	31.6 ± 1.92^d	4.1 ± 0.30^f	1.45 ± 0.07^e
	۳	۲۴	8.3 ± 0.10^{bc}	30.6 ± 1.34^e	4.1 ± 0.33^f	2.0 ± 0.39^{cde}
	۰	۲	3.3 ± 0.17^g	70.6 ± 1.9^a	13.2 ± 0.23^a	5.6 ± 0.20^a
	۱/۵	۲	5.7 ± 0.08^f	58 ± 1.45^b	9.4 ± 0.12^b	3.3 ± 0.13^b
	۳	۲	6.9 ± 0.15^d	55 ± 1.20^{bc}	7.8 ± 0.14^d	3.3 ± 0.11^b

‡ میانگین‌های دارای حرف‌های مشترک در هر ستون، بر اساس آزمون دانکن از لحاظ آماری (سطح ۵٪) تفاوت معنی داری ندارند.

هیدروژن و مالون دی آلدئید): اثر ساده رقم، دما و گابا بر محتوای نشت یونی و مالون دی آلدئید برگ در سطح احتمال پنج درصد معنی دار و اثر ساده گابا و دما بر محتوای پراکسید هیدروژن برگ در سطح احتمال پنج درصد معنی دار شد ولی اثر رقم بر محتوای این شاخص معنی دار نشد. همچنین اثر متقابل گابا و دما بر محتوای هر سه شاخص آسیب دیدگی غشا در سطح احتمال پنج درصد معنی دار شد.

بر اساس نتایج بیشترین و کمترین درصد نشت یونی به ترتیب در تیمارهای صفر میلی مولار گابا تحت دمای ۲°C و تیمار ۳ میلی مولار گابا تحت دمای ۲۴°C در هر دو رقم مشاهده شد. همچنین بیشترین مقدار پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدئید در غلظت صفر میلی مولار گابا تحت دمای ۲°C بود (جدول ۱). کمترین مقدار پراکسید هیدروژن در غلظت ۱/۵ میلی مولار گابا در رقم پرلت تحت دمای ۲۴°C مشاهده شد (جدول ۱). بین تیمارهای تحت دمای ۲۴°C تفاوت معنی داری در سطح مالون دی آلدئید مشاهده نشد.

آسیب ناشی از کاهش دما سبب متلاشی شدن ساختار غشا سلولی که تا حدی از دیواره سلولی جدا شده است می شود. این تغییر سبب افزایش غلظت پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدئید به عنوان نشانگرهای بیوشیمیایی آسیب به غشا می شود. این متابولیت به عنوان یک کاتیون می تواند به ترکیبات آنیونی غشا مثل فسفولیپیدها پیوند خورده و از این طریق باعث ثبات لایه های غشا شود. گابا یک تنظیم کننده مهم و جاروب کننده رادیکال های آزاد در سیستم های گیاهی است (Hijaz et al., 2018). یافته های حاضر همسو با بسیاری از مطالعات انجام گرفته در گیاهان متفاوت و در تنش های متفاوت نشان داد اهمیت گابا در تنش های گیاهی برای حفظ غشا چند برابر می شود. کاربرد گابا خارجی باعث بهبود رشد گیاهچه از نظر طول گیاهچه و تجمع زیست توده در تمام ارقام ذرت در ۳ و ۷ روز پس از تیمار و کاهش آسیب به غشا شد (Li et al., 2016). گابا با حفظ یکپارچگی غشای گیاهچه های طالبی سبب کاهش محتوای مالون دی آلدئید شد و گیاهچه های خربزه را در

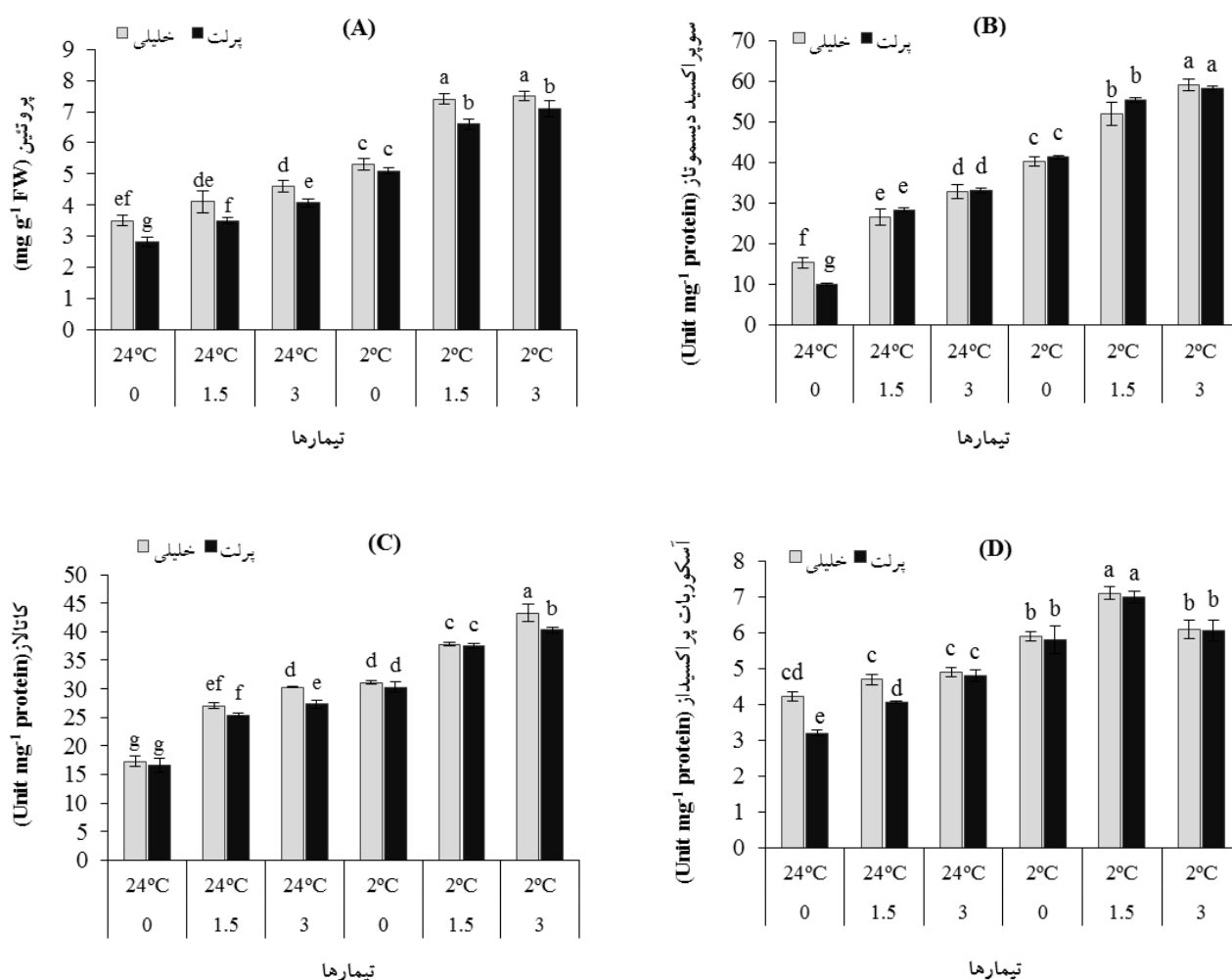
برابر تنش شوری - قلیایی محافظت کرد (Chen et al., 2018). همچنین کاربرد گابا در گیاه تنباکو تحت تنش کم آبی باعث کاهش چشمگیر پراکسیداسیون لیپیدها غشا شد (Liu et al., 2011). کاربرد گابا تحت تنش سرما در گیاه برنج، سبب کاهش نشت یونی و افزایش استحکام غشا شد (Jia et al., 2017) که تأییدی بر یافته‌های مطالعه حاضر است.

پروتئین محلول: اثر ساده رقم، گابا و دما و اثر متقابل گابا و دما بر محتوای پروتئین محلول برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. بر اساس نتایج مقایسه میانگین جدول ۱، با کاهش دما مقدار پروتئین برگ در همه تاک‌ها افزایش یافت که این افزایش در تیمارهای دریافت‌کننده گابا بیشتر بود. بیشترین مقدار پروتئین در غلظت‌های ۳ و ۱/۵ میلی‌مولار دو رقم تحت دمای ۲۰°C مشاهده شد و کمترین مقدار در رقم پرلت تحت غلظت صفر میلی‌مولار گابا و دمای ۲۴°C مشاهده شد (شکل ۱A). افزایش تجمع پروتئین‌های محافظتی و تغییرات ساختاری پروتئین‌ها دو تغییر مهم پروتئین‌ها در واکنش به تنش دمای پایین است. مسیر جایگزین گابا یک بخش از مسیرهای متابولیکی است که در تعادل بین C/N از طریق جذب کربن از گلوتامات و شار کربن از طریق چرخه تری‌کربوکسیلیک دخیل است. گابا علاوه بر اینکه به‌عنوان یک واسطه متابولیسم نیتروژن و اسیدهای آمینه عمل می‌کند بر سطح آنزیم‌هایی مثل نیترات ردوکتاز تأثیر گذاشته و به‌عنوان سیگنالی برای متابولیسم اولیه نیتروژن و جذب نیترات عمل می‌کند. گابا از طریق ممانعت از تخریب و آسیب به پروتئین‌ها، افزایش اسیدهای آمینه و تأثیر بر فعالیت آنزیم‌های درگیر در متابولیسم نیتروژن و پروتئین بر محتوای پروتئین سلول اثر می‌گذارد. کاربرد برگی ۲ میلی‌مولار گابا در لویا تحت تنش خشکی به‌طور قابل توجهی محتوای پروتئین را نسبت به گیاهان شاهد افزایش داد (Abd El-Gawad et al., 2021). محلول‌پاشی نهال‌های پرتقال با گابا ۱۰ میلی‌مولار هفت روز بعد از تیمار مقدار آمینواسیدها به شدت افزایش یافت و از شدت تنش را کاهش داد (Hijaz et al., 2018). غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ممانعت از تنش اکسیداتیو گیاهان

در پاسخ به تجمع گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابد. گابا با فعال‌کردن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در مهارکردن گونه‌های اکسیژن فعال در محافظت از غشا سلولی نقش دارد (Liu et al., 2011).

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی: اثر ساده دما و گابا بر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد. سایر اثرات دوگانه و سه‌گانه بر فعالیت این آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی معنی‌دار نشد و تنها اثر متقابل گابا و دما بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. بر اساس نتایج، تنش سرما (۲°C) منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز برگ هر دو رقم انگور خلیلی و پرلت در مقایسه با تاک‌های واقع در تیمار دمایی ۲۴°C شد (شکل ۱B). در هر دو رقم انگور، افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تاک‌های تیمار شده با غلظت ۳ میلی‌مولار گابا به ویژه تحت تنش سرما بیشتر از تاک‌های واقع در شرایط دمایی گلخانه بود. در گیاهان تحت تنش سرما میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در رقم خلیلی و پرلت به ترتیب ۲۹/۲ و ۳۱/۷ درصد بیشتر از تاک‌های شاهد تحت همین تیمار دمایی بود (شکل ۱B).

در مورد آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز مشخص شد که فعالیت این دو آنزیم با اینکه در هر دو تیمار دمایی در رقم خلیلی بیشتر بود ولی از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با رقم پرلت نداشت. فعالیت آنزیم کاتالاز رقم خلیلی تیمار شده با غلظت ۳ میلی‌مولار گابا تحت هر دو تیمار دمایی بیشتر از رقم پرلت بود (شکل ۱C). همچنین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تاک‌های رقم خلیلی بدون تیمار گابا و یا تیمار شده با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار گابا به طور معنی‌داری بیشتر از رقم پرلت بود (شکل ۱D). در کل بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز مربوط به برگ تاک‌های رقم خلیلی تیمار شده با غلظت ۳ میلی‌مولار گابا تحت تنش سرما بود و بیشترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تاک‌های تیمار شده با غلظت ۱/۵



شکل ۱- برهمکنش گاما آمینو بوتیریک اسید (گابا؛ صفر، ۱/۵ و ۳ میلی مولار) و دما (۲۴°C و ۲°C) بر محتوای پروتئین (پانل A) و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) (به ترتیب پانل‌های B-D) برگ دو رقم انگور (خلیلی و پرلت). میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

بیوشیمیایی فلفل دلمه‌ای بر روی دو ژنوتیپ Scope F1 و Mercury تحت تنش خشکی ۵۰ و ۳۰ درصد ظرفیت زراعی محلول‌پاشی با غلظت‌های ۲ و ۴ میلی مولار انجام شد، نتایج مطالعه نشان داد فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در غلظت ۲ میلی مولار نسبت به سایر تیمارها بیشترین مقدار را دارد. کاربرد گابا در سیب (Liu *et al.*, 2021) و گوجه‌فرنگی (Malekzadeh *et al.*, 2014) با تأثیر مثبت بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی سبب کاهش صدمات ناشی از تنش‌ها شده است. **قندها (ساکارز، فروکتوز، گلوکز):** اثر ساده دما و گابا بر محتوای قندهای محلول ساکارز، فروکتوز و گلوکز برگ در

میلی مولار گابا تحت تنش سرما بود که البته از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با رقم پرلت نداشت (شکل ۱C-D). تحمل به تنش سرما اغلب با افزایش سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در ارتباط است. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی به منظور کاهش اثرات تنش اکسیداتیو القاشده در انگور تحت تنش سرما مشاهده شده است (Karimi *et al.*, 2016). تیمار گابا از راه افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و مهار گونه‌های فعال اکسیژن باعث محافظت از غشا سلولی شده است (Liu *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022). به دنبال درک اثرات محلول‌پاشی گابا بر روی رشد رویشی و همچنین ترکیبات فیزیولوژیکی و

جدول ۲- برهمکنش گاما آمینو بوتیریک اسید (گابا؛ صفر، ۱/۵ و ۳ میلی‌مولار) و دما (۲۴°C و ۲°C) بر محتوای قندهای محلول و گابا درون‌زاد برگ دو رقم انگور (خلیلی و پرلت).

رقم انگور	تیمارها		ساکاروز ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$)	گلوکز ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$)	فروکتوز ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$)	گابا ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$)
	دما (°C)	گابا (mM)				
خلیلی	۲۴	۰	۲۶/۲±۰/۵ ^e	۱۹/۳±۰/۵ ^e	۲۰/۶±۱/۲ ^{ed}	۵/۳۶±۰/۹۵ ^f
	۲۴	۱/۵	۳۱/۴±۱/۰۵ ^d	۲۰/۱±۰/۹۹ ^{cd}	۲۲/۲±۱/۶ ^d	۶/۷±۰/۵۰ ^e
	۲۴	۳	۳۵/۴±۰/۵۶ ^c	۲۱/۷±۰/۶ ^c	۲۱/۰±۱/۷۲ ^{ed}	۷/۲±۰/۹۰ ^e
	۲	۰	۳۷/۱±۰/۱۳ ^c	۲۵/۴±۰/۴۹ ^b	۲۵/۷±۱/۱۲ ^c	۱۲/۰±۱/۶۰ ^c
	۲	۱/۵	۴۵/۵±۰/۵۲ ^a	۳۵/۳±۰/۵۵ ^a	۳۰/۷±۲/۰ ^{۱ab}	۱۴/۸±۰/۵۶ ^b
	۲	۳	۴۴/۱±۰/۴۵ ^a	۳۶/۴±۰/۵۸ ^a	۳۲/۴±۱/۴۷ ^a	۲۰/۰±۱/۰ ^{۱a}
پرلت	۲۴	۰	۲۳/۱±۰/۴۷ ^e	۱۸/۷±۱/۸۵ ^e	۱۸/۵±۱/۲۵ ^e	۴/۹±۰/۹۵ ^f
	۲۴	۱/۵	۳۱/۶±۰/۵ ^d	۱۹/۷±۰/۶۸ ^{cd}	۲۲/۳±۰/۹۶ ^d	۵/۵۳±۱/۰ ^{۱f}
	۲۴	۳	۳۲/۹±۰/۱۱ ^d	۲۱/۱±۰/۹۸ ^{cd}	۲۰/۶±۱/۱۸ ^{ed}	۶/۷±۱/۲۱ ^e
	۲	۰	۳۲/۸±۰/۱۷ ^d	۲۵/۳±۱/۲ ^b	۲۵/۱±۲/۵ ^c	۱۰/۰±۱/۱ ^d
	۲	۱/۵	۳۹/۴±۰/۵۲ ^b	۳۵/۳±۰/۵۷ ^a	۲۹/۳±۱/۴۷ ^b	۱۲/۶±۰/۹۲ ^c
	۲	۳	۴۱/۱±۰/۷۷ ^b	۳۷/۳±۰/۵۷ ^a	۳۱/۷±۱/۱ ^{ab}	۱۸/۷۲±۱/۴۷ ^a

† میانگین‌های دارای حرف‌های مشترک در هر ستون، بر اساس آزمون دانکن از لحاظ آماری (سطح ۵٪) تفاوت معنی‌داری ندارند.

سطح احتمال پنج‌درصد معنی‌دار شد. ولی اثر ساده رقم تنها بر محتوای ساکاروز برگ معنی‌دار شد. اثر متقابل گابا و دما بر محتوای فروکتوز و گلوکز و اثر متقابل دما و رقم بر محتوای ساکاروز در سطح احتمال پنج‌درصد معنی‌دار شد. اثر سه‌گانه رقم، گابا و دما تنها بر محتوای ساکاروز معنی‌دار شد. بر اساس نتایج جدول ۲، اعمال تنش سرما محتوای گلوکز، فروکتوز و ساکاروز را در هر دو رقم انگور خلیلی و پرلت در مقایسه با تاک‌های واقع در شرایط بدون تنش افزایش داد. در دمای ۲۴°C بین محتوای گلوکز و ساکاروز برگ تاک‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱/۵ و ۳ میلی‌مولار گابا و تاک‌های شاهد (غلظت صفر میلی‌مولار گابا) در هر دو رقم خلیلی و پرلت اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۲). در رقم خلیلی بین غلظت‌های مختلف گابا از لحاظ محتوای فروکتوز در دمای ۲۴°C اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ولی در رقم پرلت بین محتوای فروکتوز تاک‌های تیمار شده با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار گابا و تاک‌های تیمار نشده در این تیمار دمایی اختلاف

معنی‌داری مشاهده شد. تحت تنش سرما (۲°C) بین محتوای ساکارز، فروکتوز و گلوکز برگ در تاک‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱/۵ و ۳ میلی‌مولار گابا و تاک‌های شاهد (غلظت صفر میلی‌مولار گابا) در هر دو رقم خلیلی و پرلت اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۲). به‌طور کلی تیمار گابا به ویژه در تاک‌های تحت تنش سرما محتوای گلوکز، فروکتوز و ساکاروز را در مقایسه با تاک‌های شاهد به میزان چشمگیری افزایش داد. این افزایش در رقم متحمل به سرمای خلیلی بیشتر از رقم حساس به سرمای پرلت بود (جدول ۲).

کربوهیدرات‌ها به‌عنوان یکی از مهمترین تنظیم‌کننده‌های اسمزی شناخته می‌شوند که منجر به استحکام غشا در برابر آسیب ناشی از تنش‌ها می‌شوند (Ershadi et al., 2016). گابا نقش مهمی در متابولیسم قندها و اسیدهای آلی داشته و از این طریق با تنش‌های گیاهی مقابله می‌کند (Hijaz et al., 2018). مطالعات زیادی تحت تنش‌های مختلف محیطی نشان دادند گابا سبب افزایش غلظت قندهای محلول می‌شود. به دنبال

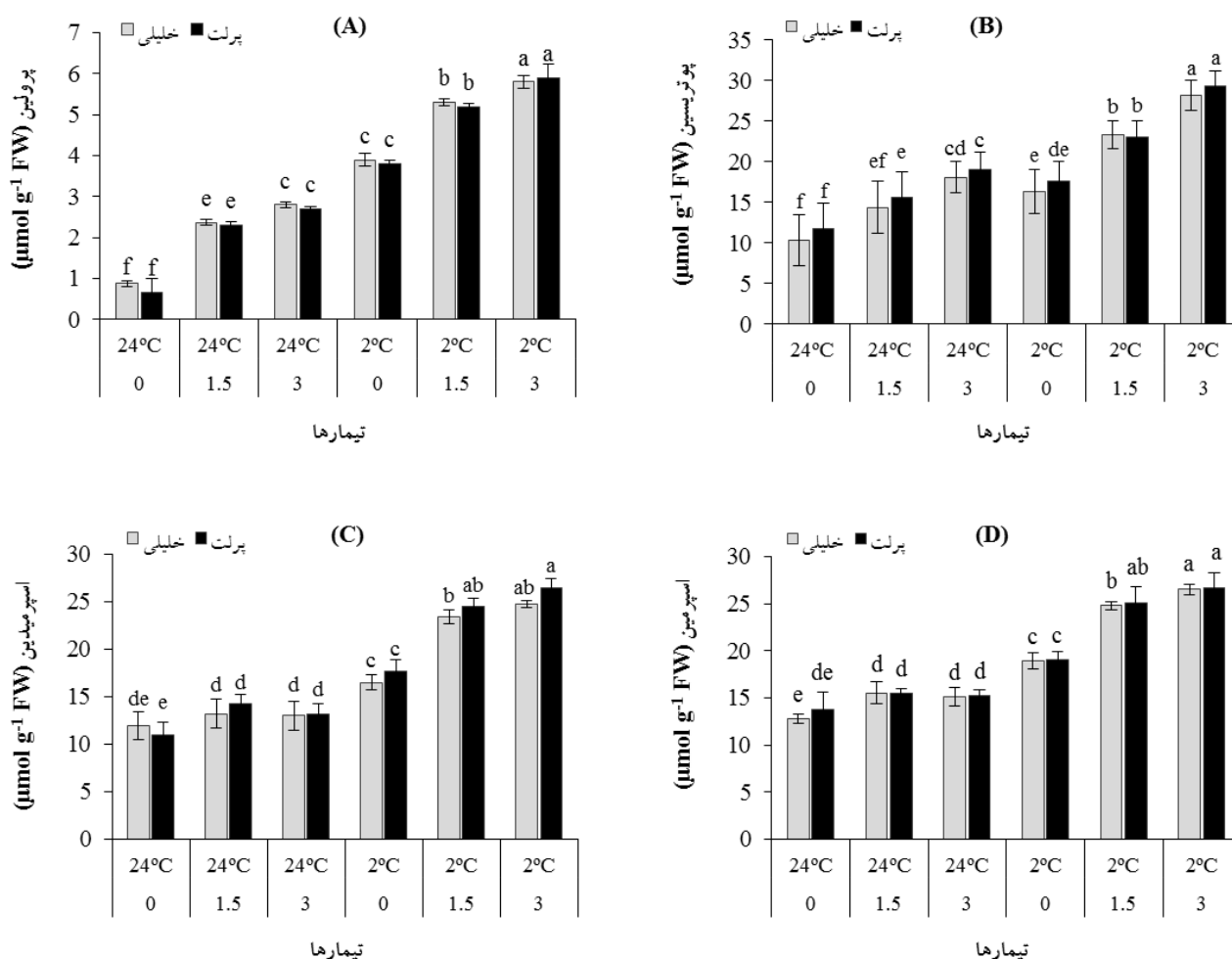
افزایش می‌یابد و کاربرد گابا به تنهایی نمی‌تواند تأثیری بر افزایش درونی گابا داشته باشد (Ahmad and Qazi, 2024).

پرولین: اثر ساده گابا و دما بر محتوای پرولین برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد و اثر سایر تیمارها بر محتوای پرولین برگ تاک معنی‌دار نشد. همان‌طور که در شکل ۲ دیده می‌شود تیمار سرما به طور معنی‌داری محتوای پرولین برگ را در هر دو رقم انگور افزایش داد. این افزایش در تیمارهایی که تحت تیمار گابا قرار گرفته بودند بیشتر از تیمارهای فاقد گابا بود. رقم پرلت با غلظت ۳ میلی‌مولار تحت دمای ۲۰°C بیشترین غلظت پرولین را داشت و تیمارهای فاقد گابا تحت دمای ۲۴°C در هر دو رقم کمترین مقدار پرولین را نشان دادند. تیمارهای غلظت ۳ و ۱/۵ میلی‌مولار گابا که تحت تنش سرما قرار نگرفته بودند سطح پرولین تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۲A). تجمع آنتی‌اکسیدان‌های غیره آنزیمی یکی از مهمترین پاسخ‌های گیاهان به تنش‌های دمایی است. پرولین در تنظیم اسمزی دخالت کرده و از طرفی سبب حفظ ساختارهای غشاهای سلولی و ساختار پروتئین‌ها می‌شود. افزایش گابا به‌عنوان یک سیگنال در شروع تنش محیطی با افزایش فعالیت آنزیم‌های پرولین-۵-کربوکسیلات سنتتاز، اورنیتین آمینو ترانسفراز و سرکوب فعالیت پرولین دهیدروژناز منجر به تجمع پرولین در گیاه و حفظ ساختار سلول می‌شود (Hijaz et al., 2018). در موز تیمارشده با گابا ۲ میلی‌مولار افزایش فعالیت آنزیم‌های پرولین-۵-کربوکسیلات سنتتاز و کاهش ۷۳ درصدی آنزیم پرولین دهیدروژناز و افزایش ۱۴ درصدی پرولین نسبت به شاهد مشاهده شد (Wang et al., 2016). کاربرد گابا در گیاهان شبدر سفید تحت تنش خشکی منجر به تجمع بیشتر گابا به صورت درون‌زا شد که با افزایش مثبت در متابولیسم پرولین و آنزیم‌های مسیر گابا - shunt همراه بود (Yong et al., 2017). افزایش پرولین با کاربرد گابا در هلو (Shang et al., 2011) و ذرت (Wang et al., 2017) نیز گزارش شده است.

پلی‌آمین‌ها (پوترسین، اسپرمین، اسپرمیدین): اثر ساده

کاربرد گابا در انار فعالیت آنزیم‌های ساکارز سنتتاز و ساکارز فسفات سنتتاز افزایش و فعالیت آنزیم ساکارز سنتتاز کربوکسیلاز به شدت کاهش یافت، اندازه‌گیری قندهای ساکارز، فروکتوز و گلوکز در تیمارهای تحت درمان گابا نسبت به گیاهان شاهد افزایش داشتند (Zarbaksh and Shahsavar, 2023). همچنین کاربرد گابا در نوعی چمن (*Agrostis stolonifera*) سبب افزایش اسیدهای آمینه و قندهای محلول در شرایط تنش دمایی بالا شد (Li et al., 2016).

گابا درون‌زاد: اثر ساده رقم، گابا و دما و اثر متقابل گابا و دما بر محتوای گابا درون‌زاد برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. اثر سایر تیمارهای ترکیبی بر محتوای گابا معنی‌دار نشد. بر اساس نتایج، محلول‌پاشی گابا محتوای گابای درون‌زاد برگ را در هر دو رقم انگور افزایش داد اما این افزایش در تاک‌های تحت دمای ۲۰°C در مقایسه با محتوای این اسیدآمینه در تاک‌های واقع در شرایط بدون تنش چشمگیرتر بود. در رقم خلیلی تحت شرایط بدون تنش (۲۴°C)، بین دو غلظت ۱/۵ و ۳ میلی‌مولار از لحاظ محتوای گابای درون‌زاد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ولی با محتوای گابا درون‌زاد تاک‌های شاهد در همین تیمار دمایی تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۲). بیشترین محتوای گابا درون‌زاد در تیمار ۳ میلی‌مولار رقم خلیلی تحت دمای ۲۰°C مشاهده شد که البته از لحاظ آماری با محتوای این شاخص در رقم پرلت تحت تنش سرما تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۲). هم‌راستا با نتایج مطالعه حاضر، کاربرد گابا ضمن افزایش بیان ژن گلوتامات دکربوکسیلاز (GAD) و کاهش سطح ژن گابا ترانس آمیناز سبب افزایش محتوای گابای درون‌زاد شد (Shekari et al., 2021). در اکثر مطالعات انجام‌گرفته در این زمینه کاربرد گابا سبب افزایش گابا درون‌زاد شده است نتایج ما تنها زمانی با این مطالعات همسو بود که گیاهان تحت استرس دمایی قرار می‌گرفتند و در شرایط نرمال و بدون استرس غلظت گابا تأثیر معنی‌داری بر گابای درونی نداشت. این احتمال وجود دارد که بیان ژن گلوتامات دکربوکسیلاز (GAD) بیشتر تحت اثر شرایط محیطی یا ترکیبی از مقدار گابا، گلوتامات و استرس محیطی

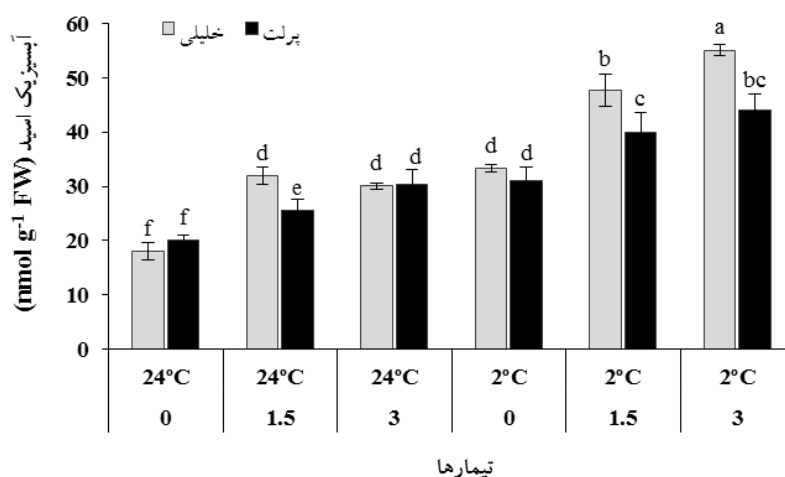


شکل ۲- برهمکنش گاما آمینو بوتیریک اسید (گابا؛ صفر، ۱/۵ و ۳ میلی‌مولار) و دما (۲۴°C و ۲°C) بر محتوای پرولین (پانل A) و پلی‌آمین‌ها (پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین به ترتیب پانل‌های B-D) برگ دو رقم انگور (خلیلی و پرلت). میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

رقم تحت تنش دمایی ۲°C بالاترین مقدار پوترسین را داشتند و کمترین مقدار در تیمارهای صفر میلی‌مولار رقم خلیلی تحت دمای ۲۴°C مشاهده شد (شکل ۲B).

پلی‌آمین‌ها به‌عنوان دومین پیام‌رسان سلول شناخته می‌شوند. در واکنش به تنش‌های محیطی غلظت این متابولیت‌ها در گیاه به سرعت تغییر می‌کند. پلی‌آمین‌ها در طیف وسیعی از فرایندهای فیزیولوژیکی سلول مثل سنتز پروتئین‌ها، همانندسازی DNA و تقسیمات سلولی شرکت دارند. مسیر تخریب پلی‌آمین‌ها در سلول‌های گیاهی به مسیر بیوستز گابا ختم می‌شود بنابراین تغییرات این دو متابولیت می‌تواند بهم وابسته باشد. کاربرد خارجی گابا در گیاهچه‌های تحت تنش

گابا و دما و اثر متقابل گابا و دما بر محتوای پلی‌آمین‌های برگ در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد. بر اساس نتایج با افزایش غلظت گابا مقدار پلی‌آمین‌های برگ در هر دو رقم افزایش یافت. کمترین و بیشترین مقدار اسپرمین و اسپرمیدین به ترتیب در تیمارهای صفر میلی‌مولار گابا تحت دمای ۲۴°C و تیمارهای ۳ و ۱/۵ میلی‌مولار تحت دمای ۲°C در هر دو رقم مشاهده شد. بین تیمارهای دو غلظت ۱/۵ و ۳ میلی‌مولار گابا در محتوای اسپرمین و اسپرمیدین تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۲). اما روند تغییرات پوترسین متفاوت بود و با افزایش غلظت گابا محلول‌پاشی از ۱/۵ به ۳ میلی‌مولار مقدار پوترسین افزایش یافت. تیمارهای ۳ میلی‌مولار گابا در هر دو



تیمارها

شکل ۳- برهمکنش گاما آمینو بوتیریک اسید (گابا؛ صفر، ۱/۵ و ۳ میلی مولار) و دما (۲۴°C و ۲°C) بر محتوای آسبیزیک اسید برگ دو رقم انگور (خلیلی و پرلت). میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

چند هورمون شده است (Hijaz *et al.*, 2018). فعال‌سازی مسیر پیام‌رسان آسبیزیک اسید با واسطه گابا با غلظت ۰/۵ میلی مولار مقاومت نهال‌های سیب را به خشکی بهبود بخشید و فعالیت‌های SOD و CAT و محتوای گابا را افزایش داد (Liu *et al.*, 2021). در نهال‌های درخت سپیدار تحت شرایط ۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم، استفاده از گابا مکمل در مقایسه با گیاهان شاهد، بر تجمع آسبیزیک اسید و اتیلن تأثیر گذاشت (Ji *et al.*, 2018). افزایش هورمون‌های ایندول استیک اسید، ایندول بوتیریک اسید و جیبرلیک اسید در نهال‌های تحت تنش شوری به دنبال کاربرد گابا مشاهده شد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه مشخص شد که گابا روی بسیاری از تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی صورت گرفته در تاک دو رقم انگور خلیلی و پرلت تحت تنش سرما تأثیرگذار است. به‌طوری‌که کاربرد این اسیدآمین به باعث تغییر بسیاری از شاخص‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی شده و موجب افزایش سازگاری به سرما در تاک‌ها می‌شود. کاربرد گابا در رقم خلیلی از لحاظ شاخص پایداری غشا، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تجمع اسمولیت‌های سازگار و تنظیم هورمونی، پاسخ بهتری در مقایسه با رقم حساس به سرمای پرلت نشان داد. در مجموع

کمبود نیترات کلسیم سبب افزایش محتوای آنزیم‌های آرژنین دکربوکسیلاز (ADC)، اورنیتین دکربوکسیلاز (ODC) و پلی‌آمین اکسیدازها (PAO) که نقش مهمی در بیوستز پلی‌آمین‌ها و گابا و ممانعت از تخریب پلی‌آمین‌ها دارند می‌شود (Hu *et al.*, 2015). همچنین کاربرد گابا در گیاهچه‌های ملون تحت تنش کمبود اکسیژن، پلی‌آمین‌های پوتریسین، اسپرمیدین، اسپرمین افزایش یافت (Wang *et al.*, 2014) که تأییدی بر یافته‌های مطالعه حاضر است.

آسبیزیک اسید: اثر ساده رقم، گابا و دما و اثر متقابل گابا و دما بر محتوای آسبیزیک اسید در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد. اثرات دوگانه و سه‌گانه تیمارهای مورد استفاده بر محتوای این فیتوهورمون معنی‌دار نشد. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود بیشترین مقدار آسبیزیک اسید در رقم خلیلی تحت غلظت ۳ میلی مولار تحت دمای ۲°C و کمترین مقدار در هر دو رقم در غلظت صفر میلی مولار تحت دمای ۲۴°C مشاهده شد (شکل ۳). در هر دو رقم غلظت‌های ۱/۵ و ۳ میلی مولار تحت دمای ۲۴°C تفاوت معنی‌داری در مقدار آسبیزیک اسید مشاهده نشد (شکل ۳).

شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد با تجمع گابا در تنش‌های زیستی و غیره‌زیستی گابا به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان عمل کرده و القا گابا منجر به افزایش قابل‌توجهی در

کاربرد گابا می‌تواند به منظور افزایش سازگاری به سرمای ارقام انگور در مناطقی با سرمای زودرس پاییزه یا سرمای دیررس بهاره مفید واقع شود. همچنین کاربرد گابا به عنوان یک ماده شیمیایی می‌تواند جهت کاهش آسیب سرما در خزانه‌ها، باغ‌های تازه احداث شده و تاکستان‌ها به کار رود.

منابع

- Abd Elbar, O. H., Elkelish, A., Niedbala, G., Farag, R., Wojciechowski, T., Mukherjee, S., ... & Ibrahim, M. F. (2021). Protective effect of γ -aminobutyric acid against chilling stress during reproductive stage in tomato plants through modulation of sugar metabolism, chloroplast integrity, and antioxidative defense systems. *Frontiers in Plant Science*, 12, 663750.
- Abd El-Gawad, H. G., Mukherjee, S., Farag, R., Abd Elbar, O. H., Hikil, M., Abou El-Yazied, A., ... & Ibrahim, M. F. (2021). Exogenous γ -aminobutyric acid (GABA)-induced signaling events and field performance associated with mitigation of drought stress in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Signaling and Behavior*, 16(2), 1853384.
- Aghdam, M. S., Naderi, R., Jannatizadeh, A., Babalar, M., Sarcheshmeh, M. A. A., & Faradonbe, M. Z. (2016). Impact of exogenous GABA treatments on endogenous GABA metabolism in anthurium cut flowers in response to postharvest chilling temperature. *Plant Physiology and Biochemistry*, 106, 11-15.
- Ahmad, S., & Qazi, F. (2024). Deciphering the enigmatic role of gamma-aminobutyric acid (GABA) in plants: Synthesis, transport, regulation, signaling, and biological roles in interaction with growth regulators and abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 108502.
- Bates, L., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 13, 39-250.
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276-287.
- Bergmeyer, N. (1970). Methoden der Enzymatischen Analyse. Akademie, Berlin.
- Bradford, M. M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Bhattacharjee, P., Chakraborti, S., Chakraborty, S., & Paul, K. (2018). The role of Gamma aminobutyric acid (GABA) during abiotic stress in plants. *Metabolic Adaptations in Plants During Abiotic Stress*, 239-248.
- Chen, H., Liu, T., Xiang, L., Hu, L., & Hu, X. (2018). GABA enhances muskmelon chloroplast antioxidants to defense salinity-alkalinity stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 65, 674-679.
- Comis, D. B., Tamayo, D. M., & Alonso, J. M. (2001). Determination of monosaccharides in cider by reversed-phase liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 436(1), 173-180.
- Ershadi, A., Karimi, R., & Mahdei, K. N. (2016). Freezing tolerance and its relationship with carbohydrates, proline and water content in 12 grapevine cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38, 1-10.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 119(3), 355-364.
- Hayat, A., Jahangir, T. M., Khuhawar, M. Y., Alamgir, M., Hussain, Z., Haq, F. U., & Musharraf, S. G. (2015). HPLC determination of gamma amino butyric acid (GABA) and some biogenic amines (BAs) in controlled, germinated, and fermented brown rice by pre-column derivatization. *Journal of Cereal Science*, 64, 56-62.
- Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189-198.
- Hijaz, F., Nehela, Y., & Killiny, N. (2018). Application of gamma-aminobutyric acid increased the level of phytohormones in *Citrus sinensis*. *Planta*, 248, 909-918.
- Hu, X., Xu, Z., Xu, W., Li, J., Zhao, N., & Zhou, Y. (2015). Application of γ -aminobutyric acid demonstrates a protective role of polyamine and GABA metabolism in muskmelon seedlings under Ca (NO₃)₂ stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 92, 1-10.
- Ji, J., Yue, J., Xie, T., Chen, W., Du, C., Chang, E., ... & Shi, S. (2018). Roles of γ -aminobutyric acid on salinity-responsive genes at transcriptomic level in poplar: Involving in abscisic acid and ethylene-signalling pathways. *Planta*, 248, 675-690.
- Jia, Y., Zou, D., Wang, J., Sha, H., Liu, H., Inayat, M. A., ... & Zhao, H. (2017). Effects of γ -aminobutyric acid, glutamic acid, and calcium chloride on rice (*Oryza sativa* L.) under cold stress during the early vegetative stage. *Journal of Plant Growth Regulation*, 36, 240-253.
- Karimi, R. (2017). Potassium-induced freezing tolerance is associated with endogenous abscisic acid, polyamines and soluble sugars changes in grapevine. *Scientia Horticulturae*, 215, 184-194.
- Karimi, R., Ershadi, A., Rezaei Nejad, A., & Khanizadeh, S. (2016). Abscisic acid alleviates the deleterious effects of cold stress on 'Sultana' grapevine (*Vitis vinifera* L.) plants by improving the anti-oxidant activity and photosynthetic

- capacity of leaves. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 91(4), 386-395.
- Kasuga, J., Arakawa, K., & Fujikawa, S. (2007). High accumulation of soluble sugars in deep supercooling Japanese white birch xylem parenchyma cells. *New Phytologist*, 174(3), 569-579.
- Khanizadeh, S., Rekika, D., Levasseur, A., Groleau, Y., Richer, C., & Fisher, H. (2005). The effects of different cultural and environmental factors on grapevine growth, winter hardiness and performance, in three locations, in Canada. *Small Fruits Review*, 4(3), 3-28.
- Kumar, N., Gautam, A., Dubey, A. K., Ranjan, R., Pandey, A.,... & Mallick, S. (2019). GABA mediated reduction of arsenite toxicity in rice seedling through modulation of fatty acids, stress responsive amino acids and polyamines biosynthesis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 173, 15-27.
- Li, D., Zhang, D., Zhang, Z., Xing, Y., Sun, N., & Cai, H. (2022). Exogenous application of GABA alleviates alkali damage in alfalfa by increasing the activities of antioxidant enzymes. *Agronomy*, 12(7), 1577.
- Li, Y., Fan, Y., Ma, Y., Zhang, Z., Yue, H., Wang, L., ... & Jiao, Y. (2017). Effects of exogenous γ -aminobutyric acid (GABA) on photosynthesis and antioxidant system in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings under low light stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 36, 436-449.
- Li, Z., Yu, J., Peng, Y., & Huang, B. (2016). Metabolic pathways regulated by γ -aminobutyric acid (GABA) contributing to heat tolerance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *Scientific Reports*, 6(1), 30338.
- Liu, C., Wang, H., Zhang, X., Ma, F., Guo, T., & Li, C. (2021). Activation of the ABA signal pathway mediated by GABA improves the drought resistance of apple seedlings. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12676.
- Liu, C., Zhao, L., & Yu, G. (2011). The dominant glutamic acid metabolic flux to produce γ -amino butyric acid over proline in *Nicotiana tabacum* leaves under water stress relates to its significant role in antioxidant activity. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53(8), 608-618.
- Loreto, F., & Velikova, V. (2001). Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology*, 127(4), 1781-1787.
- Lukatkin, A. S. (2002). Contribution of oxidative stress to the development of cold-induced damage to leaves of chilling-sensitive plants: 2. The activity of antioxidant enzymes during plant chilling. *Russian Journal of Plant Physiology*, 49(6), 782-788.
- Malekzadeh, P., Khara, J., & Heydari, R. (2014). Alleviating effects of exogenous Gamma-aminobutyric acid on tomato seedling under chilling stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20, 133-137.
- Mazzucotelli, E., Tartari, A., Cattivelli, L., & Forlani, G. (2006). Metabolism of γ -aminobutyric acid during cold acclimation and freezing and its relationship to frost tolerance in barley and wheat. *Journal of Experimental Botany*, 57(14), 3755-3766.
- Montes, C., Perez-Quezada, J. F., Pena-Neira, A., & Tonietto, J. (2012). Climatic potential for viticulture in Central Chile. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 18(1), 20-28.
- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5), 867-880.
- Ramvalho, J. C., Quartin, V. L., Leita, E., Campos, P. S., Carelli, M. L. C., Fahl, J. I., & Nunes, M. A. (2003). Cold acclimation ability and photosynthesis among species of the tropical *Coffea* genus. *Plant Biology*, 5(06), 631-641.
- Rashmi, D., Zanan, R., John, S., Khandagale, K., & Nadaf, A. (2018). γ -aminobutyric acid (GABA): Biosynthesis, role, commercial production, and applications. *Studies in Natural Products Chemistry*, 57, 413-452.
- Shang, H., Cao, S., Yang, Z., Cai, Y., & 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.
- Shekari, A., Hassani, R. N., & Aghdam, M. S. (2021). Exogenous application of GABA retards cap browning in *Agaricus bisporus* and its possible mechanism. *Postharvest Biology and Technology*, 174, 111434.
- Shelp, B. J., Bozzo, G. G., Trobacher, C. P., Zarei, A., Deyman, K. L., & Brikis, C. J. (2012). Hypothesis/review: Contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress. *Plant Science*, 193, 130-135.
- Walter, H. J. P., & Geuns, J. M. (1987). High speed HPLC analysis of polyamines in plant tissues. *Plant Physiology*, 83(2), 232-234.
- Wang, C., Fan, L., Gao, H., Wu, X., Li, J., Lv, G., & Gong, B. (2014). Polyamine biosynthesis and degradation are modulated by exogenous gamma-aminobutyric acid in root-zone hypoxia-stressed melon roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82, 17-26.
- Wang, Y., Gu, W., Meng, Y., Xie, T., Li, L., Li, J., & Wei, S. (2017). γ -Aminobutyric acid imparts partial protection from salt stress injury to maize seedlings by improving photosynthesis and upregulating osmoprotectants and antioxidants. *Scientific Reports*, 7(1), 43609.
- Wang, Y., Luo, Z., Mao, L., & Ying, T. (2016). Contribution of polyamines metabolism and GABA shunt to chilling

- tolerance induced by nitric oxide in cold-stored banana fruit. *Food Chemistry*, 197, 333-339.
- Yong, B., Xie, H., Li, Z., Li, Y. P., Zhang, Y., Nie, G., ... & Peng, Y. (2017). Exogenous application of GABA improves PEG-induced drought tolerance positively associated with GABA-shunt, polyamines, and proline metabolism in white clover. *Frontiers in Physiology*, 8, 1107.
- Yurekli, F., Turkan, I., Porgali, Z. B., & Topçuoglu, S. F. (2001). Indoleacetic acid, gibberellic acid, zeatin, and abscisic acid levels in NaCl-treated tomato species differing in salt tolerance. *Journal of Plant Sciences*, 49(4), 269-278.
- Zarbakhsh, S., & Shahsavar, A. R. (2023). Exogenous γ -aminobutyric acid improves the photosynthesis efficiency, soluble sugar contents, and mineral nutrients in pomegranate plants exposed to drought, salinity, and drought-salinity stresses. *BMC Plant Biology*, 23(1), 543.
- Zhu, X., Liao, J., Xia, X., Xiong, F., Li, Y., Shen, J., ... & Fang, W. (2019). Physiological and iTRAQ-based proteomic analyses reveal the function of exogenous γ -aminobutyric acid (GABA) in improving tea plant (*Camellia sinensis* L.) tolerance at cold temperature. *BMC Plant Biology*, 19, 1-20.

The effect of gamma-aminobutyric acid on leaf physiological and biochemical indices of two grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars under cold stress

Maryam Zaeri Behrooz ¹, Rouhollah Karimi ^{1, 2*}, Mousa Rasouli ³, Majid Rostami ¹

¹ Grapevine Production and Genetic Improvement Department, Iranian Grape and Raisin Institute, Malayer University, Malayer, Iran

² Department of Horticulture and Landscape Engineering, Faculty of Agriculture, Malayer University, Malayer, Iran

³ Department of Horticultural Sciences Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

(Received: 2024/07/02, Accepted: 2024/09/07)

Abstract

In this research, the effect of foliar application of gamma-amino-butyric acid (GABA; 0, 1.5 and 3 mM) on abscisic acid, soluble sugars, polyamines, the activity of some antioxidant enzymes, and membrane stability index of two grape cultivars (Khalili and Perlette) was investigated under greenhouse condition with two temperature treatments (2°C and 24°C) factorially (2×3) based on a completely randomized design with three replications. The vines were sprayed with different concentrations of GABA at the 15-leaf stage. After 24 hours, half of the vines treated with GABA along with the control plants were exposed to 2°C (cold stress condition) for 12 hours and the rest vines (treated with GABA and control) were kept at 24°C (non-stress condition) and sampled after 12 hours. The application of GABA under cold stress conditions caused a preservation of chlorophyll and a decrease of ion leakage, malondialdehyde and hydrogen peroxide and increase of protein, proline and abscisic acid content compared to control plants in both cultivars. The amount of sucrose, fructose and glucose in the leaves was higher in the treated Khalili cultivar compared to the Perlette cultivar under cold stress. Also, under cold stress, GABA spray led to an increase in the amount of polyamines of putrescin, spermine and spermidine. Under cold stress, the activities of superoxide dismutase and catalase enzymes at a concentration of 3 mM and ascorbate-peroxidase at a concentration of 1.5 mM of GABA showed the highest value compared to the control plants. GABA treatment maintained membrane stability and increased cold tolerance of vines by increasing in abscisic acid content, soluble sugars and antioxidant system, The effect of GABA on the cold tolerance of Khalili cultivar was greater than that of Perlette cultivar.

Keywords: Absciscic acid, Polyamines, Glucose, Catalase, Ion leakage

Corresponding author, Email: r.karimi@malayeru.ac.ir