

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

فاطمه دانشمند<sup>۱\*</sup> و حکیمه علومی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>\* گروه علمی زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۱۹۳۹۵-۳۶۹۷ تهران، ایران<sup>۲</sup> گروه اکولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفت و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفت، کرمان، ایران  
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۵/۰۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۱۹)

چکیده:

۵-آمینولولینیک اسید پیش ساز ضروری برای بیوسنتر تمام ترکیبات تراپیرونی نظیر هم، کلروفیل، باکتریوکلروفیل، فیتوکروم و ویتامین B<sub>12</sub> می‌باشد. در این مطالعه تأثیر ۵-آمینولولینیک 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-آمینولولینیک اسید در سه سطح (۰، ۱ و ۲ میلی مولار) بود. تنش شوری در هر دو سطح موجب کاهش پارامترهای رشد، افزایش مقدار مالون دلئید 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 دلئید 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-آمینولولینیک اسید، آنزیم‌های آنتی اکسیدان، تنش شوری، ترکیبات فنلی و گوجه فرنگی.

دارای قابلیت زیست تجزیه نیز می‌باشد، بنابراین به عنوان یک ماده سازگار با محیط زیست می‌تواند کاربردهای زیادی در حوزه زیست‌شناسی، 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 سیتاز و راه دیگر تبدیل ماده ۵ کربنی گلوتامیک اسید به ALA می‌باشد. در گیاهان

مقدمه:  
۵-آمینولولینیک اسید (ALA) یک کتوآمینواسید با وزن ملکولی ۱۳۱ می‌باشد (Watanab et al., 2006). ALA پیش ساز ضروری برای بیوسنتر همه ترکیبات تراپیرونی نظیر هم، کلروفیل، باکتریوکلروفیل، فیتوکروم و ویتامین B<sub>12</sub> می‌باشد که در همه گیاهان، جانوران، قارچ‌ها، جلبک ها، و باکتری‌ها وجود دارد. ALA یک ماده طبیعی است که

نیز ALA موجب افزایش رشد، فتوستز و تولید محصول گردید (Watanab *et al.*, 2006). ALA در غلظت‌های کم برای افزایش مقاومت به گرما (Zhang *et al.*, 2012)، تنفس 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 تنفس‌ها تأثیر می‌گذارد هنوز به خوبی شناخته نشده است. بعضی گزارش‌ها نقش محرك ALA روی رشد گیاهان را به دليل تأثیر آن روی فتوستز و یا تنفس (Watanab *et al.*, 2006) و برخی به دليل 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 فتوستز گرفته تا رشد و نمو و تولید محصول تحت تأثیر قرار می‌دهد. یکی از اثرات شوری تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌باشد. ROS موجب بر هم زدن متابولیسم طبیعی سلول از طریق آسیب اکسیداتیو به لپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود. برای مقابله با ROS موجودات زنده سیستم دفاع آنتی اکسیدانی را که شامل آنتی اکسیدان‌هایی غیر آنزیمی نظری آسکوربات، گلوتاتیون و ترکیبات فنلی و آنزیم‌های آنتی اکسیدان نظری سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آنزیم‌های چرخه آسکوربات-گلوتاتیون نظری 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 تنفس شوری می‌باشد. در این مطالعه نقش این ترکیب بر آسیب اکسیداتیو حاصل از تنفس شوری و سیستم دفاع آنتی اکسیدان در گیاه گوجه فرنگی مورد مطالعه قرار گرفته است.

ALA بیشتر از گلوتامیک اسید و از طریق حدواته گلوتامیل-tRNA به وجود می‌آید و برای ساخته شدن به Beale and ATP و NADPH به عنوان کوفاکتور نیاز دارد (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 نظری پروتوکلوفیلید و پروتوپورفیرین IX در حد غیر طبیعی رخ می‌دهد. بنابراین اگر در این موقع این گیاهان در معرض نور قرار بگیرند این تراپیرون‌های زیادی، به عنوان حساس کننده نوری (Photosensitizer) عمل کرده و در نتیجه موجب آسیب‌های 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 تنفس‌های محیطی نظری شوری را افزایش داد. ۵-آمینولولوئینیک 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 تنفس مؤثر است (Sun *et al.*, 2009, Bindu Roy and Vivekanandan, 1998a, b

موجب افزایش رشد و تولید محصول در گیاهان جو، سیر، سبز زمینی و لوبیا گردید (Hotta *et al.*, 1997). در انگور

## مواد و روش‌ها:

همکاران (۱۹۹۲) انجام شد و نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر حسب نانومول بر گرم وزن تر 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:** اندازه‌گیری 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 سوپراکسیدیسموتاز (EC 1.15.1.1):** سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیدیسموتاز با استفاده از سنجش مهار احیای نوری نیتروبلوترازو لم (NBT) در ۵۶۰ نانومتر انجام گرفت. یک واحد آنزیمی سوپراکسیدیسموتاز مقدار آنزیمی است که موجب ۵۰ درصد ممانعت از احیاء نوری احیای نیتروبلوترازو لم (با جلوگیری از تبدیل آن به فورمازان) می‌گردد. با استفاده از روش Giannopolitis و Ries (۱۹۷۷)، واحد آنزیمی نمونه‌ها محاسبه و فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین Bradford کل (میلی گرم) در عصاره (به دست آمده از روش Bradford, 1976)، بیان گردید (Giannopolitis and Ries, 1977).

**فعالیت آنزیم کاتالاز (EC 1.11.1.6)(CAT):** 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 (میلی گرم) موجود در عصاره (به دست آمده از روش Bradford, 1976)، در یک دقیقه محاسبه گردید. یک واحد آنزیمی کاتالاز مقدار آنزیمی است که ۱ میلی مول  $H_2O_2$  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) اندازه‌گیری

گیاه مورد آزمایش در این پژوهش گیاه گوجه فرنگی *Falcato Lycopersicum esculentum Mill* بود و آزمایش به صورت گلخانه‌ای انجام گرفت. طی آزمایشات مقدماتی غلظت ۵-آمینولولینیک 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-آمینولولینیک اسید، غلظت‌های ۰ و ۱ و ۲ میلی مولار ۵-آمینولولینیک 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 اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌ها در فویل آلومینیومی پیچیده شده و به مدت ۷۲ ساعت در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد خشک شد. سپس وزن خشک نمونه‌ها بر حسب میلی گرم بر گیاه گزارش گردید.

**پراکسیداسیون لیپید:** برای سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، غلظت مالون دآلدئید (MDA) و سایر آلدئیدها (پروپانال، بوتانال، هگزانال، هپتانال و پروپانال دی متیل استال) که محصول پراکسیداسیون اسید های چرب غیراشباع می‌باشد اندازه‌گیری گردید. اندازه‌گیری مالون دآلدئید به روش Packer و Heath (۱۹۶۹) و اندازه‌گیری غلظت سایر آلدئیدها با روش Meirs و

## 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 و b). افزایش شدت تنش نیز موجب کاهش بیشتر گردید. تیمار گیاهان با ۵-آمینولولیینیک اسید (ALA) باعث افزایش معنی دار طول ساقه و وزن خشک اندام هوایی در شرایط تنش و غیر تنش گردید، اما تفاوت معنی داری 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 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 در صد نشت یونی شد و این افزایش در شوری ۷۵ میلی مولار بیشتر از شوری ۵۰ میلی مولار بود. کاربرد ALA باعث کاهش معنی دار در صد 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)).

شد. یک واحد آنزیمی آسکوربات پراکسیداز مقدار آنزیمی است که یک میلی مول آسکوربات را در یک دقیقه اکسید می کند. فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی گرم) 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.

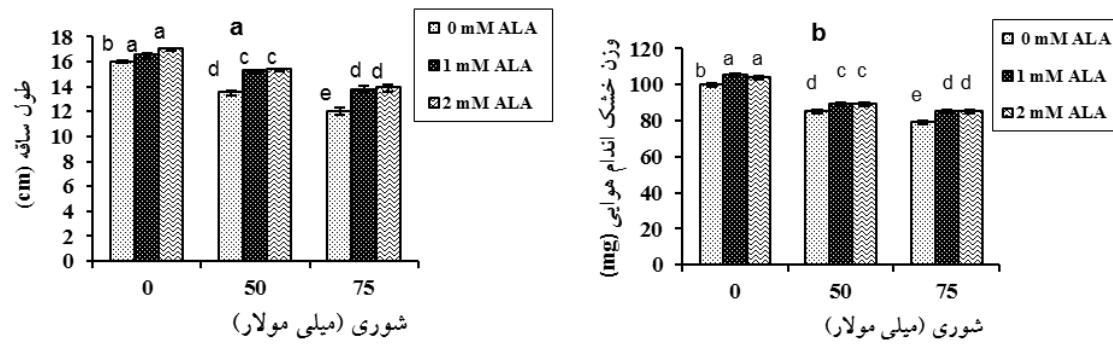
## فعالیت آنزیم پراکسیداز (GPOD)(EC 1.11.1.7):

سنچش فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از گایاکل و انداره گیری میزان جذب تراگایاکل 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 (میلی گرم) موجود در عصاره (به دست آمده از روش Bradford, 1976) گزارش شد.

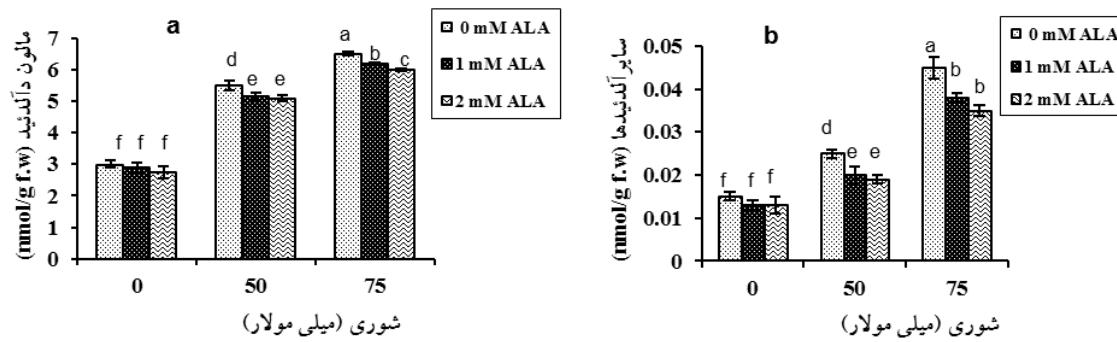
## فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز(PAL) (EC 4.3.1.5)

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

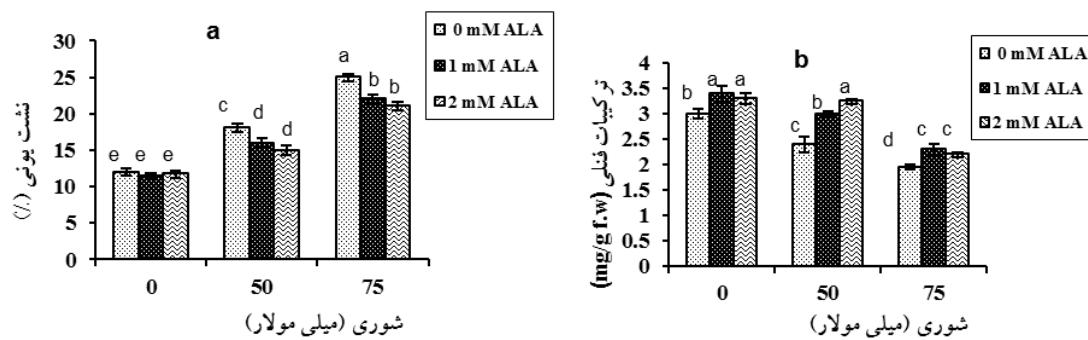
**بررسی های آماری:** تجزیه و تحلیل های آماری در این مطالعه با آزمایش فاکتوریل و طبق طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار صورت گرفته و داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS تحت آنالیز واریانس قرار گرفته و اختلاف میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ مقایسه شدند.



شکل ۱- اثر تنش شوری و تیمار ۵-آمینولولینیک 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.).



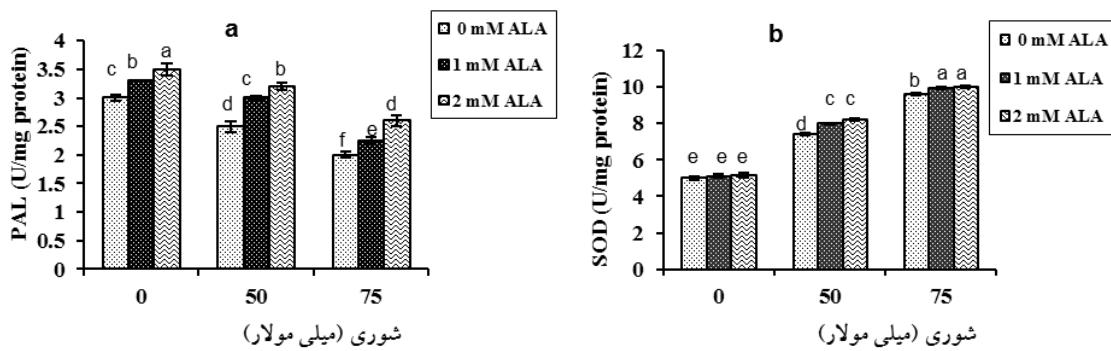
شکل ۲- اثر تنش شوری و تیمار ۵-آمینولولینیک اسید (ALA) بر مقدار مالون دآلدید (MDA) (a) و مقدار سایر آلدیده‌ها (b) در گیاه گوجه فرنگی (داده‌ها میانگین ۳ تکرار و علائم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیر یکسان نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد.).



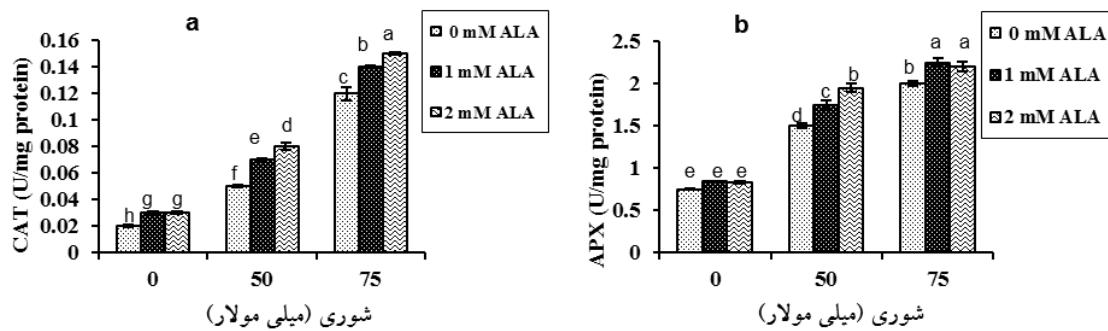
شکل ۳- اثر تنش شوری و تیمار ۵-آمینولولینیک اسید (ALA) بر درصد نشت یونی (a) و مقدار ترکیبات فتلی (b) در گیاه گوجه فرنگی (داده‌ها میانگین ۳ تکرار و علائم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیر یکسان نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد.).

این آنزیم بیشتر کاهش یافت. به کار بردن ALA موجب افزایش معنی دار مقدار فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز در

فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز در هر دو سطح تنش شوری کاهش یافت. با افزایش شدت تنش مقدار فعالیت



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 علامت 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).



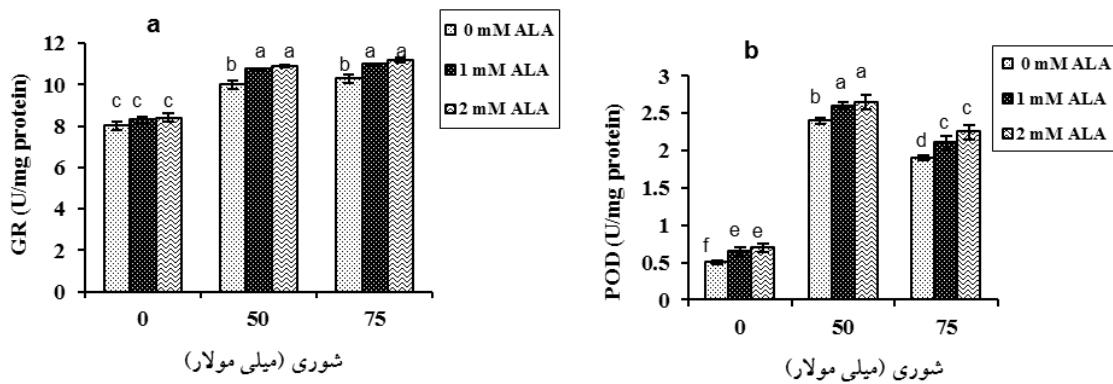
شکل ۵- اثر تنش شوری و تیمار ۵-آمینولولینیک اسید (ALA) بر فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) (a) و آسکوربات پراکسیداز (APX) (b) در گیاه گوجه فرنگی (داده‌ها میانگین ۳ تکرار و علامت روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیر یکسان نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد).

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 رداکتازار فقط در شرایط تنش گردید و بین دو غلظت ALA تفاوت معنی داری مشاهده نگردید. تیمار گیاهان با ALA باعث

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 مقدار فعالیت شوری موجب افزایش معنی دار مقدار فعالیت سوپر اکسیددیسموتاز در گیاه گوجه فرنگی شد. و با افزایش شدت تنش نیز مقدار فعالیت سوپر اکسیددیسموتاز بیشتر افزایش یافت. تیمار گیاهان با ALA باعث افزایش معنی دار مقدار فعالیت سوپر اکسیددیسموتاز 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



شکل ۶- اثر تنش شوری و تیمار ۵-آمینولولینیک اسید (ALA) بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون رداکتاز (GR) (a) و گایاکل پراکسیداز (GPOD) (b) در گیاه گوجه فرنگی (داده‌ها میانگین ۳ تکرار و علاوه 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.

کاهش داد که نتیجه آن کاهش مقدار پراکسیداسیون لیپیدها و نشت یونی بود. در گیاهان تیمار شده با ALA فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان نظیر POD، CAT، SOD و APX افزایش یافت. در گیاهان خیار تحت تنش گرما نیز GR افزایش یافت. در گیاهان خیار تحت تنش گرما نیز کاربرد ALA موجب کاهش مقدار MDA، آنیون سوپراکسید و  $H_2O_2$  گردید. ALA در این گیاهان موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان نظیر SOD، CAT و POD 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 آنزیم‌های 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 کارآبی فتوشیمیایی فتوسیستم‌ها افزایش یافت (Sun *et al.*, 2009). تجمع آنیون سوپراکسید در برگ منجر به تشکیل رادیکال هیدروکسیل از طریق واکنش فتوتون می‌گردد و رادیکال هیدروکسیل می‌تواند 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-

افزایش معنی‌دار مقدار فعالیت گایاکل پراکسیداز در شرایط تنش و غیر تنش گردید و تفاوت معنی‌داری بین دو غلاظت 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 تنش‌های 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 می‌نمایند. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان تحت تنش‌هایی نظیر تنش شوری نشان دهنده القای مکانیسم‌های دفاعی برای کاهش تنش اکسیداتیو در سلول می‌باشد هرچند که این مکانیسم‌ها قادر نباشند کاملاً 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

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 Memon *et al.*, 2009) پورفیرینی نظیر سیتوکروم شده است (Sun *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 تترابیرون ها تبدیل شود زیرا کاربرد لوولینیک اسید که مهار کننده آنزیم Dهیدراز 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 سبب کاربرد ALA موجب افزایش تولید ترکیبات فنلی از جمله آنتوسیانین، در پوست میوه سبب قبل از برداشت گردید. این محققین گزارش نمودند که دلیل این امر تأثیر ALA بر افزایش بیان ژن های مربوط به مسیر بیوسنتز آنتوسیانین نظیر ژن های (CHS) فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و ژن چالکون سنتاز (CHS) می باشد. این محققین افزایش فعالیت این آنزیم ها را دلیل افزایش مقدار آنتوسیانین دانسته اند. در مورد مکانیسم و چگونگی تأثیر ALA بر افزایش بیان ژن های در گیاهان در بیوسنتز آنتوسیانین در گزارش این محققین آمده است که کاربرد لوولینیک اسید که بازدارنده آنزیم ALA دهیدراز می

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 آنزیم های آنتی اکسیدان SOD و POD گردید (Memon *et al.*, 2009). در گیاهان کلزا تحت تنش علف کش نیز ALA موجب افزایش فعالیت آنزیم های SOD، CAT و POD گردید. در گیاهان خیار تحت تنش شوری نیز کاربرد ALA موجب کاهش مقدار  $H_2O_2$  و افزایش بیان ژن های مربوط به آنزیم های APX CAT و GR و افزایش فعالیت این آنزیم ها در گیاهان تحت تنش شوری گردید. اما ALA روی فعالیت SOD تأثیری نداشت (Zhen *et al.*, 2012). در گیاهان سبب زمینی تحت تنش شوری در شرایط درون شیشه ای نیز، ALA در غاظت های کم موجب کاهش آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش شوری، حفاظت از غشا های زیستی، کاهش مقدار MDA و افزایش فعالیت آنزیم هایی نظیر پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز گردید، اما غاظت های بالای ALA خود موجب القای تنش اکسیداتیو و تجمع پورفیرین های فتو اکسیداتیو 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 پارامتر های 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 اندامک های مختلف سلولی شامل میتوکندری، کلروپلاست و سیتوپلاسم می باشند)، به علاوه هم گروه پروستیک 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

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 غشاها 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:

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

باشد (مانع وارد شدن ALA به مسیر بیوسنتر تراپیرون‌ها و پورفیرین‌ها می‌گردد)، موجب مهار اثر تحریکی ALA بر افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتر 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).

### نتیجه گیری:

نتایج این مطالعه نشان داد که کاربرد ALA در غلاظت‌های ۱ و ۲ میلی مولار به صورت محلول پاشی روی برگ و اندام هوایی موجب کاهش اثرات تنش شوری و تنش

### منابع:

- (*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 Biochemistry 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 tetracyrrole accumulation in protoporphyrinogen IX oxidase-
- 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-aminolevulinic 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 Vivekanandan, M. (1998b) Role of aminolevulinic acid in improving biomass production in *Vigna catjina*, *V. mungo* and *V. radiata*. *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 quantities 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

- 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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., Philosophadas, 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 Zhao, 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