

مطالعه نقش گاما آمینوبوتریک اسید درونی در تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی توت‌فرنگی (*Fragaria × ananassa* Duch) تحت تنش گرمایی

الهه اکبری، مهدیه غلامی* و بهرام بانی‌نسب

گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۱۰، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۳/۰۱/۲۷)

چکیده

هدف از این تحقیق بررسی نقش گاما آمینوبوتریک اسید به عنوان یک ترکیب مؤثر در القای تحمل به تنش در گیاهان توت‌فرنگی، ارقام کاماروسا (حساس به تنش دمایی) و کردستان (متحمل به تنش دمایی) بود. بدین منظور گیاهان توت‌فرنگی در تاریخ ۱۴۰۰/۰۸/۲۴ به گلخانه پژوهشی دانشگاه صنعتی اصفهان منتقل و در مرحله ۵-۶ برگ کاملاً گسترش یافته به اتاقک‌های رشد با دمای ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۰٪ و ۱۲۰۰ لوکس نوری منتقل شدند. گیاهان پس از ۱۰ ساعت اعمال تنش دمایی مورد نظر از اتاقک رشد خارج و برخی صفات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی اندازه‌گیری شد. به منظور بررسی بیان ژن سوکسینیک سمی آلدئید دهیدروژناز، نمونه‌گیری در زمان‌های صفر، ۲، ۵ و ۱۰ ساعت پس از شروع تنش دمایی ۴۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. این تحقیق به صورت آزمایش تجزیه مرکب کاملاً تصادفی اجرا شد. نتایج حاصل از آزمایش نشان داد اعمال تنش حرارتی ۴۰ درجه سانتی‌گراد در رقم کاماروسا به‌طور معنی‌داری باعث کاهش ۲۰/۴۳ درصدی محتوای گاما آمینوبوتریک اسید، ۱۲/۱۹ درصدی میزان کربوهیدرات محلول و نیز افزایش ۴۳/۸۱ درصدی نشت یونی، ۲۰/۶۶ درصدی پرولین و ۲۰۰ درصدی شاخص خسارت ظاهری در مقایسه با شاهد شد. به‌طور معکوس اعمال تنش حرارتی ۴۰ درجه سانتی‌گراد در رقم کردستان باعث افزایش ۱۸/۷۸ درصدی گاما آمینوبوتریک اسید نسبت به تیمار شاهد شد. شاخص خسارت ظاهری نیز در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به شاهد آن اثر معنی‌داری را نشان نداد. میزان بیان ژن سوکسینیک سمی آلدئید دهیدروژناز در رقم کاماروسا ثابت بود، اما در رقم کردستان دو ساعت پس از تنش حرارتی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: تنش غیرزیستی، تغییر اقلیم، سوکسینیک سمی آلدئید دهیدروژناز، گابا

مقدمه

جهانی وابسته به تغییر الگوها است (Manafi et al., 2022). در این صورت تنش دمای بالا به یک فاکتور محدودکننده بزرگ به منظور پرورش محصولات کشاورزی در سرتاسر جهان تبدیل خواهد شد. تنش دمای بالا دارای اثرات مضر بر رشد و تولید مثل گیاهان است. تغییرات در درجه حرارت محیط به سرعت

همراه با رشد جمعیت سریع و توسعه صنعت، افزایش معنی‌داری در استفاده از سوخت‌های فسیلی ایجاد شده است. در طول قرن گذشته افزایش در غلظت گازهای گلخانه‌ای به علت سوزاندن سوخت‌های فسیلی، دلیل عمده گرم‌شدن

زیادی از تحقیقات در گیاهان تجمع سریع گابا در پاسخ به انواع تنش‌های محیطی شامل دمای بالا، افزایش فشار اسمزی، دمای پایین، شوری بالا و سمیت فلزات سنگین را نشان داده‌اند. گابا همچنین باعث کاهش آسیب‌های ناشی از تنش دمایی در گیاهان از طریق جلوگیری از پیری برگ، بهبود فتوسنتز و سرعت تعرق و تحریک فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی می‌شود. علاوه بر این، مسیر تولید گابا که وابسته به چرخه تری‌کربوکسیلیک اسید (TCA Cycle) است، نقش حیاتی را در تحمل گرما از طریق تحریک تولید گابا ایفا می‌کند (Seifikalhor et al., 2019).

مطالعات نشان داد کاربرد گابا باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون ردوکتاز و آسکوربات پراکسیداز در گیاه برنج تحت شرایط تنش گرمایی (۳۵ درجه سانتی‌گراد در روز و ۳۰ درجه سانتی‌گراد در شب) در کوتاه مدت (۱۰ روز) شد، که نشان‌دهنده اثر حفاظتی و غیرمستقیم گابا در برابر آسیب‌های اکسیداتیو است (Seifikalhor et al., 2019). در شرایط تنش، سطوح کلسیم در سلول افزایش می‌یابد که باعث تحریک بیان ژن کالمودولین (CaM) می‌شود. پروتئین کالمودولین و کلسیم (Ca^{2+}) یک کمپلکس فعال ایجاد می‌کنند که به آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز باند می‌شود. آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز، گلوتامات را به منظور تولید گابا دکربوکسیله کرده و بدین صورت بیوستتز گابا را تحریک می‌کند. مطالعات نشان داد کاربرد کلسیم به صورت پس از برداشت در سیب باعث افزایش فعالیت مسیر گابا از طریق افزایش سطوح رونویسی ژن‌های *MdSSADH*، *MdGABA-T1/2*، *MdGAD2*، *MdGAD1* شد (Han et al., 2020). همچنین کاربرد پس از برداشت کلسیم در میوه گلابی (Li et al., 2020a) و ازگیل ژاپنی (Li et al., 2020c) به واسطه تحریک و بیان ژن کالمودولین باعث افزایش فعالیت آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز و تولید گابا شد. گابا توسط فعالیت آنزیم سوکسینیک سمی آلدئید دهیدروژناز به سوکسینات تبدیل می‌گردد. سوکسینات می‌تواند وارد چرخه تری‌کربوکسیلیک اسید شود و از این طریق به تأمین انرژی در

توسط گیاهان شناسایی می‌شود و مجموعه‌ای از تغییرات در بیان ژن‌های مختلف راه اندازی می‌شود و زمینه‌ساز ایجاد پاسخ تنش و سازگاری به تغییرات دمایی می‌شود (Nievola et al., 2017).

توت‌فرنگی (*Fragaria × ananassa* Duch.) در طیف گسترده‌ای از شرایط آب و هوایی کشت می‌شود، اما دمای یک عامل مهم محدودکننده برای رشد آن است. تنش دمای بالا یک تنش محیطی مهم است که رشد، متابولیسم و عملکرد گیاهان را در سرتاسر جهان تهدید می‌کند (Hasanuzzaman et al., 2013). دمای بالا سبب تغییر در ترکیب غشاء و ساختار آن می‌شود و می‌تواند باعث نشت یون‌ها شود. تخریب غشاء باعث بازدارندگی فرآیندهایی مانند فتوسنتز و تنفس می‌شود که وابسته به فعالیت ناقل‌های الکترون و آنزیم‌های وابسته به غشاء است (Taiz and Zeiger, 2010).

دمای بالا در گیاهان باعث تولید اسمولیت‌های سازگار که قادر به سازماندهی پروتئین‌ها و ساختارهای سلولی هستند، تجمع پروتئین‌های شوک حرارتی، تنظیم متابولیت‌های ثانویه در جهت هموستازی سلول، ترمیم و بازسازی آسیب پروتئین‌ها و غشاهای و نیز اصلاح سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی به منظور پایداری مجدد تعادل احیای سلولی و هموستازی آن، می‌شود (Hasanuzzaman et al., 2013).

گاما-آمینوبوتریک اسید (گابا) (γ -Aminobutyric (GABA) acid) القاکننده درونی مکانیسم دفاعی گیاه است که نقش مهمی در پاسخ گیاه به تنش‌های محیطی ایفا می‌کند. گابا یک آمینواسید غیرپروتئینی است که در اغلب پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها یافت می‌شود و نقش‌های متعددی را در آن‌ها ایفا می‌کند. این ماده به صورت درونی در سلول‌های گیاهی ساخته می‌شود و باعث تنظیم رشد و تحمل به تنش‌ها می‌شود. گابا می‌تواند به طور ویژه باعث حفاظت از گیاه در برابر تنش دمای بالا شود. گابا در فشار تورگر برگ، تثبیت کربن و مسیرهای آسیمیلایسین درگیر است. گابا مکانیسم‌های بیولوژیک متعددی مانند، ایجاد حالت بافر در متابولیسم کربن و نیتروژن، ذخیره نیتروژن و تنظیم pH سیتوزول را راهاندازی می‌کند. تعداد

نمودارها، از نرم افزار اکسل (نسخه ۲۰۱۹) استفاده شد.

اندازه‌گیری شاخص خسارت ظاهری: به منظور تعیین میزان خسارت دمای بالا بر خصوصیات ظاهری گیاهان توت‌فرنگی، شماره‌دهی از یک تا پنج براساس مقیاس زیر صورت گرفت: عدد یک برای گیاهان بدون علائم قابل مشاهده و دارای رشد طبیعی، عدد دو برای گیاهان با آسیب جزئی که در آن حاشیه برگ‌های فوقانی به سمت داخل پیچیده شده بودند. عدد سه برای گیاهانی که علاوه بر پیچش، حاشیه برگ‌ها نکروزه شده بودند: عدد چهار نشانگر کلروزه شدن برگ‌ها به میزان متوسط (کمتر از ۵۰ درصد) و عدد پنج برای گیاهان با نکروزه شدید است (بیشتر از ۵۰ درصد) (McNellie et al., 2018).

اندازه‌گیری درصد نشت یونی برگ: ۰/۱ گرم از بافت تازه برگ سه مرتبه با آب دیونیزه شسته و سپس در ۳۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه به مدت ۲۴ ساعت غوطه‌ور می‌شود. سپس هدایت الکتریکی محلول به عنوان هدایت الکتریکی اولیه (C_i) با کمک EC متر اندازه‌گیری شد. برگ‌ها در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو و بار دیگر در دمای اتاق هدایت الکتریکی بافت برگ به عنوان هدایت الکتریکی ماکسیمم (C_m) اندازه‌گیری شد (Blum and Ebercon, 1981).

$$EL(\%) = \frac{C_i}{C_m} \times 100$$

سنجش میزان پرولین: میزان پرولین بر مبنای روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) همراه با کمی اصلاحات انجام شد. بدین منظور ۰/۵ گرم از بافت برگ همراه با ۱۰ میلی‌لیتر محلول سولفوسالیسیلیک اسید ۳٪ هموزن شد. پس از سانتریفیوژ در ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر از محلول رویی جمع‌آوری و به ۲ میلی‌لیتر محلول اسید ناین‌هیدرین تازه و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید در لوله‌های شیشه‌ای همراه با درهای پیچ‌شونده اضافه شد. نمونه‌ها در حمام آب گرم (۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) به مدت یک ساعت قرار داده شدند. سپس برای توقف واکنش در حمام آب گرم قرار گرفتند. ۴ میلی‌لیتر تولوئن به محلول‌ها اضافه و نمونه‌ها ۲۰ ثانیه ورتکس شدند.

گیاهان تحت شرایط تنش کمک می‌کند (Clark et al., 2009). هدف از این پژوهش بررسی مسیرهای متابولیکی مرتبط با گاما آمینوبوتریک اسید در ارقام توت‌فرنگی حساس (کاماروسا) و متحمل (کردستان) به تنش حرارتی و اثرات احتمالی سنتز گابای درون سلولی در کاهش آسیب‌های دمای بالا در ارقام توت‌فرنگی بود.

مواد و روش‌ها

به منظور مطالعه مکانیسم عمل گاما آمینوبوتریک اسید درونی در گیاه توت‌فرنگی تحت شرایط تنش حرارتی، نهال‌های توت‌فرنگی ارقام کاماروسا (حساس به تنش حرارتی) و کردستان (متحمل به تنش حرارتی) در تاریخ ۱۴۰۰/۰۸/۲۴ پس از تهیه از تولیدکننده تجاری نهال در کردستان، به گلخانه پژوهشی دانشگاه صنعتی اصفهان منتقل شدند. نشاها سپس در گلدان‌های پلاستیکی (۱۴×۱۲ سانتی‌متر) و در بستر پرلیت و کوکوپیت (حجمی ۵۰:۵۰) کشت و در گلخانه با شرایط دمایی ۲۰/۲۵ (روز/شب) درجه سانتی‌گراد به مدت سه هفته نگهداری شدند. آبیاری براساس نیاز همراه با محلول هوگلند ۱/۳ انجام شد.

گیاهان پس از شش هفته و در مرحله ۶-۵ برگ کاملاً گسترش یافته به اتاقک‌های رشد با دمای ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۰٪، ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و ۱۲۰۰ لوکس نوری منتقل شدند. گیاهان پس از ۱۰ ساعت اعمال تنش دمایی مورد نظر از اتاقک رشد خارج و برخی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی اندازه‌گیری شد. به منظور بررسی تغییرات مولکولی، جمع‌آوری نمونه‌های برگ تحت تنش حرارتی به منظور استخراج RNA کل در زمان‌های صفر، ۲، ۵ و ۱۰ ساعت پس از اعمال تیمار دمایی ۴۰ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت و برگ‌ها بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شده و تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. این تحقیق به صورت آزمایش تجزیه مرکب کاملاً تصادفی (دما) با چهار تکرار انجام شد. برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SAS 9.3 و برای رسم جداول و

دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. برای رسم نمودار استاندارد از سرم آلبومین گاوی (Bovin serum albumin) استفاده و میزان پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ تعیین شد.

کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II: کارایی فتوستنز توسط سنجنده کلروفیل فلوروسانس Plant Efficiency Analyzer (ساخت شرکت ELE International انگلستان) و در ساعت ۱۰ تا ۱۳ اندازه‌گیری شد. بدین منظور برگ‌ها به صورت تکی توسط گیره‌هایی به مدت ۲۰ دقیقه تاریکی دیده شده و سپس با اتصال دیود به گیره و بازکردن دریچه و فشار دادن کلید روی دیود، کارایی فتوستنز توسط دستگاه سنجش فلوروسانس ثبت شد.

درجه بازدارندگی رشد: درجه بازدارندگی رشد توسط روش Leita و همکاران (۱۹۹۳) بدست آمد. تمامی تیمارها با شاهد مقایسه شدند (درجه بازدارندگی شاهد = صفر و به عبارت دیگر ۱۰۰٪ رشد).

$$100 \times \frac{\text{وزن خشک گیاهان بیمار شده} - \text{وزن خشک گیاهان شاهد}}{\text{وزن خشک گیاهان شاهد}} = \text{درجه بازدارندگی رشد}$$

مالون دی‌آلدئید (MDA): میزان مالون دی‌آلدئید بر اساس روش Heath و Packer (۱۹۶۸) اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۰/۲ گرم بافت برگ همراه با ۲ میلی‌لیتر تری‌کربوکسیلیک اسید (TCA) ۰/۱٪ همگن شد. سپس نمونه‌ها ۱۰ دقیقه در rpm ۱۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. ۱ میلی‌لیتر از عصاره رویی همراه با ۴ میلی‌لیتر محلول تری‌کربوکسیلیک اسید ۲۰٪ در حلال تیوباربیتوریک اسید (TBA) ۰/۵٪ ترکیب و سپس محلول به مدت ۰/۵ ساعت در بن‌ماری با دمای ۹۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده شدند. پس از آن نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۱۰۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. میزان جذب مالون دی‌آلدئید از تفاوت در طول موج ۵۳۲ نانومتر و ۶۰۰ نانومتر توسط ضریب خاموشی ۱۵۵ بر میلی‌مولار سانتی‌متر محاسبه گردید.

$$\text{MDA } (\mu \text{ mol g}^{-1} \text{ FW}^{-1}) = [A532-A600/155] \times 10^3$$

جذب ماده رنگی قرمز در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده و با منحنی استاندارد پرولین مقایسه شد.

سنجش محتوای کربوهیدرات محلول: محتوای کربوهیدرات محلول طبق روش Yemm و Willis (۱۹۵۴) همراه با کمی اصلاحات انجام شد. ۰/۲ گرم نمونه همراه با ۵ میلی‌لیتر اتانول سه مرتبه عصاره‌گیری شده است. عصاره تهیه‌شده به مدت ۱۵ دقیقه در rpm ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی همراه با ۳ میلی‌لیتر عامل آنترون ترکیب شد. نمونه‌ها سپس در حمام آب گرم (۹۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده و بلافاصله روی یخ گذاشته و جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر خوانده شد.

سنجش غلظت گابا: غلظت گابا در برگ توسط روش Komatsuzaki و همکاران (۲۰۰۷) همراه با کمی تغییرات انجام شد. ۱ گرم از بافت برگ همراه با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ همگن و به مدت ۱ دقیقه ورتکس شد. سپس نمونه‌ها در rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. محلول رویی با عبور از کاغذ صافی فیلتر شد. مراحل عصاره‌گیری دو مرتبه تکرار شد. عصاره بدست آمده توسط دستگاه سانتریفیوژ تغلیظ‌کننده خشک شده و ماده خشک‌شده در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر حل و پس از مشتق‌سازی توسط دستگاه HPLC (RF-20A, Shimadzu Corp, Japan) میزان گابا، محاسبه شد. سرعت جریان، دمای ستون و طول موج آشکارسازی به ترتیب ۱/۲ میلی‌لیتر بر دقیقه، ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۴۵۰ نانومتر طول موج تابش و ۳۳۰ نانومتر طول موج برانگیختگی است.

پروتئین‌های محلول کل: جهت اندازه‌گیری غلظت پروتئین‌های محلول کل از روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد. ابتدا ۰/۱ گرم برگ تازه در هاون چینی سائیده و یک میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) به آن اضافه شد تا همگن شود. سپس عصاره با سرعت rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و ۵۰ میکرولیتر از عصاره رویی همراه با ۳ میکرولیتر محلول بردفورد ترکیب شد و پس از ۱۰ دقیقه میزان جذب نوری با استفاده از

جدول ۱- اطلاعات مربوط به توالی پرایمرها به منظور qRT-PCR

ژن	پرایمر	توالی پرایمر (5'→3')
SSADH	Sense	TTCCATCACCTCTTGCCGAT
SSADH	Anti-sense	AGGGGTGTAAGTTCAGACGG
18 S rRNA	Sense	GATTCCGGTCTATTGTGTTG
18 S rRNA	Anti-sense	TTTCGCAGTTGTTCTGCTTT

در چهار سطح (۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد) و در بخش مولکولی این تحقیق، فاکتورهای آزمایش شامل توت‌فرنگی در دو سطح (کاماروسا و کردستان) و زمان نمونه‌برداری در چهار سطح (صفر، ۲، ۵ و ۱۰ ساعت پس از شروع تنش ۴۰ درجه سلسیوس) بود. تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده توسط نرم‌افزار SAS انجام شد. مقایسه میانگین صفات با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل (نسخه ۲۰۱۹) انجام شد.

نتایج و بحث

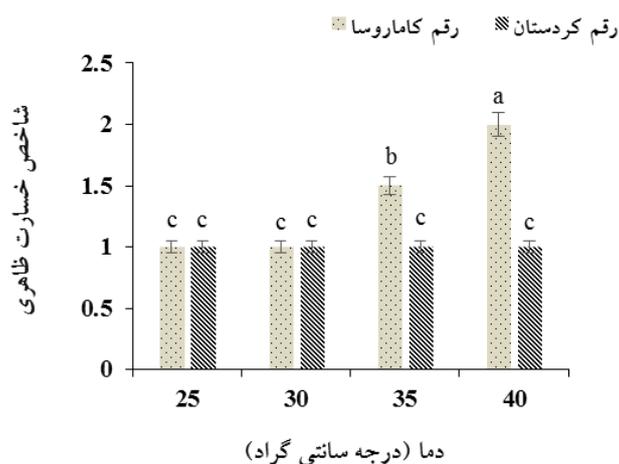
شاخص خسارت ظاهری: نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که با افزایش دما از ۲۵ (شاهد) به ۳۰ درجه سانتی‌گراد، تفاوت معنی‌داری در میزان خسارت ظاهری برگ در ارقام کاماروسا و کردستان مشاهده نشد. اگر چه با افزایش سطح فاکتور دما از ۳۰ درجه سانتی‌گراد به ۳۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد در رقم کاماروسا تفاوت معنی‌داری در شاخص خسارت ظاهری نسبت به شاهد آن (شکل ۱ و ۲) مشاهده شد. در مجموع بیشترین میزان خسارت ظاهری برگ در تیمار دمایی ۴۰ درجه سانتی‌گراد و رقم کاماروسا نسبت به شاهد مشاهده شد.

علامت عمومی القای گرما در گیاهان زرد و پژمرده شدن برگ‌ها به علت آسیب اکسیداتیو، تخریب کلروفیل و عدم تعادل آب است (Liu et al., 2019). علامت‌هایی مانند کلروز، نکروز و سفیدشدن به علت تنش دمایی در گیاهان لوبیا تحت تنش دمای بالا مشاهده شد که می‌تواند به علت آسیب اکسیداتیو در برگ‌ها باشد. کاهش در کلروفیل همراه با افزایش دما ممکن است در نتیجه جلوگیری از بیوسنتز کلروفیل یا افزایش تخریب کلروفیل و یا به‌هم‌ریختگی کلروفیل باشد

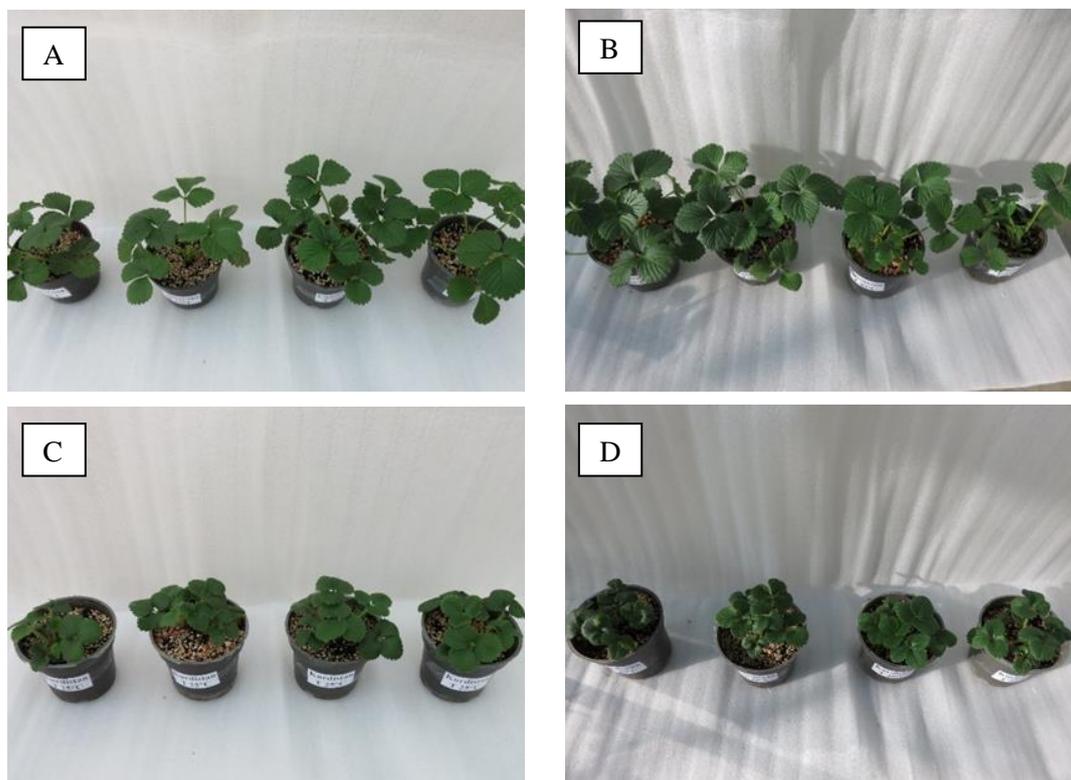
میزان بیان ژن SSADH (کد: XM_004293749.2): کل محتوای RNA براساس روش Badek و همکاران (۲۰۱۴) همراه با کمی اصلاحات انجام شد. پس از تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج‌شده با کمک الکتروفورز ژل آگارز و دستگاه نانودراپ (Inplen, NP80, Germany)، برای تهیه cDNA از کیت استخراج cDNA ساخت شرکت یکتا تجهیز آزما و آغازگر Oligo (dT)18 (50 pmol/μl) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. پس از آنکه با کمک نرم‌افزار Oligo 7، آغازگرهای رفت و برگشت برای ژن مورد نظر طراحی شد، کلیه ویژگی‌های آغازگرها شامل دمای اتصال، میزان تشکیل آغازگر-دایمر، تشکیل لوپ و همچنین واکنش PCR بررسی و در نهایت آغازگر اختصاصی (جدول ۱) طراحی و به منظور سنتز به شرکت متابیون آلمان ارسال شد.

به منظور بررسی میزان بیان ژن سوکسینیک سمی آلدئید دهیدروژناز در نمونه‌ها از آزمایش PCR کمی (qPCR) و دستگاه Real Time PCR استفاده شد. میزان رونویسی هر ژن در مقایسه با ژن 18 s با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ ارائه‌شده توسط Livak و Schmittgen (۲۰۰۱) انجام شد. واکنش qPCR به وسیله دستگاه ترموسایکر (step one 48 well) به روش $\Delta\Delta Ct$ (comperative Ct) و بر طبق روش ارائه‌شده توسط شرکت سازنده (Biofact Co., Ltd. Daejeon, Republic Korea) انجام و در این واکنش از سایبرگرین ساخت شرکت Biofact حاوی SYBER® Green I Dye و ROX استفاده شد.

این تحقیق به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح تجزیه مرکب کاملاً تصادفی (دما) با چهار تکرار انجام شد. در بخش فیزیولوژیک و بیوشیمیایی، فاکتورهای آزمایش شامل توت‌فرنگی در دو سطح (کاماروسا و کردستان) و شرایط دمایی



شکل ۱- اثر تیمارهای دمایی بر شاخص خسارت ظاهری در دو رقم توت‌فرنگی. میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد است.



شکل ۲- تصویر ارقام توت‌فرنگی کاماروسا و کردستان پس از اعمال ۱۰ ساعت تیمار دمایی (A): رقم کاماروسا و تیمار دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد (شاهد)، (B): رقم کاماروسا و تیمار دمایی ۴۰ درجه سانتی‌گراد، (C): رقم کردستان و تیمار دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد (شاهد)، (D): رقم کردستان و تیمار دمایی ۴۰ درجه سانتی‌گراد

مطالعات زیادی نشان‌دهنده درگیری گابا در تسهیل تحمل به تعداد زیادی از تنش‌های غیرزیستی مانند دما، خشکی، شوری، نور کم و کمبود نیتروژن است. گابا باعث تحریک رشد گیاه و

(Priya et al., 2019). گابا یک مولکول میانجی ضروری متابولیسم نیتروژن و بیوستنز آمینواسید است و یک نقش کلیدی را در سنتز متابولیت‌های اولیه و ثانویه ایفا می‌کند.

کاهش تنش از طریق افزایش بیان سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی می‌شود (Sita and Kumar, 2020). کاربرد خارجی گابا در گیاهان تحت تنش گرمایی به‌طور قابل‌توجهی باعث بهبود رشد و بقا توسط کاهش آسیب‌غشایی، بهبود قابلیت دوام سلولی، محتوای کلروفیل و کارایی فتوشیمیایی برگ گیاهان می‌شود (Nayyar et al., 2014). مطالعات نشان داد، موتاسیون در ژن گابا ترانس آمیناز در آراییدوپسیس باعث ایجاد یک ساختار معیوب مانند پیری برگ تحت شرایط تنش‌های زنده مختلف می‌شود. در حقیقت گیاهان موتانت، القای اولیه پیری تحت شرایط تنش‌های اکسیداتیو را نشان می‌دادند که با کاهش فعالیت فتوسنتزی، تجزیه کلروفیل و ممانعت از تثبیت کربن همراه بود (Seifikalhor et al., 2019). در این آزمایش در رقم کردستان و تیمار دمایی ۴۰ درجه سانتی‌گراد مقدار گابا به‌طور معنی‌داری بیشتر از رقم کاماروسا بود. این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده تأثیر گابا در کاهش خسارت ظاهری در گیاهان تحت تنش دمایی باشد و همسو با مطالعات ذکر شده است.

مطالعات نشان داد که تجمع گابا یک نقش مثبت را در جلوگیری از آسیب به غشا سلول و مقاومت در آسیب‌سرمایی ایفا می‌کند (Shan et al., 2016). تعداد زیادی از تحقیقات اثر تنظیم‌کننده اسمزی موادی مانند گابا و پرولین را که به‌طور گسترده‌ای در گیاهان باغبانی حضور دارند ثابت کرده‌اند و به منظور توقف تنش محیطی در گیاهان به میزان زیادی تجمع می‌یابند (Lehmann et al., 2010).

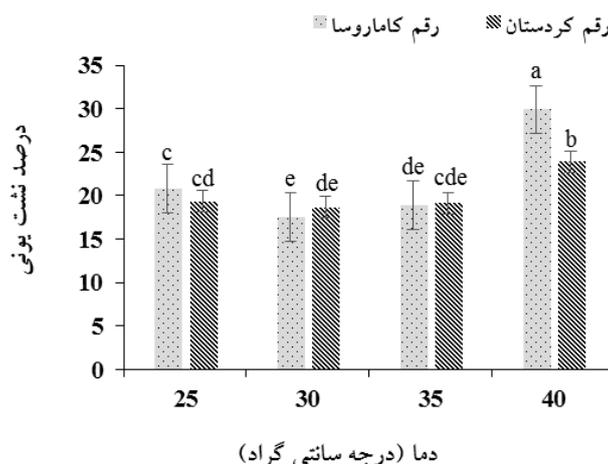
بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، کاهش سرعت در روند افزایشی درصد نشت یونی در رقم کردستان نسبت به رقم کاماروسا می‌تواند به علت بیشتر بودن محتوای گابا در رقم کردستان نسبت به رقم کاماروسا باشد. کاربرد خارجی گابا در گیاهان تحت تنش گرمایی به‌طور قابل‌توجهی باعث بهبود رشد و بقا توسط کاهش آسیب‌غشایی، بهبود قابلیت دوام سلولی، محتوای کلروفیل و کارایی فتوشیمیایی برگ گیاهان می‌شود (Nayyar et al., 2014). تحقیقات نشان داد کاربرد خارجی ۲۵ میکرومولار گابا در کاهو باعث کاهش روند افزایشی نشت یونی در گیاهان تحت شرایط تنش شوری شد (Seifikalhor et al., 2018) که همسو با نتایج حاصل از این آزمایش در رقم کردستان است. استفاده از گابا باعث افزایش آمینواسیدها (گابا، L-گلوتامیک اسید و L-آسپارتیک اسید)، ارگانیک اسیدها (مالیک و سیتریک اسید)، قندها (ساکارز، فروکتوز و گلوکز) و قندهای الکلی در گیاه بنت‌گراس خزنده (آگروستیس) تحت شرایط تنش دمایی شد (Hijaz et al., 2018).

تنش دمایی بالا باعث ایجاد برخی از تغییرات فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی در متابولیسم گیاه مانند تغییر در ساختار فضایی پروتئین، مایع‌شدن چربی، غیرفعال کردن آنزیم‌ها، جلوگیری از سنتز پروتئین‌ها، اختلال در یکپارچگی غشا و تولید بسیار زیاد گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (Hasanuzzaman et al., 2013). در دمای بالا، سیالیت بسیار زیاد چربی‌های غشاء سلول سبب کاهش وظایف فیزیولوژیک آن می‌شود. دمای بالا همچنین سبب تغییر در ترکیب غشاء و ساختار آن می‌شود و می‌تواند باعث نشت یون‌ها شود (Taiz

شاخص پایداری غشا سلولی: نتایج حاصل از پژوهش

نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار شاخص پایداری غشا سلولی در ارقام کاماروسا و کردستان در تیمار دمایی ۴۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به تیمار دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. بیشترین درصد نشت یونی در تیمار دمایی ۴۰ درجه سانتی‌گراد و به ترتیب در ارقام کاماروسا با افزایش ۴۳/۸۱ درصدی نسبت به شاهد آن و پس از آن رقم کردستان و با افزایش ۲۳/۷۲ درصدی نسبت به شاهد خود مشاهده شد (شکل ۳).

در گیاهان تحت تنش خشکی کاربرد گابا می‌تواند به عنوان یک مولکول کوچک (Small-molecule) و ماده تنظیم‌کننده اسمزی عمل کند که باعث کاهش پتانسیل اسمزی آب در سیتوپلاسم، افزایش ظرفیت نگهداری آب سلول‌ها و کاهش آسیب سلولی ایجادشده توسط کمبود آب شود (Li et al.,



شکل ۳- اثر تیمارهای دمایی بر درصد نشت یونی در دو رقم توت‌فرنگی. میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند. بارها نشان دهنده خطای استاندارد است.

گونه‌های فعال اکسیژن و بازدارنده پراکسیداسیون چربی ایفا می‌کند (Zhang et al., 2016).

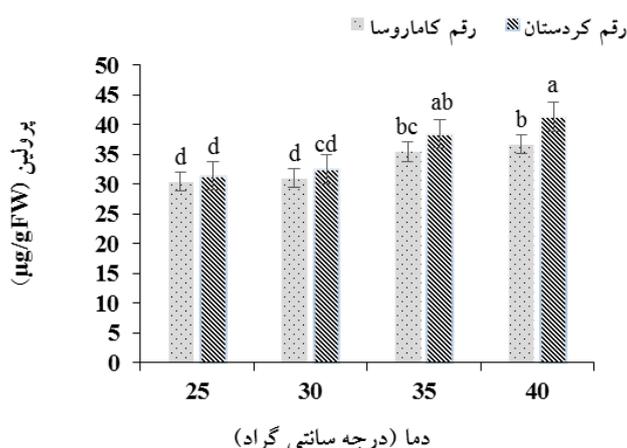
در مدت زمان زیادی پرولین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان مورد توجه قرار داشت، اما شواهد جدید نشان داد که پرولین تنها با رادیکال هیدروکسیل واکنش می‌دهد. همچنین یک واکنش با هیدروکسیل برای گابا پیشنهاد شد که توسط میانجی‌گری پرولین تحت شرایط تنش اکسیداتیو انجام می‌شود. این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده احتمال تجمع همزمان پرولین و گابا تحت شرایط تنش باشد (Seifikalhor et al., 2019). در این پژوهش بیشترین میزان پرولین در رقم کردستان و در تیمار حرارتی ۴۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد که می‌تواند به علت افزایش تجمع گابا در طول افزایش سطوح تیمارهای حرارتی در رقم کردستان باشد.

کربوهیدرات محلول برگ: نتایج پژوهش نشان‌دهنده یک روند افزایشی در محتوای کربوهیدرات محلول در ارقام کاماروسا و کردستان تا تیمار دمایی ۳۵ درجه سانتی‌گراد و سپس کاهش محتوای کربوهیدرات محلول در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد بود. اگر چه در تیمار دمایی ۴۰ درجه سانتی‌گراد میزان کربوهیدرات محلول در رقم کردستان به صورت معنی‌داری بیشتر از رقم کاماروسا بود. نتایج نشان داد اعمال تیمار حرارتی ۴۰ درجه سانتی‌گراد باعث کاهش ۱۲/۱۹ درصد

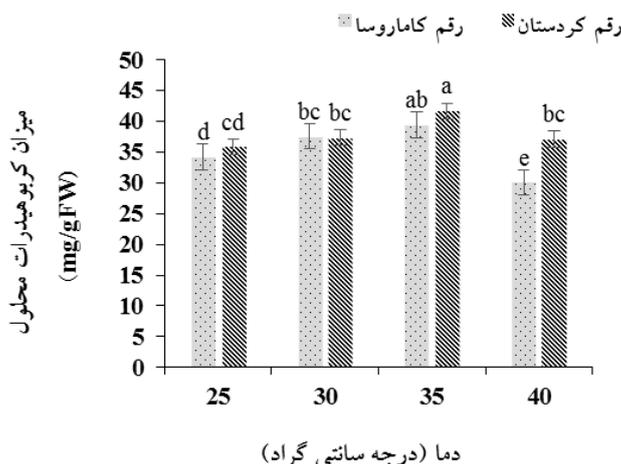
کاربرد خارجی ۱ میلی‌مولار گابا در گیاهان لوبیا تحت تنش دمایی به‌طور قابل ملاحظه‌ای باعث افزایش نقش زایشی (جوانه‌زنی دانه‌گرده، قوه نامیه دانه‌گرده، پذیرش کلاله و قابلیت زیستی تخمک)، کاهش آسیب غشا سلولی و نیز تقویت تجمع اسمولیت‌ها شد (Priya et al., 2019).

پرولین: با افزایش سطوح تیمارهای حرارتی در هر دو رقم توت‌فرنگی میزان پرولین افزایش یافت. بیشترین میزان پرولین در رقم کردستان و در تیمار حرارتی ۴۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (شکل ۴). اعمال تیمار حرارتی ۴۰ درجه سانتی‌گراد در رقم کاماروسا و کردستان به‌طور معنی‌داری باعث افزایش ۲۰/۶۶ و ۳۱/۵ درصدی پرولین نسبت به تیمار شاهد شد.

پرولین یکی از اجزا پروتئین‌های گیاهی است که به‌طور مؤثری در به‌دام‌انداختن رادیکال‌های هیدروکسیل و پایداری غشا سلولی نقش دارد. همچنین نقش پروتئین‌های حل‌شونده برای افزایش توانایی سازگاری در گیاهان ثابت شده است (Gupta et al., 2013). به علاوه پرولین می‌تواند مقدار زیادی نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات را به عنوان منبع نیتروژن و کربن برای ترمیم و بهبود انرژی پس از فرایندهای تجزیه سلول، تولید کند (Deng et al., 2015). تجمع پرولین در میوه ازگیل ژاپنی یک نقش مثبت را به عنوان به‌دام‌اندازنده



شکل ۴- اثر تیمارهای دمایی بر میزان پرولین ($\mu\text{g g}^{-1} \text{FW}$) در دو رقم توت‌فرنگی. میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد است.



شکل ۵- اثر تیمارهای دمایی بر میزان کربوهیدرات محلول ($\text{mg g}^{-1} \text{FW}$) در دو رقم توت‌فرنگی. میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

در گیاه آگروستیس نقش القای گابا در تحمل به تنش دمایی وابسته به توانایی گابا به‌منظور کاهش آسیب‌های اکسیداسیون مختلف، افزایش فعالیت فتوسنتزی و حفظ وضعیت اسمزی و نیز افزایش مسیر تولید گابا است. گابا ممکن است به عنوان یک منبع حد واسط در چرخه تری کربوکسیلیک اسید، به منظور حفظ هموستازی متابولیک‌ها باشد (Seifikalhor *et al.*, 2018). مطالعات نشان داد کاربرد خارجی گابا می‌تواند باعث افزایش سطح آمینواسیدها (گابا، L-گلوتامیک اسید و L-آسپارتیک اسید)، ارگانیک اسیدها

محتوای کربوهیدرات محلول در رقم کاماروسا نسبت به تیمار دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد (شاهد آن) شد، اما در رقم کردستان تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۵). در معرض قرارگرفتن گیاهان حساس به دمای بالا در دمای بالا باعث القا تغییرات سلولی می‌شود که شامل تولید بیش از اندازه گونه‌های فعال اکسیژن، کاهش فتوسنتز خالص، کاهش تجمع ماده خشک و سطح برگ، تغییر در سیالیت غشا سلولی، نسبت تنفس و چندین عمل متابولیکی در سطح سلولی و درون سلولی است (Tiwari and Yadav, 2019).

درگیر است (Seifikalhor *et al.*, 2019).

علاوه بر نقش مؤثر گابا درونی، کاربرد خارجی این ترکیب نیز سبب افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی می‌شود. در گیاهان نقش القای گابا در تحمل به تنش دمایی می‌تواند وابسته به توانایی گابا به منظور کاهش آسیب‌های اکسیداسیون مختلف، افزایش فعالیت فتوسنتزی و حفظ وضعیت اسمزی و نیز افزایش مسیر تولید گابا باشد. گابا ممکن است به عنوان یک منبع حد واسط در چرخه تری کربوکسیلیک اسید، به منظور حفظ هموستازی متابولیک ایفای نقش کند و از این مسیر به حفظ غلظت کربوهیدرات در گیاهان تحت شرایط تنش کمک کند (Seifikalhor *et al.*, 2018). Priya و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که تنش دمای بالا در گیاه لوبیا در مرحله زایشی باعث کاهش محتوای گابا درونی در برگ و بساک شد که همسو با نتایج بدست آمده در رقم کاماروسا بود.

پروتئین‌های محلول کل: بیشترین میزان پروتئین محلول کل در تیمار دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در رقم کردستان مشاهده شد (شکل ۷). اعمال تیمارهای حرارتی باعث کاهش میزان پروتئین‌های محلول کل در رقم کاماروسا شد. اگر چه میزان پروتئین‌های محلول کل در رقم کردستان و تیمار دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تفاوت معنی‌داری را با گیاهان شاهد خود نشان نداد.

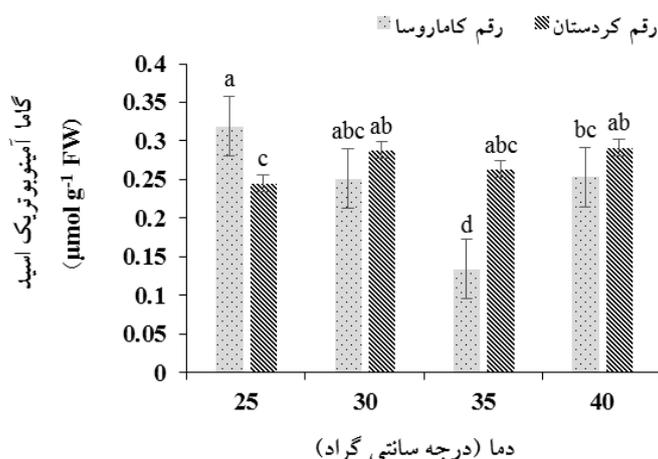
گیاهان متابولیسم‌های خود را به روش‌های مختلفی به ویژه از طریق تولید حل‌شونده‌های سازگار که قادر به سازماندهی پروتئین‌ها و ساختارهای سلولی هستند، تجمع پروتئین‌های شوک حرارتی، تنظیم متابولیت‌های ثانویه در جهت هموستازی سلول، ترمیم و بازسازی آسیب پروتئین‌ها و غشاها و نیز اصلاح سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی به منظور پایداری مجدد تعادل احیای سلولی و هموستازی آن، در پاسخ به دمای بالا تغییر می‌دهند (Hasanuzzaman *et al.*, 2013).

دریافت اولیه و انتقال سیگنال‌های تنش گرمایی در گیاهان به‌طور عمده توسط فاکتورهای شوک حرارتی (HSFs) صورت می‌گیرد که منجر به تولید انواع پروتئین‌های چپرون مولکولی (HSPs) محافظ سلول مانند پروتئین‌های شوک حرارتی

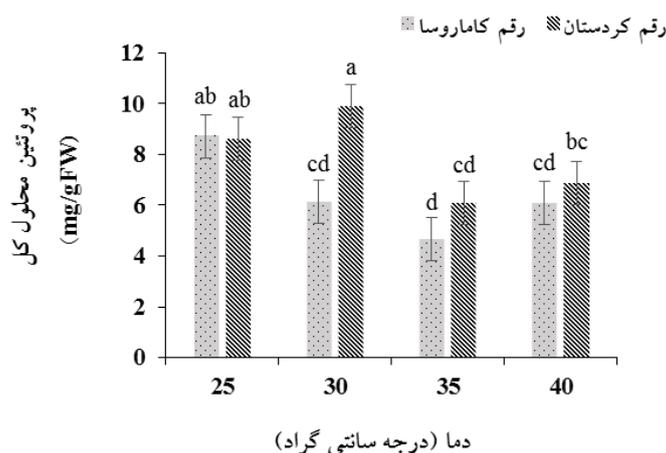
(مالیک و سیتریک اسید)، قندها (ساکارز، فروکتوز و گلوکز) و قندهای الکلی در گیاهان تحت شرایط تنش دمایی گردد (Hijaz *et al.*, 2018). در این پژوهش کاهش معنی‌دار کربوهیدرات محلول در تیمار تنش دمایی ۴۰ درجه سانتی‌گراد در رقم کاماروسا نسبت به کردستان می‌تواند به علت کاهش میزان گابای درونی در این رقم در مقایسه با رقم کردستان باشد. این موضوع نشان‌دهنده اثر گابا بر افزایش و یا حفظ کربوهیدرات محلول در گیاهان تحت تنش دمایی است. از این رو کاربرد خارجی گابا در گیاهان تحت تنش از طریق تأمین انرژی برای گیاهان، باعث القای تحمل به شرایط تنش خواهد شد.

گاما آمینوبوتریک اسید: نتایج حاصل از پژوهش نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار غلظت گاما آمینوبوتریک اسید در سطوح تیمارهای دمایی و ارقام است (شکل ۶). میزان گابا در رقم کاماروسا و در تیمار دمایی ۳۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد کاهش معنی‌داری را نسبت به تیمار دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد نشان داد. در رقم کردستان و تیمار دمایی ۴۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به تیمار دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد میزان گابا ۱۸/۷۸ درصد افزایش داشت، اما در رقم کاماروسا کاهش ۲۰/۴۳ درصد مشاهده شد.

براساس پژوهش‌های صورت‌گرفته بر روی هفت رقم توت‌فرنگی، ارقام ونتانا، آروماس و کاماروسا حساس به گرما، ارقام کردستان، گایوتا و کوپین الیزا متحمل به گرما و رقم پاروس مابین این دو گروه معرفی شدند (Manafi *et al.*, 2022). در این پژوهش رقم کاماروسا به عنوان یک رقم حساس به گرما در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد کاهش معنی‌دار میزان گابا را نسبت به شاهد آن نشان داد اما در رقم کردستان به عنوان یک رقم متحمل به گرما در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد افزایش معنی‌دار میزان گابا نسبت به شاهد آن مشاهده شد، که نشان‌دهنده اهمیت و تأثیر گابا در القای تحمل به تنش دمایی در گیاه توت‌فرنگی است. گابا می‌تواند به‌طور ویژه باعث حفاظت از گیاه در برابر تنش دمای بالا شود. گابا در فشار تورگر برگ، تثبیت کربن و مسیرهای آسمیلاسیون



شکل ۶- اثر تیمارهای دمایی بر میزان گاما آمینوبوتریک اسید ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$) در دو رقم توت‌فرنگی. میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد است.



شکل ۷- اثر تیمارهای دمایی بر پروتئین‌های محلول کل ($\text{mg g}^{-1}\text{FW}$) در دو رقم توت‌فرنگی. میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

آسیب‌دیده از تنش در طول تنش حرارتی یا سایر تنش‌های غیرزنده است. پروتئین‌های شوک حرارتی باعث محافظت از ساختار سه بعدی پروتئین‌ها تحت شرایط تنش حرارتی می‌شود و به تاخوردگی مجدد تعداد زیادی از پروتئین‌ها به وسیله خنثی‌سازی کمک کرده و از این طریق از کاهش برگشت‌ناپذیر وظیفه پروتئین‌ها جلوگیری می‌کند. همچنین در پایدارسازی پروتئین در طول تنش دمایی نقش دارند (Brown *et al.*, 2016). پروتئین‌های شوک حرارتی نه تنها توسط شوک حرارتی کوتاه‌مدت القا می‌شوند، بلکه به منظور سازگاری در

می‌شوند. فعال‌سازی یا افزایش مسیرهای فاکتورهای شوک حرارتی واکنش سازگاری مهم به تنش حرارتی در گیاهان است. فاکتورهای شوک حرارتی، فاکتورهای رونویسی حیاتی درگیر در فعال‌سازی رونویسی ژن‌های شوک حرارتی هستند. تعداد زیادی از ژن‌های مکانیسم دفاعی حرارتی مانند پروتئین‌های شوک حرارتی و آسکوربات پراکسیداز توسط فاکتورهای شوک حرارتی تنظیم می‌شوند (Liu *et al.*, 2019). وظیفه پروتئین‌های شوک حرارتی به عنوان چپرون‌های مولکولی، پایدارسازی پروتئین‌ها و ترمیم مجدد پروتئین‌های

گیاهان ذرت باعث افزایش شاخص بازدارندگی رشد شد. De Azevedo Neto و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند پیش‌تیمار پراکسید هیدروژن باعث کاهش بازدارندگی رشد در گیاهان تحت تنش شوری شد.

گابا باعث تحریک رشد گیاه و کاهش تنش از طریق افزایش بیان سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی می‌شود (Sita and Kumar, 2020). کاربرد خارجی گابا در گیاهان تحت تنش گرمایی به‌طور قابل‌توجهی باعث بهبود رشد و بقا توسط کاهش آسیب‌غشایی، بهبود قابلیت دوام سلولی، محتوای کلروفیل و کارایی فتوشیمیایی برگ گیاهان می‌شود (Nayyar et al., 2014). در این پژوهش نیز در رقم کردستان با محتوای گابای بیشتر نسبت به شاهد آن، درجه بازدارندگی رشد کمتری را در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به رقم کردستان نشان داد.

مالون دی‌آلدهید (MDA): نتایج حاصل از آزمایش نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در میزان تغییرات مالون دی‌آلدهید در ارقام کاماروسا و کردستان در تیمار دمایی ۴۰ درجه سلسیوس نسبت به شاهد آن‌ها بود. اگر چه در دمای ۴۰ درجه سلسیوس میزان مالون دی‌آلدهید در رقم کاماروسا به‌طور معنی‌داری بیشتر از رقم کردستان بود (شکل ۱۰).

افزایش میزان مالون دی‌آلدهید به‌عنوان یک شاخص توسعه پراکسیداسیون چربی و آسیب رادیکال‌های آزاد به غشا سلولی تحت تنش دمای بالا است. افزایش غلظت مالون دی‌آلدهید در نتیجه اعمال تنش دمای بالا در گیاه لوبیا مشاهده شد. اگر چه کاربرد خارجی گابا در گیاه لوبیا تحت تنش دمایی باعث کاهش غلظت مالون دی‌آلدهید در برگ گیاه لوبیا شد (Priya et al., 2019). در این آزمایش اگر چه تفاوت معنی‌داری بین میزان مالون دی‌آلدهید در تیمارهای دمایی مشاهده نشد، اما نتایج نشان داد، میزان مالون دی‌آلدهید درونی در رقم کاماروسا بیشتر از کردستان بود.

تغییرات بیان ژن SSADH: میزان بیان ژن SSADH (ژن کلیدی در ورود گابا در زنجیره تری‌کربوکسیلیک اسید) در رقم کاماروسا ثابت بود، اما در رقم کردستان دو ساعت پس از

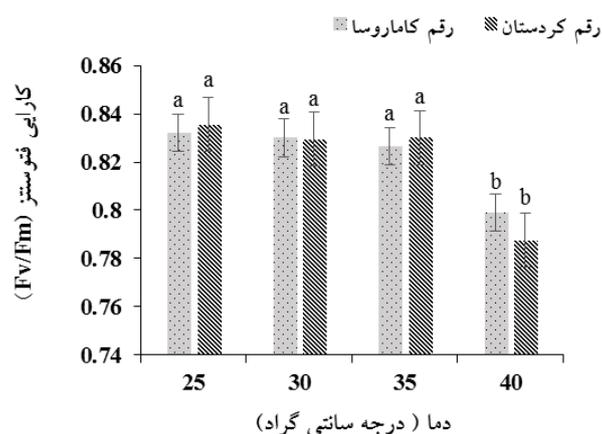
شرایط تنش حرارتی بلند مدت نیز ضروری هستند. مطالعات نشان داد، کاربرد خارجی گابا در گیاه بنت‌گراس خزنده باعث فعال‌سازی و افزایش بیان پروتئین‌های شوک حرارتی و در نهایت افزایش تجمع این پروتئین‌ها در برگ شد (Liu et al., 2019). در این پژوهش نیز در رقم کردستان به‌عنوان رقم متحمل به دمای بالا، میزان محتوای پروتئین محلول کل بیشتر از رقم کاماروسا در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد بود.

کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II: نتایج نشان داد در هر دو رقم توت‌فرنگی اعمال تیمار دمایی ۴۰ درجه سانتی‌گراد باعث کاهش معنی‌دار شاخص کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II شد، اگر چه در این دما بین رقم کاماروسا و کردستان تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۸).

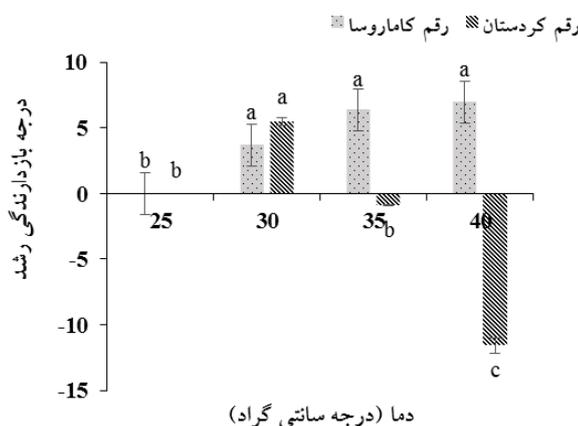
تنش شوری باعث کاهش راندمان سیستم انتقال الکترون می‌گردد که سرانجام باعث کاهش کارایی فتوستتز می‌شود. گابا یک نقش میانجی را در چندین مسیر متابولیکی و فیزیولوژیکی مانند کارایی فتوستتز، چرخه تری‌کربوکسیلیک اسید و افزایش تولید متابولیت‌هایی مانند آمینواسید، کربوهیدرات، اسیدهای آلی و الکل‌ها ایفا می‌کند در گیاه فلفل سیاه، تغییر مثبت در سنجش پارامترهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی شامل افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی، بهبود کارایی فتوستتز، افزایش جذب دی‌اکسید کربن، افزایش پرولین و افزایش محتوای قند کلی به‌علاوه تنظیم پتانسیل اسمزی توسط کاربرد گابا مشاهده شد (Seifikalhor et al., 2019). اگر چه در این آزمایش تفاوت معنی‌داری بین دو رقم توت‌فرنگی کاماروسا (محتوای گابا درونی کم) و کردستان (محتوای گابا درونی زیاد) در شاخص کارایی فتوستتز مشاهده نشد.

درجه بازدارندگی رشد: اعمال تیمارهای حرارتی در رقم کاماروسا باعث افزایش معنی‌دار درجه بازدارندگی رشد نسبت به شاهد آن شد. در رقم کردستان ابتدا یک روند افزایشی در درجه بازدارندگی رشد (دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد) و سپس روند کاهش درجه بازدارندگی رشد مشاهده شد (شکل ۹).

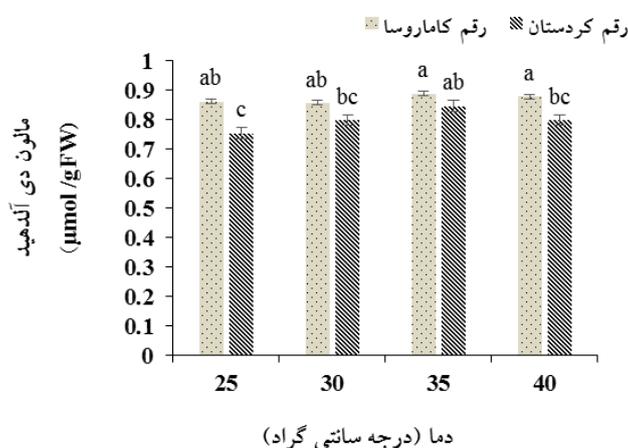
تنش‌های زیستی و غیرزیستی باعث کاهش رشد در گیاهان می‌شوند. Terzi و Guzel (۲۰۱۳) گزارش کردند تنش مس در



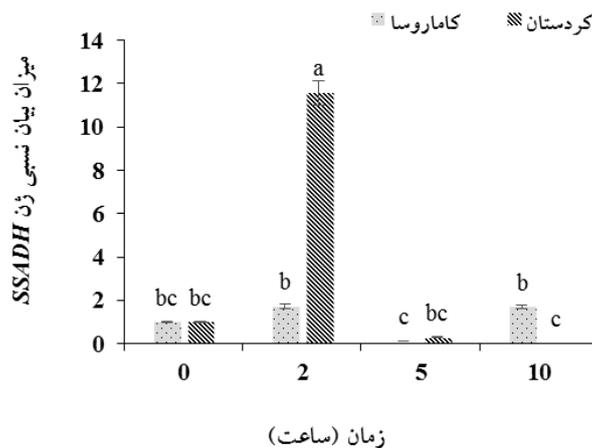
شکل ۸- اثر تیمارهای دمایی بر کارایی فتوسنتز (Fv/Fm) در دو رقم توت‌فرنگی. میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد است.



شکل ۹- اثر تیمارهای دمایی بر درجه بازدارندگی رشد در دو رقم توت‌فرنگی. میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد است.



شکل ۱۰- اثر تیمارهای دمایی بر میزان مالون دی‌آلدئید ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$) در دو رقم توت‌فرنگی. میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد است.



شکل ۱۱- تجزیه و تحلیل میزان بیان نسبی ژن SSADH در دو رقم توت فرنگی تحت تنش دمایی. بیان نسبی نشانگر افزایش نسبی در بیان در مقایسه با کنترل مربوطه است (کنترل ۱ تنظیم شد). میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

صورت پس از برداشت در سیب باعث افزایش فعالیت مسیر گابا از طریق افزایش سطوح رونویسی ژن‌های *MdGAD1*، *MdSSADH*، *MdGABA-T1/2*، *MdGAD2* شد (Han et al., 2020).

نتیجه‌گیری

در این پژوهش در رقم کردستان (متحمل به تنش دما) پس از اعمال ۱۰ ساعت تنش دمایی ۴۰ درجه سانتی‌گراد میزان گابا افزایش اما در رقم کاماروسا (حساس به تنش دما) میزان آن کاهش یافت. نتایج نشان داد در رقم کردستان عدم تغییر معنی‌دار در میزان کربوهیدرات محلول و شاخص خسارت ظاهری و افزایش میزان پرولین و درصد پروتئین محلول کل و کاهش در سرعت افزایش نشت یونی در دمایی ۴۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به شاهد می‌تواند بیان‌کننده اثر گابا در تأمین انرژی در گیاهان تحت شرایط تنش و نیز نقش گابا در فعال‌سازی و افزایش بیان پروتئین‌های شوک حرارتی باشد. میزان بیان ژن سوکسینیک سمی آلدهید دهیدروژناز (ژن کلیدی در ورود گابا در زنجیره تری کربوکسیلیک اسید) در رقم کاماروسا ثابت بود، اما در رقم کردستان ۲ ساعت پس از تنش حرارتی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و می‌تواند نشان‌دهنده

تنش دمایی میزان بیان ژن نسبت به تیمار شاهد ۱۱/۵۷ برابر افزایش یافت (شکل ۱۱).

گابا توسط فعالیت آنزیم سوکسینیک سمی آلدهید دهیدروژناز به سوکسینات تبدیل می‌گردد. سوکسینات می‌تواند وارد چرخه تری کربوکسیلیک اسید شود و از این طریق به تأمین انرژی در گیاهان تحت شرایط تنش کمک می‌کند (Clark et al., 2009). این موضوع نشان‌دهنده اثر مهم ژن‌های کلیدی در مسیر گابا شانت بر تأمین انرژی در گیاهان تحت تنش دمایی است. از این‌رو کاربرد خارجی گابا در گیاهان تحت تنش دمایی می‌تواند از طریق افزایش بیان ژن‌های گابا ترانس آمیناز و سوکسینیک سمی آلدهید دهیدروژناز به تأمین انرژی در گیاهان و در نهایت القای تحمل به شرایط تنش کمک کند. تحقیقات نشان داد کاربرد گابا در گیاه پرتقال در شرایط نرمال باعث افزایش آمینواسیدهای گلیسین، آلانین، پرولین، آسپارژین، L-گلوتامین، متیونین و آلفاکتوگلوکوتارات و نیز باعث القای بیان ژن‌های *GABA-T* و *SSADH* شد. کاربرد گابا از طریق افزایش بیان ژن‌های آنزیم‌های چرخه تری کربوکسیلیک اسید شامل مالات دهیدروژناز و سوکسینات دهیدروژناز باعث تحریک تنفس و فراهم‌کردن انرژی شد (Hijaz et al., 2018) که همسو با نتایج بدست آمده در رقم کردستان در این آزمایش است. همچنین کاربرد کلسیم به

ورود سریع گابا در چرخه تری کربوکسیلیک اسید و تأمین انرژی در لحظات اولیه قرارگیری رقم کردستان تحت شرایط تنش دمایی باشد.

از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور که در راستای رسیدن به نتایج این پژوهش در قالب طرح حمایت از رساله دکتری مستقل (با کد طرح ۴۰۰۴۷۶۴) حمایت مالی داشتند، قدردانی می‌نماییم.

تشکر و قدردانی

منابع

- Badek, B., Napiorkowska, B., Masny, A., & Korbin, M. (2014). Changes in the expression of three cold-regulated genes in 'Elsanta' and 'Selvik' strawberry (*Fragaria ananassa*) plants exposed of freezing. *Journal of Horticultural Research*, 22(2), 53-61. <http://doi:10.2478/johr-2014-0022>
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207. <http://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Blum, A. & Ebercon, A. (1981). Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Science*, 21, 43-47. <http://doi.org/10.2135/cropsci1981.0011183X002100010013x>
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brown, R., Wang, H., Dennis, M., Slovin, J., & Turechek, W. (2016). The Effects of heat treatment on the gene expression of several heat shock protein genes in two cultivars of Strawberry. *International Journal of Fruit Science*, 16, 239-248. <https://doi.org/10.1080/15538362.2016.1199996>
- Clark, S., Di, M., Leo, R., Dhanoa, P. K., Van Cauwenberghe, O. R., Mullen, R. T., & Shelp, B. J. (2009). Biochemical characterization, mitochondrial localization, expression, and potential functions for an Arabidopsis 5 -aminobutyrate transaminase that utilizes both pyruvate and glyoxylate. *Journal of Experimental Botany*, 60(6), 1743-1757. <http://doi: 10.1093/jxb/erp044>
- De Azevedo Neto, A. D., Prisco, J. T., Eneas-Filho, J., Medeiros, J. V. R., & Gomes-Filho, E. (2005). Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants. *Journal of Plant Physiology*, 162, 1114-1122. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.01.007>
- Deng, F. F., Yang, S. L., & Gong, M. (2015). Effect of exogenous abscisic acid on proline accumulation and metabolic pathways in *Jatropha curcas* seedlings under cold stress. *Plant Physiology Journal*, 51(2), 221-226. <http://doi.org/10.13592/j.cnki.ppj.2014.0495>
- Gupta, K., Dey, A., & Gupta, B. (2013). Plant polyamines in abiotic stress responses. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35 (7), 2015-2036. <http://doi.org/10.1007/s11738-013-1239-4>
- Guzel, S. & Terzi, R. (2013). Exogenous hydrogen peroxide increases dry matter production, mineral content and level of osmotic solutes in young maize leaves and alleviates deleterious effects of copper stress. *Botanical Studies*, 54, 26. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-54-26>
- Han, S., Liu, H., Han, Y., He, Y., Nan, Y., Qu, W., & Rao, J. (2020). Effects of calcium treatment on malate metabolism and γ -aminobutyric acid (GABA) pathway in postharvest apple fruit. *Food Chemistry*, 334, 127479. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127479>
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M. M., Roychowdhury, R., & Fujita, M. (2013). Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 9643-9684. <http://doi:10.3390/ijms14059643>
- Heath, R. L. & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189-198. [http://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](http://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Hijaz, F., Nehela, Y., & Killiny, N. (2018). Application of gamma-aminobutyric acid increased the level of phytohormones in *Citrus sinensis*. *Planta*, 248(4), 909-918. <http://doi: 10.1007/s00425-018-2947-1>
- Komatsuzaki, N., Tsukaharab, K., Toyoshimac, H., Suzukic, T., Shimizua, N., & Kimuraa, T. (2007). Effect of soaking and gaseous treatment on GABA content in germinated brown rice. *Journal of Food Engineering*, 78(2), 556-560. <http://doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.10.036>
- Lehmann, S., Funck, D., Szabados, L., & Rentsch, D. (2010). Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids*, 39(4), 949-962. <http://doi.org/10.1007/s00726-010-0525-3>
- Leita, L., Nobili, M. D., Mondini, C., & Garcia, M. T. B. (1993). Response of Leguminosae to cadmium exposure. *Journal of Plant Nutrition*, 16, 2001-2012. <https://doi.org/10.1080/01904169309364670>

- Li, J., Qian, Z., Xin, Z., Baodong, W., Yingbo, Z., & Shujuan, J. (2020a). Calcium treatment alleviates pericarp browning of 'Nanguo' pears by regulation the GABA shunt after cold storage. *Front Plant Science*, *11*, 580986. <http://doi:10.3389/fpls.2020.580986>
- Li, J., Zhou, X., Wei, B., Cheng, S., Zhou, Q., & Ji, S. (2019b). GABA application improves the mitochondrial antioxidant system and reduces peel browning in 'Nanguo' pears after removal from cold storage. *Food Chemistry*, *297*, 124903. <http://doi:10.1016/j.foodchem.2019.05.177>
- Li, Z., Wang, L., Xie, B., Hu, S., Zheng, Y., & Jin, P. (2020c). Effects of exogenous calcium and calcium chelant on cold tolerance of postharvest loquat fruit. *Scientia Horticulturae*, *269*(25), 109391. <http://doi:10.1016/j.scienta.2020.109391>
- Liu, T., Liu, Z., Li, Z., Peng, Y., Zhang, X., Ma, X., Huang, L., Liu, W., Nie, G., & He, L. (2019). Regulation of heat shock factor pathway by γ -aminobutyric acid (GABA) associated with thermotolerance of creeping bentgrass. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(19), 4713. <http://doi:10.3390/ijms20194713>
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ ct method. *Methods*, *25*(4), 402-408. <http://doi:10.1006/meth.2001.1262>
- Manafi, H., Baninasab, B., Gholami, M., Talebi, M., & Khanizadeh, S. (2022). Exogenous melatonin alleviates heat-induced oxidative damage in strawberry (*Fragaria* \times *ananassa* Duch. cv. Ventana) plant. *Journal of Plant Growth Regulation*, *41*(1), 1-13. <http://doi.org/10.1007/s00344-020-10279-x>
- McNellie, J. P., Chen, J., Li, X., & Yu, J. (2018). Genetic mapping of foliar and tassel heat stress tolerance in maize. *Crop Science*, *58*, 2484-2493. <http://doi:10.2135/cropsci2018.05.029172>
- Muneer, S., Park, Y. G., Kim, S., & Jeong, B. R. (2017). Foliar or subirrigation silicon supply mitigates high temperature stress in strawberry by maintaining photosynthetic and stress-responsive proteins. *Journal of Plant Growth Regulation*, *36*, 836-845. <http://doi.org/10.1007/s00344-017-9687-5>
- Nayyar, H., Kaur, R., Kaur, S., & Singh, R. (2014). γ -Aminobutyric acid (GABA) imparts partial protection from heat stress injury to rice seedlings by improving leaf turgor and upregulating osmoprotectants and antioxidants. *Journal of Plant Growth Regulation*, *33*, 408-419. <http://doi.org/10.1007/s00344-013-9389-6>
- Nievola, C. C., Carvalho, C. P., Carvalho, V., & Rodrigues, E. (2017). Rapid responses of plants to temperature changes. *Temperature*, *4*, 371-405. <http://doi.org/10.1080/23328940.2017.1377812>
- Priya, M., Sharma, L., Kaur, R., Bindumadhava, H. M., Nair, R., Siddique, K. H. M., & Nayyar, H. (2019). GABA (γ -aminobutyric acid), as a thermo-protectant, to improve the reproductive function of heat stressed mungbean plants. *Scientific Reports*, *9*(1), 7788. <http://doi:10.1038/s41598-019-44163-w>
- Seifikalhor, M., Aliniaiefard, S., Hassani, B., Niknam, V., & Lastochkina, O. (2019). Diverse role of γ -aminobutyric acid in dynamic plant cell responses. *Plant Cell Reports*, *38*(8), 847-867. <http://doi:10.1007/s00299-019-02396-z>
- Seifikalhor, M., Aliniaiefard, S., Seif, M., Javadi Asayesh, E., Bernard, F., Hassani, B., & Li, T. (2018). Enhanced salt tolerance and photosynthetic performance: Implication of γ -amino butyric acid application in salt-exposed lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *130*, 157-172. <http://doi:10.1016/j.plaphy.2018.07.003>
- Shan, T. M., Jin, P., Zhang, Y., Huang, Y. P., Wang, X. L., & Zheng, Y. H. (2016). Exogenous glycine betaine treatment enhances chilling tolerance of peach fruit during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, *114*, 104-110. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.12.005>
- Sita, K. & Kumar, V. (2020). Role of gamma amino butyric acid (GABA) against abiotic stress tolerance in legumes: A review. *Plant Physiology Reports*, *25*(4), 654-663. <http://doi:10.1007/s40502-020-00553-1>
- Tiwari, Y. K. & Yadav, S. K. (2019). High temperature stress tolerance in maize (*Zea mays* L.): Physiological and molecular mechanisms. *Journal of Plant Biology*, *62*, 93-102. <http://doi.org/10.1007/s12374-018-0350-x>
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology*. 5nd Ed, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts USA. <http://doi:10.1093/aob/mcg079>
- Yemm, E. W. & Willis, A. J. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal*, *57*(3), 508-514. <http://doi:10.1042/bj057050868>
- Zhang, Y., Jin, P., Huang, Y. P., Shan, T. M., Wang, L., Li, Y. Y., & Zheng, Y. H. (2016). Effect of hot water combined with glycine betaine alleviates chilling injury in cold-stored loquat fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *118*, 141-147. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.010>

Study the effect of internal γ -Aminobutyric acid on physiological and biochemical changes of strawberry (*Fragaria* \times *ananassa* Duch) under heat stress

Elaheh Akbari, Mahdiyeh Gholami*, Bahram Baninasab

Department of Horticulture, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
(Received: 2024/01/30, Accepted: 2024/04/15)

Abstract

The purpose of this study was to investigate the metabolism and role of gamma-aminobutyric acid as an effective compound in inducing stress tolerance in plants, in cultivars of strawberry 'Camarosa' (heat-sensitive) and 'Kurdistan' (heat-tolerant). For this purpose, the strawberry plants were transferred to Isfahan University of Technology on 15 November 2021 and with a fully expanded 5–6 leaf stage, they were transferred to growth chambers with temperatures of 25, 30, 35 and 40 °C, relative humidity of 70% and 1200 lux of light. After 10 hours of temperature stress, the plants were taken out of the growth chamber and some physiological, biochemical and molecular traits were measured. In order to investigate the expression of the Succinic semialdehyde dehydrogenase gene, sampling was done at 0, 2, 5 and 10 hours after the start of a temperature stress of 40 °C. This research was conducted as a completely randomized mixed-analysis experiment. The results of the experiment showed that high temperature (40 °C) in cultivar 'Camarosa' significantly 20.43% decrease the content of gamma-aminobutyric acid and 12.19% the amount of soluble carbohydrates, as well as 43.81% increased the percentage of ion leakage, 20.66% proline, and 200% in injury rating value compared to the control (temperature of 25 °C). In contrast, High temperature stress (40 °C) in the cultivar 'Kurdistan' caused a 17.78% increase in gamma-aminobutyric acid compared to the control treatment. Injury rating value was statistically non-significant in the cultivar 'Kurdistan' at a temperature of 40 °C compared to the control. The expression level of the *SSADH* gene (the key gene in the entry of GABA into the tricarboxylic acid pathway) was constant in cultivar 'Camarosa', but in cultivar 'Kurdistan', the gene expression level increased significantly 2 hours after heat stress.

Keywords: Abiotic stress, Climate change, GABA, Succinic semialdehyde dehydrogenase

Corresponding author, Email: mah.gholami@iut.ac.ir