به زراعی کشاورزی
دوره ۱۶ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۳
صفحه‌های ۲۵۸-۲۴۷

تأثیر کاربرد خارجی پرولین و گلایسین‌بتائین بر تغییرات بیوشیمیایی در انگور در وضعیت تنش خشکی

مهدی محمدزمانی[۱]، ولی ربیعی[۲]*، محمدعلی نجاتیان[۳] و مهدی طاهری [۴]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۲. دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۳. دانشیار، بخش تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی قزوین، قزوین، ایران
۴. استادیار، بخش خاک و آب، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی زنجان، زنجان، ایران

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۲/۰۳/۰۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۴/۱۶

چکیده

پرولین و گلایسین‌بتائین از رایج‌ترین مواد آلی سازگارند که با تنظیم اسمزی و محافظت از غشاها، پروتئین‌ها و آنزیم‌ها از تأثیرات مخرب تنش‌های اسمزی در گیاهان جلوگیری می کنند. براساس گزارش ها، با کاربرد خارجی این ترکیبات در گیاهان، تحمل آنها به خشکی را می‌توان افزایش داد. بدین‌منظور، این تحقیق به صورت فاکتوریل بر پایهٔ طرح بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار بر روی چهار رقم انگور خوشناو'، پیکانی'، پرلت' و 'فلیم سیدلس' اجرا شد. تاک‌های تحت تنش خشکی با ۷۰ درصد از آب مورد نیاز انگور آبیاری شدند. پرولین (۱۰ میلی مولار) و گلایسین بتائین (۱۵ میلی مولار) در چهار مرحله (پیش از گلدهی، گلدهی، غوره شدن و رنگ گرفتن خوشه های انگور) روی تاک‌ها محلول‌پاشی شد. نتایج نشان داد که مقدار پرولین و گلایسین‌بتائین درونی گیاه و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در هر دو تیمار پرولین و گلایسین‌بتائین به طور معناداری بیشتر از شاهد بود. بیشترین و کمترین مقدار پرولین به ترتیب در ارقام فلیم سیدلس' و پیکانی' ارزیابی شد، اما دیگر صفات اندازه گیری‌شده اختلاف معناداری در بین ارقام نشان ندادند. با توجه به نقش این آنزیم‌ها در از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن و همچنین نقش پرولین و گلایسین‌بتائین در فعال کردن آنتی‌اکسیدان‌ها، با کاربرد این دو اسمولیت می‌توان تحمل انگور را در مقابل تنش خشکی افزایش داد.

کلیدواژه‌ها: آسکوربات‌پراکسیداز، آنتی‌اکسیدان، پراکسیداز، تنش آبی، تنظیم اسمزی.

* نویسنده مسئول Email: rabiei@znu.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

۱. مقدمه

گیاهان با روش های گوناگونی در برابر تنش خشکی مقاومت می‌کنند. یکی از رایج‌ترین واکنش‌ها در گیاهان، تولید انواع مواد عالی سازگار با تنش خشکی است. این ترکیبات با نام کلی محافظت‌کننده‌های اسمزی[1] شناخته می‌شوند. در تنش خشکی، فعالیت های فیزیولوژیکی گیاه، به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم دچار اختلال می‌شود. ازآنجا که وجود فشار زیاد تورم سلولی برای اجرای فعالیت‌های فیزیولوژیکی از جمله رشد سلول‌ها و حرکات روزنه‌ای ضروری است، درک بیشتر این مسئله با دستکاری در روابط گیاه و آب و مقاومت در برابر تنش کم آبی در مقیاس فیزیولوژی و مولکولی می تواند موجب بهبود شایان توجه عملکرد گیاه شود [۲].

آب در اساسی‌ترین واکنش حیات یعنی فتوسنتز، به‌عنوان مادهٔ تأمین‌کنندهٔ الکترون، هیدروژن و اکسیژن نقش دارد و در خنک شدن گیاه از طریق تعرق، عامل اساسی است. در هر صورت، آب به‌دلیل ویژگی‌های فیزیکی – شیمیایی خود نظیر پیوندهای هیدروژنی، گرمای نهان ذوب، ظرفیت گرمایی ویژه، گرمای نهان تبخیر، ویسکوزیته و نیروهای کششی بین مولکول های خود و دیواره، توانسته عامل مؤثری در گیاه باشد [۴۱]. خشکی یکی از تنش های محیطی است که بر اکثر مراحل رشد گیاه آثار زیان آوری وارد می کند [۳۴]. در مقیاس سلولی، گیاه آثار مضر تنش را به کمک مواد تنظیم کنندهٔ فشار اسمزی که بیشتر شامل اسیدهای آمینه، قندها و برخی یون‌های معدنی، هورمون‌ها و پروتئین‌ها است در سلول‌های خود کاهش می‌دهد [۲۵].

پرولین و گلایسین‌بتائین از جمله ترکیباتی‌اند که در واکنش به تنش‌های خشکی تولید می‌شوند، اما تحقیقات نشان می‌دهد که برخی گیاهان برای مقابله با تنش‌های محیطی به‌اندازهٔ کافی این ترکیبات را تولید نمی‌کنند [۴۸]. کاهش محتوای پروتئین تحت تنش خشکی با افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ پروتئین و نیز تجمع آمینواسیدهای آزاد از جمله پرولین مرتبط است [۱۷]. در وضعیت نرمال، پرولین، ۵ درصد از کل آمینواسیدهای گیاه را تشکیل می‌دهد، اما در وضعیت تنش این مقدار تا ۸۰ درصد هم می‌رسد [۸]. پرولین نوعی آمینواسید با فرمول مولکولی $C_5H_9NO_2$، درون کلروپلاست تولید می‌شود، اما درون سیتوسول تجمع می‌یابد [۷]. پرولین به‌عنوان ماده‌ای محلول، سبب تنظیم فشار اسمزی، کاهش هدررفت آب از سلول، حفظ آماس سلولی، پایداری شکل طبیعی پروتئین‌ها و حفاظت سامانه‌های غشایی می‌شود [۱۰].

بررسی‌ها نشان می‌دهد که تجمع پرولین، علاوه بر شدت تنش، به مرحلهٔ نمو، نوع اندام و نوع گونهٔ گیاهی بستگی دارد. پرولین در طی تنش افزایش می‌یابد و به‌عنوان تنظیم‌کنندهٔ اسمزی سبب کاهش هدررفت آب از سلول می‌شود، اما بعد از رفع تنش به‌عنوان منبع کربن، نیتروژن و انرژی برای بازیابی و بهبود مصرف می‌شود [۴۷]. مقدار پرولین آزاد در گیاهانی که در حد مطلوب آبیاری می‌شوند بسیار کم و در حدود ۰/۲–۰/۶ میلی‌گرم در گرم مادهٔ خشک است، اما مقدار این ماده پس از کاهش آب بافت‌ها تا ۴۰–۵۰ میلی‌گرم در هر گرم مادهٔ خشک افزایش می‌یابد [۲۰]. گلایسین‌بتائین نیز نوعی ترکیب آمونیومی چهارگانه با فرمول مولکولی $C_5H_{11}NO_2$، معمول‌ترین محلول آلی سازگار است که در میکروارگانیسم‌های مختلف، گیاهان عالی و حیوانات وجود دارد و از بین بسیاری از ترکیبات آمونیومی چهارگانهٔ شناخته‌شده، بیشترین و فراوان‌ترین ترکیب در پاسخ به تنش‌ها است [۴۵]. این ترکیب اولین بار در قرن نوزدهم از چغندرقند استخراج و به‌همین دلیل با نام بتائین شناخته شد. اما با کشف بتائین‌های بیشتر، امروزه با نام گلایسین‌بتائین شناخته می‌شود. ازآنجا که

1. Osmoprotectant

Archive of SID
www.SID.ir

گلایسین‌بتائین درون کلروپلاست سنتز می‌شود، می‌تواند در وضعیت تنش از صدمه به غشای تیلاکوئیدها جلوگیری کند و کارایی فتوسنتز را افزایش دهد [۳۸].

در وضعیت تنش، گلایسین‌بتائین می‌تواند از فعالیت‌های فتوسنتزی شامل آنزیم‌های فتوسنتزی [۲۴]، پروتئین‌ها و لیپیدها در غشاهای تیلاکوئیدی [۴۳] و جریان الکترونی در فتوسیستم II فتوسنتز، محافظت کند [۳۷]. همچنین گلایسین‌بتائین، حفاظت از پروتئین‌ها و غشاهای سلولی در مقابل دماهای زیاد و استرس‌های اسمزی درون گیاه را بر عهده دارد [۲۹، ۳۸، ۴۶]. کاربرد گلایسین بتائین در گونه‌هایی که این ترکیب را به‌مقدار کم تولید می‌کنند یا اصلاً تولید نمی‌کنند به کاهش تأثیرات مضر تنش‌های محیطی کمک می‌کند [۳۲، ۴۵]. براساس پژوهش‌ها، محلول‌پاشی با گلایسین‌بتائین با تثبیت رنگدانه‌ها و در نتیجه بهتر شدن فتوسنتز و پارامترهای رشدی، تحمل برنج را در برابر تنش شوری افزایش داده است [۱۲، ۱۵]. همچنین صدمات تنش اسمزی ناشی از شوری کلرید سدیم را می‌توان با کاربرد گلایسین بتائین کم کرد که این موضوع به غلظت و زمان مصرف این ماده بستگی دارد [۳۲].

پرولین و گلایسین‌بتائین می‌توانند سبب مهار رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن[1] شوند و آثار مضر آنها را کاهش دهند [۳۵]. به‌عبارت ساده‌تر، گیاهان در واکنش به تنش خشکی، پرولین و گلایسین‌بتائین بیشتری تولید و از این طریق از صدمات ناشی از تنش خشکی جلوگیری می‌کنند.

هدف از اجرای پژوهش حاضر، افزایش کاربرد خارجی پرولین و گلایسین‌بتائین، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و غلظت درونی پرولین و گلایسین‌بتائین است تا با افزایش تحمل بوته‌های انگور به تنش خشکی از شدت خسارت‌ها کاسته شود.

۲. مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال ۱۳۸۹ در کلکسیون ملی انگور در ایستگاه تحقیقات درجهٔ یک انگور تاکستان واقع در استان قزوین اجرا شد. برای این کار از چهار رقم انگور شامل دو رقم ایرانی 'خوشناو' کردستان و پیکانی' کاشمر و دو رقم خارجی 'پرلت'[2] و فلیم‌سیدلس'[3] استفاده شد. تاک‌ها چهارساله و به‌صورت کوردون دوطرفهٔ دوطبقه تربیت شده بودند. پژوهش به‌صورت فاکتوریل (فاکتور اول شامل رقم در چهار سطح و فاکتور دوم تیمار در سه سطح شاهد، پرولین و گلایسین‌بتائین) در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در چهار تکرار اجرا شد. در این پژوهش همهٔ تاک‌ها تنش خشکی را دریافت کردند و سه تیمار شاهد (بدون محلول‌پاشی)، پرولین (۱۰ میلی‌مولار) و گلایسین‌بتائین (۱۵ میلی‌مولار) در چهار مرحلهٔ پیش از گلدهی، گلدهی، غورگی و شروع رنگ گرفتن حبه‌ها روی تاک‌ها محلول پاشی شدند. دلیل انتخاب این مراحل حساسیت بسیار زیاد انگور به کم آبی در این مراحل است [۳]. به منظور اعمال تنش خشکی، براساس توصیهٔ برخی محققان مقدار نیاز آبی انگور با توجه به منطقهٔ آزمایش استخراج شد و ۷۰ درصد آن به کمک کنتور به گیاه داده شد [۱، ۲]. برآورد نیاز آبی در [۱] براساس معادلهٔ تغییر یافتهٔ پنمن مانتیث محاسبه شده است. با توجه به اینکه ارقام استفاده‌شده چهارساله بودند، براساس توصیهٔ [۱]، مقدار آب آبیاری محاسبه‌شده ضریب ۰/۷ می‌گیرد.

مقدار آب آبیاری خالص مورد نیاز برای انگور در محل تاکستان در روش آبیاری قطره‌ای برای مدت ۲۴۰ روز براساس منبع یادشده ۴۸۵۰ متر مکعب در هکتار محاسبه شده است. با توجه به ضریب ۰/۷ ذکرشده برای سن تاک‌ها (۳۳۹۵ = ۰/۷ × ۴۸۵۰) و با عنایت به شدت تنش

1. ROS

2.'Perlette'

3.'Flame Seedless'

Archive of SID
www.SID.ir

۷۰ درصد مورد نظر، حدود (۲۳۷۶/۵ = ۰/۷ × ۳۳۹۵) متر مکعب در طی ۲۴۰ روز برای یک هکتار استفاده شد. به ازای هر تاک دو قطره چکان وجود داشت که دبی خروجی هر قطره چکان در یک ساعت ۸ لیتر برآورد شد (دو قطره‌چکان = ۱۶ لیتر در هر ساعت برای هر تاک). با توجه به تراکم کاشت (۳ × ۲)، آبیاری تاک ها با فواصل هفت روز یک بار و هر مرتبه ۲ و ۳۰ دقیقه در نظر گرفته شد تا مقدار تنش مورد نیاز اعمال شود. صفات مورد نظر به‌شرح زیر اندازه‌گیری شد:

۲. ۱. پرولین

برای اندازه‌گیری پرولین از روش نین‌هیدرین اسید با کمی تغییرات استفاده شد [۱۱]: ابتدا ۰/۵ گرم از هر نمونه گیاه با ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالسیلیک ۳ درصد در هاون چینی ساییده شده و ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. دو میلی‌لیتر از عصارهٔ صاف‌شده با دو میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و دو میلی‌لیتر اسید استیک مخلوط شد. نمونه‌ها در بن‌ماری با دمای ۱۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت یک ساعت قرار داده شده و پس از سرد شدن، به آنها چهار میلی‌لیتر تولوئن افزوده شد.

پس از تشکیل دو فاز مجزا، قسمت رنگی برداشته شد و توسط اسپکتروفتومتر، مقدار جذب آنها در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد. آن‌گاه غلظت پرولین (میکرومول بر گرم مادهٔ تر) با استفاده از رابطهٔ زیر محاسبه شد:

$$P = \frac{(N \times T) / ۱۱۵ / ۵}{M / ۵} \qquad (۱)$$

در این رابطه، P: مقدار پرولین (میکرومول پرولین بر گرم مادهٔ تر)؛ N: عدد خوانده‌شده توسط اسپکتروفتومتر (میکروگرم بر لیتر)؛ T: مقدار تولوئن مصرفی (میلی‌لیتر)؛ و M: وزن نمونه (گرم) است.

۲. ۲. گلایسین‌بتائین

مقدار گلایسین‌بتائین با روش گریو و گراتان[1] با کمی تغییر اندازه‌گیری شد [۱۶]: یک گرم از نمونه‌های خشک‌شده با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر قرار داده شد. یک میلی‌لیتر از محلول استخراج‌شده از بافت گیاهی با یک میلی‌لیتر اسید سولفوریک دو نرمال ترکیب و ۰/۵ میلی‌لیتر از این ترکیب به مدت یک ساعت در حمام آب یخ قرار داده شد. سپس ۰/۲ میلی‌لیتر یدین – یدید پتاسیم به آن اضافه و ورتکس شد و ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس ۱۵ دقیقه در دمای صفر درجهٔ سانتی‌گراد و دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته و کریستال‌های سیاه که در جداره و ته لوله تشکیل شده بود، نگه داشته شد (با توجه به اینکه با افزایش دما، حلالیت کریستال در اسید افزایش می‌یابد و امکان جدا کردن آنها کم می شود، باید تمام مراحل در دمای کم و محیط یخ انجام گیرد). کریستال‌ها در یک میلی‌لیتر ۱،۲– دی کلرواتان حل شد. سپس محلول با ۱،۲– دی کلرواتان به حجم ۹ میلی‌لیتر رسانده و ۲ تا ۲/۵ ساعت داخل یخ قرار داده شد. در پایان، یک میلی‌لیتر از این مایع برداشته شد و در اسپکتروفتومتر با طول موج ۳۶۵ نانومتر قرائت شد.

۲. ۳. آنزیم‌های پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز

یک گرم از نمونه‌های گیاهی بعد از خرد کردن با ازت مایع با ۷/۵ سی سی اتانول سرد مخلوط و ۳۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شد. سپس ۱۵ دقیقه در دمای صفر درجهٔ سانتی‌گراد و ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی شناور دور ریخته شد. شست‌وشو با اتانول سه بار تکرار شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز به کمک روش

1. Grave and Grattan

Archive of SID
www.SID.ir

چانس و مهلی[1] با اندکی تغییر اندازه‌گیری شد [۱۳]. بدین منظور به پودر گیاهی شسته‌شده با اتانول، ۵ سی سی بافر استخراج سدیم - پتاسیم فسفات ۲۰۰ میلی مولار سرد (pH=۷) اضافه شده و ۳۰ دقیقه روی شیکر با دور ۱۱۰ قرار داده شد. نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد با دور ۱۵۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس عصارهٔ رویی جدا شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم براساس تشکیل تتراگویاکول از گویاکول در حضور پراکسید هیدروژن است. برای این کار، ۴/۵۱ میکرولیتر از گویاکول ۱۰ میلی‌مولار، ۹۹۲ میکرولیتر از بافر سدیم-پتاسیم فسفات ۱۰ میلی‌مولار، ۱۵۰۰ میکرولیتر از عصاره استخراج و در نهایت ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۴۰ میلی مولار به مخلوط واکنش اضافه شد.

فعالیت آنزیم در طول موج ۴۷۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰-۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز به‌صورت تعداد ماکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه‌شده در دقیقه در میلی گرم پروتئین گزارش شده است. فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز بنابر روش یوشیمارو[2] با کمی تغییر اندازه‌گیری شد [۴۲]. به پودر گیاهی شسته‌شده با اتانول ۴ سی‌سی بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار سرد (pH=۷) افزوده و ۳۰ دقیقه روی شیکر با سرعت ۱۱۰ قرار داده شد. مراحل در محیط آب یخ انجام گرفت. سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و بلافاصله محلول رویی جدا شد.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در سه تکرار، ۵۰ میکرولیتر از گویاکول ۱۰ میلی‌مولار، ۲/۹ میلی‌لیتر از بافر پتاسیم فسفات ۱۰ میلی‌مولار، ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۴۰ میلی‌مولار و در نهایت ۴۰ میکرومولار از عصاره استخراج و به مخلوط واکنش اضافه شد تا واکنش شروع شود. فعالیت آسکوربات‌پراکسیداز در طول موج ۲۹۰ نانومتر به‌مدت سه دقیقه در دمای ۲۰-۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد.

۲. ۴. تجزیه‌وتحلیل آماری

برای بررسی تأثیرات تیمارها به دلیل استفاده از چهار رقم، ابتدا درصد تغییرات داده‌ها در تیمارهای پرولین و گلایسین‌بتائین نسبت به شاهد محاسبه و سپس تجزیهٔ واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و مقایسهٔ میانگین هر صفت با استفاده از آزمون چنددامنه ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام گرفت.

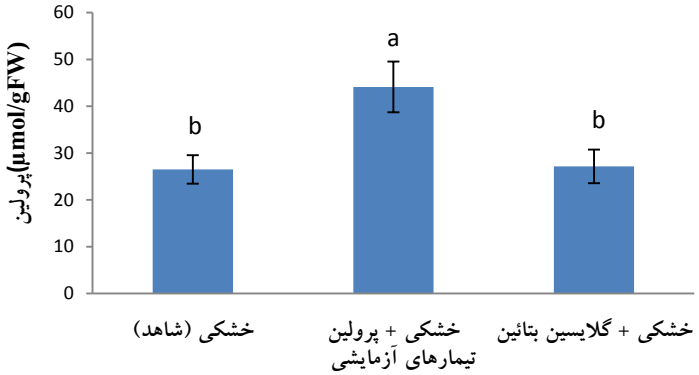
۳. نتایج و بحث

آنالیز داده ها نشان می دهد که با کاربرد خارجی پرولین و گلایسین بتائین، محتوای پرولین و گلایسین‌بتائین درونی گیاهبه‌طور معناداری افزایش پیدا می‌کند (شکل‌های ۱ و ۲) که سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز نیز می‌شود (شکل‌های ۳ و ۴). نتایج مقایسهٔ میانگین‌ها، بیشترین مقدار پرولین در تیمار پرولین و بیشترین مقدار گلایسین بتائین در تیمار گلایسین بتائین را نشان داد (شکل‌های ۱ و ۲).

گلایسین‌بتائین و پرولین از ترکیباتی‌اند که درون سیتوپلاسم وجود دارند و از دهیدراته شدن و پلاسمولیز سلول‌ها در وضعیت شدید اسمزی ممانعت می‌کنند [۱۴، ۲۲]. در پژوهشی کاربرد ۱۰ میلی مولار پرولین در وضعیت تنش شوری سبب افزایش پرولین داخلی، افزایش محتوای نسبی آب برگ و افزایش شایان توجه فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به شاهد شد [۲۳].

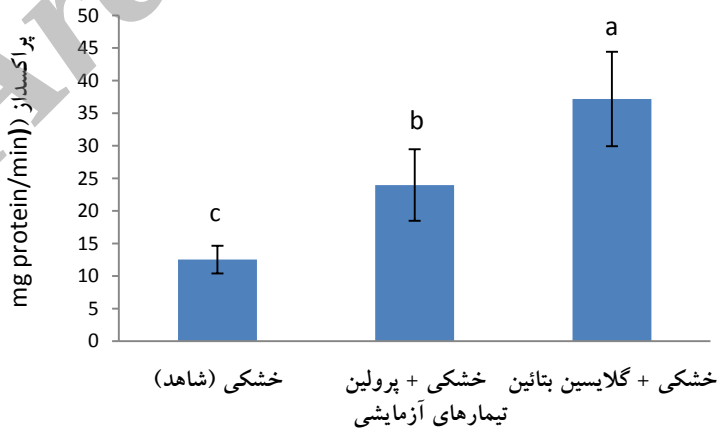
1. Chance and Maehly
2. Ushimaru

www.SID.ir
Archive of SID



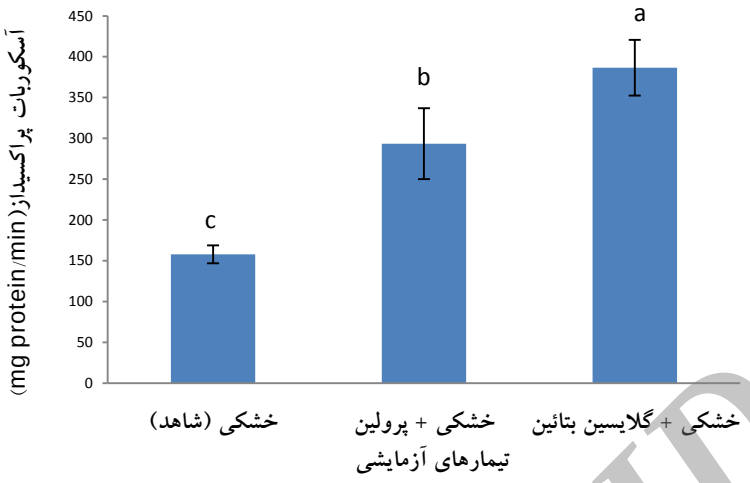
شکل ۱. مقایسهٔ میانگین‌های پرولین در سه تیمار شاهد، پرولین و گلایسین‌بتائین تحت تنش خشکی
خطوط عمودی نشان‌دهندهٔ خطای استاندارد توزیع میانگین‌ها (SE) است.
میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آزمون دانکن تفاوت معناداری در سطح ۵ درصد ندارند.

شکل ۲. مقایسهٔ میانگین‌های گلایسین‌بتائین در سه تیمار شاهد، پرولین و گلایسین‌بتائین تحت تنش خشکی
خطوط عمودی نشان‌دهندهٔ خطای استاندارد توزیع میانگین‌ها (SE) است.
میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آزمون دانکن تفاوت معناداری در سطح ۵ درصد ندارند.



شکل۳. مقایسهٔ میانگین‌های آنزیم پراکسیداز در سه تیمار شاهد، پرولین و گلایسین‌بتائین تحت تنش خشکی
خطوط عمودی نشان‌دهندهٔ خطای استاندارد توزیع میانگین‌ها (SE) است.
میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آزمون دانکن تفاوت معناداری در سطح ۵ درصد ندارند.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۴. مقایسهٔ میانگین‌های آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در سه تیمار شاهد، پرولین و گلایسین‌بتائین تحت تنش خشکی
خطوط عمودی نشان‌دهندهٔ خطای استاندارد توزیع میانگین‌ها (SE) است.
میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آزمون دانکن تفاوت معناداری در سطح ۵ درصد ندارند.

در رز کاربرد ۵ میلی‌مولار پرولین سبب افزایش محتوای درونی پرولین و افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شد و عمر پس از برداشت را ۳/۳ روز افزایش داد [۲۸]. بررسی‌ها نشان می‌دهد وقتی گیاهان دچار تنش آبی می‌شوند، مقدار گلایسین‌بتائین درونی آنها افزایش می‌یابد و این افزایش سبب افزایش تحمل به تنش سرمایی در آنها می‌شود. آنها همچنین اثبات کردند محلول‌پاشی گلایسین‌بتائین روی برگ‌ها سبب افزایش گلایسین‌بتائین داخلی شد و تحمل به تنش سرمایی را افزایش داد [۴۴]. کاربرد غلظت‌های صفر، ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار گلایسین‌بتائین در انگور سبب افزایش سطوح گلایسین‌بتائین درونی از ۴ تا ۳۶ میلی‌مولار شد. این امر نشان‌دهندهٔ آن است که همبستگی مثبتی بین کاربرد خارجی گلایسین‌بتائین و غلظت درونی آن وجود دارد. کاربرد گلایسین‌بتائین خارجی موجب افزایش اسیمیلاسیون کربن و بهبود شاخص‌های رشدی در تاک‌ها می‌شود [۳۳]. این نتایج، یافته‌های تحقیق حاضر را تأیید می‌کند.

فعالیت هر دو آنزیم پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در تیمار گلایسین بتائین بیشتر از تیمار پرولین و در تیمار پرولین بیشتر از شاهد به‌دست آمد (شکل‌های ۳ و ۴). تنش های محیطی تولید گونه های فعال اکسیژن را در سلول‌های گیاهی تحریک می‌کند و با صدمه‌زدن به پروتئین‌ها، لیپیدها، DNA و کربوهیدرات‌ها سبب مرگ سلول می‌شود [۶]. گیاهان به‌کمک سیستم‌های آنزیمی و غیرآنزیمی در مقابل صدمات گونه های فعال اکسیژن مقاومت می‌کنند. تحقیقات حاکی از افزایش فعالیت پراکسیداز در اثر کاربرد پرولین و گلایسین‌بتائین در وضعیت تنش به ویژه تنش شوری است [۱۴، ۲۲، ۲۷]. محققان پیشنهاد کردند که پرولین در از بین بردن رادیکال‌های آزاد نقش مهم‌تری نسبت به اسمولیت‌های دیگر دارد [۲۱]. در این تحقیق، پرولین سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شد، اما تأثیر گلایسین‌بتائین بیشتر از پرولین به‌دست آمد. دلیل این موضوع آن است که گلایسین بتائین تنها از طریق فعال کردن آنتی اکسیدان ها می تواند رادیکال های آزاد را از بین ببرد، اما پرولین علاوه بر فعال کردن آنتی اکسیدان ها، خود

Archive of SID
www.SID.ir

نیز به‌طور مستقیم می‌تواند سبب مهار رادیکال‌های آزاد شود [۲۸].

برای افزایش تحمل گیاهان به تنش‌ها به‌ویژه تنش خشکی، حضور پرولین و گلایسین‌بتائین به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اسمزی و همچنین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برای از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن ضروری به‌نظر می‌رسد. تحقیقات نشان داده پرولین و گلایسین بتائین فعالیت سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانت را در واکنش به استرس‌های اکسیداتیو افزایش می‌دهد. محققان دریافتند که تنش شوری تا حد زیادی از فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و پراکسیداز جلوگیری می‌کند، اما با کاربرد پرولین فعالیت این آنزیم‌ها در همان وضعیت، به‌مراتب بیشتر می‌شود [۲۷].

پرولین و گلایسین‌بتائین، تحمل به شوری را در تنباکو نیز با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت افزایش می‌دهند [۲۲]. در تحقیقی روی گندم در وضعیت تنش خشکی، استفاده از گلایسین‌بتائین سبب افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز شد [۳۱]. پرولین و بتائین موجب بیان بیشتر ژن‌های دخیل در سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی در وضعیت تنش شوری می‌شوند [۹].

بنابر گزارش‌ها، پرولین از طریق فعال کردن آنتی‌اکسیدانت‌ها در وضعیت تنش کادمیوم می‌تواند تحمل گیاه را به فلزات سنگین افزایش دهد [۴۰]. در آزمایشی که اثر کاربرد پرولین در تنش پراکسید هیدروژن در انگور بررسی شد، محتوای پرولین داخلی تا حد زیادی در اثر کاربرد پرولین خارجی افزایش پیدا کرد. همچنین کاربرد پرولین سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز در وضعیت تنش شد [۳۶].

غلظت پرولین و گلایسین بتائین در برخی از گونه‌های گیاهی برای تنظیم اسمزی کافی نیست و این یکی از دلایل کم بودن مقاومت گیاهان در مقابل تنش خشکی است [۳۵]. همچنین تجمع پرولین در زمان تنش خشکی مسیرهای انرژی و متابولیسم کربن را تغییر می‌دهد، زیرا با اکسیداسیون یک مولکول پرولین معادل ۳۰ATP انرژی آزاد می‌شود و بیوسنتز پرولین به‌طور غیرمستقیم نسبت $NADP^+/NADPH$ را افزایش می‌دهد [۱۸].

این تغییر، جریان کربن را از طریق مسیر پنتوز فسفات تحت تأثیر قرار می‌دهد و سبب سنتز بیشتر اریتروز۴-فسفات[1] می‌شود [۱۹]. اریتروز۴- فسفات در مسیر اسید شیکمیک مصرف می‌شود. مسیر اسید شیکمیک سبب ایجاد اسید آمینهٔ آروماتیک می‌شود که این ترکیبات (اسیدآمینه‌های آروماتیک) نیز به متابولیت‌های اولیه و ثانویه تبدیل می‌شوند. متابولیت‌های ثانویه‌ای که از اسیدهای آمینهٔ آروماتیک به‌وجود می‌آیند نظیر لیگنین به ترکیبات فنولی معروف‌اند. توالی ذکرشده در بالا در وضعیت استرس سبب تغییر ویژگی‌های دیوارهٔ سلولی و تجمع لیگنین می‌شود. لیگنین در دیواره‌های سلولی به‌خصوص در دیواره‌های ثانویهٔ عناصر تراکئیدی آوند چوبی یافت شده و موجب استحکام مکانیکی و سفتی ساقه‌های چوبی می‌شود. هرچند وظیفهٔ اصلی لیگنین ساختمانی است، به‌عنوان نوعی مادهٔ شیمیایی دفاعی نیز مطرح است [۴]. پرولین علاوه بر اینکه در طی تنش افزایش می‌یابد و به‌عنوان تنظیم‌کنندهٔ اسمزی سبب افزایش حفظ آب می‌شود، بعد از رفع تنش نیز به‌عنوان منبع کربن، نیتروژن و انرژی برای بازیابی و بهبود مصرف می‌شود [۴۷].

در تحقیق حاضر، بین ارقام از نظر درصد تغییرات محتوای پرولین اختلاف معناداری وجود داشت، به‌طوری‌که رقم فلیم سیدلس[2] بیشترین، و رقم پیکانی[3] کمترین مقدار پرولین را داشتند. آزمون دانکن اختلاف معناداری را به‌لحاظ درصد تغییرات گلایسین‌بتائین، پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز در بین ارقام نشان نداد (جدول ۱).

1. Erythrose 4- phosphate

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱. مقایسهٔ میانگین‌های درصد تغییرات پرولین، گلایسین‌بتائین، پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز در چهار رقم انگور تیمارشده با پرولین و گلایسین‌بتائین تحت تنش خشکی

رقم	تغییرات میانگین‌ها (٪)			
	پرولین	گلایسین‌بتائین	پراکسیداز	آسکوربات‌پراکسیداز
'پرلت	۱۲۰/۹^{ab}	۱۳۶/۴^{a}	۱۹۵/۹^{a}	۲۱۹/۵^{a}
'فلیم سیدلس'	۱۴۶/۶^{a}	۱۳۵/۱^{a}	۲۷۱/۴^{a}	۲۴۳/۱^{a}
'پیکانی'	۱۱۰/۴^{b}	۱۳۹/۰^{a}	۲۴۶/۴^{a}	۱۵۲/۷^{a}
'خوشناو	۱۳۴/۳^{ab}	۱۲۴/۳^{a}	۲۱۱/۷^{a}	۱۴۳/۸^{a}

میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آزمون دانکن تفاوت معناداری در سطح ۵ درصد ندارند.

یکی از اهداف مهم در بیشتر پژوهش‌های کشاورزی، افزایش عملکرد و کیفیت محصولات است. با وقوع تنش خشکی در سلول‌های گیاهی، تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن تشدید می شود که با تخریب فسفولیپیدهای غشای سلول، کارایی غشا از بین می‌رود. کاهش فعالیت‌های فتوسنتزی، کاهش توانایی تثبیت دی‌اکسید کربن در کلروپلاست و نشت الکترولیت‌ها از سلول، ناشی از خسارت گونه‌های فعال اکسیژن به فسفولیپیدهای غشا است [۳۹]. به‌دنبال تخریب فتوسنتز و از بین رفتن کلروپلاست، تثبیت دی‌اکسیدکربن کاهش پیدا می‌کند که سبب کاهش تولید گیاه می شود. در این وضعیت، عملکرد و کیفیت محصول کاهش می‌یابد، اما گیاهان برای مقابله با این شرایط دارای سیستم دفاعی با کارایی مطلوب اند که رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برد یا خنثی می‌کند.

یکی از این سیستم‌های دفاعی، فعالیت آنتی‌اکسیدان‌هایی همانند پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز است. بیشتر بودن رادیکال‌های آزاد در داخل سلول نسبت به آنتی‌اکسیدان‌ها ممکن است سبب فعالیت‌های تخریبی شود. این رادیکال های آزاد در میتوکندری، کلروپلاست، میکروزوم و آپوپلاست یافت شده و سبب تخریب این بافت‌ها می‌شوند [۲]. ازآنجا که پرولین و گلایسین‌بتائین می‌توانند به‌عنوان ازبین برندهٔ اکسیژن یگانه و رادیکال های هیدروکسیل فعالیت کنند، ممکن است سبب تثبیت پروتئین ها، DNA و پایداری غشا شوند و از صدمات مخرب رادیکال های آزاد به فتوسنتز و کلروپلاست جلوگیری کنند و از این طریق سبب افزایش عملکرد و کیفیت محصول شوند [۵].

همهٔ این موارد مؤید این است که افزایش سطوح پرولین و گلایسین‌بتائین ممکن است سبب افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی شود. در تحقیق حاضر، مقدار پرولین و گلایسین‌بتائین درونی گیاه به ترتیب در تیمار پرولین و گلایسین‌بتائین به‌طور معناداری بیشتر از شاهد به‌دست آمد. همچنین با اینکه فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در هر دو تیمار پرولین و گلایسین‌بتائین بیشتر از شاهد بود، مشاهده شد در تیمار گلایسین‌بتائین فعالیت این دو آنزیم بیشتر از پرولین است. با توجه به تأثیر این آنزیم‌ها در از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن و با عنایت به اهمیت پرولین و گلایسین‌بتائین در فعال کردن آنتی‌اکسیدان‌ها، می‌توان توصیه کرد با کاربرد این دو اسمولیت تحمل انگور را در مقابل تنش خشکی افزایش داد.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

۱. فرشی ع ا، شریعتی م ر، جارالهی ر، قائمی م ر، شهابی فـر م و تـولائی م م (۱۳۷۶) بـرآورد آب مـورد نیـاز گیاهان عمدهٔ زراعی و باغی کشور – جلـد دوم. نشـر آموزش کشاورزی. تهران. ۴۵۳ ص.

۲. کافی م، برزوئی ا، صالحی م، کمندی ع، معصومی ع و نبـاتی ج (۱۳۸۸) فیزیولـوژی تـنش‌هـای محیطـی در گیاهان. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۵۰۲ ص.

۳. نجاتیان م ع (۱۳۸۵) جمع آوری و ارزیابی اولیهٔ ارقـام انگور اسـتان قـزوین. تحقیقـات نهـال و بـذر. ۲۲(۳): ۳۱۹–۳۳۸.

۴. هـاپکینز ج ویلیـام (۱۳۸۶) مقدمـه‌ای بـر فیزیولـوژی گیاهی. ویرایش دوم. ترجمـهٔ احمـدی ع، احسـان‌زاده پ، جباری ف. مؤسسـهٔ انتشـارات و چـاپ دانشـگاه تهران. تهران. ۶۵۳ ص.

5. Alia Pardha Saradhi P (1993) Suppression in mitochondrial electron transport is the prime cause behind stress-induced proline accumulation. Biochemical and Biophysical Research Communications. 19: 54-58.

6. Apel K and Hirt H (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. Annual Review. Plant Biology. 55: 373-399.

7. Ashton JD and DeshPal SV (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. Plant. 4(2): 215-223.

8. Aspinall D and Paleg LG (1981) Proline accumulation: Physiological aspects. In: The physiology and biochemistry of drought resistance in plants, academic Press, Paleg, L. G. and Aspinall, D. (Eds.). Sydney, pp. 205-241.

9. Banu MN A, Hoque MA, Watanabe-Sugimoto M, Matsuoka K, Nakamura Y and Shimoishi Y (2009) Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. Plant Physiology. 166: 146-156.

10. Barker DJ, Sullivan CY and Moser LE (1993) Water deficit effects on osmotic potential, cell wall elasticity and proline in five forage grasses. Agronomy. 85: 270-275.

11. Bates IS, Waldern RP and Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil. 39: 205-207.

12. Cha um S, Supaibulwatana K and Kirdmanee C (2006) Water relation, photosynthetic ability and growth of Thai Jasmine rice (Oryza sativa L. sp. indica cv. KDML 105) to salt stress by application of exogenous glycinebetaine and choline. Agronomy and Crop Science. 192: 25-36.

13. Chance B and Maehly AC (1995) Assay of catalase and peroxidase. Methods in Enzymology. 2: 764-775.

14. Demiral T and Turkan I (2004) Does exogenous glycinebetaine affect antioxidative system of rice seedlings under NaCl treatment?. Plant Physiology. 161: 1089-1100.

15. Gadallah MAA (2000) Effects of acid mist and ascorbic acid treatment on the growth, stability of leaf membranes, chlorophyll content and some mineral elements of Carthamus tinctorius, the safflower. Water, Air and Soil Pollution. 118: 311-327.

16. Grieve CM and Grattan SR (1983) Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. Plant Soil. 70: 303-307.

17. Hanson AD and Hitz WD (1982) Metabolic responses of mesophytes to plant water deficit. Annual Review of Plant Physiology. 33: 163-203.

Archive of SID
www.SID.ir

18. Hare PD and Cress WA (1996) Tissue specific accumulation of transcript encoding D1-pyrroline-5-carboxylate reductase in Arabidopsis thaliana. Plant Growth Regulation. 19: 249-256.

19. Hare PD, Cress WA and Van Staden J (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation in plants. Plant Cell Environment. 21: 535-553.

20. Heuer B (2003) Influence of exogenous application of proline and glycinebetaine on growth of salt-stressed tomato plants. Plant Science. 165: 693-699.

21. Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z and Verma DP (2000) Removal of feedback inhibition of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. Plant Physiology. 122: 1129-1136.

22. Hoque MA, Okuma E, Banu MNA, Nakamura Y, Shimoishi Y and Murata Y (2007) Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. Plant Physiology. 164: 553-561.

23. Huang Y, Bie ZL, Liu ZX, Zhen A and Wang WJ (2009) Exogenous proline increases the salt tolerance of cucumber by enhancing water status and peroxidase enzyme activity. Soil Science and Plant Nutrition. 55: 698-704.

24. Incharoensakadi A, Takabe T and Akazawa T (1986) Effect of betaine on enzyme activity and subunit interaction of ribulose-1, 5-biphosphate carboxylase: oxygenase from Aphanothece halophytica. Plant Physiology. 81: 1044-1049.

25. Ingram J and Bartles D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. Annual. Review. Plant Physiology. Plant Molecular. Biology. 47: 377-403.

26. Jones RG, Storey R, Betaines LG and Paleg D (1981) The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants. Academic Press. Sydney. Pp. 171-204.

27. Khedr AHA, Abbas MA, Wahid AAA, Quick WP and Abogadallah GM (2003) Proline induces the expression of salt-stress responsive proteins and may improve the adaptation of Pancratium maritimum L. to salt-stress. Experimental Botany. 54: 2553-2562.

28. Kumar N, Pal M, Singh A, Sairam RK and Srivasatava GC (2010) Exogenous proline alleviates oxidative stress abd increase vase life in rose (Rosa hybrida L. Grand Gala). Scientia Horticulturae. 127: 79-85.

29. Laurie S and Stewart GR (1990) The effects of compatible solutes on the heat stability of glutamine synthetase from chickpeas grown under different nitrogen and temperature regimes. Experimental Botany. 41: 1415-1422.

30. Lopez CML, Takahashi H and Yamazaki S (2002) Plant-water relations of kidney bean plants treated with NaCl and foliarly applied glycinebetaine. J. kidney bean plants treated with NaCl and foliar applied glycinebetaine. Agronomy and Crop Science. 188: 73-80.

31. Ma QQ, Wang W, Li YH, Li DQ and Zou Q (2006) Alleviation of photoinhibition in drought-stressed wheat (Triticum aestivum) by foliar-applied glycinebetaine. Plant Physiology. 163: 165-175.

32. Makela P, Munns R, Colmer TD, Condon AG and Peltonen-Sainio P (1998) Effect of foliar applications of glycinebetaine on stomatal conductance, abscisic acid and solute concentrations in leaves of salt or drought stressed tomato. Plant Physiology. 25: 655-663.

33. Mickelbart M, Chapman P and Collier-Christian L (2006) Endogenous levels and exogenous of glycinebetaine to grapvines. Scientia Horticultural. 111: 7-16.

Archive of SID
www.SID.ir

34. Nilsen ET and Orcutt DM (1996) Physiology of plants under stress (Abiotic factors). Jon Wily & Sons, New York. 680 p.

35. Okuma E, Soeda K, Tada M and Murata Y (2000) Exogenous proline mitigates the inhibition of growth of Nicotiana tabacum cultured cells under saline conditions. Soil Science and Plant Nutrition. 46: 257-263.

36. Ozden M, Demirel U and Kahraman A (2009) Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (Vitis vinifera L.) exposed to oxidative stress by H2O2. Scientia Horticulturae. 119: 163-168.

37. Papageorgiou GC, Fujimara Y and Murata YN (1991) Protection of the oxygen-evolving photosystem II complex by glycine betaine. Biochimica et Biophysica Acta. 1057: 361-366.

38. Robinson SP and Jones JP (1986) Accumulation of glycine betaine in chloroplasts provides osmotic adjustment during salt stress. Plant Physiology. 13: 659-668.

39. Scandalios JG (1993) Oxygen stress and superoxide dismutase. Plant Physiology. 101: 7-12.

40. Sharma SS and Dietz KJ (2006) The significance of amino acids and amino-acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. Experimental Botany. 57: 711-726.

41. Taiz L and Zeiger E (2006) Plant Physiology. Fourth edition. Publishers Sunderland, Massachusetts. 738 p.

42. Ushimaru T, Maki Y, Sano S, Koshiba T, Asada K and Tsuji H (1997) Induction of enzyme involved in the ascorbate dependent antioxidative system, namely, ascorbate peroxi-Antioxidant Enzymes and Aldehyde Releasing Capacity in Oryza sativa 44 dase, monodehydroascorbate reductase and dehydro ascorbate reductase after exposure to air of rice (Oryza sativa) seedlings germinated under water. Plant Cell Physiology. 38: 541-549.

43. Wiliams WP and Brain APR (1992) Dominy, Induction of non-bilayer lipid phase separation in chloroplast thylakoid membranes by compatible cosolutes and its relationto the thermal stability of photosystem II. Biochimica et Biophysica Acta. 1099: 137-144.

44. Xing W and Rajashekar CB (1999) Alleviation of water stress in beans by exogenous glycine betaine. Plant Science. 148: 185-195.

45. Yang X and Lu C (2005) Photosynthesis is improved by exogenous glycinebetaine in salt stressed maize plants. Plant Physiology. 124: 343-352.

46. Yordanov V and Tsoev T (2000) Plant response to drought, acclimation and stress tolerance. Photosynthica. 38(1): 171-186.

47. Zhang CS, Lu Q and Verma DPS (1997) Characterization of Δ-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene promoter in transgenic Arabidopsis thaliana subjected to water stress. Plant Science. 129: 81-89.

48. Zhang J, Nguyen HT and Blum A (1999) Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. Experimental Botany. 50: 291-302.

Archive of SID

www.SID.ir