



## به‌زرعی کشاورزی

دوره ۱۶ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۳  
صفحه‌های ۲۵۸-۲۴۷

# تأثیر کاربرد خارجی پرولین و گلایسین بتائین بر تغییرات بیوشیمیایی در انگور در وضعیت تنش خشکی

مهدی محمدزمانی<sup>۱</sup>، ولی ربیعی<sup>۲\*</sup>، محمدعلی نجاتیان<sup>۳</sup> و مهدی طاهری<sup>۴</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۲. دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۳. دانشیار، بخش تحقیقات اصلاح و تهیه 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 پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۴/۱۶

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۲/۰۳/۰۴

### چکیده

پرولین و گلایسین بتائین از رایج‌ترین مواد آلی سازگارند که با تنظیم اسمزی و محافظت از غشاها، پروتئین‌ها و آنزیم‌ها از تأثیرات مخرب تنش‌های اسمزی در گیاهان جلوگیری می‌کنند. براساس گزارش‌ها، با کاربرد خارجی این ترکیبات در گیاهان، تحمل آنها به خشکی را می‌توان افزایش داد. بدین منظور، این تحقیق به صورت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار بر روی چهار رقم انگور خوشنما، 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 خوشه‌های انگور) روی تاک‌ها محلول‌پاشی شد. نتایج نشان داد که مقدار پرولین و گلایسین بتائین درونی گیاه و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در هر دو تیمار پرولین و گلایسین بتائین به طور معناداری بیشتر از شاهد بود. بیشترین کمترین مقدار پرولین به ترتیب در ارقام فلیم سیدلس و پیکانی ارزیابی شد، اما دیگر صفات اندازه‌گیری شده 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 گلایسین بتائین در فعال کردن آنتی‌اکسیدان‌ها، با کاربرد این دو اسمولیت می‌توان تحمل انگور را در مقابل تنش خشکی افزایش داد.

**کلیدواژه‌ها:** آسکوربات پراکسیداز، آنتی‌اکسیدان، پراکسیداز، تنش آبی، تنظیم اسمزی.

## ۱. مقدمه

گیاهان با روش های گوناگونی در برابر تنش خشکی مقاومت می کنند. یکی از رایج ترین واکنش ها در گیاهان، تولید انواع مواد عالی سازگار با تنش خشکی است. این ترکیبات با نام کلی محافظت کننده های اسمزی<sup>۱</sup> شناخته می شوند. در تنش خشکی، فعالیت های فیزیولوژیکی گیاه، به طور مستقیم یا غیرمستقیم دچار اختلال می شود. از آنجا که وجود فشار زیاد تورم سلولی برای اجرای فعالیت های فیزیولوژیکی از جمله رشد سلول ها و حرکات روزنه ای 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 اساسی ترین واکنش حیات یعنی فتوسنتز، به عنوان ماده تأمین کننده الکترون، هیدروژن و اکسیژن نقش دارد و در خنک شدن گیاه از طریق تعرق، عامل اساسی است. در هر صورت، آب به دلیل ویژگی های 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 کننده فشار اسمزی که بیشتر شامل اسیدهای آمینه، قندها و برخی یون های معدنی، هورمون ها و پروتئین ها است در سلول های خود کاهش می دهد [۲۵].

پرویلین و گلیسین بتائین از جمله ترکیباتی اند که در واکنش به تنش های خشکی تولید می شوند، اما تحقیقات نشان می دهد که برخی گیاهان برای مقابله با تنش های

محیطی به اندازه کافی این ترکیبات را تولید نمی کنند [۴۸]. کاهش محتوای پروتئین تحت تنش خشکی با افزایش فعالیت آنزیم های تجزیه کننده پروتئین و نیز تجمع آمینواسیدهای آزاد از جمله پرویلین مرتبط است [۱۷]. در وضعیت نرمال، پرویلین، ۵ درصد از کل آمینواسیدهای گیاه را تشکیل می دهد، اما در وضعیت تنش این مقدار تا ۸۰ درصد هم می رسد [۸]. پرویلین نوعی آمینواسید با فرمول مولکولی  $C_5H_9NO_2$ ، درون کلروپلاست تولید می شود، اما درون سیتوسول تجمع می یابد [۷]. پرویلین به عنوان ماده ای محلول، سبب تنظیم فشار اسمزی، کاهش هدررفت آب از سلول، حفظ آماس سلولی، پایداری شکل طبیعی پروتئین ها و حفاظت سامانه های غشایی می شود [۱۰].

بررسی ها نشان می دهد که تجمع پرویلین، علاوه بر شدت تنش، به مرحله نمو، نوع اندام و نوع گونه گیاهی بستگی دارد. پرویلین در طی تنش افزایش می یابد و به عنوان تنظیم کننده اسمزی سبب کاهش هدررفت آب از سلول می شود، اما بعد از رفع تنش به عنوان منبع کربن، نیتروژن و انرژی برای بازیابی و بهبود مصرف می شود [۴۷]. مقدار پرویلین آزاد در گیاهانی که در حد مطلوب آبیاری می شوند بسیار کم و در حدود ۰/۶-۰/۲ میلی گرم در گرم ماده خشک است، اما مقدار این ماده پس از کاهش آب بافت ها تا ۴۰-۵۰ میلی گرم در هر گرم ماده خشک افزایش می یابد [۲۰]. گلیسین بتائین نیز نوعی ترکیب آمونیومی چهارگانه با فرمول مولکولی  $C_5H_{11}NO_2$ ، معمول ترین محلول آلی سازگار است که در میکروارگانیسم های مختلف، گیاهان عالی و حیوانات وجود دارد و از بین بسیاری از ترکیبات آمونیومی چهارگانه شناخته شده، بیشترین و فراوان ترین ترکیب در پاسخ به تنش ها است [۴۵]. این ترکیب اولین بار در قرن نوزدهم از چغندر قند استخراج و به همین دلیل با نام بتائین شناخته شد. اما با کشف بتائین های بیشتر، امروزه با نام گلیسین بتائین شناخته می شود. از آنجا که

### 1. Osmoprotectant

## ۲. مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال ۱۳۸۹ در کلکسیون ملی انگور در ایستگاه تحقیقات درجه یک انگور تاجستان 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' و 'فلیم سیدلس' استفاده شد. تاک‌ها چهارساله و به صورت کوردون دوطرفه دوطبقه تربیت شده بودند. پژوهش به صورت فاکتوریل (فاکتور اول شامل رقم در چهار سطح و فاکتور دوم تیمار در سه سطح شاهد، پرولین و گلایسین بتائین) در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در چهار تکرار اجرا شد. در این پژوهش همه تاک‌ها تنش خشکی را دریافت کردند و سه تیمار شاهد (بدون محلول‌پاشی)، پرولین (۱۰ میلی‌مولار) و گلایسین بتائین (۱۵ میلی‌مولار) در چهار مرحله پیش از گلدهی، گلدهی، غورگی و شروع رنگ گرفتن حبه‌ها روی تاک‌ها محلول‌پاشی شدند. دلیل انتخاب این مراحل حساسیت بسیار زیاد انگور به کم‌آبی در این مراحل است [۳]. به منظور اعمال تنش خشکی، براساس توصیه برخی محققان مقدار نیاز آبی انگور با توجه به منطقه آزمایش استخراج شد و ۷۰ درصد آن به کمک کنتور به گیاه داده شد [۱، ۲]. برآورد نیاز آبی در [۱] براساس معادله تغییر یافته پنمن ماتیت محاسبه شده است. با توجه به اینکه ارقام استفاده شده چهارساله بودند، براساس توصیه [۱]، مقدار آب آبیاری محاسبه شده ضریب ۰/۷ می‌گیرد.

مقدار آب آبیاری خالص مورد نیاز برای انگور در محل تاجستان 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 ( $۳۳۹۵ = ۴۸۵۰ \times ۰/۷$ ) و با عنایت به شدت تنش

گلایسین بتائین 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، گلایسین بتائین 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 گلایسین بتائین، 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 به مقدار کم تولید می‌کنند یا اصلاً تولید نمی‌کنند به کاهش تأثیرات مضر تنش‌های محیطی کمک می‌کند [۳۲، ۴۵]. براساس پژوهش‌ها، محلول‌پاشی با گلایسین بتائین 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 گلایسین بتائین می‌توانند سبب مهار رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن<sup>۱</sup> شوند و آثار مضر آنها را کاهش دهند [۳۵]. به عبارت ساده‌تر، گیاهان در واکنش به تنش خشکی، پرولین و گلایسین بتائین بیشتری تولید و از این طریق از صدمات ناشی از تنش خشکی جلوگیری می‌کنند.

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

2. 'Perlette'

3. 'Flame Seedless'

1. ROS

## ۲.۲. گلايسين بتائين

مقدار گلايسين بتائين با روش گريو و گراتان<sup>۱</sup> با کمی تغيير اندازه گيري شد [۱۶]: یک گرم از نمونه های خشک شده با ۱۰ ميلي ليتر آب مقطر مخلوط و به مدت ۴۸ ساعت روی شيکر قرار داده شد. یک ميلي ليتر از محلول استخراج شده از بافت گیاهی با یک ميلي ليتر اسيد سولفوریک دو نرمال ترکیب و ۰/۵ ميلي ليتر از این ترکیب به مدت یک ساعت در حمام آب یخ قرار داده شد. سپس ۰/۲ ميلي ليتر یدین - یدید پتاسیم به آن اضافه و ورتکس شد و ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت و سپس ۱۵ دقیقه در دمای صفر درجه سانتی گراد و دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته و کریستال های 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 می یابد و امکان جدا کردن آنها کم می شود، باید تمام مراحل در دمای کم و محیط یخ انجام گیرد). کریستال ها در یک ميلي ليتر ۱،۲- دی کلرواتان حل شد. سپس محلول با ۱،۲- دی کلرواتان به حجم ۹ ميلي ليتر رسانده و ۲ تا ۲/۵ ساعت داخل یخ قرار داده شد. در پایان، یک ميلي ليتر از این مایع برداشته شد و در اسپکتروفتومتر با طول موج ۳۶۵ نانومتر قرائت شد.

## ۲.۳. آنزیم های پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز

یک گرم از نمونه های گیاهی بعد از خرد کردن با ازت مایع با ۷/۵ سی سی اتانول سرد مخلوط و ۳۰ دقیقه روی شيکر قرار داده شد. سپس ۱۵ دقیقه در دمای صفر درجه سانتی گراد و ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی شناور دور ریخته شد. شست و شو با اتانول سه بار تکرار شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز به کمک روش

۷۰ درصد مورد نظر، حدود  $(2376/5 = 0/7 \times 3395)$  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 قطره چکان = 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 به شرح زیر اندازه گیری شد:

## ۲.۱. پرولین

برای اندازه گیری پرولین از روش نین هیدرین اسید با کمی تغییرات استفاده شد [۱۱]: ابتدا ۰/۵ گرم از هر نمونه گیاه با ۱۰ ميلي ليتر اسيد سولفوسالسلیک ۳ درصد در هاون چینی ساییده شده و ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. دو ميلي ليتر از عصاره صاف شده با دو ميلي ليتر معرف نین هیدرین و دو ميلي ليتر اسيد استیک مخلوط شد. نمونه ها در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت قرار داده شده و پس از سرد شدن، به آنها چهار ميلي ليتر 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. آن گاه غلظت پرولین (میکرومول بر گرم ماده تر) با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$P = \frac{(N \times T) / 115 / 5}{M / 5} \quad (1)$$

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

عصاره استخراج و به مخلوط واکنش اضافه شد تا واکنش شروع شود. فعالیت آسکوربات پراکسیداز در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت سه دقیقه در دمای ۲۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد.

#### ۴.۲. تجزیه و تحلیل آماری

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

#### ۳. نتایج و بحث

آنالیز داده‌ها نشان می‌دهد که با کاربرد خارجی پرولین و گلیسین بتائین، محتوای پرولین و گلیسین بتائین درونی گیاه به طور معناداری افزایش پیدا می‌کند (شکل‌های ۱ و ۲) که سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز نیز می‌شود (شکل‌های ۳ و ۴). نتایج مقایسه میانگین‌ها، بیشترین مقدار پرولین در تیمار پرولین و بیشترین مقدار گلیسین بتائین در تیمار گلیسین بتائین را نشان داد (شکل‌های ۱ و ۲).

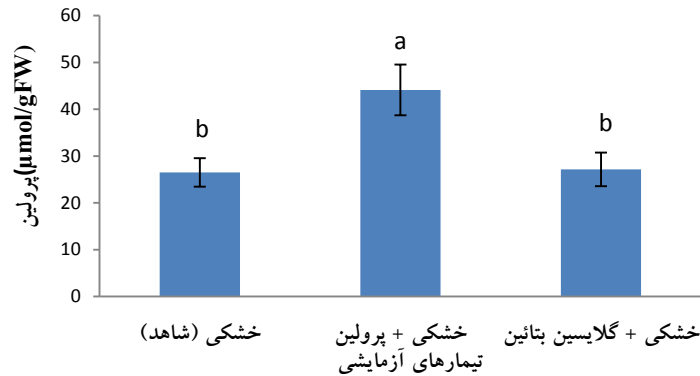
گلیسین بتائین و پرولین از ترکیباتی‌اند که درون سیتوپلاسم وجود دارند و از دهیدراته شدن و پلاسمولیز سلول‌ها در وضعیت شدید اسمزی ممانعت می‌کنند [۱۴، ۲۲]. در پژوهشی کاربرد ۱۰ میلی مولار پرولین در وضعیت تنش شوری سبب افزایش پرولین داخلی، افزایش محتوای نسبی آب برگ و افزایش شایان توجه فعالیت آنزیم پراکسیداز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

چانس و مهلی<sup>۱</sup> با اندکی تغییر اندازه‌گیری شد [۱۳]. بدین منظور به پودر گیاهی شسته شده با اتانول، ۵ سی سی بافر استخراج سدیم - پتاسیم فسفات ۲۰۰ میلی مولار سرد (pH=7) اضافه شده و ۳۰ دقیقه روی شیکر با دور ۱۱۰ قرار داده شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۵۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس عصاره رویی جدا شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم براساس تشکیل تتراگوایاکول از گوایاکول در حضور پراکسید هیدروژن است. برای این کار، ۴/۵۱ میکرولیتر از گوایاکول ۱۰ میلی مولار، ۹۹۲ میکرولیتر از بافر سدیم-پتاسیم فسفات ۱۰ میلی مولار، ۱۵۰۰ میکرولیتر از عصاره استخراج و در نهایت ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۴۰ میلی مولار به مخلوط واکنش اضافه شد.

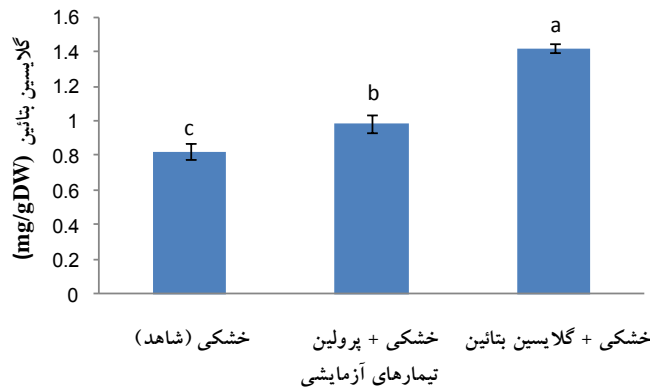
فعالیت آنزیم در طول موج ۴۷۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز به صورت تعداد ماکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه شده در دقیقه در میلی گرم پروتئین گزارش شده است. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بنابر روش یوشیمارو<sup>۲</sup> با کمی تغییر اندازه‌گیری شد [۴۲]. به پودر گیاهی شسته شده با اتانول ۴ سی سی بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار سرد (pH=7) 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 درجه سانتی‌گراد در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و بلافاصله محلول رویی جدا شد.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در سه تکرار، ۵۰ میکرولیتر از گوایاکول ۱۰ میلی مولار، ۲/۹ میلی لیتر از بافر پتاسیم فسفات ۱۰ میلی مولار، ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۴۰ میلی مولار و در نهایت ۴۰ میکرومولار از

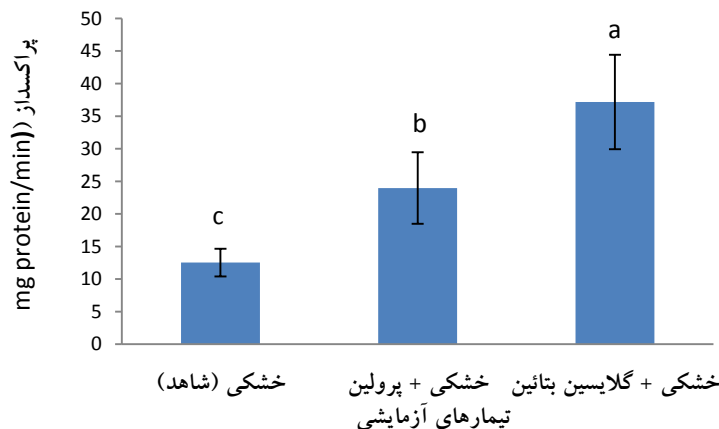
1. Chance and Maehly  
2. Ushimaru



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

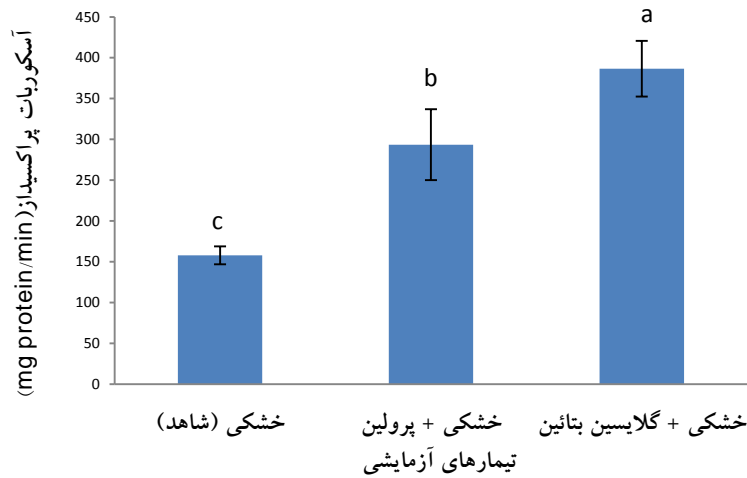


شکل ۲. مقایسه میانگین‌های گلايسين بتاين در سه تیمار شاهد، پرولین و گلايسين بتاين تحت تنش خشکی خطوط عمودی نشان‌دهنده خطای استاندارد توزیع میانگین‌ها (SE) است. میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آزمون دانکن تفاوت معناداری در سطح ۵ درصد ندارند.



شکل ۳. مقایسه میانگین‌های آنزیم پراکسیداز در سه تیمار شاهد، پرولین و گلايسين بتاين تحت تنش خشکی خطوط عمودی نشان‌دهنده خطای استاندارد توزیع میانگین‌ها (SE) است. میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آزمون دانکن تفاوت معناداری در سطح ۵ درصد ندارند.

## تأثیر کاربرد خارجی پرولین و گلیاسین بتائین بر تغییرات بیوشیمیایی در انگور در وضعیت تنش خشکی



شکل ۴. مقایسه میانگین‌های آنزیم آسکوربات پراکسیداز در سه تیمار شاهد، پرولین و گلیاسین بتائین تحت تنش خشکی خطوط عمودی نشان‌دهنده خطای استاندارد توزیع میانگین‌ها (SE) است. میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آزمون دانکن تفاوت معناداری در سطح ۵ درصد ندارند.

در تیمار گلیاسین بتائین بیشتر از تیمار پرولین و در تیمار پرولین بیشتر از شاهد به دست آمد (شکل‌های ۳ و ۴). تنش‌های محیطی تولید گونه‌های فعال اکسیژن را در سلول‌های گیاهی تحریک می‌کند و با صدمه زدن به پروتئین‌ها، لیپیدها، DNA و کربوهیدرات‌ها سبب مرگ سلول می‌شود [۶]. گیاهان به کمک سیستم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی در مقابل صدمات گونه‌های فعال اکسیژن مقاومت می‌کنند. تحقیقات حاکی از افزایش فعالیت پراکسیداز در اثر کاربرد پرولین و گلیاسین بتائین 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 گلیاسین بتائین بیشتر از پرولین به دست آمد. دلیل این موضوع آن است که گلیاسین بتائین تنها از طریق فعال کردن آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند رادیکال‌های آزاد را از بین ببرد، اما پرولین علاوه بر فعال کردن آنتی‌اکسیدان‌ها، خود

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 گلیاسین بتائین درونی آنها افزایش می‌یابد و این افزایش سبب افزایش تحمل به تنش سرمایی در آنها می‌شود. آنها همچنین اثبات کردند محلول پاشی گلیاسین بتائین روی برگ‌ها سبب افزایش گلیاسین بتائین داخلی شد و تحمل به تنش سرمایی را افزایش داد [۴۴]. کاربرد غلظت‌های صفر، ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار گلیاسین بتائین در انگور سبب افزایش سطوح گلیاسین بتائین درونی از ۴ تا ۳۶ میلی‌مولار شد. این امر نشان‌دهنده آن است که همبستگی مثبتی بین کاربرد خارجی گلیاسین بتائین و غلظت درونی آن وجود دارد. کاربرد گلیاسین بتائین 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

[۳۵]. همچنین تجمع پرولین در زمان تنش خشکی مسیرهای انرژی و متابولیسم کربن را تغییر می‌دهد، زیرا با اکسیداسیون یک مولکول پرولین معادل  $30 \text{ ATP}$  انرژی آزاد می‌شود و بیوستز پرولین به طور غیرمستقیم نسبت  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  را افزایش می‌دهد [۱۸].

این تغییر، جریان کربن را از طریق مسیر پنتوز فسفات تحت تأثیر قرار می‌دهد و سبب سنتز بیشتر اریتروز-۴-فسفات<sup>۱</sup> می‌شود [۱۹]. اریتروز-۴-فسفات در مسیر اسید شیکمیک مصرف می‌شود. مسیر اسید شیکمیک سبب ایجاد اسید آمینه آروماتیک می‌شود که این ترکیبات (اسید آمینه‌های آروماتیک) نیز به متابولیت‌های اولیه و ثانویه تبدیل می‌شوند. متابولیت‌های ثانویه‌ای که از اسیدهای آمینه آروماتیک به وجود می‌آیند نظیر لیگنین به ترکیبات فنولی معروف‌اند. توالی ذکر شده در بالا در وضعیت استرس سبب تغییر ویژگی‌های دیواره سلولی و تجمع لیگنین می‌شود. لیگنین در دیواره‌های سلولی به‌خصوص در دیواره‌های ثانویه عناصر تراکئیدی آوند چوبی یافت شده و موجب استحکام مکانیکی و سفتی ساقه‌های چوبی می‌شود. هرچند وظیفه اصلی لیگنین ساختمانی است، به عنوان نوعی ماده شیمیایی دفاعی نیز مطرح است [۴]. پرولین علاوه بر اینکه در طی تنش افزایش می‌یابد و به عنوان تنظیم‌کننده اسمزی سبب افزایش حفظ آب می‌شود، بعد از رفع تنش نیز به عنوان 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، به طوری که رقم فلیم سیدلس، بیشترین، و رقم پیکانی، کمترین مقدار پرولین را داشتند. آزمون دانکن اختلاف معناداری را به لحاظ درصد تغییرات گلایسین بتائین، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در بین ارقام نشان نداد (جدول ۱).

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

برای افزایش تحمل گیاهان به تنش‌ها به ویژه تنش خشکی، حضور پرولین و گلایسین بتائین به عنوان تنظیم‌کننده‌های اسمزی و همچنین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برای از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن ضروری به نظر می‌رسد. تحقیقات نشان داده پرولین و گلایسین بتائین فعالیت سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان 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، به مراتب بیشتر می‌شود [۲۷].

پرولین و گلایسین بتائین، تحمل به شوری را در تنباکو نیز با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان افزایش می‌دهند [۲۲]. در تحقیقی روی گندم در وضعیت تنش خشکی، استفاده از گلایسین بتائین 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 آنتی‌اکسیدان‌ها 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 آسکوربات پراکسیداز 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

1. Erythrose 4- phosphate



جدول ۱. مقایسه میانگین‌های درصد تغییرات پرولین، گلایسین بتائین، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در چهار رقم انگور تیمار شده با پرولین و گلایسین بتائین تحت تنش خشکی

رقم	تغییرات میانگین‌ها		
	پراکسیداز	گلایسین بتائین	آسکوربات پراکسیداز
پرت <sup>۱</sup>	۱۲۰/۹ <sup>ab</sup>	۱۳۶/۴ <sup>a</sup>	۲۱۹/۵ <sup>a</sup>
فلیم سیدلس <sup>۲</sup>	۱۴۶/۶ <sup>a</sup>	۱۳۵/۱ <sup>a</sup>	۲۴۳/۱ <sup>a</sup>
پیکانی <sup>۳</sup>	۱۱۰/۴ <sup>b</sup>	۱۳۹/۰ <sup>a</sup>	۱۵۲/۷ <sup>a</sup>
خوشناو <sup>۴</sup>	۱۳۴/۳ <sup>ab</sup>	۱۲۴/۳ <sup>a</sup>	۱۴۳/۸ <sup>a</sup>

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

[۲]. از آنجا که پرولین و گلایسین بتائین می‌توانند به‌عنوان از بین برنده اکسیژن یگانه و رادیکال‌های هیدروکسیل فعالیت کنند، ممکن است سبب تثبیت پروتئین‌ها، DNA و پایداری غشا شوند و از صدمات مخرب رادیکال‌های آزاد به فتوستت و کلروپلاست جلوگیری کنند و از این طریق سبب افزایش عملکرد و کیفیت محصول شوند [۵].

همه این موارد مؤید این است که افزایش سطوح پرولین و گلایسین بتائین ممکن است سبب افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی شود. در تحقیق حاضر، مقدار پرولین و گلایسین بتائین درونی گیاه به ترتیب در تیمار پرولین و گلایسین بتائین به‌طور معناداری بیشتر از شاهد به دست آمد. همچنین با اینکه فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در هر دو تیمار پرولین و گلایسین بتائین بیشتر از شاهد بود، مشاهده شد در تیمار گلایسین بتائین 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 گلایسین بتائین در فعال کردن آنتی‌اکسیدان‌ها، می‌توان توصیه کرد با کاربرد این دو اسمولیت تحمل انگور را در مقابل تنش خشکی افزایش داد.

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 می‌شود که با تخریب فسفولیپیدهای غشای سلول، کارایی غشا از بین می‌رود. کاهش فعالیت‌های فتوستتزی، کاهش توانایی تثبیت دی‌اکسید کربن در کلروپلاست و نشت الکترولیت‌ها از سلول، ناشی از خسارت گونه‌های فعال اکسیژن به فسفولیپیدهای غشا است [۳۹]. به دنبال تخریب فتوستت و از بین رفتن کلروپلاست، تثبیت دی‌اکسید کربن کاهش پیدا می‌کند که سبب کاهش تولید گیاه می‌شود. 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 آسکوربات پراکسیداز است. بیشتر بودن رادیکال‌های آزاد در داخل سلول نسبت به آنتی‌اکسیدان‌ها ممکن است سبب فعالیت‌های تخریبی شود. این رادیکال‌های آزاد در میتوکندری، کلروپلاست، میکروزوم و آپوپلاست یافت شده و سبب تخریب این بافت‌ها می‌شوند

منابع

- 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.
۱. فرشعی ع، شریعتی م، ر، جارالهی ر، قائمی م، ر، شهبابی فر م و تولائی م م (۱۳۷۶) برآورد آب مورد نیاز گیاهان عمده زراعی و باغی کشور - جلد دوم. نشر آموزش کشاورزی. تهران. ۴۵۳ ص.
۲. کافی م، برزوئی ا، صالحی م، کمندی ع، معصومی ع و نباتی ج (۱۳۸۸) فیزیولوژی تنش‌های محیطی در گیاهان. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۵۰۲ ص.
۳. نجاتیان م ع (۱۳۸۵) جمع آوری و ارزیابی اولیه ارقام انگور استان قزوین. تحقیقات نهال و بذر. ۲۲(۳): ۳۳۸-۳۱۹.
۴. هاپکینز ج ویلیام (۱۳۸۶) مقدمه‌ای بر فیزیولوژی گیاهی. ویرایش دوم. ترجمه احمدی ع، احسان زاده پ، جباری ف. مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه 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

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 *Pancreatium 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 and 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 grapes. *Scientia Horticultural*. 111: 7-16.

34. Nilsen ET and Orcutt DM (1996) Physiology of plants under stress (Abiotic factors). Jon Wiley & 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *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 peroxidase, Antioxidant Enzymes and Aldehyde Releasing Capacity in *Oryza sativa* 44 dase, monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase after exposure to air of rice (*Oryza sativa*) seedlings germinated under water. *Plant Cell Physiology*. 38: 541-549.
43. Williams WP and Brain APR (1992) Dominy, Induction of non-bilayer lipid phase separation in chloroplast thylakoid membranes by compatible cosolutes and its relation to 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. *Photosynthetica*. 38(1): 171-186.
47. Zhang CS, Lu Q and Verma DPS (1997) Characterization of  $\Delta$ -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.