

تأثیر بتا آمینوبوتیریک اسید بر محتوای آب نسبی، تنظیم اسمزی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه کلزا (*Brassica napus* L.) تحت تنش خشکی

ندا محمدی^۱، امین باقی زاده^۲ و پیمان رجایی^۳

^۱ کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، باشگاه پژوهشگران و نخبگان

^۲ کرمان، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، گروه بیوتکنولوژی

^۳ کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، دانشکده علوم

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱/۱۶

چکیده

طیف وسیعی از اثرات حفاظتی اسید آمینه غیرپروتئینی بتا آمینوبوتیریک اسید در برابر تنش‌های گیاهی در گزارشهای مختلف ذکر شده است. در این تحقیق تأثیر برهم‌کنش بین بتا آمینوبوتیریک اسید ($0.300\mu\text{M}$) و تنش خشکی (شاهد، تنش ملایم و شدید) مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد وقتی گیاه کلزا تحت تنش خشکی قرار گرفت، ثابت پایداری غشاء (MSI) و محتوای آب نسبی (RWC) و محصولات پراکسیداسیون لیپیدی افزایش یافت. پیش تیمار گیاهان با بتا آمینوبوتیریک اسید باعث افزایش درصد MSI و RWC و کاهش مقدار آلدهیدها در برگ گیاهان تحت تنش گردید. تنش خشکی باعث افزایش معنی‌دار مقدار پراکسید هیدروژن در گیاه کلزا شد. مقدار پراکسید هیدروژن در برگ گیاهان تیمار شده با BABA کاهش معنی‌داری یافت. در شرایط تنش خشکی، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، گلوکاتایون ردوکتاز و پراکسیداز نسبت به شاهد افزایش اما فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش نشان داد. در گیاهانی که با بتا آمینو بوتیریک اسید پیش تیمار شده و بعد تحت تنش خشکی قرار گرفته بودند، فعالیت کلیه آنزیم‌های ذکر شده افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: تنظیم اسمزی، بتا آمینوبوتیریک اسید، تنش خشکی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، کلزا

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۱۹۶۵۵۷۵، پست الکترونیکی: mohamadineda15@gmail.com

مقدمه

در سالهای ۱۹۶۳ و ۱۹۶۴ Papavizas و Davy گزارشهایی در مورد نقش BABA در حفاظت گیاهان نخود در برابر پاتوژن *Aphanomyces euteiche* دادند. آنان ثابت کردند از بین ۱۰ ترکیب شیمیایی آزمایش شده تنها DL- بتا آمینو بوتیریک اسید (DL-BABA) و DL- متیل بتا آسپارتیک اسید (DL-MBAA) باعث القا مقاومت ریشه نخود به پوسیدگی شدید ریشه می شود. اینطور بیان می شود که این دو اسید آمینه بطور مستقیم روی پاتوژن اثر نمی کنند بلکه مانع بیان علائم بیماری می شوند. BABA در طیف وسیع باعث مقاومت به ویروس باکتری، قارچ‌های

بتا آمینو بوتیریک اسید (BABA) یک آمینو اسید غیر پروتئینی است که در طبیعت نادر است. تنها گزارشی که از وجود ترکیب اخیر در گیاهان به دست آمده مربوط به ریشه گیاهان گوجه فرنگی بوده که در خاک زیاد در آفتاب مانده و تخریب شده بدست آمده است (۱۷). اما بسیار جالب است که بتا آمینو بوتیریک اسید در رقابت با گلیسین عمل می کند و در غلظتهای پایین مانع پاسخ‌های مربوط به گلیسین و در غلظت‌های بالا باعث تقویت جریان غشایی می شود (۴۵).

اوومیسیت و نماتود می شود. تاکنون هیچ گونه اثر سمیت مستقیم BABA دیده نشده است (۴۶).

در آزمایش انجام شده توسط Ton و همکاران در سال ۲۰۰۵ گیاهان جهش یافته آراییدوپسیس (*ibs*) انتخاب شدند. جهش یافته *ibs1* در پروتئین کینازهای وابسته به سیکلین، *ibs2* در ژن *AtSAC1b* که کدکننده یک پلی فسفو اینوزیتید فسفاتاز است و *ibs3* در تنظیم ژن *ABA1* که کدکننده زاتین اپوکسیداز (آنزیم بیوسنتزی مسیر ABA) است، نقص داشتند. برای تعیین نقش این سه ژن IBS در مقاومت القا شده توسط BABA این جهش یافته ها در برابر تنش شوری و پاتوژن آزمایش شدند (۴۶). ترجمه محصول *AtSAC1b* پروتئینی است که به عنوان یک پلی فسفو اینوزیتید فسفاتاز عمل می کند که فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ فسفات (*ptdIns*) و فسفاتیدیل اینوزیتول ۴ فسفات و فسفاتیدیل اینوزیتول ۵،۳ بیس فسفات را به فسفاتیدیل اینوزیتول تبدیل می کند. نقش علامت رسانی فسفاتیدیل اینوزیتول در پاسخ به تنش های گیاهی مثل تنش اسمزی به خوبی شناخته شده است (۵۰). در گیاهان جهش یافته، BABA در مقاومت گیاه به تنش مؤثر واقع نشد.

در آزمایشهایی که توسط Cao و همکارانش (۲۰۰۸) بر تأثیر BABA بر تنش کمبود یون پتاسیم در دانه رست های آراییدوپسیس انجام گردید، مشخص شد محتوای K^+ در ریشه و ساقه دانه رست های تحت تیمار با BABA بیش از گیاهان کنترل بود (۱۰). Zimmerli و همکاران در سال ۲۰۰۸ نیز تأثیر BABA را بر مقاومت دمایی در آراییدوپسیس مورد بررسی قرار دادند (۵۱). تأثیر ۵/۵ mM BABA بر گیاهانی که به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۴۵ °C قرار گرفته بودند مشخص کرد که گیاهان تحت تیمار مقاومت بیشتری نسبت به گیاهان شاهد نشان دادند. Cao و همکارانش در سال ۲۰۰۹ در مورد تأثیر BABA در افزایش بردباری به تنش کادمیم را در گیاه آراییدوپسیس

گزارش کردند (۱۱). BABA بردباری به کادمیم را از طریق مکانیزم وابسته به گلوکاتایون افزایش می دهد. GSH از سلول های گیاه در برابر تنش اکسیداتیو حفاظت می کند. این امر در سمیت زدایی کادمیم مهم است (۴۸).

مطالعات زیادی در زمینه تنش خشکی در کلزا انجام شده است و شماری از ویژگی های فیزیولوژیک و مورفولوژیک مؤثر در تحمل به تنش خشکی گزارش شده است. کمبود آب می تواند اثر سوئی بر عملکرد کلزا بگذارد ولی این اثر به رقم، مرحله نمو و سازش یافتگی گیاه به خشکی بستگی دارد. حساسترین مرحله رشد و نمو کلزا به کم آبی، مرحله گل دهی است. کمبود آب در این مرحله سبب افت شدید تعداد گل، کپسول و دانه شده و وزن هزار دانه و درصد روغن دانه را کاهش می دهد (۱). بنا به گزارش پاسبان اسلام و همکاران (۱۳۸۰) تنش کمبود آب در کلزا باعث کاهش عملکرد، تعداد خورجین در بوته و تعداد دانه در خورجین می گردد (۲). Qifuma و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند، تنش کمبود آب در مرحله گل دهی و پر شدن دانه تأثیر منفی روی عملکرد دانه دارد (۳۶). در طول دوره تنش خشکی تعداد گل در هر بوته، تعداد و اندازه بذر کاهش می یابد. گزارشهایی که در مورد اثر تنش خشکی بر میزان روغن و پروتئین دانه وجود دارد عمدتاً مؤید اثر منفی تنش خشکی بر محتوای روغن و پروتئین دانه می باشد (۲۹). Downey (۱۹۸۳) گزارش کرد که تنش خشکی و درجه حرارت بالا باعث کاهش اسیدهای چرب اشباع نشده در روغن کلزا شد (۱۷).

از آنجا که BABA در آلودگی های پاتوژنی عملکرد خود را از طریق مکانیزم دفاعی وابسته به SA و متعاقباً فعال شدن پاسخ های مقاومت سرتاسری (systemic SAR) (acquired resistance) اعمال می کند (۵۲) و در موارد دیگر مثل تنش های غیر زیستی، BABA از طریق مسیر علامت رسانی وابسته به ABA عمل می کند (۴۶). هر دو

اندازه گیری مقدار آب نسبی برگ: تعداد ۳ برگ از بالاترین برگ ها جدا گردید و با ترازوی دقیق اندازه گیری شد. سپس نمونه ها در آب مقطر قرار گرفتند تا به طور کامل آماس کنند، سپس برگ ها به مدت ۳ ساعت در آون با دمای ۸۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا وزن خشک نمونه ها به دست آید. در نهایت با فرمول زیر محتوای آب نسبی برگ و کمبود اشباع آب اندازه گیری شد.

$$100 \times (FW - DW) / (TW - DW)$$

FW وزن تازه برگ، DW وزن خشک، TW وزن آماس می باشد.

اندازه گیری شاخص پایداری غشاء (MSI: Membrane stability index): شاخص پایداری غشاء بر اساس روش Sairam و همکاران (۱۹۷۷) محاسبه شد. بر اساس این روش دو گروه نمونه آماده شد. در هر گروه ۰/۱ گرم از نواحی مشابه برگ در ظروف شیشه ای درپوش دار حاوی ۱۰ میلی لیتر آب مقطر قرار داده شد. لوله های گروه اول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ °C حمام آب گرم قرار داده شد و بعد هدایت الکتریکی (EC) آن توسط دستگاه EC متر مدل Metrohm ۷۱۲ خوانده شد (C1). لوله های گروه دوم به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش ۱۰۰ °C قرار داده شدند و هدایت الکتریکی آنها نیز اندازه گیری گردید (C2). شاخص پایداری غشاء بر اساس رابطه زیر اندازه گیری شد:

$$MSI = [1 - (C1/C2)] \times 100$$

اندازه گیری مقدار پرولین: برای اندازه گیری پرولین محتوای برگ گیاه از روش Bates et al (۱۹۷۳) استفاده شد (۶). برای اندازه گیری پرولین ابتدا مقدار ۰/۲ گرم گیاهچه توزین شد و در هاون چینی در ۳ میلی لیتر اسید سولفوسالسیلیک اسید ۳٪ به خوبی سائیده شد و مخلوط حاصل در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۲ میلی لیتر از عصاره صاف شده را به لوله های دردار منتقل کرده و به تمام لوله ها ۲ میلی لیتر معرف ناین هیدرین و ۲ میلی لیتر اسید استیک

مسیر در تحمل به تنش آبی مؤثرند، در تحقیق حاضر سعی شده است که بردباری به تنش کم آبی و سنجش برخی آنتی اکسیدان های آنزیمی و غیر آنزیمی بعد از تیمار BABA در گیاه کلزا مورد سنجش قرار گیرد.

مواد و روشها

در این تحقیق از گیاه کلزا (*Brassica napus* L.) رقم Madonna استفاده شد. بذرها این گیاه از مرکز تحقیقات کشاورزی کرج تهیه گردید. پس از جدا کردن بذرها یکسان از نظر اندازه این بذرها با هیپوکلریت سدیم ۰/۱ درصد ضد عفونی گردید و پس از شستشو با آب مقطر به گلدان های (۱۵×۱۵ Cm) حاوی پرلیت منتقل شد. برای هر تیمار ۳ گلدان به عنوان ۳ تکرار در نظر گرفته و در هر گلدان ۴ بذر کاشته شد. گلدان ها پس از کشت در اتاق رشد در شرایط دوره متناوب نوری ۱۶/۸ ساعت (تاریکی/ نور) با شدت نور ۱۴ کیلو لوکس، رطوبت ۷۵٪ و دمای ۱۶ ± ۲/۲۳ درجه سانتی گراد (تاریکی/ نور) نگهداری شد. قبل از شروع تیمار کم آبی همه گیاهان به طور منظم در حد ظرفیت مزرعه آبیاری شدند. ۲۶ روز بعد از جوانه زنی تنش کم آبی اعمال شد.

تیمارهای مورد استفاده عبارت بودند از:

- ۱) شاهد: آبیاری یک روز در میان انجام شد.
 - ۲) D1: گیاهان ۳ روز تحت تنش کم آبی قرار گرفتند.
 - ۳) D2: گیاهان ۵ روز تحت تنش کم آبی قرار گرفتند.
- بتا آمینوبوتیریک اسید (Sigma) در غلظت ۰ و ۳۰۰ میکرومولار به شکل محلول در آب یک روز قبل از اعمال تیمار کم آبی به گیاهان داده شد. گیاهان شاهد یک روز قبل از اعمال تیمار کم آبی با آب آبیاری شدند. برای نمونه گیری به منظور سنجش صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در پایان هر تیمار از بافت تازه گیاه اقدام به نمونه گیری شد و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد گردید و به فریزر ۸۰- منتقل شد.

گلاسیل اضافه شد. پس از بستن لوله ها به مدت ۱ ساعت در آب ۱۰۰ درجه قرار داده شد. پس از سرد کردن لوله ها به هر کدام ۴ میلی لیتر تولوئن اضافه گردید و با استفاده از دستگاه ورتکس به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه لوله ها تکان داده شد. سرانجام فاز رویی که به رنگ قرمز و حاوی پرولین محلول در تولوئن است، برداشته و همزمان با نمونه های استاندارد در دستگاه اسپکتروفوتومتر قرار داده شد. اعداد در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. غلظت پرولین بر حسب میلی گرم بر گرم بافت تازه برگ با استفاده از منحنی استاندارد تعیین گردید.

سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء (LPO: Lipid peroxidation): این آزمایش با استفاده از اندازه گیری مالون دی آلدئید (MDA) و بر اساس روش Heath and Packer (۱۹۶۹) به عنوان فراورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء انجام شد (۲۰). نمونه های منجمد به میزان ۰/۲ گرم در ۵ میلی لیتر TCA (تری کلرو استیک اسید) ۰/۱٪ عصاره گیری شدند. عصاره حاصل با استفاده از دستگاه سانتریفوژ NAPCO مدل ۲۰۲۸ به مدت ۵ دقیقه در $\times g$ ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس به یک میلی لیتر از سوسپانسیون صاف شده ۵ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید ۲۰ درصدی که حاوی ۰/۵٪ TBA (تیو باریتوریک اسید) بود، به هر کدام از نمونه ها اضافه شد و در حمام آب گرم $^{\circ}C$ ۱۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. بعد از ۳۰ دقیقه لوله ها از حمام خارج شده و پس از سرد شدن دوباره مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در $\times g$ ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. میزان مالون دی آلدئید با اندازه گیری جذب در طول موج ۵۳۲ خوانده شد. ماده مورد نظر برای جذب در این طول موج کمپلکس قرمز رنگ MDA-TBA است. جذب بقیه رنگیزه های غیر اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کم شد. و با استفاده از ضریب خاموشی $\epsilon=155 \times 10^5 \mu M^{-1} Cm^{-1}$ محاسبه شد.

اندازه گیری مقدار پراکسید هیدروژن: مقدار پراکسید

هیدروژن بر اساس واکنش H_2O_2 با یدید پتاسیم (KI) و با روش Alexiva (۲۰۰۱) انجام شد (۴). در این روش ۰/۵ گرم از بافت تازه گیاه در TCA (تری کلرو استیک اسید) ۰/۱٪ سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در $\times g$ ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید. سپس به ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی ۵۰۰ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰mM (pH=7) و ۲ میلی لیتر پتاسیم یدید ۱M اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۱ ساعت در تاریکی در دمای اتاق قرار داده شد و بعد جذب نمونه ها در ۳۹۰ نانومتر اندازه گیری شد.

برای محاسبه غلظت پراکسید هیدروژن از منحنی استاندارد استفاده شد. برای رسم منحنی استاندارد غلظت های ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار پراکسید هیدروژن تهیه و منحنی جذب بر حسب غلظت رسم و معادله آن به دست آمد.

عصاره گیری برای سنجش فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان: ۰/۵ گرم بافت تر در هاون چینی محتوای ۵ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار با pH=7/۵ که حاوی پلی وینیل پیرولیدین ۱٪، EDTA ۱ میلی مولار و PMSF ۱ میلی مولار بود، ساییده شد. تمام مراحل در یخ انجام گردید. در مورد عصاره مربوط به فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به عصاره حاصل آسکوربیک اسید ۱۰ میلی مولار افزوده شد. همگن های حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در $\times g$ ۲۰۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. سپس محلول رویی به عنوان عصاره خام آنزیمی در ویال های ۰/۵ میلی لیتری تقسیم شد و تا زمان سنجش فعالیت آنزیمها و پروتئین ها در دمای $^{\circ}C$ ۸۰- نگهداری شد.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از محاسبه کاهش جذب H_2O_2 (کاهش مقدار H_2O_2) در nm ۲۴۰ و با روش Dhindsa و همکاران (۱۹۸۱) انجام شد (۱۴). مخلوط واکنش شامل ۲/۸۷ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار با ۷

pH= ۷ آب اکسیژنه ۰/۱۵ میلی مولار، EDTA ۰/۱ میلی مولار، آسکوربات ۰/۵ میلی مولار، ۵۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی. به دنبال اکسید شدن آسکوربات با شروع واکنش آنزیمی کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر، دو دقیقه پس از شروع واکنش محاسبه شد. ضریب خاموشی آسکوربات ($\epsilon = 2.8 \times 10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) و فرمول $A = \epsilon bc$ فعالیت آنزیمی بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازاء هر میلی گرم پروتئین بیان شد (۳۰).

سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (GR): فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز به وسیله اکسیداسیون NADPH تعیین می‌شود. در این روش ۱ میلی لیتر از مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار pH= ۷/۸، EDTA ۲ میلی مولار، NADPH ۰/۱۵ میلی مولار، GSSG ۰/۵ میلی مولار و ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی بود. واکنش با اضافه کردن NADPH شروع شد. جذب نمونه ها به مدت ۳ دقیقه در طول موج ۳۴۰ نانومتر در مقابل شاهد خوانده شد. یک واحد فعالیت آنزیمی مقدار آنزیمی است که برای اکسیداسیون یک میکرومول NADPH در یک دقیقه لازم است. برای محاسبه مقدار NADPH اکسید شده از ضریب خاموشی معادل $6.2 \times 10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ استفاده شد (۴۳).

تجزیه و تحلیل‌های آماری داده های حاصل به روش تجزیه واریانس بر پایه طرح کامل تصادفی انجام شد. برای ارزیابی اثر تیمارها روی صفات اندازه گیری شده، همه داده های بدست آمده با استفاده از نرم افزارهای Excell و SPSS تحت آنالیز واریانس یک طرفه قرار گرفت. مقایسه میانگین تیمارها با روش Duncan انجام و $P \leq 0.05$ بعنوان سطح معنی دار بودن اختلافات در نظر گرفته شد.

نتایج

اندازه گیری مقدار آب نسبی برگ (RWC): در این مطالعه گیاهان تحت تنش خشکی محتوای آب خود را در مقایسه

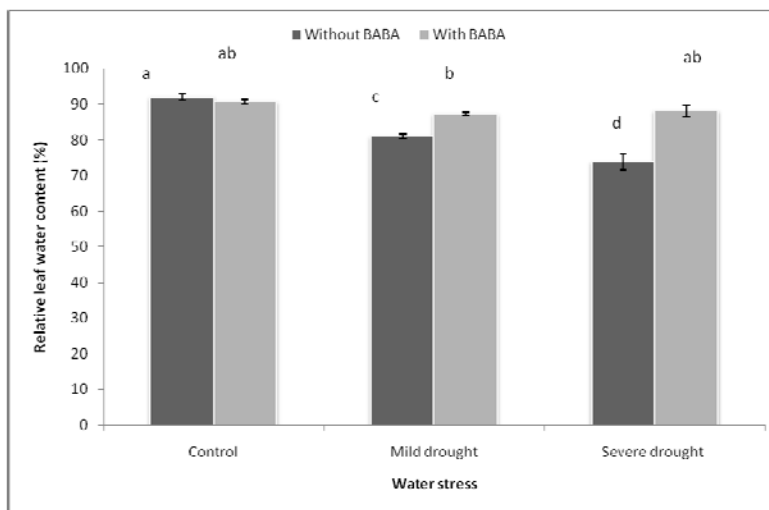
pH= ۳۰ و میکرو لیتر آب اکسیژنه ۱۵ میلی مولار می باشد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی را اضافه کرده و واکنش شروع می شود. میزان H_2O_2 موجود در مخلوط واکنش پس از یک دقیقه با استفاده از ضریب خاموشی ($\epsilon = 0.28 \text{ cm}^{-1} \text{ mMol}^{-1}$) و فرمول $A = \epsilon bc$ محاسبه شد که نشان دهنده میزان فعالیت آنزیم است. A معادل جذب خوانده شده، ϵ ضریب خاموشی، c غلظت H_2O_2 و b طول کوت (۱ سانتیمتر) می باشد. فعالیت آنزیم به صورت واحد آنزیمی بر حسب مقدار پروتئین کل (میلی گرم) موجود در ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره (بدست آمده از روش برادفورد) در یک دقیقه محاسبه گردید (۱۴).

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD): برای سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) از روش Giannopolitis & Ries (۱۹۷۷) استفاده شد (۱۸). مخلوط واکنش شامل موارد زیر بود: ۲/۵ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار با pH= ۷/۸، ۰/۱ میلی لیتر میتیونین ۱۳ mM، ۰/۱ میلی لیتر Nitro Blue Tetrazolium $0.75 \times 10^{-4} \text{ M}$ ، ۲ μM ، ۰/۲ میلی لیتر عصاره آنزیمی. نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در معرض نور قرار داده شدند و پس از این مدت جذب آنها در طول موج ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. در این آزمایش دو نمونه شاهد مورد استفاده قرار گرفت که هر دو بدون عصاره آنزیمی بود، نمونه اول بدون دریافت نور (به عنوان شاهد برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفوتومتر) و نمونه دوم ۱۵ دقیقه در مقابل منبع نوری قرار گرفت (به عنوان کنترل، زیرا به دلیل عدم وجود آنزیم احیاء NBT در حضور نور به طور ۱۰۰٪ انجام می گیرد). یک واحد فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به عنوان مقدار آنزیمی در نظر گرفته شد که منجر به مهار ۵۰٪ احیای نوری نیتروبلوتترازولیم می گردد.

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX): مخلوط واکنش شامل: بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار

محتوای آب برگ در گیاهان پیش تیمار شده با BABA به $88/2\%$ و $82/2\%$ به ترتیب در تنش ملایم و شدید افزایش یافت. شکل ۱ نتایج حاصل از اندازه گیری مقدار آب نسبی برگ در گیاه کلزا را نشان می‌دهد.

با گیاهان شاهد از دست دادند. محتوای آب برگ از 99% در گیاهان شاهد به 81% و $73/4\%$ به ترتیب در تنش ملایم و شدید کاهش نشان داد. BABA توانست سازگاری گیاه کلزا را به تنش خشکی به طور معنی‌دار افزایش دهد.

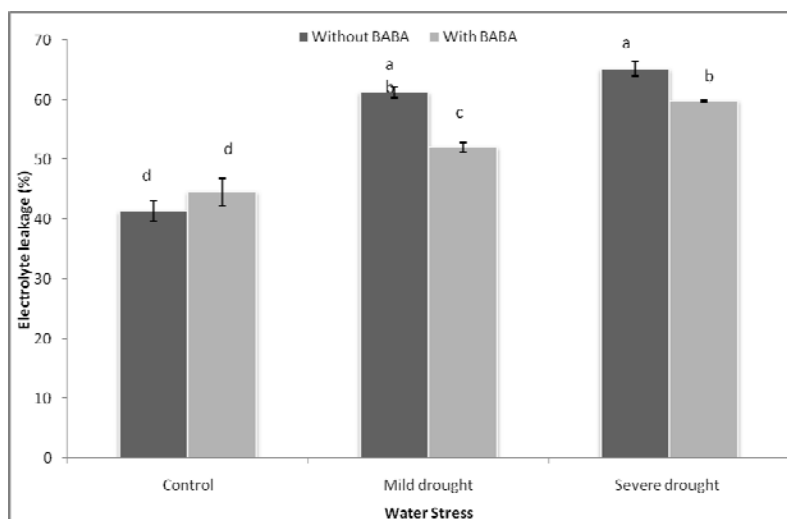


شکل ۱- تأثیر تنش خشکی و پیش تیمار BABA بر مقدار آب نسبی برگ در گیاه کلزا

میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. $P < 0.05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد. حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن و حروف مشابه نشانه معنی‌دار نبودن داده‌ها در مجموعه تیمارهاست؛ در حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

شاهد شد (شکل ۲). پیش تیمار BABA باعث افزایش معنی‌دار شاخص پایداری غشاء تحت تیمار کم آبی گردید (شکل ۲).

اندازه گیری شاخص پایداری غشاء (MSI): در این بررسی تنش ملایم و شدید کم آبی به ترتیب موجب کاهش 25% و 37% شاخص پایداری نسبت به گیاهان

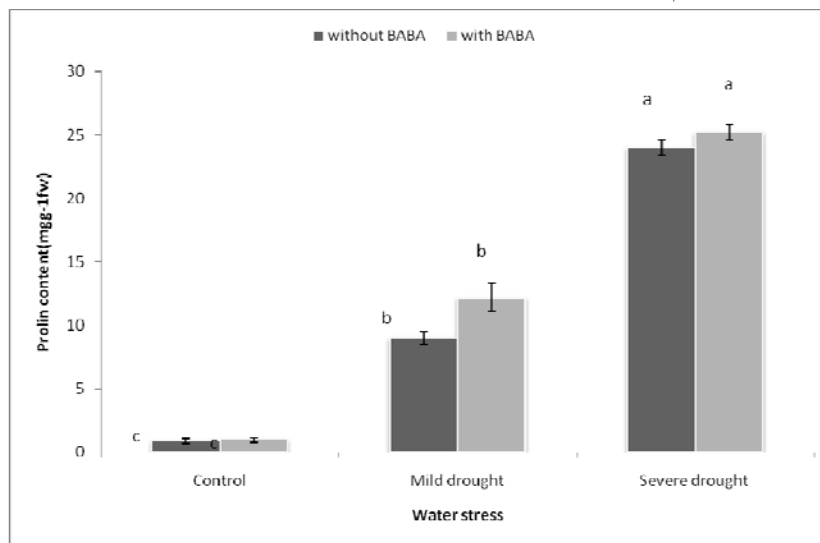


شکل ۲- تأثیر تنش خشکی و پیش تیمار BABA بر شاخص پایداری غشاء در گیاه کلزا

میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. $P < 0.05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد. حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن و حروف مشابه نشانه معنی‌دار نبودن داده‌ها در مجموعه تیمارها در حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

تا ۲۰ برابر نسبت به گیاهان شاهد رسید. البته پیش تیمار BABA افزایش معنی داری در محتوای پرولین در برگ و ریشه گیاه کلزا نداشت.

سنجش مقدار پرولین: همان طور که در شکل ۳ نشان داده شده، نتایج حاصل از سنجش پرولین نشان داد که تنش کم آبی باعث افزایش معنی دار مقدار پرولین شده است. این افزایش در گیاهان تحت تنش ملایم تا ۹ و در تنش شدید



شکل ۳- تأثیر تنش خشکی و پیش تیمار BABA بر مقدار پرولین در برگ گیاه کلزا

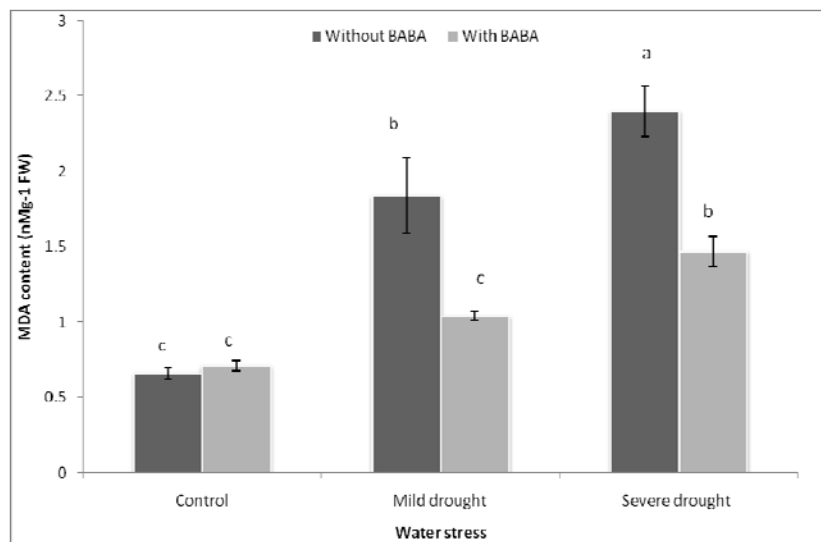
میانگین ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. $P < 0.05$ به عنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد. حروف متفاوت نشانه معنی دار بودن و حروف مشابه نشانه معنی دار نبودن داده‌ها در مجموعه تیمارهاست؛ در حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن است.

شد. مقدار پراکسید هیدروژن در گیاهان تیمار شده با BABA کاهش معنی داری تا حدود ۴۳٪ و ۶۶٪ در شرایط تنش ملایم و شدید نسبت به گیاهان بدون پیش تیمار BABA نشان داد (شکل ۵).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): شکل ۶ نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز را در گیاهان شاهد و تحت تنش نشان می دهد. همانطور که در شکل مشاهده می شود فعالیت آنزیم کاتالاز برگ در شرایط تنش ملایم و شدید نسبت به شاهد کاهش معنی دار نشان داد. پیش تیمار گیاهان با BABA فعالیت کاتالاز برگ را تا ۱/۸ برابر به طور معنی دار افزایش داد.

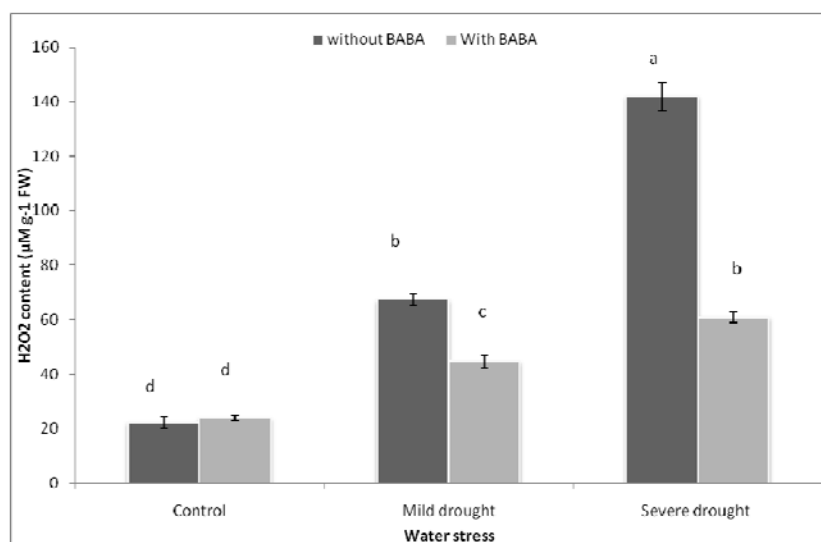
سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء: مالون دآلدهید شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدها در نظر گرفته شده است. در این آزمایش مقدار مالون دآلدهید تحت تنش ملایم و شدید کم آبی به ترتیب در برگ ۲/۷ و ۳/۶ برابر افزایش نشان داد. در گیاهان پیش تیمار شده با BABA تحت تنش کم آبی، مقدار مالون دآلدهید برگ به طور معنی دار حدود ۵۷/۷٪ در مقایسه با گیاهانی که پیش تیمار نشده بودند، کاهش یافت (شکل ۴).

سنجش مقدار پراکسید هیدروژن: داده های حاصل از تأثیر تیمار خشکی بر مقدار پراکسید هیدروژن در گیاهان مورد آزمایش نشان داد که تیمار ملایم و شدید خشکی به ترتیب موجب افزایش معنی دار ۳ برابر H_2O_2 در برگ گیاه کلزا



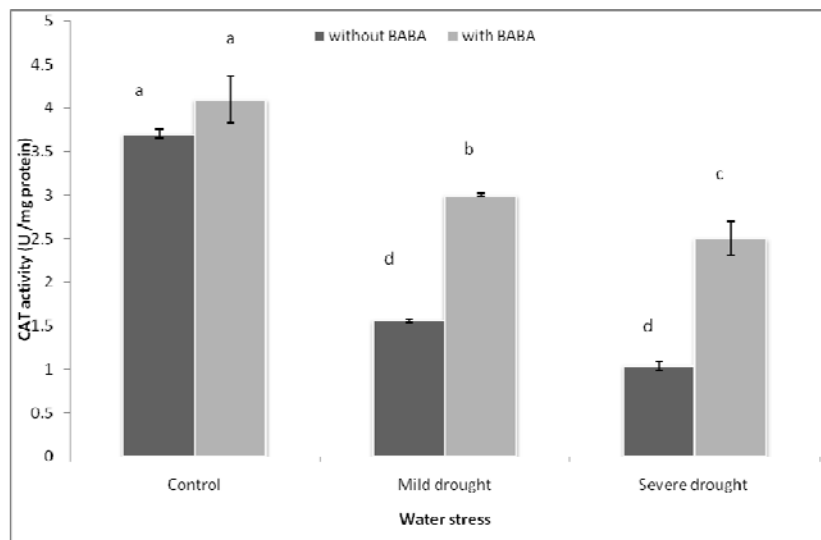
شکل ۴- تأثیر تنش خشکی و پیش تیمار BABA بر مقدار مالون دآلدهید در برگ گیاه کلزا

میانگین ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. $P < 0.05$ به عنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد. حروف متفاوت نشانه معنی دار بودن و حروف مشابه نشانه معنی دار نبودن داده‌ها در مجموعه تیمارهاست؛ در حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن است.



شکل ۵- تأثیر تنش خشکی و پیش تیمار BABA بر مقدار پراکسید هیدروژن در برگ گیاه کلزا

میانگین ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. $P < 0.05$ به عنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد. حروف متفاوت نشانه معنی دار بودن و حروف مشابه نشانه معنی دار نبودن داده‌ها در مجموعه تیمارهاست؛ در حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن است.

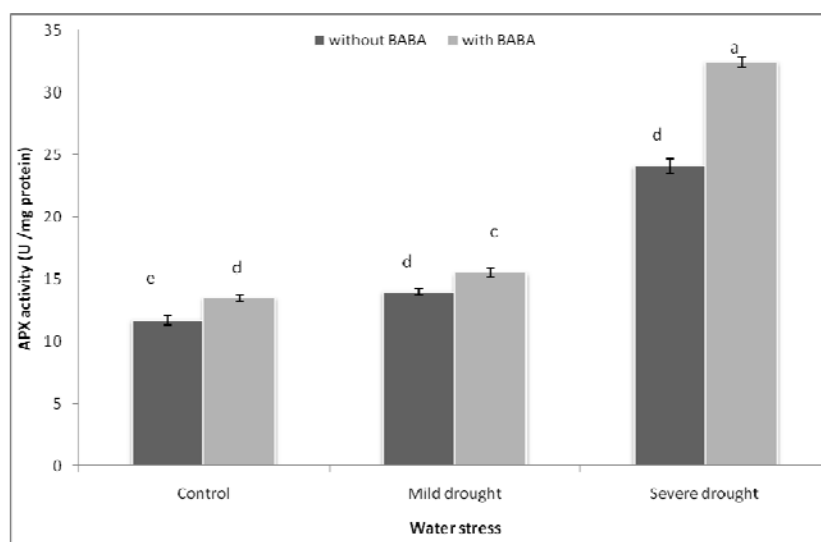


شکل ۶- تأثیر تنش خشکی و پیش تیمار BABA بر فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ گیاه کلزا

میانگین ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. $P < 0.05$ به عنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد. حروف متفاوت نشانه معنی دار بودن و حروف مشابه نشانه معنی دار نبودن داده‌ها در مجموعه تیمارهاست؛ در حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن است.

شاهد شده است. پیش تیمار گیاهان با BABA سبب افزایش معنی دار فعالیت آنزیم تا حدود ۱/۷ و ۱/۴ برابر در مقایسه با گیاهان تحت تنش بدون دریافت پیش تیمار BABA شد (شکل ۷).

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ نشان داد که تنش ملایم و شدید خشکی به ترتیب باعث افزایش معنی دار فعالیت آنزیم تا ۱/۲ و ۲ برابر در مقایسه با گیاه

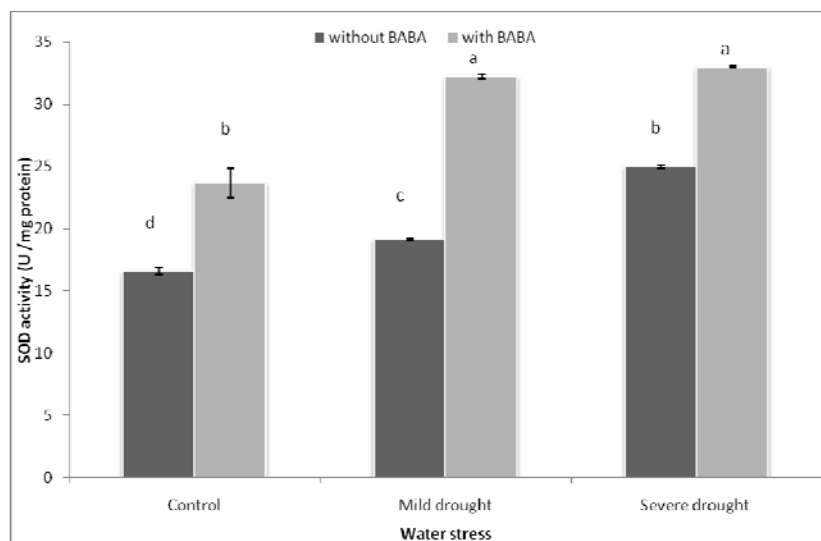


شکل ۷- تأثیر تنش خشکی و پیش تیمار BABA بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ گیاه کلزا

میانگین ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. $P < 0.05$ به عنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد. حروف متفاوت نشانه معنی دار بودن و حروف مشابه نشانه معنی دار نبودن داده‌ها در مجموعه تیمارهاست؛ در حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن است.

در برگ حدود ۱/۲ برابر در تنش ملایم و ۱/۵ برابر در تنش شدید نسبت به شاهد افزایش معنی دار نشان داد. پیش تیمار گیاهان با BABA فعالیت این آنزیم در برگ را تا ۲/۴ برابر به طور معنی دار افزایش داد.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: شکل ۸ نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را در گیاهان شاهد و تحت تنش نشان می دهد. همانطور که در شکل مشاهده می شود فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز



شکل ۸- تأثیر تنش خشکی و پیش تیمار BABA بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در برگ گیاه کلزا

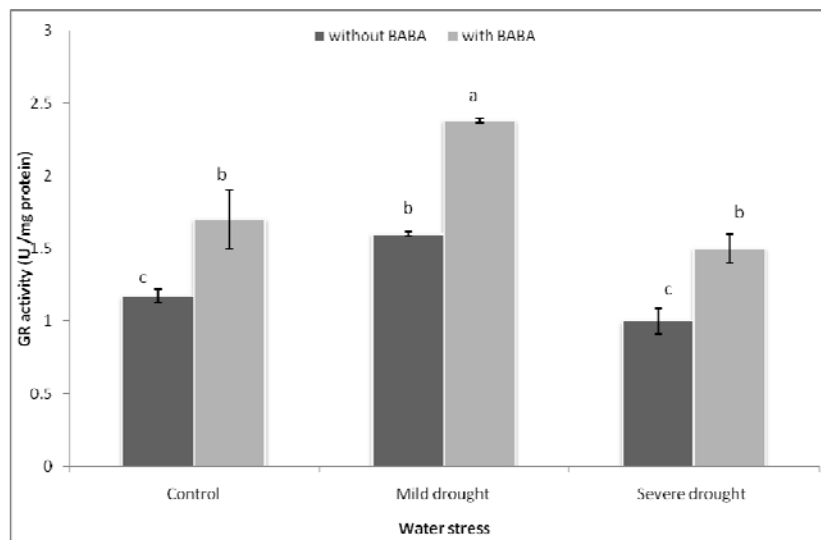
میانگین ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. $P < 0.05$ به عنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد. حروف متفاوت نشانه معنی دار بودن و حروف مشابه نشانه معنی دار نبودن داده ها در مجموعه تیمارهاست؛ در حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن است.

بحث و نتیجه گیری

کاهش محتوای آب برگ را می توان یکی از پارامترهای اندازه گیری تنش خشکی در نظر گرفت. در این مطالعه گیاهان تحت تنش محتوای آب خود را در مقایسه با گیاهان شاهد تا حدود ۲۰٪ در تنش ملایم و ۲۷٪ در تنش شدید از دست دادند. پیش تیمار گیاهان با BABA توانست با بستن روزنه ها تحمل گیاه به خشکی را افزایش دهد و پژمردگی را به تأخیر بیندازد. در آزمایشهای انجام شده توسط Bian و همکاران (۲۰۰۹) در گیاه *Kentucky bluegrass* نشان داده شد که RWC تا حدود ۶۸٪ افت می کند (۷).

فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز (GR): شکل ۹ نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز را در گیاهان شاهد و تحت تنش نشان می دهد. همانطور که در شکل مشاهده می شود فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز در برگ حدود ۱/۸ برابر در تنش ملایم افزایش یافت و در تنش شدید نسبت به شاهد کاهش معنی دار نشان نداد. پیش تیمار گیاهان با BABA فعالیت گلوکاتایون ردوکتاز برگ و ریشه را تا ۱/۵ برابر به طور معنی دار افزایش داد.

شکل ۱۰ - میزان پژمردگی در گیاه کلزا پیش تیمار شده با BABA را با گیاهان شاهد و تحت تنش شدید خشکی نشان می دهد.



شکل ۹- تأثیر تنش خشکی و پیش تیمار BABA بر فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز در برگ گیاه کلزا

میانگین ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. $P < 0.05$ به عنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد. حروف متفاوت نشانه معنی دار بودن و حروف مشابه نشانه معنی دار نبودن داده‌ها در مجموعه تیمارهاست؛ در حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن است.



شکل ۱۰- مقایسه میزان پژمردگی در گیاه کلزا پیش تیمار شده با BABA در گیاهان شاهد و تحت تنش شدید خشکی

BABA در مدت زمان فوق اثرات پژمردگی از خود نشان ندادند. اما در گیاهان تیمار شده میزان آب از دست رفته در مقایسه با گیاهان کنترل کمتر بوده است (۲۵).

یکی از آسیب های جدی تنش خشکی خسارت به غشاء و رها سازی یون ها از سلول به فضای بین سلولی است (۱۹ و ۲۸). اندازه گیری محصولات پراکسیداسیون لیپید یکی از معمولترین روش های اندازه گیری صدمات اکسیداتیو به غشاء است و به میزان وسیع در گیاهان استفاده می‌شود.

این نتایج در گیاه گوجه فرنگی (۳۱) و لوبیا (۴۷) نیز گزارش شد. بنا به گزارش Jacab و همکاران، BABA زمینه را برای سنتز ABA فراهم می کند و این امر منجر به بسته شدن روزنه ها و افزایش محتوای آب برگ می شود. طی آزمایش هایی که Jacab و همکارانش در سال ۲۰۰۵ انجام دادند گیاهان پیش تیمار شده با BABA در برابر تنش شوری و خشکی بردباری بیشتری نشان دادند. محرومیت آبی در آرابیدوپسیس ظرف یک هفته باعث پژمردگی گیاه شد، در حالیکه در گیاهان تیمار شده با

رادیكال های اكسيژن با پراكسيداسيون اسيدهاى چرب غيراشباع ، آلددهيدهايى مانند مالون دآلدهيد توليد مى كنند و اين محصول آلددهيدى به عنوان شاخص تنش اكسيداتيوى اندازه گيرى مى شود (۷). نتايج اين تحقيق نشان مى دهد كه BABA منجر به كاهش پراكسيداسيون ليپيد و نشت يونى و در نتيجه افزايش تحمل گياه به تنش خشكى مى شود.

حفظ پايدارى غشاء سلولى تحت تنش بخشى از مكانيزم تحمل به تنش محسوب مى شود. در اين آزمون در شرايط تنش افزايش نشت يونى با افزايش MDA همراه است كه نشان دهنده آن است كه پراكسيداسيون ليپيد منجر به سياليت غشاء شده و نفوذپذيرى غشاء را افزايش داده است. اين نتيجه توسط ساير محققان از جمله Reddy و همكاران (۲۰۰۴)، Lima و همكاران (۲۰۰۲)، Daneshmand و همكاران (۲۰۱۰) و Sharma ana Dubay (۲۰۰۵) نيز گزارش شده است (۱۳، ۲۷، ۳۸ و ۴۷).

افزايش پراكسيداسيون ليپيدها در برگ مى تواند نتيجه بسته شدن روزنه ها و نتيجه كاهش غلظت دى اكسيد كربن باشد كه به نوبه خود غلظت $NADP^+$ در دسترس براى پذيرش الكترون از فتوسيسم I و II را كاهش مى دهد، بنابراين منجر به احياء اكسيژن مولكولى و توليد AOS مى شود (۲۲). كاهش MDA توسط پيش تيمار BABA نشان دهنده حفاظت بهتر غشاء از آسيب هاى اكسيداتيوى است كه احتمالا نتيجه افزايش فعاليت آنزيم هاى آنتى اكسيدانت مى باشد. همبستگى بين افزايش فعاليت آنزيم هاى آنتى اكسيدانت و كاهش مالون دآلدهيد در گياه گوجه فرنگى تحت تنش شورى نيز گزارش شده است (۸).

نتايج حاصل از سنجش پرولين در گياه كلزا نشان داد كه ميزان اين تركيبات در گياهان تحت تنش افزايش معنى دارى داشته است. پرولين در شرايط تنش تا ۲۰ برابر نسبت به گياهان شاهد افزايش نشان داده است. پيش تيمار گياهان با BABA افزايش معنى دارى در سطح پرولين و

اسيدهاى آمينه آزاد گياه نداشت. گزارش هاى مشابهى در مورد تنش كم آبى بر گياهان ذرت، گندم و برنج وجود دارد (۲۳). تجمع اين اسموليت در سيتوپلاسم در حفاظت از ساختمان ماكرومولكولها در محيطى كه تعادل يونى به هم خورده است عمل مى كند (۳۲). در گزارش Diaz و همكاران (۲۰۰۵) در گياه كاهو تحت تنش خشكى، كاهش مقدار RWC عامل افزايش تجمع پرولين ذكر شده است. بنا به اين گزارش تجمع پرولين در اين گياه از طريق سنتز از نو (Denevo) و نه از طريق هيدروليز پروتئين ها صورت مى گيرد (۱۵). پرولين در گياهان تحت تنش به حفظ تعادل گياه كمك مى كند (۴۲). علاوه بر نقش اسمزى حفاظت از يكپارچگى غشاء، نيروى احيا كنندگى راديكال هاى OH و تنظيم نسبت NAD/NADH از آن جمله است (۱۵). تجمع پرولين در سلول ها با ممانعت از دناتوره شدن پروتئين ها همراه است. حفظ ساختار و فعاليت آنزيم ها (۴۱) و حفظ غشاء از آسيب هاى ROS در شرايط كم آبى و نيز كاتابوليسم پرولين توسط آنزيم دهيدروژناز در اين شرايط متوقف مى شود (۱۲). بنا به گزارش Jacob و همكاران (۲۰۰۵) BABA زمينه را براى سنتز ABA فراهم مى كند (۲۴) و اين امر باعث بسته شدن روزنه ها مى شود. اين آزمون ها نشان داد كه ظرف مدت ۲۴ ساعت پس از تيمار با BABA تجمع بالايى از ABA در پاسخ به تنش شورى در گياه ديده شد اما ميزان پرولين افزايش نيافت. نتايج بررسى حاضر نيز در راستاى اين تحقيق مى باشد. ظاهرا BABA تجمع و آماده سازى اين اسموليت ها را القاء نمى كند.

تنش خشكى همانند ساير تنش هاى محيطى مانند شورى، فلزات سنگين و تنش دمائى مى تواند باعث تنش اكسيداتيوى شود كه بسيار آسيب زننده است. در اين شرايط همانطور كه در بالا مورد بحث قرار گرفت، آنتى اكسيدان هاى غير آنزيمى و آنتى اكسيدان هاى آنزيمى در گياه فعال مى شوند. SOD تبديل آنيون سوپراوكسيد به آب اكسيژنه را به عهده دارد. در مطالعات پيشين نشان داده شده است كه

طرفی می تواند منجر به ذخیره گلوکاتایون احیاء بیشتری شود (۴۷).

کاتالاز در حذف آب اکسیژنه نقش دارد. در این آزمایش فعالیت کاتالاز در هر دو سطح تنش کاهش نشان داد. نتایج Zhang و Kirkham (۱۹۹۴) در کاهش فعالیت کاتالاز تحت رژیم کم آبی در راستای این تحقیق است. کاهش فعالیت این آنزیم در شرایط تنش در گیاه گندم (۲۱) و آرابیدوپسیس (۲۶) نیز گزارش شده است. کاهش در فعالیت کاتالاز احتمالا در نتیجه توقف سنتز آنزیم، تغییر در جمع شدن زیرواحدهای آنزیمی تحت شرایط تنش و یا تخریب زیستی آنزیم به وسیله پروتئازهای پراکسیزومی و یا غیر فعال شدن نوری (Photo inactivation) آنزیم باشد (۳). در آزمایش حاضر افزایش آب اکسیژنه در شرایط تنش با کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه و متعاقبا کاهش آب اکسیژنه در گیاهان پیش تیمار شده با BABA با افزایش فعالیت کاتالاز توجیه می شود.

تیمار BABA باعث القاء فعالیت آنزیم های CAT, APX, SOD, GR شده است. احتمالا BABA از طریق تغییر در بیوسنتز ABA به طور گذرا در مراحل اولیه باعث افزایش رادیکال های اکسیژن می شود که این ترکیبات محرک فعالیت آنزیم های فوق است. در گزارش های قبلی نشان داده شد که آبیاری خاک با ماده شیمیایی BABA مکانیزم های دفاعی را تحریک می کند و یک حفاظت بلند مدت را در برابر تنش های زیستی مانند باکتری های بیوتروف (۵۲) و قارچهای نکروتروف (۵۱) باعث می شود. Zhang نشان داد که BABA مقاومت به تنش های محیطی را نیز افزایش می دهد و مکانیزم این مقاومت وابسته به مسیر علامت رسانی ABA است (۹ و ۴۹). تولید زودتر و سریعتر ABA باعث بسته شدن روزنه و بیان ژن های تنظیمی ABA شده که در نهایت منجر به افزایش کارایی استفاده از آب گیاه می شود (۲۴). در این تحقیق نشان داده شد که BABA نه تنها باعث افزایش فعالیت آنزیم های

تغییر در فعالیت SOD با توجه به شدت خشکی، طول مدت تنش و گونه گیاهی متفاوت است. کاهش در فعالیت SOD در دانه رست های آفتابگردان (۳۷)، *Aegilops squarrosa* (۵) و افزایش آن در گندم (۵) دیده شده است. در تحقیق حاضر فعالیت SOD تحت تنش خشکی افزایش یافت. Jagtap و Bhargava (۱۹۹۵) نیز القاء سطوح فعالیت SOD را در تحمل رقم زراعی ذرت به تنش خشکی نشان دادند (۲۳). پیش تیمار BABA فعالیت این آنزیم را در مقایسه با گیاهان تیمار نشده تحت تنش و گیاهان شاهد بالا برده است. احتمالا تولید بیشتر اکسیژن مولکولی در کلروپلاست ها در نتیجه تنش ناشی از BABA منجر به افزایش فعالیت SOD در نتیجه افزایش سوبسترای این آنزیم شده است.

افزایش معنی دار APX در گیاهان تحت تنش دیده شده است. Sairam و همکاران (۱۹۹۸) دریافتند که کاهش پراکسیداسیون لیپید با افزایش و القاء فعالیت APX در ژنوتیپ های مقاوم به خشکی در گندم با هم مرتبط است. بنابراین به نظر می رسد در این مطالعه در شرایط تنش خشکی محصول فعالیت SOD، که آب اکسیژن است توسط القاء فعالیت APX حذف شود. GR نیز با تبدیل گلوکاتایون اکسید (GSSG) به گلوکاتایون احیاء (GSH) در تنش اکسیداتیو نقش کلیدی دارد (۳۹). افزایش فعالیت این آنزیم در برگهای گیاه ذرت تحت تنش خشکی گزارش شده است که در بالا بردن ظرفیت تحمل گیاه به تنش تأثیرگذار است (۳۵). افزایش فعالیت این آنزیم در شرایط تیمار با BABA در گیاه کلزا در این آزمایش مشخص شد. نشان داده شده است که رادیکال های سوپراکسید و آب اکسیژنه احتمالا مسئول القاء GR هستند (۳۵). افزایش در فعالیت GR می تواند نسبت NADP+/NADPH را افزایش دهد و در نتیجه NADP+ در دسترس برای پذیرش الکترون های تولید شده از زنجیره انتقال الکترون را افزایش دهد و باز تولید آسکوربات را تسهیل نماید. از

آنزیمی، آسیب های تنشی مانند رادیکال های اکسیژن را کاهش دهد. البته، این نکته را نیز باید مورد توجه داشت که بنا به گزارش سایر محققان غلظت های بالای این ماده نقش همکاری با ROS داشته و شدت تنش را افزایش می دهند. بنابراین استفاده از BABA را می توان به عنوان یک مفهوم جدید برای حفظ گیاه در برابر تنش خشکی بدون دستکاری ژنتیکی که با صرف هزینه های بالا همراه است، معرفی کرد.

آنتی اکسیدان می شود بلکه فعالیت آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی را نیز بالا می برد و به این ترتیب کاهش پراکسیداسیون لیپیدها و افزایش بردباری به تنش خشکی را در گیاه کلزا القاء می کند.

نتیجه گیری کلی: بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق، BABA در غلظت پایین (۳۰۰ میکرومولار) می تواند به عنوان القاء کننده یک تنش خفیف از طریق فعال کردن مسیر علامت رسانی و نیز بیوسنتزی ABA و متعاقبا فعال کردن سیستم آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیر

منابع

۱. پاسبان اسلام، ب.، م. ر. شکیب، م. ر. نیشابوری، م. ر. مقدم و م. ر. احمدی. ۱۳۸۰. اثرات تنش کمبود آب بر روی ویژگی های کمی و کیفی کلزا. مجله دانش کشاورزی ۷۸-۷۵: (۴) ۱۰.
۲. نصری، م.، حیدر شریف آباد، ح.، شیرانی، ا.، مجیدی هروان، ا.، زمانی، ح.، ۱۳۸۵. بررسی اثر تنش خشکی بر خصوصیات فیزیولوژیک ارقام کلزا. مجله علوم کشاورزی سال دوازدهم، شماره ۱: ۱۲۶-۱۳۴.
3. Abedi T, Pakniyat H. 2010. Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). Czech Journal of Genetic Plant Breeding. 46 (1): 27-34.
4. Alexiva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E. 2001. The effect of water stress on the activities of key regulatory enzymes of the sucrose to starch pathway in wheat. Plant growth Regulator. 35: 81-91.
5. Badiani M, Biasi MG, Colognola M, Artemi F. 1990. Catalase, peroxidase and superoxide dismutase activities in seedlings submitted to increasing water deficit, Agrochemical. 34: 90-102.
6. Bates LS, Waldern RW and Treare LD. 1973. Rapid determination of free proline for stress students. Plant and Soil. 39: 205-207
7. Bian S, Jiang Y. 2009. Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of *Kentucky bluegrass* in response to drought stress and recovery. Scientia Horticulturae 120: 264-270.
8. Bor M, Ozdemir F, Tu'rkkan I. 2003. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L and wild beet *Beta maritima* L. Plant Science. 164: 77-84.
9. Bruce T, Matthes MC, Napier, JA, Pickett JA. 2007. Stressful "memories" of plants: Evidence and possible mechanisms. Plant Science. 173 : 603-608
10. Cao SQ, Jiang L, Yuan H. 2008. *b*-Aminobutyric acid protects Arabidopsis against low potassium stress Acta Physiologia Plantarum. 30:309-314.
11. Cao SQ, Ren G. 2009. The Role of Aminobutyric Acid in Enhancing Cadmium Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Russian in Fiziologiya Rastenii, 56(4): 635-640.
12. Chaves MM, Pereira JS, Maroco J, Rodrigues ML, Ricardo CPP, Osorio ML, Carvalho I, Faria T, Pinheiro C. 2002. How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. Annual Botany .89:907-16.
13. Daneshmand F, Arvin MJ, Kalantari MK. 2010. Physiological responses to NaCl stress in three wild species of potato in vitro. Acta Physiol Plant: 32:91-101
14. Dhindsa RS, Motowe W .1981. Drought tolerance in two mosses: correlation with enzymatic defense against lipid peroxidation. Journal of Experimental Botany 32:79-91
15. Diaz R, Borsani O, Marquez A, Monza J. 2005. Nitrogen metabolism in relation to drought stress responses in cultivated and model *Lutulus* species. Lotus Newsletter 35(1): 83-92.

16. Downey, R. K. 1983. Origin and description of the Brassica oilseed In: Kramer, J. K. G., F. D. Sauer and W. J. Pigden, (eds). High and low erucic acid rapeseed oils production, usage, chemistry and toxicological evaluation. Academic press. Toronto. Canada. pp. 1-20.
17. Gamliel A and Katan J. 1992. Influence of seed and root exudates on fluorescent *Pseudomonas* and fungi in solarized soil. *Phytopathology* 82: 320-327
18. Giannopolitis CN and Ries SK. 1977. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59: 309-314.
19. Halliwell B. 1982. Oxygen-derived species and herbicide action, *Physiology Plantarum*. 21-24
20. Heath RL, Paeker L. 1969. Photoperoxidation in isolated chloroplast and stiochiometry of fatty acid peroxidation. *Archive of Biochemistry and Biophysics*. 125:189-198.
21. Herbinger K, Tausz M, Wonisch A, Soja G, Sorger A, Grill D. 2002. Complex interactive effects of drought and ozone stress on the antioxidant defence systems of two wheat cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*. 40:691-696.
22. Hernandez JA, Jimenez A, Mullineaux PM, Sevilla F. 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences, *Plant Cell and Environment*. 23: 853-862.
23. Jagtap V, Bhargava S. 1995. Variation in the antioxidant metabolism of drought tolerant and drought susceptible varieties of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Exposed to high light, low water and high temperature stress, *Journal of Plant Physiology*. 145: 195-197.
24. Jacob G, Cottier V, Toquin V., Rigoli G, Zimmerli L, Me' traux JP, and Mauch-Mani B. 2001. β -Aminobutyric acid-induced resistance in plants. *European Journal of Plant Pathology*. 107, 29-37.
25. Jacob G, Ton J, Flors V. 2005. Enhancing *Arabidopsis* Salt and Drought Stress Tolerance by Chemical Priming for Its Absciscic Acid Responses. *Plant Physiology*. 139: 267-274.
26. Jung S. 2004. Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. *Plant Science*. 166: 459-466.
27. Lima, A.L.S., DaMatta, F.M., Pinheiro, H.A., Totola, M.R., Loureiro, M.E., 2002. Photo responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany*. 47, 239-247.
28. Liu C, Liu Y, Guo K, Fan D, Li G, Zheng Y, Yu L, Yang R. 2011. Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern china. *Environmental and Experimental Botany*. 71: 174-183.
29. Mendham, N.J., and P.A. Salisbury. 1995. Physiology, crop development, growth and yield of Brassica oilseeds. CAB International. pp.11-64.
30. Nakano Y, Asado K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22(5):867-880
31. Nasibi F, Kalantari M. K. 2009. Influence of nitric oxide in protection of tomato seedling against oxidative stress induced by osmotic stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 7:127-131.
32. Nayyar H. 2003. Accumulation of osmolytes and osmotic adjustment in water stressed wheat and maize as affected by calcium and its antagonists. *Environmental and Experimental Botany*. 50:253-264.
33. Pandey R, Agarwal RM, Jeevaratnam K, Sharma GL. 2004. Osmotic stress- induced alternations in rice and recovery on stress release. *Plant Growth Regulation*. 42: 79-84.
34. Papavizas GC and Davey CB. 1963. Effect of amino compounds and related substances lacking sulfur on *Aphanomyces* root rot of peas. *Phytopathology* 53: 116-122.
35. Pastori G, Mullineaux P, Foyer CH. 2000. Post transcriptional regulation prevents accumulation of glutathione reductase protein and activity in the bundle sheath cells of maize. Implication on the sensitivity of maize to low temperatures. *Plant Physiology*. 122:667-75.
36. Qifuma, Sh., R. Niknam and D.W. Turner. 2006. Responses of osmotic adjustment and seed yield of *Brassica napus* and *B. juncea* to soil water deficit at different growth stages. *Aust. J. Agric. Res.* 57: 221-226.
37. Quartacci MF, Sgherri CLM, Pinzin C, Navari-Izzo F. 1994. Superoxide radical production in wheat plants differently sensitive to drought. *Royal Society of Edinburgh*. 102B: 287-290.

38. Reddy P, Sairanganayakulu G, Thippeswamy M, 2008. Identification of stress-induced genes from the drought tolerant semi-arid legume crop horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) through analysis of subtracted expressed sequence tags. *Plant Science* 175: 372–384
39. Sairam RK, Shukla SD, Saxena DC. 1998. Stress induced injury and antioxidant enzymes in relation to drought tolerance in wheat genotypes, *Biologia Plantarum*. 40 (3): 357–364.
40. Sairam RK, Shukla SD, Saxena DC. 1998. Stress induced injury and antioxidant enzymes in relation to drought tolerance in wheat genotypes, *Biologia Plantarum*. 40 (3): 357–364.
41. Samuel D, Kumat TK, Ganesh G, Jayaraman G, Yang PW, Chang MM. 2000. Prolin inhibit aggregation during protein refolding. *Protein science* 9: 334-352.
42. Sarhadi PP, Arora S, Prasad KV. 1995. Prolin accumulation in plants exposed to UV radiation and protect them against induced peroxidation. *Biochemical and biophysical research communications*. 290: 1-5.
43. Schaedle M and Bassham JA. 1977. Chloroplast glutathion reductase. *Plant Physiology*. 59: 1011-1012.
44. Sharma P, Duby RS. 2005. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 17 (1): 35-52.
45. Shelp BJ, Bown AW and McLean MD .1999. Metabolism and function of gamma-aminobutyric acid. *Trends Plant Science* 4: 446–452.
46. Ton J, Jakab G, Toquin V, Flors V, Iavicoli A, Maeder N, Me´traux J. and Mauch-Man B. 2005. Dissecting the b-Aminobutyric Acid–Induced Priming Phenomenon in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 17: 987–999.
47. Tu`rkan I, Bor M, O`zdemir F, Koca H. 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science* 168: 223–231.
48. Xiang C, Werner BL, Christensen EM, and Oliver DJ. 2001. The Biological Functions of Glutathione Revisited in Arabidopsis Transgenic Plants with Altered Glutathione Levels, *Plant Physiology*. 126: 564–574.
49. Zhang J, Kirkham MB. 1996. Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings, *New Phytology*. 132: 361–373
50. Zhu JK. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 53, 247–273.
51. Zimmerli L, Hou1, B.H., Tsai C.H, Jakab G. 2008. The xenobiotic b-aminobutyric acid enhances Arabidopsis Thermo tolerance. *The Plant Journal* 53, 144–156
52. Zimmerli L, Jakab G, Metraux JP, Mauch-Mani B .2000. Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in Arabidopsis by b-aminobutyric acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 12920–12925

Effect of β -amino butyric acid (BABA) on relative leaf water content, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in Rapeseed (*Brassica napus* L.) plants under drought stress

Mohammadi N.¹ Baghizadeh A.² and Rajaei P.³

¹ Young Researcher Club, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, I.R. of Iran

² International Center for Science, High Technology and Environmental Sciences, Kerman, I.R. of Iran

³ Faculty of Science, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, I.R. of Iran

Abstract

The broad spectrum protective effects of the non-protein amino acid β -aminobutyric acid (BABA) against numerous plant stresses has been well-documented in the literature. In this study the interaction between BABA (0,300 μ M) and drought (control, mild and severe stress) were studied. Results showed that rapeseed plants which were under drought stress had lower percentage of membrane stability index (MSI) and relative water content (RWC), higher lipid peroxidation products when compared with control plants. Pretreatment of plants with BABA increased the MSI and RWC and decreased the amount of aldehydes in water stress plants. H_2O_2 content was increased under drought stress, pretreatment of plants with BABA decreased the amount of hydrogen peroxide. In drought stress condition, activity of SOD, APX, GR and POD were elevated over the controls while CAT activity decreased. In plants which pretreated with BABA and then exposed to drought stress the activity of mentioned enzymes increased.

Key words: β -aminobutyric acid, drought stress, antioxidant enzymes, *Brassica napus*