

تأثیر گاما آمینوبوتیریک اسید بر ویژگی‌های هورمونی و بیوشیمیایی گیاه کدو خورشتی (*Cucurbita pepo*) تحت سمیت علف‌کش تریفلورالین

نسرین اسمعیل نژاد و جلیل خارا*

ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۷/۴/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۱۵

چکیده

مکانیسم اثر تریفلورالین از طریق مهار تقسیم میتوز سلولی می‌باشد. گاما آمینوبوتیریک اسید (گابا) به‌عنوان اسید آمینه غیر پروتئینی، برخی فعالیت‌های فیزیولوژیکی از جمله تنظیم رشد گیاه و مقاومت در برابر تنش‌ها را بر عهده دارد. به‌منظور بررسی تأثیر علف‌کش تریفلورالین و نقش گابا بر فعالیت‌های آنزیمی و میزان پرولین و تنظیم‌کننده‌های رشد جیبرلین (GA_3) و سیتوکینین (۶- بنزیل آمینوپورین) در گیاه کدو خورشتی (*Cucurbita pepo*) آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کرت‌های کاملاً تصادفی با ۴ سطح غلظت علف‌کش تریفلورالین (۰، ۵، ۱۵ و ۲۵ ppm) و دو سطح گابا (۰ و ۵۰۰ میکرومول بر لیتر) در ۳ تکرار انجام گرفت. تریفلورالین ۲ روز قبل از کاشت به گل‌دان‌ها اضافه شد. سه روز بعد از رشد گیاهچه‌ها، آب مقطر و محلول ۵۰۰ میکرومول بر لیتر گابا به ترتیب بر سطح برگ‌های گیاهان شاهد و تیمار اسپری شد. علف‌کش تریفلورالین بر آنزیم اورنیتین آمینوترانسفراز (OAT)، پرولین‌دهیدروژناز (PDH)، محتوای پرولین و فیتوهورمون‌های جیبرلین و سیتوکینین معنی‌دار بود. از سوی دیگر، گابا تأثیر معنی‌داری بر فعالیت PDH و محتوای پرولین و سطح جیبرلین و سیتوکینین بر جای گذاشت. با مصرف گابا، محتوای پرولین و سیتوکینین و جیبرلین به‌طور معنی‌داری افزایش یافت در حالی که فعالیت PDH ریشه و بخش هوایی با استفاده از گابا به‌طور معنی‌دار کاهش یافت. با افزایش غلظت تریفلورالین، محتوای پرولین و فعالیت OAT افزایش و میزان جیبرلین و سیتوکینین و فعالیت PDH کاهش یافت. شرایط هورمونی و بیوشیمیایی گیاهان کدو تحت سمیت علف‌کش تریفلورالین با استفاده از گابا بهبود یافت.

واژه‌های کلیدی: کدوی خورشتی، پرولین، فیتوهورمون‌ها، تریفلورالین، گاما آمینوبوتیریک اسید

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۴۴۱۴۷۱۳، پست الکترونیکی: j.khara@urmia.ac.ir

مقدمه

قرارگرفته است (۳ و ۴). تریفلورالین جزو علف‌کش‌های مهارکننده تقسیم میتوز محسوب شده که با اتصال به پروتئین توبولین در ساختمان میکروتوبول‌ها، باعث مهار تقسیم سلولی شده و از تشکیل دیواره سلولی جلوگیری می‌کند. کمپلکس توبولین- علف‌کش از پلیمریزه شدن میکروتوبول‌ها جلوگیری می‌کند. در نتیجه باعث اختلال در مرحله متافاز تقسیم میتوز می‌شود (۲۳). استفاده از علف‌کش تریفلورالین اثرات سوئی نیز بر روی گیاه زراعی دارد، برای مثال استفاده از تریفلورالین با غلظت ۱۵ تا ۲۵

گیاهان همواره تحت تأثیر عوامل زنده و غیرزنده محیط اطراف خود از جمله خاک، آب، اقلیم، مواد شیمیایی، علف‌های هرز و غیره هستند. علف‌های هرز از طریق رقابت با گیاهان زراعی باعث کاهش عملکرد گیاه می‌شوند (۳۳). کنترل شیمیایی علف‌های هرز با استفاده از علف‌کش، مؤثرترین روش کنترل علف‌های هرز است. تریفلورالین ($C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$) از جمله علف‌کش‌های از خانواده دی‌نیتروآنیلین‌ها است که از مدتها پیش برای کاهش تراکم و گسترده‌گی علف‌های هرز مورد استفاده

ppm سبب کاهش معنی‌دار رشد ریشه و ساقه و عملکرد آفتابگردان شده است (۲).

مصرف علف‌کش‌ها حتی در واریته‌های مقاوم محصولات می‌تواند با تأثیر بر مسیرهای متابولیکی و فرایندهای انتقال انرژی و همچنین ایجاد صدمات اکسیداتیو، موجب تنش شده و حتی سبب گیاه‌سوزی و مرگ شود (۵). در اثر انواع تنش‌های محیطی، الکترون‌های برانگیخته در داخل کلروپلاست و میتوکندری به مولکول اکسیژن منتقل می‌شوند و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) از جمله یون‌های سوپراکسید و پراکسیدها بخصوص هیدروژن پراکسید تشکیل می‌گردد (۲۱) که برای مولکول‌هایی مانند DNA در هسته، RNA در هسته و سیتوپلاسم، پروتئین‌های سیتوپلاسمی و حتی اندامکی و همچنین لیپیدهای غشایی بسیار سمی هستند (۱۸). تنش اکسیداتیو که یکپارچگی غشای سلولی گیاه را از بین می‌برد، زمانی ایجاد می‌شود که تولید گونه‌های فعال اکسیژن بیش از مقدار تولید آنتی‌اکسیدان‌ها باشد (۲۰).

آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنژیمی مانند پرولین، آسکوربیک اسید و گلوکاتایون سلول را در مقابل تنش اکسیداتیو حفظ می‌کنند (۴۴). علف‌کش‌های خانواده دی‌نیتروآیلین سبب افزایش محتوای هیدرکسی پرولین در دیواره سلولی گیاه بادام‌زمینی می‌شوند و برخی اسیدهای آمینه از جمله گلوتامیک اسید در ریشه و برگ افزایش می‌یابد که پیش ماده تولید اسیدهای آمینه دیگر از جمله پرولین است (۱۹). پرولین دارای توانایی حفظ و موازنه پروتئین‌ها و پایداری DNA و غشاست (۹).

گاما آمینو بوتیریک اسید (گابا) همراه با بتا آمینو بوتیریک اسید به‌عنوان اسیدهای آمینه غیرپروتئینی، برخی فعالیت‌های فیزیولوژیکی از جمله تنظیم رشد گیاه و مقاومت در برابر تنش‌ها، حفظ pH سیتوزول، تنظیم اسمزی و متابولیسم کربن و نیتروژن بر عهده دارند (۱۲). هرگاه گیاهان در معرض تنش‌های مختلف محیطی

قرارگیرند، میزان این ماده در گیاهان به‌سرعت افزایش می‌یابد (۳۸). مصرف گابا مقاومت به سرما را در هلو (*Prunus persica*) (۳۶)، مقاومت به شوری را در تنباکوی زیتنی (*Nicotiana sylvestris*) (۶) و مقاومت به خشکی را در چچم چندساله (*Lolium perenne*) (۲۵) افزایش داده است. همچنین، رشد لوله‌گرده و جهت آن به مقدار گابا در گیاهان توتون (*Nicotiana tabaccum*) بستگی دارد (۴۵).

مقدار گابا در گیاهان بسیار اندک است ولی در شرایط تنش، گیاهان جهت افزایش مقاومت خود، به‌سرعت مقدار آن را در بافت‌های رویشی افزایش می‌دهند (۲۴). مصرف آن رشد رویشی، فتوسنتز و ظرفیت تبادل گازها را افزایش می‌دهد، بیوستز کلروفیل، پاسخ‌های آنژیمی غیر آنتی‌اکسیدانی و پایداری غشاء را تحریک می‌کند (۳۰).

با توجه به اثرات نامطلوب علف‌کش تریفلورالین روی محصول، استفاده از ترکیبات و برقراری شرایطی که به نحوی میزان سمیت علف‌کش‌ها را در جهت رسیدن به محصول بهینه، کاهش دهند بسیار حائز اهمیت است. با در نظر گرفتن مقاومت محدود کدو خورشتی به بسیاری از علف‌کش‌ها و نبود اطلاعات کافی در مورد اثرات فیزیولوژیکی تریفلورالین بر کدو و نقش مصرف گابا بر تعدیل اثرات مضر این علف‌کش، مطالعه حاضر برای بررسی اثرات تریفلورالین بر برخی پارامترهای رشد و احتمال نقش حفاظتی گابا در برابر تنش ناشی از علف‌کش انجام گرفت. برای اولین بار در سال ۱۹۶۳ برای کنترل طیف وسیعی از علف‌های هرز پهن‌برگ و علف‌های هرز خانواده گرامینه در مزارع سویا، پنبه و آفتابگردان از علف‌کش تریفلورالین استفاده شده است (۲). از طرفی، مصرف گابا در گیاهان عدس تحت تنش علف‌کش با افزایش میزان گابای درونی و فعال نمودن مسیرهای آنتی‌اکسیدانی و تخفیف صدمات رادیکال‌های آزاد باعث کاهش آسیب‌های ناشی از علف‌کش شد (۴۶). هدف از

رشد با دمای شبانه میانگین ۱۸ و دمای روزانه ۳۰ درجه، رطوبت نسبی ۷۰ تا ۸۰ درصد و دوره نوری ۱۶:۸ (شب : روز) قرار گرفتند. گیاهان در طی دو هفته اول با آب مقطر و از هفته سوم به بعد، به صورت یک روز در میان با محلول غذایی هوگلند تغذیه شدند. در ابتدای هفته ششم، آنالیزهای رشدی و بیوشیمیایی گیاهان بعد از تفکیک اندام هوایی و ریشه انجام گرفت.

محتوای جیبرلین (GA₃) و سیتوکینین (۶- بنزیل آمینو پورین) با استفاده از کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC) تعیین شد. استاندارد GA₃ و ۶- بنزیل آمینوپورین از شرکت سیگما (St. Louis, MO, USA) تهیه شد. برای استخراج هورمون‌ها بر روی ۱۰ گرم از نمونه‌ها، ۱۰ میلی‌لیتر استونیتریل اسیدی شده (محلول ۱٪ اسیداستیک در استونیتریل) اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۲ دقیقه همگن شد. ۴ گرم سولفات منیزیم و ۱/۵ گرم استات سدیم افزوده شد و به مدت ۱ دقیقه لوله‌ها در ورتکس قرار داده شدند. بعد به مدت ۳ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفوژ شدند. ۲ میلی‌لیتر از مایع رویی در لوله‌های ۲ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی‌گرم سوربنت C18 و ۱۵۰ میلی‌گرم انهدرید سولفات منیزیم ریخته شد. لوله‌ها ابتدا به مدت ۱ دقیقه ورتکس و بعد به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۶۰۰۰ سانتریفوژ شدند. محلول رویی از فیلترهایی با منافذ ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای انجام آنالیز نگهداری شد (۴۷).

برای تعیین میزان پرولین از روش بیتس و همکاران (۱۹۷۲) (۱۳) استفاده شد. ۰/۰۴ گرم از بافت خشک ریشه‌ها و اندام هوایی همراه با ۱۵ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد ساییده شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴ درجه یخچال نگهداری شد تا اسید آمینه پرولین آزاد شود. بعد هموژنات در ۳۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی با ۲ میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال و ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین مخلوط شد و به مدت یک ساعت

این تحقیق، سنجش هورمون‌های جیبرلین (GA₃) و سیتوکینین (۶- بنزیل آمینوپورین) جهت ردیابی توازن هورمونی و ارزیابی فعالیت آنزیم‌های اورنیتین آمینوترانسفراز (OAT) و پرولین دهیدروژناز (PDH) به منظور تعیین اثرات تریفلورالین و گابا روی توازن هورمونی و مسیر بیوسنتز پرولین (به‌عنوان یکی از تنظیم‌کننده‌های اسمزی در گیاهان تحت تنش) می‌باشد. در صورت نتیجه‌بخش بودن این ایده شاید بتوان با کاربرد گابا، وضعیت بیوشیمیایی و هورمونی گیاه کدو خورشتی را در تنش تریفلورالین بهبود بخشید و غلظت مؤثری از علف‌کش را یافت که با وجود کنترل مناسب علف‌های هرز، تأثیر سمی بر گیاه نداشته باشد.

مواد و روشها

آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۴ سطح غلظت علف‌کش تریفلورالین (۰، ۵، ۱۵ و ۲۵ ppm) و دو سطح گابا (۰ و ۵۰۰ میکرومول بر لیتر) در ۳ تکرار به صورت گلدانی انجام شد. ۲۴ گلدان با قطر ۱۲ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر در محلول تجاری وایتکس ضد عفونی شده و با پنبه آغشته به الکل استریل شدند. خاک گلدان‌ها عبارت از ماسه شسته و استریل شده دراتوکلاو بود. تا حدود ۳ سانتی‌متری لبه گلدان‌ها پر شد. سپس غلظت‌های مختلف علف‌کش تریفلورالین ۲ روز قبل از کاشت به گلدان‌ها اضافه شد. بذره‌های کدو خورشتی (*Cucurbita pepo cv.* Shiraz Hybrid F1) با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه ضد عفونی سطحی شد. سپس، بذرها با آب مقطر به طور کامل شسته شدند. بذره‌های کدو داخل یک پارچه تمیز به مدت سه روز در شرایط رطوبت کافی قرار داده شدند تا این‌که ریشه‌چه بذرها به طول ۲ میلی‌متر ظاهر شدند. در گلخانه، بر سطح گیاهچه‌های چهار برگچه‌ای (هفت روزه) بدون تیمار و تیمار با گابا به ترتیب آب مقطر و محلول ۵۰۰ میکرومول بر لیتر گابا پاشیده شد. گلدان‌ها طی دوره رشد ۵ هفته‌ای در اتاقک

(شرکت Shimadzu، ژاپن) در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

برای تهیه عصاره گیاهی و سنجش میزان فعالیت آنزیم OAT از روش سانچز و همکاران (۳۵) با اندکی تغییرات استفاده شد. ۵ گرم از بافت تر ریشه و اندام هوایی به‌طور مجزا از کلیه تیمارها و تکرارها به داخل هاون سرد منتقل شد. بافت‌های موجود در هاون توسط ۱ میلی‌لیتر بافر (شامل بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۵ مولار با pH ۷/۹ EDTA، ۱ میلی‌مولار و گلیسرول ۱۵٪ حجمی) و ۲-مرکاپتول ۱۰ میلی‌مولار، ساییده شد و عصاره بدست آمده در لوله‌های آزمایشی با نیروی ۱۵۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. بر روی محلول روئی، ۲ میلی‌لیتر سولفات آمونیوم ۶۰ درصد اضافه شد و این محلول به‌عنوان عصاره خام برای اندازه‌گیری فعالیت OAT مورد استفاده قرار گرفت. بر روی ۲ میلی‌لیتر بافر (شامل بافر تریس -HCl ۰/۲ مولار با pH ۷/۸، اورنیتین ۴۶/۸ میلی‌مولار و α - کتوگلو تارات ۱۲/۵ میلی‌مولار و NAD^+ ۰/۱۲۵ میلی‌مولار) ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استخراجی افزوده شد. فعالیت آنزیم از طریق احیا شدن NAD^+ با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV/visible (S2100-WPA) (شرکت Shimadzu، ژاپن) در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

جهت آنالیز کمی فیتوهورمون‌های جیبرلین و سیتوکینین برگی، از سیستم کروماتوگرافی Agilent1100 مجهز به گاززدا (Degasser) به همراه پمپ چهارتایی و دتکتور (DAD) آرایه دیودی و همراه شیر تزریق Rheodyne مدل (i) ۷۷۲۵ و ستون XDB-C18 به طول ۱۰۰ میلی‌متر و قطر ۴/۶ میلی‌متر و نرم‌افزار Chemstation استفاده شد. برای جداسازی جیبرلین و سیتوکینین از ستون XDB-C18 به طول ۱۰۰ میلی‌متر و قطر ۴/۶ میلی‌متر استفاده شد. جهت سنجش جیبرلین و سیتوکینین، به ترتیب از استاندارد GA_3 و ۶- بنزیل آمینوپورین شرکت سیگما استفاده شد. در

در بن‌ماری در حال جوش قرارگرفت. لوله‌های آزمایش بعد از خروج از بن‌ماری در آب یخ قرارگرفتند و بعد ۴ میلی‌لیتر تولوئن به هر لوله اضافه و به هم زده شد تا دو فاز جداگانه ایجاد گردد. میزان جذب در ۵۲۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و محتوای پرولین برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک تعیین شد. برای محاسبه میزان پرولین نمونه‌ها، منحنی استاندارد تعیین غلظت پرولین (در محدوده غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر) ترسیم شده معادله خطی ($y = 0.2173x + 0.007$) به‌دست‌آمده برای تعیین غلظت‌های مجهول پرولین مورد استفاده قرارگرفت.

جهت اندازه‌گیری آنزیم پرولین دهیدروژناز، برای تهیه عصاره گیاهی از روش لویز-کاریون (۲۰۰۸) (۲۸) با اندکی تغییرات استفاده شد. ۵ گرم از بافت تر هر دو اندام ریشه و هوایی به‌طور مجزا از کلیه تیمارها و تکرارها وزن شد و به داخل هاون سرد (داخل آب یخ) بود منتقل شد. بافت‌های موجود در هاون توسط ۱ میلی‌لیتر بافر شامل (بافر تریس -HCl ۰/۰۵ مولار با pH ۷/۴، $MgCl_2$ ۷ میلی‌مولار، HCl ۰/۶ مولار، EDTA ۳ میلی‌مولار، دی تیوتیتول ۱ میلی‌مولار، پلی وینیل پیرولیدین ۵٪ (وزنی-حجمی) ساییده شد. هموژن بدست آمده توسط کاغذ صافی فیلتر شد. محلول حاصل از فیلتر، با نیروی ۳۹۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس، محلول روئی با استفاده از ستون سفادکس ۲۵-G نمک‌گیری شده و با ۱ میلی‌لیتر بافر (شامل بافر تریس HCl ۰/۰۵ مولار با pH ۷/۴ و گلیسرول ۱۰٪ حجمی) رقیق شد. محلول حاصل به‌عنوان عصاره خام برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پرولین دهیدروژناز مورد استفاده قرارگرفت. به این ترتیب که بر روی ۲/۵ میلی‌لیتر بافر (شامل Na_2CO_3 -HCl ۰/۱۵ مولار با pH ۱۰/۳ و پرولین ۲/۶۷ میلی‌مولار و NAD^+ ۱۰ میلی‌مولار) ۰/۳ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی استخراج شده افزوده شد و بعد فعالیت آنزیم از طریق احیاء شدن NAD^+ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (s210-WPA) UV/visible

برای آماده‌سازی نمونه‌ها جهت انجام HPLC، بر روی ۱۰ گرم از نمونه‌ها، ۱۰ میلی‌لیتر استونیتریل اسیدی شده (۱٪ اسیداستیک در استونیتریل) اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۲ دقیقه هم‌وزن شد. ۴ گرم سولفات منیزیم و ۱/۵ گرم استات سدیم افزوده شد و به مدت ۱ دقیقه لوله‌ها در ورتکس قرار داده شدند. بعد به مدت ۳ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفوژ شدند. ۲ میلی‌لیتر از مایع رویی در لوله‌های ۲ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی‌گرم سوربنت C₁₈ و ۱۵۰ میلی‌گرم انهیدرید سولفات منیزیم ریخته شد. لوله‌ها ابتدا به مدت ۱ دقیقه ورتکس و بعد به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۶۰۰۰ سانتریفوژ شدند. محلول رویی از فیلترهایی با منافذ ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شد و در دمای ۴°C برای انجام آنالیز نگهداری شد. طول موج برای جیبرلین ۲۰۶ نانومتر و برای ۶- بنزیل آمینوپورین ۲۷۰ نانومتر در نظر گرفته شد.

کلیه محاسبات آماری با استفاده از آزمون توکی و دانکن و نرم‌افزار SPSS Version 22 و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام گرفت.

نتایج

تغییرات فعالیت آنزیم اورنیتین‌آمینوترانسفراز (OAT): نتایج حاصل از تجزیه واریانس حاکی بود که گابا تأثیر معنی‌داری بر فعالیت OAT در ریشه و بخش هوایی ندارد، در حالی که تأثیر غلظت‌های مختلف علف‌کش تریفلورالین بر آنزیم OAT در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی‌دار بود (جدول ۱).

تمامی آزمایش‌ها از آب دیونیزه استفاده گردید. برای جداسازی GA₃ و ۶- بنزیل آمینوپورین از روش بهاللا و همکاران (۱۵) با اندکی تغییر استفاده گردید. جداسازی طبق برنامه شویش گرادیان در HPLC، توسط دو حلال A شامل ترکیب استات آمونیوم ۵ میلی‌مولار در اسید فرمیک ۰/۰۵ درصد و حلال B شامل استونیتریل بود. فاز متحرک برای سنجش GA₃، استونیتریل و آب‌اسیدی (اسید فسفریک ۰/۰۱ درصد) با نسبت ۶۰:۴۰ (۶۰ قسمت استونیتریل و ۴۰ قسمت آب اسیدی) و فاز متحرک برای سنجش ۶- بنزیل آمینوپورین، استات آمونیوم ۵ میلی‌مولار در اسید فرمیک ۰/۰۵ درصد در آب با نسبت ۶۰:۴۰ (۶۰ قسمت استات آمونیوم و ۴۰ قسمت آب اسیدی) مورد استفاده قرارگرفت. حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر و سرعت جریان ۰/۶ میلی‌لیتر در دقیقه و دمای ستون به میزان ۳۵°C تنظیم گردید.

برای آماده‌سازی استانداردها برای به دست آوردن پیک استاندارد، به میزان ۱ میلی‌گرم از هرکدام از ترکیبات در بالن ۱۰ میلی‌لیتر توسط استونیتریل حل شد و حجم حاصل به‌عنوان محلول استوک شامل ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از هرکدام از ترکیبات تهیه شد. ۱ میلی‌لیتر از این محلول استوک در بالن ۱۰ میلی‌لیتری با استونیتریل به حجم رسانده شد. این محلول ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ترکیبات مذکور را شامل می‌شود که با چندین بار رقیق‌سازی محلول ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر از جیبرلین و ۶- بنزیل آمینوپورین به دست آمد. حدود ۲۰ میکرولیتر به دستگاه تزریق شد تا منحنی استاندارد حاصل شود. سپس،

جدول ۱- تجزیه واریانس فعالیت آنزیم‌های اورنیتین‌آمینوترانسفراز و پرولین دهیدروژناز در تیمارهای علف‌کش و گابا

آنزیم پرولین‌دهیدروژناز (PDH)		آنزیم اورنیتین‌آمینوترانسفراز (OAT)		df	منبع تغییرات
بخش هوایی	ریشه	بخش هوایی	ریشه		
۱۴۸/۲۰۷**	۱۴۰/۸۳۹**	۴۸۹/۵۲۵**	۸۳۵/۸۰۰**	۳	عامل غلظت علف‌کش
۷/۶۷۳**	۹/۵۲۶**	۱۰/۴۵۴ ^{ns}	۹/۳۰۰ ^{ns}	۱	عامل (گابا)
۰/۰۰۶ ^{ns}	۰/۰۳۶ ^{ns}	۰/۴۱۶ ^{ns}	۰/۰۴۹ ^{ns}	۳	اثرات متقابل دو عامل
۰/۰۸۱	۰/۱۸۷	۳/۸۴۱	۶/۹۷۴	۱۶	خطا

ns به معنی عدم تأثیر تیمارها است و علامت ** به معنی تأثیر معنی‌دار تیمارها در سطح احتمال ۰/۰۱ است.

بقیه جدول ۱

df		میانگین مربعات		منبع تغییرات	
		پرویلین			
GA ₃	۶-آمینوبنزیل پورین	بخش هوایی	ریشه		
۱۲/۵۵۳**	۷۰/۹۸۹**	۰/۱۶۵**	۰/۱۸۱**	۳	عامل غلظت علف‌کش
۲۵/۸۵۵**	۱۸۴/۰۳۹**	۰/۰۷۴*	۰/۰۲۲**	۱	عامل گابا
۶/۵۴۴**	۳۲/۴۲۸**	۰/۰۰۳ ^{ns}	۰/۰۱۰*	۳	اثرات متقابل دو عامل
۰/۰۶۹	۰/۱۳۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۱۶	خطا

داده‌ها نشانگر میانگین سه تکرار \pm SE بوده و علامت‌های * و ** به ترتیب به معنی تأثیر معنی‌دار تیمارها در سطوح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ است. همچنین عدم اختلاف معنی‌دار با ns نشان داده شده است.

جدول ۲- مقایسه میانگین محتوای پرویلین و فعالیت آنزیم‌های اورنیتین آمینوترانسفراز و پرویلین دهیدروژناز در گیاه کدو خورشتی تحت تیمار با گابا

پرویلین بخش هوایی (mgg ⁻¹ DW)		آنزیم اورنیتین آمینوترانسفراز (OAT) (U/mg protein)		آنزیم پرویلین دهیدروژناز (PDH) (U/mg protein)		تیمار
		بخش هوایی	ریشه	بخش هوایی	ریشه	
۰/۴۵۵±۰/۱۷۱ ^b	۳۸/۵۵±۱۰/۹۵ ^a	۳۷/۱۲±۸/۵۰ ^a	۲۶/۷۳±۴/۴۶۶ ^a	۲۶/۳۵±۴/۴۸۷ ^a	۲۵/۲۱±۴/۵۱۷ ^b	بدون گابا
۰/۵۶۵±۰/۱۳۴ ^a	۳۹/۸۰±۱۰/۸۷ ^a	۳۸/۴۴±۸/۱۷۷ ^a	۲۵/۴۷±۴/۳۲۹ ^b			با گابا

داده‌ها نشانگر میانگین سه تکرار \pm SE بوده و حروف غیرمشترک در هر ستون، اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهند.

جدول ۳- مقایسه میانگین محتوای پرویلین و فعالیت آنزیم‌های اورنیتین آمینوترانسفراز و پرویلین دهیدروژناز در گیاه کدو خورشتی تحت تیمار با غلظت‌های مختلف علف‌کش تریفلورالین

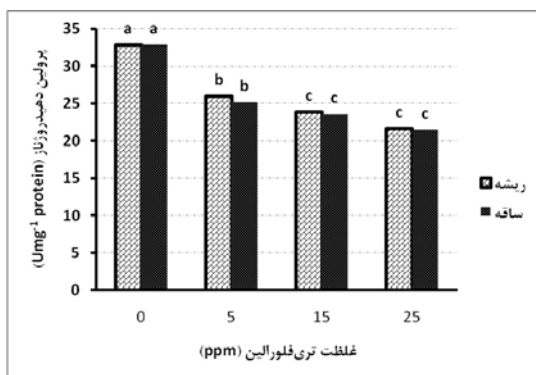
پرویلین بخش هوایی (mgg ⁻¹ DW)		آنزیم اورنیتین آمینوترانسفراز (OAT) (U/mg protein)		آنزیم پرویلین دهیدروژناز (PDH) (U/mg protein)		غلظت علف‌کش (ppm)
		بخش هوایی	ریشه	بخش هوایی	ریشه	
۰/۲۶۸±۰/۰۹۸ ^d	۲۲/۷۵±۲/۰۰۳ ^c	۲۷/۳۳±۱/۷۶۸ ^c	۳۲/۸۸±۰/۹۰۹ ^a	۳۲/۸۹±۰/۶۵۷ ^a	۲۱/۵۱±۰/۶۵۵ ^d	۰
۰/۵۴۵±۰/۰۶۲ ^c	۳۸/۴۵±۴/۳۵۴ ^b	۳۳/۲۱±۳/۲۲۵ ^b	۲۵/۹۷±۰/۷۲۴ ^b	۲۵/۱۶±۰/۷۵۰ ^b		۵
۰/۵۸۸±۰/۰۵۷ ^b	۴۷/۲۲±۰/۸۲۷ ^a	۴۴/۳۷±۰/۷۷۴ ^a	۲۳/۸۹±۰/۷۳۴ ^c	۲۳/۵۶±۰/۶۱۱ ^c		۱۵
۰/۶۴۰±۰/۰۵۱ ^a	۴۸/۲۸±۰/۷۳۸ ^a	۴۶/۲۲±۰/۷۰۸ ^a	۲۱/۶۸±۰/۷۹۵ ^d			۲۵

داده‌ها نشانگر میانگین سه تکرار \pm SE بوده و حروف غیرمشترک در هر ستون، اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهند.

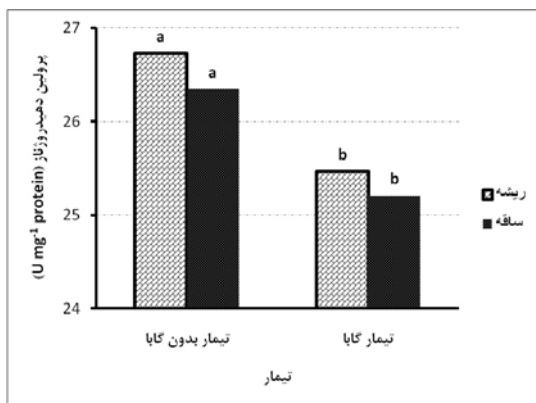
غلظت ۲۵ ppm تریفلورالین به ترتیب ۲۷/۳ و ۲ U/mg protein ۴۶/۲ اندازه‌گیری شد. از سوی دیگر، تأثیر گابا بر فعالیت آنزیم OAT ریشه و بخش هوایی قابل ملاحظه نبود و با مصرف گابا، فعالیت این آنزیم افزایش جزئی نشان داد، در حالی که با مصرف تریفلورالین، فعالیت آن در ریشه بیش از ۲ برابر افزایش یافت.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان داد استفاده از تریفلورالین سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم OAT ریشه و بخش هوایی گیاه کدوی خورشتی می‌شود. فعالیت آنزیم OAT ریشه و بخش هوایی متناسب با افزایش غلظت تریفلورالین، به‌طور معنی‌دار افزایش یافت (جدول های ۲ و ۳). فعالیت آنزیم OAT ریشه در گیاهان شاهد ۲۲/۷۵ و در غلظت ۲۵ ppm تریفلورالین، حدود U/mg protein ۴۸/۳ بود. همچنین، فعالیت OAT بخش هوایی در حضور

با شاهد کاهش یافت. طبق نتایج حاضر، PDH ریشه و بخش هوایی با استفاده از گابا به‌طور معنی‌دار در مقایسه با شاهد کاهش یافت. در مقایسه با اثرات تریفلورالین، تیمار گابا منجر به تغییرات کمتری در فعالیت PDH ریشه و اندام هوایی شد.

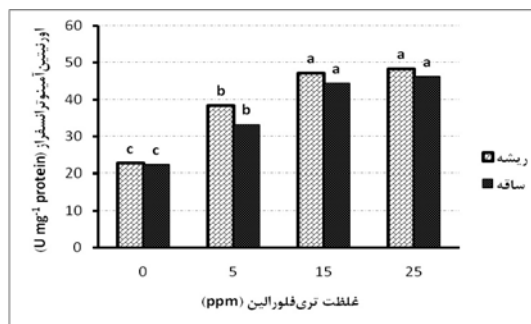


شکل ۳- مقایسه میانگین تأثیر علف‌کش تریفلورالین بر میزان پروتئین دهیدروناز ریشه و اندام هوایی کدو خورشیدی. داده‌ها نشانگر میانگین سه تکرار \pm SE بوده و حروف لاتین غیرمشابه نشانگر معنی‌دار بودن ($P \leq 0.01$) می‌باشد.

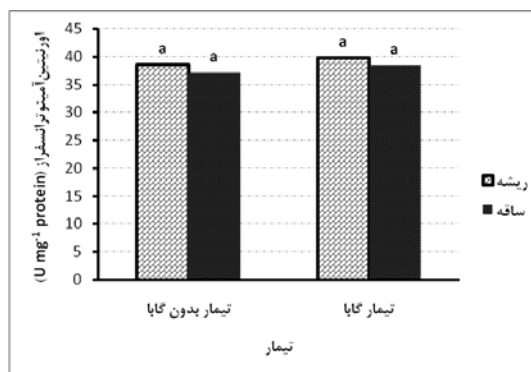


شکل ۴- مقایسه میانگین تأثیر گاما آمینوبوتیریک اسید بر میزان پروتئین دهیدروناز ریشه و بخش هوایی کدو خورشیدی. داده‌ها نشانگر میانگین سه تکرار \pm SE بوده و حروف لاتین غیرمشابه نشانگر معنی‌دار بودن ($P \leq 0.01$) می‌باشد.

تغییرات میزان پروتئین: آنالیز آماری داده‌ها، افزایش محتوای پروتئین را در گیاهان تیمار شده با گابا و گیاهان فاقد گابا، همراه با افزایش غلظت تریفلورالین نشان داد. این تفاوت بین سطوح غلظت، در سطح احتمال ۱ درصد



شکل ۱- مقایسه میانگین تأثیر علف‌کش تریفلورالین بر فعالیت اورنیتین آمینوترانسفراز ریشه و بخش هوایی کدو خورشیدی. داده‌ها نشانگر میانگین سه تکرار \pm SE است. حروف لاتین غیر مشابه نشانگر معنی‌دار بودن ($P \leq 0.01$) می‌باشد.

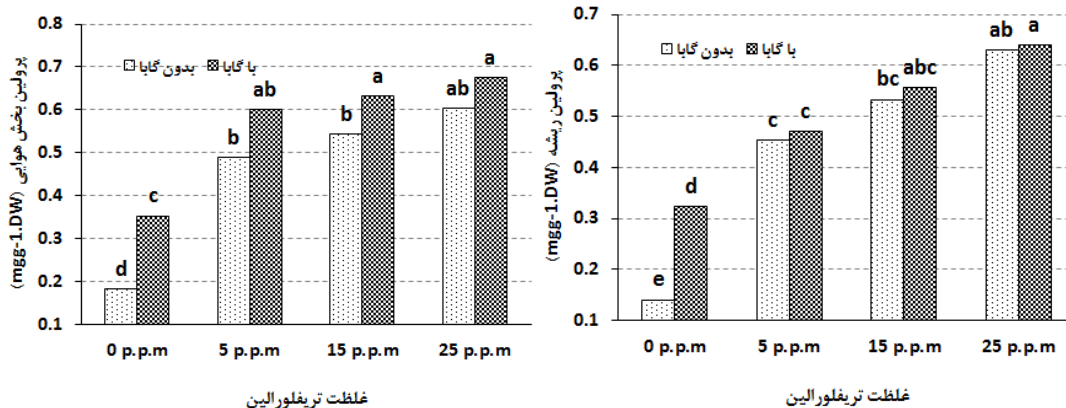


شکل ۲- مقایسه میانگین تأثیر گاما آمینوبوتیریک اسید بر فعالیت اورنیتین آمینوترانسفراز ریشه و اندام هوایی کدو خورشیدی. داده‌ها نشانگر میانگین سه تکرار \pm SE بوده و حروف لاتین غیرمشابه نشانگر معنی‌دار بودن ($P \leq 0.01$) می‌باشد.

تغییرات فعالیت آنزیم پروتئین دهیدروناز (PDH): نتایج حاصل از تجزیه واریانس حاکی است که تأثیر گابا و غلظت‌های مختلف علف‌کش تریفلورالین بر آنزیم PDH ریشه و بخش هوایی در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی‌دار است (جدول ۱). میزان این آنزیم در ریشه و بخش هوایی به‌تناسب افزایش غلظت تریفلورالین، به‌طور معنی‌دار کاهش یافت (جدول‌های ۲ و ۳). مقدار آن در ریشه شاهد ۳۲/۸۸ و در تیمار ۲۵ ppm تریفلورالین حدود ۳۲/۹ U/mg protein بود. به‌علاوه، مقدار این آنزیم به ترتیب در اندام هوایی شاهد و در تیمار ۲۵ ppm تریفلورالین، ۲۱/۶۸ و ۲۱/۵۱ U/mg protein بود و بیش از ۱/۵ برابر در مقایسه

معنی‌دار بود. گیاهان تیمار شده با گابا از محتوای پرولین بیشتری نسبت به فاقد تیمار برخوردار بودند و آنالیز آماری داده‌ها مربوط به محتوای پرولین ریشه، اختلاف معنی‌داری

را بین گیاهان شاهد و گیاهان تیمار شده با گابا نشان داد.



شکل ۵ - مقایسه میانگین تأثیر گابا بر میزان پرولین ریشه و بخش هوایی در غلظت‌های مختلف تریفلورالین در گیاه کدو خورشتی. داده‌ها نشانگر میانگین سه تکرار \pm SE بوده و حروف لاتین غیرمشابه نشانگر معنی‌دار بودن ($P \leq 0.01$) می‌باشد.

جدول ۴ - مقایسه میانگین محتوای پرولین، ۶- بنزیل آمینوپورین و GA_3 در حضور و غیاب گابا و غلظت‌های مختلف تریفلورالین در کدو خورشتی

بیرلین (ng g ⁻¹ FW)	سیتوکینین (pmol g ⁻¹ FW)	پرولین (mg g ⁻¹ DW)		تیمار	غلظت علف‌کش (ppm)
		بخش هوایی	ریشه		
۱۲/۸۰±۰/۰۰۲ ^{bc}	۱۹/۵۵±۰/۰۰۱ ^d	۰/۱۸۳±۰/۰۴۵ ^d	۰/۱۴۰±۰/۰۲۸ ^e	بدون گابا	۰
۱۸/۰۰±۰/۱۰۰ ^a	۳۲/۰۳±۰/۰۶۴ ^a	۰/۳۵۳±۰/۰۲۱ ^c	۰/۳۲۳±۰/۰۲۱ ^d	با گابا	
۱۲/۴۱±۰/۰۴۷ ^{cd}	۱۸/۶۸±۰/۱۷۰ ^d	۰/۴۹۰±۰/۰۱۷ ^b	۰/۴۵۳±۰/۰۳۵ ^a	بدون گابا	۵
۱۳/۲۲±۰/۰۶۹ ^b	۲۲/۰۹±۰/۰۹۰ ^b	۰/۶۰۰±۰/۰۱۷ ^{ab}	۰/۴۷۰±۰/۰۴۵ ^c	با گابا	
۱۲/۰۹±۰/۱۰۰ ^{de}	۱۷/۳۰±۰/۱۷۳ ^e	۰/۵۴۳±۰/۰۳۵ ^b	۰/۵۳۳±۰/۰۲۰ ^{bc}	بدون گابا	۱۵
۱۳/۲۶±۰/۰۳۷۹ ^b	۲۰/۹۹±۰/۰۸۵۳ ^c	۰/۶۳۳±۰/۰۳۲ ^a	۰/۵۵۶±۰/۰۶۶ ^{abc}	با گابا	
۱۱/۶۲±۰/۰۵۴۱ ^e	۱۶/۷۴±۰/۰۲۷۴ ^e	۰/۶۰۳±۰/۰۱۱ ^{ab}	۰/۶۳۰±۰/۰۲۰ ^{ab}	بدون گابا	۲۵
۱۲/۷۴±۰/۰۲۲۳ ^{bc}	۱۹/۳۱±۰/۰۴۲۷ ^c	۰/۶۷۶±۰/۰۴۹ ^a	۰/۶۴۶±۰/۰۸۳ ^a	با گابا	
۰/۶۰۳	۰/۸۶۶	۰/۱۰۶	۰/۱۰۶	LSD ($\alpha=0.01$)	

داده‌ها نشانگر میانگین سه تکرار \pm SE بوده و حروف غیرمشترک در هر ستون، اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.01$) را نشان می‌دهند.

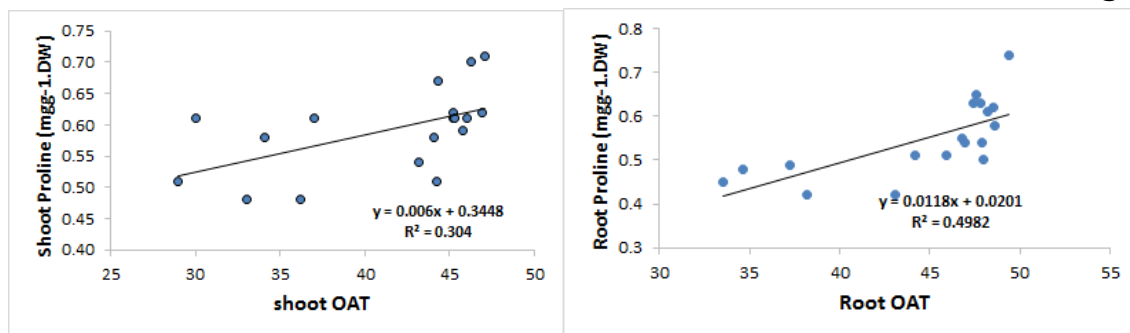
از سوی دیگر، همبستگی بین غلظت OAT ریشه و اندام هوایی گیاه با مقدار PDH معکوس بوده و با وجود اختلاف اندک، معنی‌دار بود به طوری که با افزایش مقدار OAT مقدار PDH کاهش یافت (شکل ۷).

فیتوهورمون‌های جیبرلین و سیتوکینین: نتایج حاصل از تجزیه واریانس حاکی است که تأثیر گابا و غلظت‌های

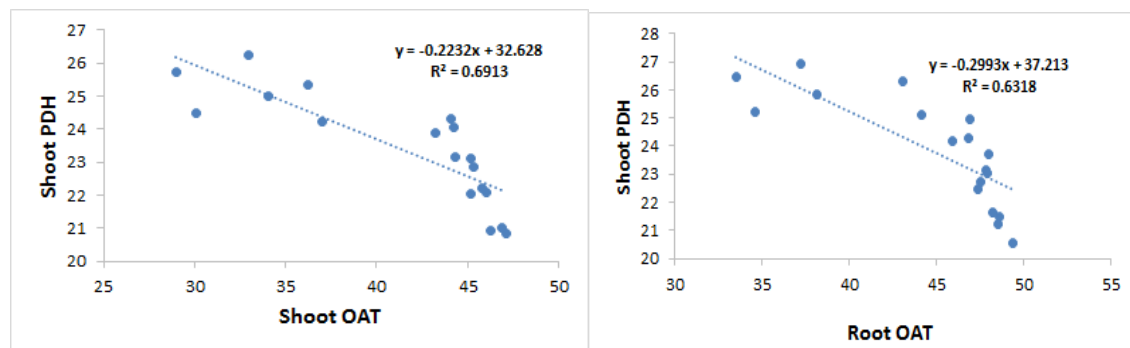
همبستگی آنزیم‌های پرولین دهیدروژناز و اورنیتین آمینوترانسفراز با پرولین ریشه و بخش هوایی: همبستگی بین غلظت OAT بخش هوایی و ریشه گیاه با مقدار پرولین اندام هوایی مثبت و معنی‌دار بود یعنی با افزایش مقدار این آنزیم، مقدار پرولین نیز افزایش یافت (شکل ۶).

غلظت‌های تریفلورالین، محتوای ۶- بنزیل آمینوپورین و GA₃ در گیاهان تیمار شده با گابا به‌طور معنی‌دار در مقایسه با شاهد افزایش یافت.

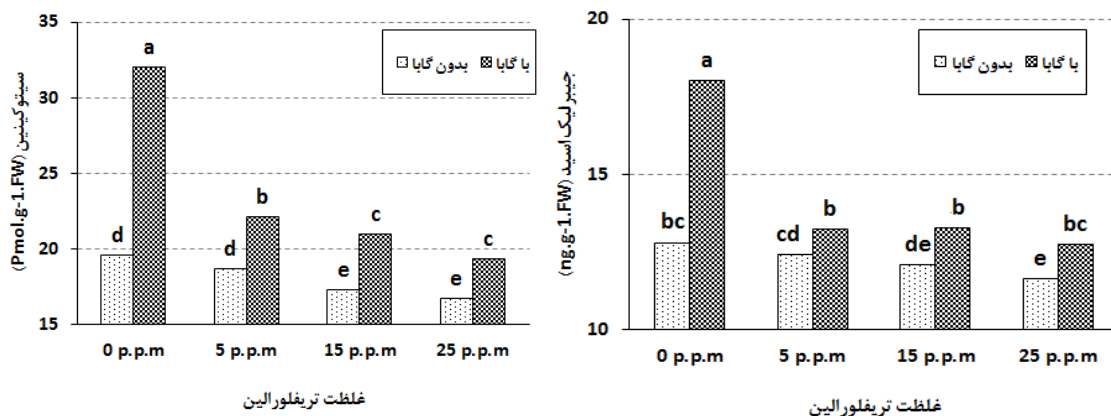
مختلف تریفلورالین بر فیتوهورمون‌های GA₃ و ۶-بنزیل آمینوپورین در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی‌دار بود. اثرات متقابل بین گابا و غلظت علف‌کش برای این دو ماده در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). در تمامی



شکل ۶- همبستگی فعالیت آنزیم اورنیتین آمینوترانسفراز با محتوای پرولین اندام هوایی و ریشه کدو خورشتی



شکل ۷- همبستگی فعالیت آنزیم اورنیتین آمینوترانسفراز با پرولین دهیدروژناز در کدوی خورشتی



شکل ۸- محتوای سیتوکینین و جیبرلیک اسید ریشه و بخش هوایی در حضور و غیاب گابا و غلظت‌های مختلف تریفلورالین در کدو خورشتی

سنتر پرولین از قبیل OAT و پرولین ردوکتاز می‌شود و در نتیجه پرولین در گیاه افزایش می‌یابد (۳۱). در راستای نتایج این پژوهش، Shang و همکاران (۳۶) نیز گزارش

بحث

در رابطه با افزایش مشاهده شده در فعالیت OAT، گفته می‌شود که تنش سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های درگیر در

فسفولیپاز D عنوان شده است (۲۶). این آنزیم اثر تنظیم‌کنندگی منفی روی بیوسنتز پرولین دارد.

مشاهده شد که پرولین ریشه و بخش هوایی به تناسب افزایش غلظت تریفلورالین افزایش یافته است. نتایج این تحقیق با نتایج دورگشا (۱۹۹۳) (۱۹) مطابقت داشت. وی دریافت که تیمار فلوکلورالین از علف‌کش‌های خانواده دی نیتروآیلین سبب افزایش محتوای هیدرکسی پرولین در دیواره سلولی گیاه بادام زمینی می‌شود. گلوتامیک اسید، اولین اسید آمینه‌ای است که در فرآیند آمیناسیون تشکیل می‌شود و می‌تواند پیش ماده تولید اسیدهای آمینه دیگر از جمله پرولین باشد. افزایش مقدار اسیدهای آمینه ممکن است به دلیل کاهش سنتز پروتئین‌ها و تحریک بیوسنتز اسیدهای آمینه و پروتئولیز پروتئین‌ها باشد (۱). همچنین این نتایج با نتایج مرادبیگی و خارا (۱۳۹۰) (۲) مطابقت داشت که در آن با افزایش غلظت تریفلورالین، محتوای پرولین و اسیدهای آمینه آزاد در ریشه و اندام هوایی آفتابگردان افزایش یافته است.

به‌طور کلی، تجمع پرولین در شرایط تنش ممکن است به دلیل تحریک سنتز آن و یا جلوگیری از تجزیه آن و یا تجزیه پروتئین‌ها باشد (۲۲). به‌علاوه، افزایش فعالیت آنزیم‌های درگیر در سنتز پرولین از قبیل OAT و پرولین ردوکتاز و جلوگیری از فعالیت آنزیم پرولین کاتابولاز می‌تواند سبب افزایش میزان پرولین شود (۳۱). در گیاهان، پرولین از طریق گلوتامات یا اورنیتین و با فعالیت آنزیم‌های P5CS و OAT سنتز می‌گردد. تجمع پرولین در نتیجه تنش‌های محیطی ممکن است از روش‌های زیر انجام گیرد: الف) تنش سبب تحریک سنتز پرولین از گلوتامات شود. ب) در اثر کاهش فعالیت پرولین دهیدروژناز توسط گابا به‌صورت پس‌خور منفی، مسیر تجزیه متوقف شده و با فعال شدن OAT مسیر سنتز پرولین تحریک شود ج) کاهش اکسیداسیون پرولین به کاهش ورود آن به ساختار پروتئین‌ها منجر شود (۹).

کرده‌اند که تیمار پس از برداشت میوه هلو با گابا سبب افزایش OAT و کاهش فعالیت PDH در میوه می‌گردد. معلوم شده گابا مقدار گلوتامات و اورنیتین را بالا برده، در نتیجه میزان پرولین افزایش می‌یابد (۲۷).

در زمان مواجهه گیاه با تنش، بیان ژن کدکننده آنزیم پرولین-۵- کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) افزایش یافته و مانع بیان ژن PDH و کاهش آن در بافت گیاه می‌شود (۳۲). از آنچه که مشاهده شد به نظر می‌رسد تریفلورالین به‌عنوان تنش فعالیت PDH را کاهش داده و در این شرایط پرولین در گیاه تجمع می‌یابد. این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر و نتایج بدست آمده توسط شانگ و همکاران (۲۰۱۱) (۳۶) مطابقت داشت. آنها نشان داده‌اند تیمار گابا در میوه هلو، با کاهش میزان تخریب لیپیدها و پروتئین‌ها و با تجمع پرولین و تنظیم متابولیسم، تحمل گیاه را در مقابل تنش‌های محیطی افزایش می‌دهد.

طبق نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها، مقدار پرولین ریشه و بخش هوایی با استفاده از گابا افزایش یافت. مصرف این ماده با افزایش ظرفیت تبادل گازها و بیوسنتز کلروفیل، میزان فتوسنتز و رشد مورفولوژیکی گیاه را بهبود می‌بخشد و پاسخ‌های آنزیمی و غیرآنتی‌اکسیدانی و پایداری غشا را نیز فعال می‌کند (۳۰). افزایش مقدار پرولین از طریق بیان زیاد ژن بیوسنتز پرولین (P5CS) (۳۵)، آزاد شدن یون کلسیم و فعال‌سازی پروتئین کیناز C (۲۴)، افزایش مقدار گلوتامات و اورنیتین (۲۷) و افزایش فعالیت OAT، گلوتامات دکربوکسیلاز (GAD) و پرولین-۵- کربوکسیلات دهیدروژناز (۳۶) صورت می‌گیرد. تیمار پس از برداشت میوه هلو با گابا سبب افزایش OAT و P5CS و کاهش فعالیت PDH در این میوه و موجب افزایش قابل‌ملاحظه میزان پرولین می‌گردد (۳۶). با این حال، برخلاف نتایج این تحقیق، مقدار پرولین در گیاهان *Agrostis stolonifera* و *Arabidopsis* تحت تیمار با گابا تحت تنش گرما کاهش یافته که دلیل آن فعال شدن

در تمامی غلظت‌های تریفلورالین، سیتوکینین و جیبرلیک اسید با استفاده از گابا به‌طور معنی‌دار در مقایسه با شاهد افزایش یافت. بنابراین با استفاده از گابا می‌توان اثرات منفی تریفلورالین را بر سیتوکینین متعادل ساخت. این نتایج با یافته‌های القراوی و همکاران (۲۰۱۴) (۷) مطابقت داشت که در آن استفاده از گابا در شرایط تنش شوری سبب شد مقدار هورمون‌هایی مانند IAA، JBA، GA₁ و GA₄ به ترتیب به مقدار ۳۸/۶، ۱۳/۳، ۲۴ و ۶۱/۱ درصد افزایش یابد. همچنین شی و همکاران (۲۰۱۰) (۳۸) نشان داده‌اند که گابا در سنتز هورمون‌ها نیز نقش دارد. از طرف دیگر، حجاز و همکاران (۲۰۱۸) (۴۸) گزارش داده‌اند که کاربرد خارجی گابا میزان بسیاری ترکیبات از جمله برخی فیتوهورمون‌ها (شامل اسید سالیسیلیک، ترانس جاسمونیک اسید، ایندول استیک اسید، و آبسزیک اسید) را افزایش داده است. آنها دریافتند که در پرتقال (*Citrus sinensis*) گابا موجب افزایش بیان (upregulation) ژن‌های کد کننده این هورمون‌ها می‌شود و از این‌رو، سنتز این هورمون‌ها در گیاهان افزایش می‌یابد. آنها حتی افزوده‌اند که گابا روی بیان ۱۶ ژن از ژن‌های کد کننده هورمون‌های گیاهی اثر مثبت گذاشته و باعث افزایش بیان آنها شده و با این روش بیوسنتز آنها را افزایش داده است.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق استفاده از تریفلورالین و همچنین گابا سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های درگیر در سنتز پرولین از قبیل OAT و کاهش آنزیم‌های تجزیه‌کننده پرولین از جمله آنزیم PDH و در نتیجه افزایش معنی‌دار پرولین ریشه و بخش هوایی گیاه کدو خورشیدی شد.

تریفلورالین سبب کاهش معنی‌دار میزان هورمون‌های گیاهی سیتوکینین (۶- بنزیل آمینوپورین) و جیبرلیک اسید (GA₃) شد، ولی در همه گیاهان تیمار شده با گابا و در حضور تمامی غلظت‌های تریفلورالین، محتوای این هورمون‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. گابا با تأثیر

علف‌کش‌ها نیز به با ایجاد تنش در گیاه، سبب افزایش پرولین در گیاه می‌شوند، به‌طوری که طبق نتایج توتوا و همکاران (۲۰۰۴) (۴۱) میزان پرولین در گیاه توتون یک روز پس از تیمار با کلروسولفورون (Chlorosulfuron) افزایش یافته است.

در این پژوهش، تریفلورالین با ایجاد تنش در گیاه سبب کاهش معنی‌دار مقدار سیتوکینین (۶- بنزیل آمینوپورین) و جیبرلیک اسید (GA₃) شد. کاهش مقدار سیتوکینین درون‌زاد در واکنش به تنش‌ها مشاهده شده است (۱۱ و ۳۷). اثرات متقابل بین گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و اکسین و سیتوکینین به گیاه اجازه می‌دهد تا توسعه و رشد خود را در شرایط غیرمساعد بیرونی تعدیل کند (۱۶).

انواعی از تنش‌های غیرزنده فعالیت هورمون سیتوکینین را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۱۰). در شیره آوند چوبی، تنش خشکی سبب کاهش ترانس زاتین، زاتین ریوزید، ایزوپنتیل آدنین و ایزوپنتیل آدنوزین می‌شود (۸). همچنین علاوه بر آن، انتقال ترانس- زاتین ریوزید به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد (۱۱ و ۱۷). غلظت بالای ۶- بنزیل آمینوپورین سبب تجمع پرولین در گیاه می‌شود (۳۹). نقش همزمان سنتز سیتوکینین و آنزیم‌های تجزیه‌کننده در پاسخ به تنش احتمالاً به الگوهای بیان فضایی و موقتی آنها بستگی دارد. مطالعات ژنتیکی در مورد آراییدوپسیس نشان داده‌اند که سیتوکینین نقش منفی در پاسخ به تنش بازی می‌کند (۲۹، ۴۲ و ۴۳). کاهش مقدار سیتوکینین تحمل به تنش شوری و خشکی را بهبود می‌بخشد (۳۴ و ۴۳). بیان ژن گلوکاتایون S- ترانسفراز کلاس تاو (GSTU5) در اثر تنش‌های غیرزنده افزایش می‌یابد. بر این اساس، بیان بیش‌ازحد ژن GSTU5 در اثر فعالیت بالای گلوکاتایون پراکسیداز، سبب می‌شود تحمل گیاهان تراریخته به سرما، اسمز، شوری و علف‌کش افزایش یابد (۱۴ و ۴۰).

مزرعه‌ای تحت شرایط محیط طبیعی جهت مطالعه امکان مصرف و تأثیر گابا برافزایش مقاومت گیاهان به سمیت علف‌کش‌ها و همچنین صرفه اقتصادی کاربرد زراعی آن انجام گیرد.

مثبت بر تولید ۶- بنزیل آمینو پورین و GA_3 سبب بهبود فعالیت سلولی و رشد گیاه گردید. بنابراین، تأثیر منفی تنش علف‌کش بر این هورمون‌ها را می‌توان با استفاده از گابا بهبود بخشید. علاوه براین، لازم است آزمایش‌های

منابع

- ۱- حسنلو، ط.، ا. سفالیان، ع. اصغری و م. زین‌ادینی. ۱۳۹۵. اثر تنش خشکی بر پارامترهای فیزیولوژیکی و تجمع اسیدهای آمینه در کلزا. پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی، سال هشتم، شماره ۱۸. ۲۰۳-۱۹۱.
- ۲- مرادی‌گی، ه. و خارا، ج. ۱۳۹۰. ارزیابی تغییر برخی شاخصهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی حاصل از تعامل علف‌کش تریفلورالین و همزیستی میکوریزی با قارچ *Glomus versiforme* در گیاه آفتابگردان (رقم لاکومکا). زیست‌شناسی گیاهی، سال سوم، شماره دهم. ص ۷۰-۵۹.
- ۳- مرادی ع.ر.، راشد محصل م.ح.، پارسا م. ۱۳۸۸. ارزیابی کارایی علفکش‌های ایمازاتاپیر، اکسی‌فلورفن، ترفلان، پندیمتالین و وچین دستی روی عملکرد نخود رقم ILC482 در منطقه مشهد. سومین همایش علوم علفهای هرز ایران. بایلسر. جلد ۲. ص ۴۶۰-۴۵۸.
- ۴- شیمی، پ. رهبری ا. و مصباح م. ۱۳۸۸. بررسی کارایی چند علفکش در کنترل علفهای هرز مزارع توتون (*Nicotiana tabacum*). تولید گیاهان زراعی. دوره ۲ شماره ۴. ص ۳۸-۲۳.
5. Agostinetti D, Perboni, L, Langaro A, Gomes J, Fraga D, Franco J, 2016. Changes in photosynthesis and oxidative stress in wheat plants submitted to herbicides application. *Planta Daninha* 34: 1-9.
6. Akçay N, Bor, M, Karabudak, T, Özdemir F, Türkan İ, 2012. Contribution of Gamma amino butyric acid (GABA) to salt stress responses of *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant and wild type plants. *Journal of Plant Physiology* 169: 452-458.
7. Alqarawi A, Abd Allah E, Hashem A, 2014. Alleviation of salt-induced adverse impact via mycorrhizal fungi in *Ephedra aphylla* Forssk. *Journal of Plant Interactions* 9: 802-810.
8. Alvarez S, Marsh EL, Schroeder SG, Schachtman DP. 2008. Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. *Plant Cell and Environment*. 31: 325-340.
9. Amutha R, Muthulaksmi S, Baby Rani W, Indira K, Mareeswari P. 2007. Studies on biochemical basis of heat tolerance in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 3(4): 234-238.
10. Argueso CT, Ferreira FJ, Kieber JJ. 2009. Environmental perception avenues: The interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant Cell and Environment*. 32: 1147-1160.
11. Bano A, Hansen H, Dörffling K, Hahn H. 1994. Changes in the contents of free and conjugated abscisic acid, phaseic acid and cytokinins in xylem sap of drought stressed sunflower plants. *Phytochemistry*. 37: 345-347.
12. Barbarosa JM, Singh NK, Cherry JH, Locy RD, 2010. Nitrate uptake and utilization is modulated by exogenous γ -aminobutyric acid in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 443-450.
13. Bates LS, Waldren RP, Teare ID. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205-207.
14. Benekos K, Kissoudis C, Nianiou-Obeidat I, Labrou N, Madesis P, Kalamaki M, Makris A, Ansen H, Dörffling K. 2003. Root-derived trans-zeatin riboside and abscisic acid in drought-stressed and rewatered sunflower plants: Interaction in the control of leaf diffusive resistance? *Functional Plant Biology*. 30: 365-375.
15. Bhalla K, Singh SB, Agarwal R. 2010. Quantitative determination of gibberellins by high performance liquid chromatography from various gibberellins producing *Fusarium* strains. *Environmental Monitoring and Assessment*. 167(1-4): 515-520.
16. Bielach A, Hrtyan M, Tognetti VB. 2017. Plants under stress: Involvement of auxin and cytokinin, Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 18: 1427; doi:10.3390/ijms18071427.

17. Davies WJ, Kudoyarova G, Hartung W. 2005. Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought. *Journal of Plant Growth Regulation*. 24: 285-295.
18. Driessens N, Versteyhe S, Ghaddhab C, Burniat A, De Deken X, Van Sande J, Dumont JE, Miot F, Corvilain B. 2009. Hydrogen peroxide induces DNA single and double-strand breaks in thyroid cells and is therefore a potential mutagen for this organ. *Endocrine-related Cancer* 16: 845-856.
19. Durgesha M. 1993. Effect of fluchloralin on protein synthesis, free amino acids and hydroxyproline content in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Annals of Applied Biology* 123: 703-708.
20. Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM. 1997. Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum* 100: 241-254.
21. Gill SS, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
22. Gomes FP, Oliva MA, Mielke MS, Almeida AAF, Aquino LA. 2010. Osmotic adjustment, proline accumulation and membrane stability in leaves of *Cocos nucifera* submitted to drought stress. *Scientia Horticulturae*. 126: 379-384.
23. Horst V. 2004. Further root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in already mycorrhizal plants in suppressed after a critical level of root colonization. *Plant Physiology*. 161: 339-341.
24. Kinnersley AM, Turano FJ. 2000. Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 19: 479-509.
25. Krishnan S, Laskowski K, Shukla V, Merewitz EB. 2013. Mitigation of drought stress damage by exogenous application of a non-protein amino acid γ -aminobutyric acid on perennial ryegrass. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 138: 358-366.
26. Li Z, Yu J, Peng Y, Huang B. 2016. Metabolic pathways regulated by γ -aminobutyric acid (GABA) contributing to heat tolerance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *Scientific Reports*. 6: 30338. doi: 10.1038/srep30338
27. Lin WD, Liao YY, Yang TJ, Pan CY, Buckhout TJ, Schmidt W. 2011. Coexpression-based clustering of *Arabidopsis* root genes predicts functional modules in early phosphate deficiency signaling. *Plant Physiology*, 155: 1383-1402.
28. Lopez-Carrion AI, Castellano R, Rosales MA, Ruiz JM, Romero L. 2008. Role of nitric oxide under saline stress: implications on proline metabolism. *Biologiae Plantarum*. 52: 587-591.
29. Lubovská Z, Dobrá J, Štorchová H, Wilhelmová N, Vanková R. 2014. Cytokinin oxidase/dehydrogenase overexpression modifies antioxidant defense against heat, drought and their combination in *Nicotiana tabacum* plants. *Journal of Plant Physiology*. 171: 1625-1633.
30. Luo HY, Gao HB, Xia QP, Gong BB, Xiao-Lei WU. 2011. Effects of exogenous GABA on reactive oxygen species metabolism and chlorophyll fluorescence parameters in tomato under NaCl stress. *Scientia Agricultura Sinica* 34: 37-544.
31. Madan S, Nainawatee HS, Jain RK, Chowdhury JB. 1995. Proline and proline metabolising enzymes in *in-vitro* selected NaCl-tolerant *Brassica juncea* L. under salt stress. *Annals of Botany*. 76: 51-57.
32. Monteoliva MI, Rizzi YS, Cecchini NM, Hajirezaei MR, Alvarez ME. 2014. Context of action of proline dehydrogenase (ProDH) in the hypersensitive response of *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*. 13: 14-21.
33. Moradbeigi H, Khara J. 2012. An evaluation of some physiological and biochemical parameters resulting from interaction of herbicide trifluralin and mychorrizal colonization by *Glomus versiforme* in sunflower plants (cv. lakomka). *Iranian Journal of Plant Biology* 3: 59-70.
34. Nishiyama R, Watanabe Y, Fujita Y, Le DT, Kojima M, Werner T, Vankova R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Kakimoto T, Sakakibara H, Schmulling T, Tran LS. 2011. Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses and abscisic acid biosynthesis. *Plant Cell*. 23: 2169-2183.
35. Sanchez E, Lopez-Lefebvre LR, Garcia PC, Rivero RM, Ruiz JM, Romero L. 2001. Proline metabolism in response to highest nitrogen dosages in green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike). *Journal Plant Physiology*. 158: 593-598.

36. Shang H, Cao S, Yang Z, Cai Y, Zheng Y. 2011. Effect of exogenous γ -aminobutyric acid treatment on proline accumulation and chilling injury in peach fruit after long-term cold storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 1264-1268.
37. Shashidhar VR, Prasad TG, Sudharshan L. 1996. Hormone signals from roots to shoots of sunflower (*Helianthus annuus* L.) moderate soil drying increases delivery of abscisic acid and depresses delivery of cytokinins in xylem sap. *Annals of Botany*. 78: 151-155.
38. Shi SQ, Shi Z, Jiang ZP, Qi LW, Sun XM, Li CX, Liu JF, Xiao WF, Zhang SG. 2010. Effects of exogenous GABA on gene expression of *Caragana intermedia* roots under NaCl stress: regulatory roles for H₂O₂ and ethylene production. *Plant Cell and Environment*. 33: 149-162.
39. Thomas JC, McElwain EF, Bohnert HJ. 1992. Convergent induction of osmotic stress-responses. *Plant Physiology*. 100: 416-423.
40. Tiwar, V, Patel MK, Chaturvedi AK, Mishra A, Jha B. 2016. Functional characterization of the Tau class glutathione-S-transferases gene (SbGSTU) promoter of *Salicornia brachiata* under salinity and osmotic stress. *PLoS ONE*. 17;11(2): e0148494. doi: 10.1371/journal.pone.0148494. eCollection.
41. Toteva T, Slavov VS, Batchvarova R, Batchvarova A, Stefanov D. 2004. Stress markers in chlorsulphuron tolerant transgenic tobacco plants. *Plant Physiology*. 30(1-2): 103-111.
42. Vojta P, Kokáš F, Husicková A, Grúz J, Bergougnoux V, Marchetti CF, Jiskrová E, Ježilová E, Mik V, Ikeda Y, Galuszka P. 2016. Whole transcriptome analysis of transgenic barley with altered cytokinin homeostasis and increased tolerance to drought stress. *New Biotechnology*. 33: 676-691.
43. Werner T, Nehnevajova E, Kollmer I, Novak O, Strnad M, Kramer U, Schmulling T. 2010. Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance and leaf mineral enrichment in Arabidopsis and tobacco. *Plant Cell*. 22: 3905-3920.
44. Xu A, Xiong H, Yin G. 2009. Distinct oxygenation difference between manganese (IV) hydroxo and oxo moieties: Electron transfer versus concerted oxygen transfer. *Chemistry*. 15(43): 11478-11481.
45. Yu GH, Sun MX, 2007. Deciphering the possible mechanism of GABA in tobacco pollen tube growth and guidance. *Plant Signaling & Behavior*. 2: 393-395.
46. AL-Quraan NA, Al-Smadi ML, Swaleh AF. 2015. GABA metabolism and ROS induction in lentil (*Lens culinaris* Medik) plants by synthetic 1,2,3-Thiadiazole compounds. *Journal of Plant Interactions*. 10: 184- 194.
47. Bhalla K, Singh SB, Agarwal R. 2010. Quantitative determination of gibberellins by high performance liquid chromatography from various gibberellins producing *Fusarium* strains. *Environmental Monitoring and Assessment*. 167: 515- 520.
48. Hijaz F, Nehela Y, Nabil Killiny N. 2018. Application of gamma-aminobutyric acid increased the level of phytohormones in *Citrus sinensis*. *Planta*. 249: 1-10.

Effect of exogenous gamma amino butyric acid on hormonal and biochemical characteristics of squash (*Cucurbita pepo*) plants under toxicity of herbicide trifluralin

Esmailnejad Khiavi N.,¹ Khara J.¹ and Akhgari M.²

¹ Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

² Dept. of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

Abstract

The main mechanism of action of herbicide Trifluralin is the inhibition of cell mitosis. As an important non-protein amino acid, γ -aminobutyric acid (GABA) contributes in certain physiological functions and stress tolerance. So, to detect the effect of Trifluralin and role of GABA on enzymatic activities and content of proline and growth substances including gibberellin (GA_3) and cytokinin (6- benzyl amino purine) an experiment was conducted using squash (*Cucurbita pepo*) seedlings. Four levels (0, 5, 15 and 25 ppm) of trifluralin and presence or absence of GABA were applied in completely randomized design and in 3 replicates. Pots were sprayed by trifluralin 2 days after planting. Distilled water and GABA ($500 \mu\text{mol l}^{-1}$) were sprayed on control and treated plants respectively 3 days after planting. Effect of trifluralin on ornithine amino-transferase (OAT), proline dehydrogenase (PDH) and content of proline and also GA_3 and 6-benzyl amino purine was significant ($p \leq 0.01$) according to ANOVA. On the other hand, GABA had a significant effect on activity of PDH, content of proline and GA_3 and cytokinin level. Content of proline and activity of OAT and the amounts of GA_3 and cytokinin increased significantly, although PDH was decreased under influence of GABA. Content of proline and OAT activity were raised and GA_3 , benzyl amino purine and activity of PDH were declined by increased levels of trifluralin. Overall, it can be concluded that growth and biochemical indices of squash plants were improved by GABA under toxicity of herbicide trifluralin.

Key words: Squash, Proline, Phytohormones, Trifluralin, GABA