

## استفاده برونزا از ۵ - آمینولولینیک اسید (ALA) برای کاهش تنش شوری در گیاه گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

فاطمه دانشمند<sup>۱\*</sup> و حکیمه علومی<sup>۲</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۶/۲۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۲۴)

### چکیده

در این مطالعه تأثیر ۵ - آمینولولینیک اسید به‌عنوان پیش‌ساز ترکیباتی نظیر کلروفیل بر کاهش تنش شوری در گیاه گوجه‌فرنگی بررسی گردید. در این پژوهش فاکتور اول تنش شوری در سه سطح (۰، ۵۰ و ۷۵ میلی‌مولار کلرید سدیم) و فاکتور دوم تیمار ۵ - آمینولولینیک اسید در سه سطح (۰، ۱ و ۲ میلی‌مولار) بود. تنش شوری در هر دو سطح (۵۰ و ۷۵ میلی‌مولار) موجب کاهش وزن تر اندام هوایی (به ترتیب ۱۱ و ۱۳ درصد)، وزن خشک اندام هوایی (۱۵ و ۲۰ درصد)، طول ساقه (۱۳ و ۲۵ درصد) و سطح برگ سوم (۲۰ و ۲۷/۵ درصد) و کاهش مقدار کلروفیل (۲۲/۵ و ۴۹ درصد)، پروتئین (۱۲/۵ و ۳۳/۵ درصد) و یون پتاسیم (۲۲/۵ و ۵۵/۵ درصد) و موجب افزایش مقدار مالون دآلدئید (به ترتیب ۸۴ و ۱۱۷ درصد) و پراکسید هیدروژن (۶۰ و ۱۰۰ درصد)، پرولین (۶۱ و ۱۱۰ درصد)، قندهای محلول (۸ و ۱۸ درصد)، آسکوربات (۲۵ و ۵۰ درصد)، گلوکاتایون (۲۹ و ۴۳ درصد) و مقدار یون سدیم (۵۰۰ و ۷۰۰ درصد) در برگ گیاه شد. کاربرد ۵ - آمینولولینیک اسید در هر دو سطح باعث افزایش سطح برگ سوم، افزایش مقدار کلروفیل، پروتئین، پرولین، قندهای محلول، آسکوربات، گلوکاتایون و کاهش مقدار پراکسیداسیون لیپیدها، پراکسید هیدروژن و مقدار سدیم گردید اما بر مقدار پتاسیم تأثیری نداشت. در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که کاربرد ۵ - آمینولولینیک اسید در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مولار با افزایش اسمولیت‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی و مقدار کلروفیل موجب افزایش مقاومت گیاهان در شرایط تنش شوری و بهبود رشد گیاهان در شرایط غیرتنش می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی، اسمولیت‌ها، تنش اسمزی، ترکیبات تراپیرولی

۱. استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران

۲. استادیار گروه اکولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان

\*. مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: f.daneshmand@yahoo.com

## مقدمه

زندگی اتوتروفی گیاهان عالی وابسته به ۵ تراپیروول می‌باشد. تراپیروول‌های حلقوی شامل کلروفیل، هم، سیروهم و Mg - پروتوپورفیرین بوده و از تراپیروول خطی می‌توان فیتوکروموبیلین را نام برد (۱۳). کلروفیل رنگیزه سبز گیاه است که برای دریافت نور و فرآیند فتوسنتز ضروری می‌باشد. هم گروه پروستتیک بسیاری از پروتئین‌ها مثل سیتوکروم و لگهموگلوبین می‌باشد که به ترتیب در انتقال الکترون و تثبیت ازت نقش دارند، به‌علاوه هم، گروه پروستتیک آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز نیز می‌باشد. سیروهم در دو آنزیم مختلف کلروپلاستی شامل نیتريت رداکتاز و سولفیت رداکتاز وجود دارد که به ترتیب در جذب و احیای نیتروژن و سولفور به شکل‌های اکسایش یافته نقش دارند. فیتوکروم دارای فیتوکروموبیلین به‌عنوان گروه عمل‌کردی و در بیان ژن‌های تنظیم شونده توسط نور قرمز درگیر می‌باشد. Mg - پروتوپورفیرین یک سرکوب‌گر همراه (co-repressor) و گیرنده احتمالی نور آبی است (۲، ۶، ۷ و ۱۳).

اینک نقش ۵ - آمینولولینیک اسید (ALA) به‌عنوان پیش‌ساز پورفیرین‌هایی مانند کلروفیل، باکتروکلروفیل، هم، ویتامین B<sub>12</sub>، فیتوکروم، سیروهم و Mg - پروتوپورفیرین ثابت شده است (۴، ۵ و ۱۳). در سال‌های اخیر نقش‌های زیستی ALA (به‌عنوان ماده‌ای که به‌طور طبیعی در بدن موجودات اعم از گیاهان و جانوران وجود دارد) در کشاورزی و پزشکی مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۵). اما در استفاده از این ترکیب، نوع گیاه، مرحله نموی گیاه، مقدار و زمان به‌کارگیری این ماده و نحوه تیماردهی (به‌صورت محلول‌پاشی و یا آبیاری ریشه‌ای) باید مورد بررسی دقیق قرار گیرد (۱). ALA هنگامی که در غلظت‌های زیاد مورد استفاده قرار بگیرد به‌عنوان یک علف‌کش فتودینامیک که دارای قابلیت زیست - تجزیه (Biodegradable) است عمل می‌کند. ALA در غلظت‌های بالا موجب تجمع مقدار زیادی پروتوپورفیرین IX می‌شود که این ماده موجب تولید مقادیر بالای گونه‌های فعال اکسیژن

به‌خصوص اکسیژن یکتایی از طریق مکانیسم فتودینامیک می‌گردد (۹، ۱۵، ۱۸ و ۱۹). برعکس گزارش شده است که کاربرد ALA در غلظت‌های پایین موجب بهبود رشد و حتی افزایش مقاومت به بسیاری از تنش‌های محیطی شده و اینک ALA به‌عنوان ماده‌ای تنظیم کننده رشد مورد توجه قرار گرفته است (۱۷، ۲۸، ۲۹، ۳۱، ۳۲ و ۳۳). به‌عنوان مثال ALA موجب افزایش رشد و تولید محصول در گیاهان لوبیا، جو، سیر، سیب‌زمینی و تربچه گردید (۱۷). در گیاه هندوانه (۲۵) و انگور (۲۸) و چند گونه از جنس *Vigna* (۶) نیز ALA موجب افزایش رشد، فتوسنتز و تولید محصول گردید. ALA در غلظت‌های کم برای افزایش مقاومت به گرما (۳۱)، تنش نوری (۲۵)، تنش حاصل از علف‌کش (۲۱) و تنش شوری (۲۲، ۲۳، ۲۹، ۳۳ و ۳۴) مورد استفاده قرار گرفته و نتایج مثبتی هم به‌دست آمده است. اما مکانیسم‌هایی که با آن ALA روی افزایش رشد، تولید محصول و مقاومت به تنش‌ها تأثیر می‌گذارد هنوز به‌خوبی شناخته نشده است. بعضی گزارش‌ها نقش محرک ALA روی رشد گیاهان را به‌دلیل تأثیر آن روی فتوسنتز و یا تنفس (۲۸) و برخی به‌دلیل تأثیر بر فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی (۲۱) و (۲۵) و برخی نیز به‌دلیل تأثیر آن بر اسمولیت‌ها و یا تغذیه معدنی (۲۲ و ۲۳) می‌دانند.

شوری زمین‌های کشاورزی یکی از جدی‌ترین عوامل محیطی است که موجب مهار رشد و نمو گیاهان، کاهش تولید محصول و حتی مرگ گیاهان می‌گردد. گیاهان در حال رشد در شرایط تنش شوری، پارامترهای ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی آنها تغییر می‌کند و تنش شوری منجر به مهار جوانه‌زنی، بذری، مهار رشد ریشه و اندام هوایی، بر هم زدن تعادل یون و تعادل آب در سلول و تغییر میزان هورمون‌های گیاهی، کاهش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی و کاهش میزان فتوسنتز می‌گردد. شوری منجر به تجمع اسمولیت‌هایی نظیر پرولین، قند و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و مقدار مالون دالدئید و تغییر فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان سلول می‌گردد (۱).

### پارامترهای رشد

سطح برگ سوم، طول ساقه و وزن تر و خشک اندام هوایی گیاهان در گروه‌های تیماری مختلف اندازه‌گیری گردید. برای اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌ها در فویل آلومینیومی پیچیده شده و به مدت ۷۲ ساعت در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. سپس وزن خشک نمونه‌ها بر حسب میلی‌گرم بر گیاه گزارش گردید.

### رنگیزه‌های فتوسنتزی

مقدار ۰/۲ گرم از برگ سوم فریز شده با ۱۵ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد سائیده شده و پس از صاف کردن جذب آنها با اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲۰ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد و مقدار کلروفیل کل بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید (۲۰).

### پراکسیداسیون لیپیدها

برای سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، غلظت مالون دآلدئید (MDA) که محصول پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشد، اندازه‌گیری گردید. مقدار ۰/۲ گرم از بافت فریز شده گیاه (برگ سوم) با ۵ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره‌ی حاصل با استفاده از سانتی‌فیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g سانتی‌فیوژ شد. به یک میلی‌لیتر از محلول رویی حاصل از سانتی‌فیوژ، ۴ میلی‌لیتر محلول تری کلرو استیک اسید (TCA) ۲۰ درصد که حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید (TBA) بود، اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم حرارت داده شد. سپس بلافاصله در یخ سرد شد و دوباره مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g سانتی‌فیوژ گردید. شدت جذب این محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. ماده‌ی مورد نظر برای جذب در این طول موج، کمپلکس قرمز MDA-TBA است. شدت جذب بقیه رنگیزه‌های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این

با توجه به قرار گرفتن ایران در منطقه گرم و خشک و با بارندگی محدود و کاهش کیفیت آب‌های مورد استفاده در کشاورزی، دست‌یابی به راه‌هایی برای مقابله با تنش شوری و کاهش تنش و افزایش تولید محصول در گیاهان غیر قابل اجتناب خواهد بود. از آنجا که ALA یک ترکیب طبیعی و سازگار با محیط زیست است که در همه موجودات و گیاهان وجود دارد و دارای قابلیت زیست تجزیه نیز می‌باشد، بنابراین هدف از این مطالعه بررسی نقش ALA برونزا در کاهش تنش شوری و یا بهبود رشد در گیاه گوجه‌فرنگی به‌عنوان یک گیاه مدل می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

گیاه مورد آزمایش در این پژوهش گیاه گوجه‌فرنگی *Solanum lycopersicum* رقم Falcato بود که از شرکت هلندی DE RUITER SEEDS تهیه شد و آزمایش در سال ۱۳۹۱ در گلخانه مرکز آموزش عالی ملاصدرا یزد انجام گرفت. طی آزمایشات مقدماتی غلظت ۵ - آمینولولینیک اسید و مدت زمان و نحوه تیماردهی بهینه گردید. بذرها در گلدان‌های پلاستیکی با گنجایش ۱ کیلوگرم خاک حاوی (خاک: ماسه: پیت‌ماس) با نسبت‌های (۲:۱:۱) کاشته شد و آبیاری تا زمان اعمال تنش شوری به‌صورت یک روز در میان با توجه به ظرفیت مزرعه‌ای برای همه گلدان‌ها به‌طور یکسان انجام شد. در شروع مرحله سه برگی، برای اعمال پیش تیمار ۵ - آمینولولینیک اسید، غلظت‌های ۰ و ۱ و ۲ میلی‌مولار ۵ - آمینولولینیک اسید در سه نوبت به‌صورت یک روز در میان روی برگ‌های گیاهان اسپری شد (روی گیاهان شاهد آب مقطر اسپری گردید). سپس تنش شوری در سه سطح (۰، ۵۰ و ۷۵ میلی‌مولار کلرید سدیم) به‌صورت آبیاری اعمال گردید (۳ تکرار برای هر تیمار) و در مرحله ۵ برگی گیاهان برداشت شدند و پس از اندازه‌گیری پارامترهای ریخت‌شناسی، برگ سوم (شمارش از پایین به بالا) در نیتروژن مایع فریز شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

**قندهای محلول**

برای سنجش کربوهیدرات‌های محلول از ۰/۱ گرم برگ سوم گیاه با استفاده از ۲/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه (دو مرحله ۳۰ دقیقه‌ای) کربوهیدرات‌های محلول استخراج شدند و عصاره‌ها با کاغذ صافی صاف شده و سپس الکل آنها تبخیر گردید. رسوب حاصل در ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. از هر نمونه ۲۰۰ میکرولیتر در یک لوله آزمایش ریخته و به آن ۵ میلی‌لیتر معرف آنترون اضافه گردید. پس از مخلوط شدن، به مدت ۱۷ دقیقه در بن‌ماری ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از سرد شدن نمونه شدت جذب در ۶۲۵ نانومتر خوانده شد. غلظت هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید (۱۲).

**پروتئین**

برای سنجش مقدار پروتئین، ابتدا پروتئین‌ها از برگ گیاه در دمای ۴ - ۰ درجه سانتی‌گراد استخراج شدند. به این منظور یک گرم بافت برگ در یک هاون چینی محتوی سه میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با  $\text{pH} = 7.2$  که شامل اتیلن دی‌آمین تترااستیک اسید (EDTA) ۱ میلی‌مولار، فیل متان سولفونیل فلورید (PMSF) ۱ میلی‌مولار و پلی وینیل پیرولیدون (PVP) ۱ درصد بود، سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفوژ یخچال‌دار در  $g$  ۱۴۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. از محلول رویی برای سنجش پروتئین استفاده گردید. به این منظور به لوله‌های آزمایش مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره پروتئینی و پنج میلی‌لیتر معرف بیوره افزوده و سریعاً ورتکس شد. شدت جذب به‌طور یکسان برای تمام نمونه‌ها پس از گذشت دو دقیقه و قبل از یک ساعت با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد با کمک آلبومین گاوی محاسبه و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید (۸).

مقدار کسر گردید. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  استفاده شد و نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر حسب نانومول بر گرم وزن تر محاسبه گردید (۱۶).

**پراکسید هیدروژن ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )**

برای سنجش پراکسید هیدروژن، برگ سوم گیاه در حمام یخ با تری‌کلرو استیک اسید ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره در سانتریفوژ یخچال‌دار در  $g$  ۱۰۰۰۰ برای ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی به ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار ( $\text{pH} = 7$ ) و ۱ میلی‌لیتر یدید پتاسیم یک مولار اضافه گردید و جذب در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. مقدار پراکسید هیدروژن در هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد و بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر گزارش گردید (۲۷).

**پرولین**

برای اندازه‌گیری پرولین، مقدار ۰/۰۲ گرم از بافت فریز شده گیاه (برگ سوم) در ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۳ درصد سولفوسالیسیلیک اسید سائیده و عصاره حاصل به مدت ۵ دقیقه در  $g$  ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از مایع رویی با ۲ میلی‌لیتر معرف نین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید خالص مخلوط شد و یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار گرفت سپس بلافاصله لوله‌های محتوی مخلوط در حمام یخ، سرد گردید. بعد ۴ میلی‌لیتر تولوئن به مخلوط اضافه گردید و لوله‌ها به خوبی تکان داده شد. با ثابت نگه داشتن لوله‌ها به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه دو لایه مجزا تشکیل شد. میزان جذب لایه رنگی فوقانی که حاوی تولوئن و پرولین بود در ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه مقدار پرولین از منحنی استاندارد پرولین استفاده گردید و نتایج بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید (۳).

## آسکوربات کل

میکرولیتر آنزیم گلوکاتایون رداکتاز افزوده شد و جذب در ۴۱۲ نانومتر خوانده شد. محاسبه گلوکاتایون کل از طریق منحنی استاندارد انجام و بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر ارائه گردید (۱۴).

## یون‌های سدیم و پتاسیم

برای اندازه‌گیری این دو یون، یک گرم از بافت خشک برگ سوم گیاه در ۱۰ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. سپس نمونه‌های حل شده در اسید به آرامی گرم شدند تا اسید آن تبخیر گردد. حجم محلول باقی‌مانده (حدود ۱ میلی‌لیتر) با آب دو بار تقطیر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف گردید و با دستگاه جذب اتمی مقدار این دو یون اندازه‌گیری شدند. مقدار این دو یون بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گزارش گردید.

## تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل‌های آماری طبق آزمایش فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار صورت گرفت و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS تحت آنالیز واریانس قرار گرفته و اختلاف میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ مقایسه شدند.

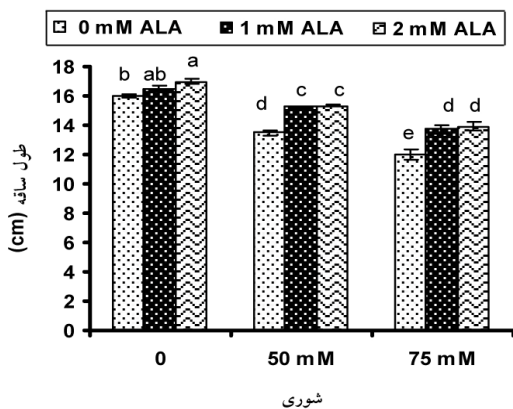
## نتایج

شکل‌های ۱ تا ۱۴، اثر متقابل تیمارهای تنش شوری و ۵-آمینولولینیک اسید (ALA) را بر وزن تر اندام هوایی (شکل ۱)، وزن خشک اندام هوایی (شکل ۲)، طول ساقه (شکل ۳)، سطح برگ سوم (شکل ۴)، مقدار کلروفیل (شکل ۵)، پراکسیداسیون لیپید و مقدار مالون دالدئید (MDA) (شکل ۶)، مقدار  $H_2O_2$  (شکل ۷)، پرولین (شکل ۸)، قندهای محلول (شکل ۹)، پروتئین (شکل ۱۰)، آسکوربات (شکل ۱۱)، گلوکاتایون (شکل ۱۲)، مقدار یون سدیم (شکل ۱۳) و پتاسیم (شکل ۱۴) نشان می‌دهد.

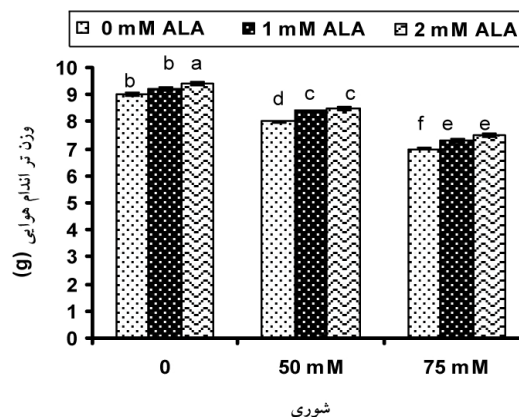
مقدار ۵/۰ گرم بافت فریز شده گیاه (برگ سوم) در ۱۰ میلی‌لیتر متافسفریک اسید ۵ درصد سائیده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰g سانتریفوژ گردید. برای اندازه‌گیری آسکوربات کل ۳۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ی سانتریفوژ شده در لوله‌ی آزمایش ریخته شده و محلول‌های زیر به ترتیب به آن اضافه شد: ابتدا ۷۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار سپس ۱۵۰ میکرولیتر دی‌تیوترایتول ۱۰ میلی‌مولار مخلوط حاصل ۱۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار داده شد. سپس ۱۵۰ میکرولیتر N - اتیل مالامید ۵/۰ درصد اضافه و مخلوط حاصل ورتکس و مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار گرفت. سپس ۶۰۰ میکرولیتر تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد، ۶۰۰ میکرولیتر ارتوفسفریک اسید ۴۴ درصد، ۶۰۰ میکرولیتر آلفا آلفا دی پیریدیل ۴ درصد و ۱۰ میکرولیتر  $FeCl_3$  (۴۷۵ میلی گرم در ۵/۰ میلی‌لیتر آب) اضافه گردید. مخلوط حاصل با ورتکس به هم زده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت سپس مجدداً ورتکس شد و برای بار دوم به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. شدت جذب در ۵۲۵ نانومتر خوانده شد و با استفاده از آسکوربات منحنی استاندارد رسم گردید و نتایج بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد (۱۰).

## گلوکاتایون کل

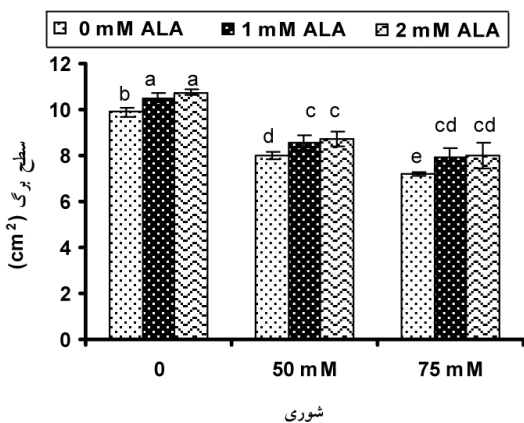
برای اندازه‌گیری مقدار گلوکاتایون کل، ۵/۰ گرم از بافت برگ سوم گیاه، در یک هاون چینی محتوی ۲ میلی‌لیتر متافسفریک اسید ۲٪ به‌طور کامل سائیده شد. محلول همگن به‌دست آمده به لوله سانتریفوژ منتقل و پس از ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، با استفاده از دستگاه سانتریفوژ یخچال‌دار سانتریفوژ گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول رویی به لوله آزمایش حاوی ۷۰۰ میکرولیتر NADPH (۳/۰ میلی‌مولار)، ۱۰۰ میکرولیتر دی تیوبیس DTNB (۶ میلی‌مولار) و ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید و بعد از ۴-۳ دقیقه، ۱۰



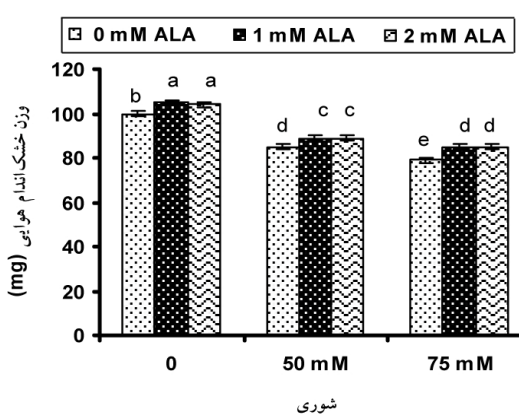
شکل ۳. اثر متقابل تنش شوری و تیمار ۵- آمینولولینیک اسید (ALA) بر طول ساقه در گیاه گوجه‌فرنگی (داده‌ها میانگین ۳ تکرار و علائم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیر یکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد).



شکل ۱. اثر متقابل تنش شوری و تیمار ۵- آمینولولینیک اسید (ALA) بر وزن تر اندام هوایی در گیاه گوجه‌فرنگی (داده‌ها میانگین ۳ تکرار و علائم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیر یکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد).



شکل ۴. اثر متقابل تنش شوری و تیمار ۵- آمینولولینیک اسید (ALA) بر سطح برگ سوم در گیاه گوجه‌فرنگی (داده‌ها میانگین ۳ تکرار و علائم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیر یکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد).



شکل ۲. اثر متقابل تنش شوری و تیمار ۵- آمینولولینیک اسید (ALA) بر وزن خشک اندام هوایی در گیاه گوجه‌فرنگی (داده‌ها میانگین ۳ تکرار و علائم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیر یکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد).

کلروفیل (۲۲/۵ و ۴۹ درصد)، پروتئین (۱۲/۵ و ۳۳/۵ درصد) و یون پتاسیم (۲۲/۵ و ۵۵/۵ درصد) شد. تنش شوری در هر دو سطح موجب افزایش مقدار مالون دالدئید (به ترتیب ۸۴ و ۱۱۷ درصد) و سطح برگ سوم (۲۰ و ۲۷/۵ درصد) و کاهش مقدار

تنش شوری در هر دو سطح (۵۰ و ۷۵ میلی‌مولار) موجب کاهش وزن تر اندام هوایی (به ترتیب ۱۱ و ۱۳ درصد)، وزن خشک اندام هوایی (۱۵ و ۲۰ درصد)، طول ساقه (۱۳ و ۲۵ درصد) و سطح برگ سوم (۲۰ و ۲۷/۵ درصد) و کاهش مقدار

درصد)، پروتئین (۵/۸ و ۵ درصد)، آسکوربات (۱۰ و ۱۵ درصد) و موجب کاهش مقدار  $H_2O_2$  (۴ و ۴/۶ درصد) گردید. اما بر مقدار مالون دآلدئید، پرولین، گلوکاتئون، سدیم و پتاسیم تأثیر معنی داری نداشت.

### بحث

در این مطالعه کاربرد ALA موجب افزایش مقدار کلروفیل کل در گیاهان گوجه‌فرنگی در شرایط تنش و غیر تنش گردید. ALA اولین پیش‌ساز کلیدی برای بیوسنتز کلروفیل است و در گیاهان مرحله محدود کننده سرعت در طی سنتز تتراپیرول‌ها می‌باشد (۲۵). کاربرد ALA در گیاهان دیگری نظیر *Brassica campestris* (۲۱)، جو (۱ و ۲۶)، چند گونه از جنس *Vigna* (۶)، خرما (۳۰) و کاج (۱۱ و ۲۴) نیز موجب افزایش مقدار کلروفیل شده است.

تنش شوری اغلب موجب مهار رشد و کاهش ظرفیت فتوسنتزی گیاهان می‌گردد. در این مطالعه نیز تنش شوری موجب کاهش پارامترهای رشد و سطح برگ گردید. مشابه با نتایج این مطالعه، تنش شوری موجب کاهش وزن خشک ریشه و اندام هوایی و سطح برگ در گیاهان خیار تحت تنش شوری شد، اما این کاهش با کاربرد ALA بهبود یافت (۳۴). نتایج مطالعه حاضر با نتایج به‌دست آمده در گیاهان کلزا (۲۳) و سیب‌زمینی (۳۳) مطابقت دارد. گزارش شده است که تیمار ALA در گیاه هندوانه موجب بهبود فتوسنتز، افزایش کارایی فتوشیمیایی و سرعت زنجیره انتقال الکترون و هم‌چنین خاموش‌سازی فتوشیمیایی در این گیاه گردید (۲۵).

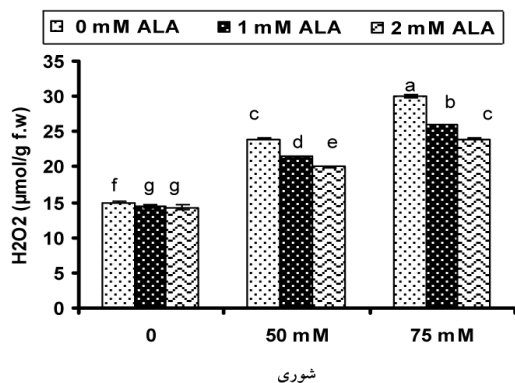
مکانیسمی که با آن ALA فتوسنتز را تنظیم می‌کند هنوز دقیقاً روشن نشده است. اما این موضوع مشخص شده است که ALA پیش‌ساز کلیدی برای بیوسنتز کلروفیل در گیاهان می‌باشد. بنابراین اثرات تشویقی ALA روی فتوسنتز می‌تواند در نتیجه افزایش مقدار کلروفیل باشد (۲۵). اما گزارش شده است که در گیاه توت‌فرنگی، تیمار ALA روی مقدار کلروفیل در برگ‌ها تأثیری نداشت اما میزان فتوسنتز را افزایش داد.

درصد)، قندهای محلول (۸ و ۱۸ درصد)، آسکوربات (۲۵ و ۵۰ درصد)، گلوکاتئون (۲۹ و ۴۳ درصد) و مقدار یون سدیم (۵۰۰ و ۷۰۰ درصد) شد.

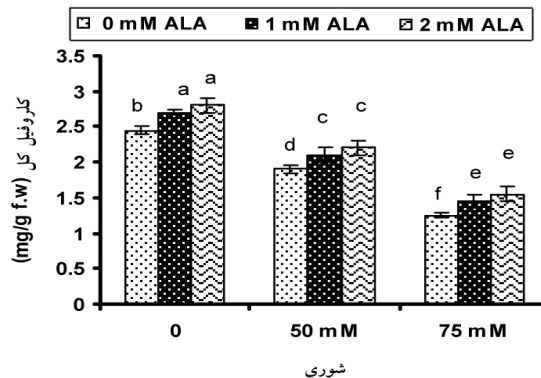
تیمار با ALA (۱ و ۲ میلی‌مولار) در شرایط تنش شوری (۵۰ میلی‌مولار)، موجب افزایش وزن تر اندام هوایی (به‌ترتیب ۵ و ۶/۲۵ درصد)، وزن خشک اندام هوایی (۴/۷ و ۴/۸ درصد)، طول ساقه (۹ و ۱۰ درصد) و سطح برگ سوم (۷/۵ و ۸/۷ درصد) و افزایش مقدار کلروفیل (۱۰/۵ و ۱۵/۸ درصد) شد، اما بر مقدار یون پتاسیم تأثیری نگذاشت. هم‌چنین تیمار با ALA (۱ و ۲ میلی‌مولار) در شرایط تنش شوری (۵۰ میلی‌مولار)، موجب کاهش مقدار مالون دآلدئید (۶/۴ و ۷/۳ درصد)،  $H_2O_2$  (۱۰/۴ و ۱۶/۷ درصد) و مقدار یون سدیم (۱۵ و ۱۴ درصد) و افزایش پرولین (۸/۷ و ۱۶ درصد)، قندهای محلول (۶/۲ و ۷/۴ درصد)، پروتئین (۱۱/۵ و ۱۳/۵ درصد)، آسکوربات (۱۲ و ۱۶ درصد) و گلوکاتئون (۱۱ و ۲۸ درصد) شد.

تیمار با ALA (۱ و ۲ میلی‌مولار) در شرایط تنش شوری (۷۵ میلی‌مولار)، موجب افزایش وزن تر اندام هوایی (۴/۳ و ۷/۲ درصد)، وزن خشک اندام هوایی (۶/۲۵ و ۶/۳ درصد)، طول ساقه (۱۴/۵ و ۱۷ درصد) و سطح برگ سوم (۹/۷۵ و ۱۱ درصد) و افزایش مقدار کلروفیل (۱۶ و ۲۴ درصد) شد اما بر مقدار یون پتاسیم تأثیری نگذاشت. تیمار با ALA (۱ و ۲ میلی‌مولار) در شرایط تنش شوری (۷۵ میلی‌مولار)، موجب کاهش مقدار مالون دآلدئید (۴/۶ و ۷/۷ درصد)،  $H_2O_2$  (۱۳/۵ و ۲۰ درصد) و مقدار یون سدیم (۱۵ و ۹ درصد) و افزایش پرولین (۴/۵ و ۱۰ درصد)، قندهای محلول (۵/۷ و ۵/۲ درصد)، پروتئین (۷/۵ و ۱۳/۷۵ درصد)، آسکوربات (۱۳/۵ و ۱۶/۵ درصد) و گلوکاتئون (۲۰ و ۱۷/۵ درصد) شد.

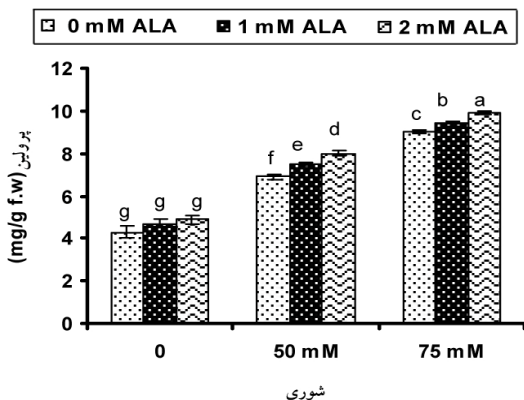
در شرایط غیر تنش نیز تیمار با ALA (۱ و ۲ میلی‌مولار) موجب افزایش وزن تر اندام هوایی (به‌ترتیب ۲/۲۲ و ۴/۵ درصد)، وزن خشک اندام هوایی (۵ و ۴/۸ درصد)، طول ساقه (۳/۲ و ۶/۲۵ درصد)، سطح برگ (۶ و ۸/۶ درصد) و مقدار کلروفیل (۱۰ و ۱۴ درصد)، قندهای محلول (۵/۳ و ۶/۶



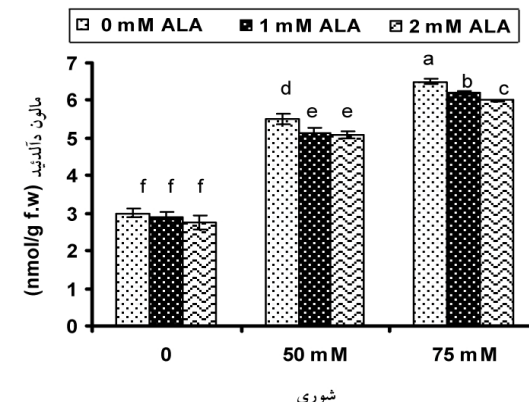
شکل ۷. اثر متقابل تنش شوری و تیمار ۵ - آمینولولینیک اسید (ALA) بر مقدار H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در گیاه گوجه‌فرنگی (داده‌ها میانگین ۳ تکرار و علائم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیر یکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد).



شکل ۵. اثر متقابل تنش شوری و تیمار ۵ - آمینولولینیک اسید (ALA) بر مقدار کلروفیل کل در گیاه گوجه‌فرنگی (داده‌ها میانگین ۳ تکرار و علائم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیر یکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد).



شکل ۸. اثر متقابل تنش شوری و تیمار ۵ - آمینولولینیک اسید (ALA) بر مقدار پروتئین در گیاه گوجه‌فرنگی (داده‌ها میانگین ۳ تکرار و علائم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیر یکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد).

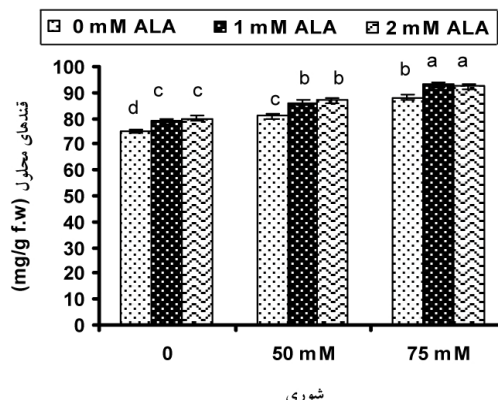
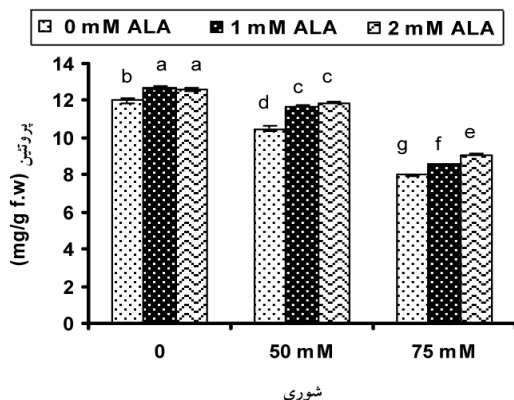


شکل ۶. اثر متقابل تنش شوری و تیمار ۵ - آمینولولینیک اسید (ALA) بر مقدار مالون دآلدئید (MDA) در گیاه گوجه‌فرنگی (داده‌ها میانگین ۳ تکرار و علائم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیر یکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد).

هندوانه، به دلیل اثرات تشویقی و محرک این ماده روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش فعالیت آنها می‌باشد که در نزدیک مرکز واکنش فتوسیستم I می‌توانند آنیون سوپراکسید را جاروب کرده و منجر به افزایش سرعت انتقال الکترون و کاهش بازدارندگی نوری تحت شرایط تنش‌های

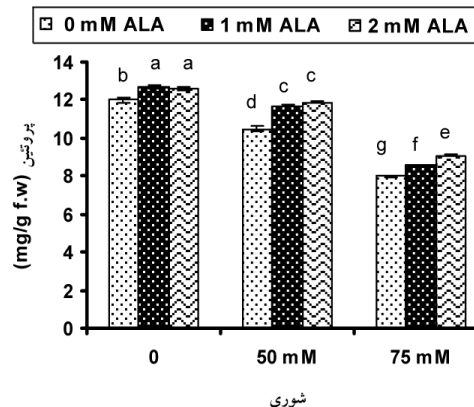
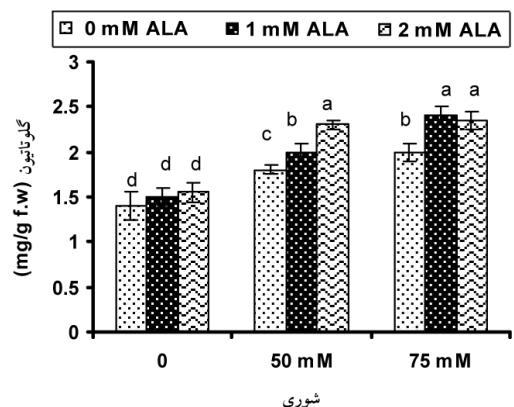
در این امر درگیرند (۲۵). گزارش شده است که ALA در گیاهان هندوانه نیز، پارامترهای فتوسنتزی و تبادل گازی را بهبود بخشد (۲۵). در این گیاهان ALA موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز گردید. در این گزارش آمده است که اثر محرک ALA روی فتوسنتز در برگ‌های





شکل ۹. اثر متقابل تنش شوری و تیمار ۵-آمینولولینیک اسید (ALA) بر مقدار قندهای محلول در گیاه گوجه‌فرنگی (داده‌ها میانگین ۳ تکرار و علائم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیر یکسان نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد).

شکل ۱۱. اثر متقابل تنش شوری و تیمار ۵-آمینولولینیک اسید (ALA) بر مقدار آسکوربات کل در گیاه گوجه‌فرنگی (داده‌ها میانگین ۳ تکرار و علائم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیر یکسان نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد).



شکل ۱۰. اثر متقابل تنش شوری و تیمار ۵-آمینولولینیک اسید (ALA) بر مقدار پروتئین در گیاه گوجه‌فرنگی (داده‌ها میانگین ۳ تکرار و علائم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیر یکسان نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد).

شکل ۱۲. اثر متقابل تنش شوری و تیمار ۵-آمینولولینیک اسید (ALA) بر مقدار گلوکاتانین در گیاه گوجه‌فرنگی (داده‌ها میانگین ۳ تکرار و علائم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیر یکسان نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد).

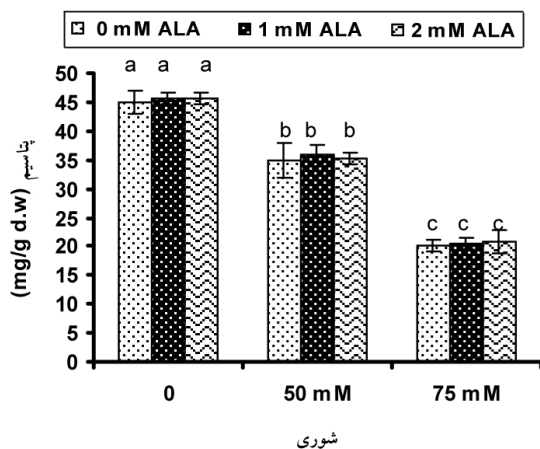
محیطی شود (۲۵). گیاهان مقدار گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را با کمک آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی کنترل می‌نمایند. در این مطالعه تنش اکسیداتیو و میزان MDA و  $H_2O_2$  در شرایط تنش شوری افزایش یافت. از میان ROS ها،  $H_2O_2$  دارای پایداری بیشتری بوده و می‌تواند از غشاءهای زیستی رد شود و به شدت به متابولیسم سلولی آسیب برساند (۳۴). افزایش  $H_2O_2$  یکی از نشانه‌های تنش اکسیداتیو القاء شده توسط تنش‌های محیطی نظیر شوری می‌باشد. گیاهان تحت تنش باید مقدار  $H_2O_2$  را در بافت‌های خود تحت کنترل

دارای پایداری بیشتری بوده و می‌تواند از غشاءهای زیستی رد شود و به شدت به متابولیسم سلولی آسیب برساند (۳۴). افزایش  $H_2O_2$  یکی از نشانه‌های تنش اکسیداتیو القاء شده توسط تنش‌های محیطی نظیر شوری می‌باشد. گیاهان تحت تنش باید مقدار  $H_2O_2$  را در بافت‌های خود تحت کنترل

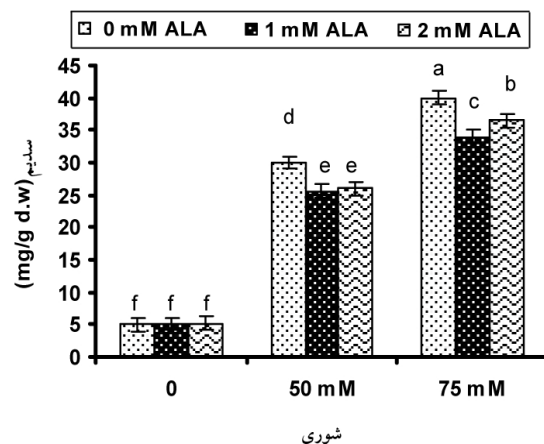
داشته باشند تا آسیب‌های ناشی از واکنش فنتون را به حداقل برسانند. در این مطالعه کاربرد ALA تنش اکسیداتیو، مقدار MDA و  $H_2O_2$  را کاهش داد. در گیاهان تیمار شده با ALA فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان افزایش یافت (داده‌ها آورده نشده است) و هم‌چنین بر مقدار آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی مانند آسکوربات و گلوتاتیون نیز افزوده گردید. مشابه با این نتایج در گیاهان خیار تحت تنش نیز کاربرد ALA موجب کاهش مقدار  $H_2O_2$  گردید (۳۴). در مطالعه مشابهی در گیاه جو، نیز مقدار ROS در گیاهان جو تحت تنش افزایش یافت و ALA مقدار ROS، پراکسیداسیون لیپید و  $H_2O_2$  را کاهش داد و مقدار آنتی‌اکسیدان‌ها را افزایش داد (۱). این نتایج نشان می‌دهد که تیمار ALA دارای توانایی حفاظت از گیاهان گوجه‌فرنگی در برابر تنش اکسیداتیو می‌باشد که با نتایج به‌دست آمده روی گیاهان سیب‌زمینی نیز مطابقت دارد (۳۳). آسکوربات و گلوتاتیون یکی از اجزای اصلی سیستم جاروب‌کننده ROS در سلول می‌باشند و نقش مهمی در جلوگیری از آسیب‌های اکسیداتیو دارند. در این مطالعه کاربرد ALA موجب افزایش مقدار آسکوربات و گلوتاتیون در برگ‌های گیاه گوجه‌فرنگی در تنش شوری گردید. مشابه با این نتایج در گیاهان کلزا نیز تنش شوری موجب افزایش مقدار MDA و ROS و هم‌چنین موجب افزایش مقدار آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی مانند آسکوربات و گلوتاتیون گردید و کاربرد ALA باعث افزایش مقدار بیشتر مقدار آسکوربات و گلوتاتیون و کاهش مقدار MDA و ROS گردید (۲۲).

گیاهانی که در معرض تنش‌هایی مانند شوری و خشکی قرار دارند، برای تنظیم اسمزی و برای حفظ فشار تورژسانس خود، اسمولیت‌هایی نظیر پرولین و قندها را سنتز می‌کنند. در این مطالعه، مقدار پرولین در گیاهان گوجه‌فرنگی تحت تنش شوری افزایش پیدا کرد و تیمار ALA نیز مقدار پرولین را در شرایط تنش و غیر تنش افزایش داد. مشابه با نتایج این مطالعه، در گیاهان جو نیز

تیمار ALA موجب افزایش مقدار پرولین گردید (۱). در این مطالعه مقدار قندهای محلول و پروتئین نیز در گیاهان تیمار شده با ALA افزایش یافت. مشابه با نتایج این مطالعه، در گیاهان کلزای تحت تنش شوری نیز اسمولیت‌هایی نظیر پرولین و قندهای محلول افزایش یافت. کاربرد ALA موجب بهبود افزایش تجمع اسمولیت‌هایی نظیر پرولین، قندهای محلول، پروتئین و آمینواسیدهای آزاد گردید. در گیاهان خیار تحت تنش گرما نیز ALA موجب افزایش مقدار پرولین و قندهای محلول گردید (۳۱). در این گزارش آمده است که، پرولین علاوه بر نقش محافظ اسمزی و خاموش کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن، می‌تواند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را تنظیم کند و به‌علاوه جذب یون را نیز تحت تأثیر قرار دهد (۳۱). قندهای محلول نیز می‌توانند ROS را خاموش سازند. در گیاه اسفناج نیز ALA موجب افزایش قند فروکتان (پلی‌فروکتوزیل ساکاروز) گردید (۲۹). در گیاه تربچه نیز کاربرد ALA بر متابولیسم قندها و نشاسته تأثیر گذاشت (۱۵). گزارش شده است که ALA متابولیسم نشاسته را با افزایش بیان ژن‌های مرتبط آنزیم بتا‌آمیلاز کنترل نموده و موجب افزایش فعالیت آنزیم بتا‌آمیلاز در ریشه اصلی گیاه تربچه گردید (۱۵). در یک مطالعه روی گیاهان جو، گزارش شده است که در این گیاهان در حضور ALA برون‌زا، مقدار ALA درون‌زا کاهش پیدا کرد و سنتز پرولین افزایش یافت، که این مطلب نشان می‌دهد مسیر گلوتامیک اسید به سمت ALA به سمت مسیر گلوتامیک اسید - پرولین تغییر یافته است. از آنجا که در گیاهان کلروفیل، هم پرولین از پیش‌ساز مشترکی به‌نام گلوتامیک اسید ساخته می‌شوند و در مسیر گلوتامیک اسید به سمت کلروفیل و هم ماده‌ای به‌نام ALA وجود دارد، به‌نظر می‌رسد که ALA برون‌زا با بر عهده گرفتن قسمتی از بیوسنتز کلروفیل و هم می‌تواند علاوه بر اینکه موجب افزایش مقدار کلروفیل و هم گردد، می‌تواند موجب تحریک مسیر سنتز پرولین از گلوتامیک نیز گردد و سبب افزایش مقاومت به تنش شود (۱).



شکل ۱۴. اثر متقابل تنش شوری و تیمار ۵-آمینولولینیک اسید (ALA) بر مقدار یون پتاسیم در گیاه گوجه‌فرنگی (داده‌ها میانگین ۳ تکرار و علائم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیر یکسان نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد).



شکل ۱۳. اثر متقابل تنش شوری و تیمار ۵-آمینولولینیک اسید (ALA) بر مقدار یون سدیم در گیاه گوجه‌فرنگی (داده‌ها میانگین ۳ تکرار و علائم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیر یکسان نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد).

نیز ALA بر تغذیه معدنی گیاه نیز تأثیر گذاشت و منجر به کاهش جذب سدیم و نسبت سدیم به پتاسیم شد (۲۳).

### نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که کاربرد ALA در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مولار به‌صورت محلول‌پاشی روی برگ و اندام هوایی، با افزایش مقدار کلروفیل، پروتئین، فنل، پروتئین و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی و کاهش مقدار سدیم موجب کاهش اثرات تنش شوری و تنش اکسیداتیو ناشی از آن روی گیاه گوجه‌فرنگی و هم‌چنین بهبود پارامترهای رشد در شرایط غیرتنش شد.

### سپاسگزاری

نویسندگان بدین‌وسیله از پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی جهت تأمین اعتبار مالی این پروژه با شماره قرارداد (۳/۳۱۲۲) قدردانی می‌نمایند.

بنابراین افزایش مقاومت گیاهان به تنش شوری و هم‌چنین افزایش رشد گیاهان توسط ALA را، می‌توان توسط افزایش مقدار پروتئین که یک محافظت‌کننده عمومی در برابر تنش‌ها است توضیح داد و هم‌چنین توسط نقش ALA به‌عنوان پیش‌ساز کلروفیل و هم‌نیز توجیه نمود. به‌علاوه اینکه، ALA به‌عنوان القاء‌کننده تجمع سیتوکینین و تثبیت‌کننده ساختار پروتئین‌ها نیز شناخته شده است (۱).

در این مطالعه برای روشن شدن چگونگی نقش ALA در افزایش مقاومت گیاهان گوجه‌فرنگی به شوری، مقدار یون‌های سدیم و پتاسیم در ریشه و اندام هوایی گیاهان اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان داد که ALA مقدار سدیم را در اندام هوایی و ریشه گیاهان تحت تنش شوری کاهش داد اما بر مقدار پتاسیم تأثیری نداشت. مشابه با نتایج این مطالعه، ALA در گیاهان پنبه از طریق کاهش جذب سدیم منجر به بهبود مقاومت به تنش شوری گردید. در این گیاهان ALA موجب کاهش مقدار سدیم در ریشه و اندام هوایی گیاهان پنبه گردید (۲۹). در گیاهان کلزای تحت تنش شوری

## منابع مورد استفاده

1. Averina, N. G., E. R. Gritskevich, I. V. Vershilovskaya, A. V. Usator and E. B. Yaronkaya. 2010. Mechanisms of salt stress tolerance development in barley plants under the influence of 5-aminolevulinic acid. *Russian Journal of Plant Physiology* 57(6): 792-798.
2. Avissar, V. J. and P. A. Mobery. 1995. The common origin of pigments of life-early steps of chlorophyll biosynthesis. *Photosynthesis Research* 44: 221-224.
3. Bates, L. S., R. P. Waldern and I. D. Tare. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 29: 205-207.
4. Beal, S. I. 1999. Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynthesis Research* 60: 43-73.
5. Beale, S. I. and P. A. Castelfranco. 1974. The biosynthesis of  $\delta$ -aminolevulinic acid in higher plants. *Plant Physiology* 53: 291-296.
6. Bindu Roy, C. and M. Vivekanadan. 1998. Role of aminolevulinic acid in improving biomass production in *Vinga catjing*, *V. mungo* and *V. radiate*. *Biologia Plantarum* 41(2): 211-215.
7. Bollivar, D. W. 2006. Recent advances in chlorophyll biosynthesis. *Photosynthesis Research* 89(3): 1-22.
8. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* 72: 248-254.
9. Chakraborty, N. and B. C. Tripathy. 1992. 5-Aminolevulinic acid induced photodynamic reactions in thylakoid membranes of cucumber (*Cucumis sativus* L.) cotyledons. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 1(1): 65-68.
10. De Pinto, M. C., D. Francis and L. Gara. 1999. The redox state of ascorbate-dehydroascorbate pairs a specific sensor of cell division in tobacco By-Z cells. *Protoplasma* 209: 90-97.
11. Drazic, G. and N. Mihailovic. 1998. Chlorophyll accumulation in black pine seedlings treated with 5-aminolevulinic acid. *Biologia Plantarum* 41(2): 277-280.
12. Fales, F. W. 1951. The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. *Journal of Biological Chemistry* 193: 113-124
13. Gough, S. P., T. Westergen and M. Hansson. 2003. Chlorophyll biosynthesis in higher plants: regulatory aspects of 5-aminolevulinic acid formation. *Journal of Plant Biology* 46(3): 135-160.
14. Griffith, O. W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Annals of Biochemistry* 106: 207-212.
15. Hara, M., I. Takahashi, M. Yamori, T. Tanaka, S. Funada and K. Watanab. 2011. Effects of 5-aminolevulinic acid on growth and amylase activity in the radish taproot. *Plant Growth Regulation* 64(3): 287-291.
16. Heath, R. L. and L. Packer. 1969. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
17. Hotta, Y., T. Tanaka, H. Takaoka, Y. Takeuchi and M. Konnai. 1997. Promotive effects of 5-aminolevulinic acid on the yield of several crops. *Plant Growth Regulation* 22: 109-114.
18. Jung, S., K. Back, K. Yang, Y. I. Kuk and S. U. Chon. 2008a. Defense response produced during photodynamic damage in transgenic rice over expressing 5-aminolevulinic acid synthase. *Photosynthetica* 46(1): 3-9.
19. Jung, S., H. J. Lee, Y. Lee, K. Kang, Y. S. Kim, B. Grimm and K. Back. 2008b. Toxic tetrapyrrole accumulation in protoporphyrinogen IX oxidase-overexpressing transgenic rice plants. *Plant Molecular Biology* 67: 539-546.
20. Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
21. Memon, S. A., X. Hou, G. L. Wan and Y. Li. 2009. Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on chlorophyll, antioxidative enzymes and photosynthetic of packchoi (*Brassica campestris* ssp. *Chinensis* var. *communis* Tsen et Lee). *Acta Physiologiae Plantarum* 31: 51-57.
22. Naeem, M. S., M. Rashed, D. Liu, Z. L. Jin, D. F. Ming, K. Yoneyama, Y. Takeuchi and W. J. Zhou. 2011. 5-Aminolevulinic acid ameliorates salinity-induced metabolic, water related and biochemical changes in *Brassica napus* L. *Acta Physiologiae Plantarum* 33(2): 517-528.
23. Naeem, M. S., Z. I. Jin, G. L. Wan, P. Liu, H. B. Liu, K. Yonegama and W. J. Zhou. 2010. 5-Aminolevulinic acid improves photosynthetic gas exchange capacity and ion uptake under salinity stress in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant and Soil* 332(1-2): 405-415.
24. Pavlovic, A., V. Demko, M. Durchan and J. Hudak. 2009. feeding with aminolevulinic acid increased chlorophyll content in norway spruce (*Picea abies*) in the dark. *Photosynthetica* 47 (4): 631-634.
25. Sun, Y. P., Z. P. Zhang, and L. J. Wang. 2009. Promotion of 5-aminolevulinic acid treatment on leaf photosynthesis is related with increase of antioxidant enzyme activity in watermelon seedlings grown under shade condition. *Photosynthetica* 47: 347-354.

26. Tanaka, A., Y. Tanaka and H. Tsuji. 1994. Preferential accumulation of apoproteins of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex in greening barley leaves treated with 5-aminolevulinic acid. *Planta* 192: 92-97.
27. Velikova, V., I. Yordanov and A. Edreva. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. *Plant Science* 151: 59-66.
28. Watanab, K., E. Nishihara, S. Watanab, T. Tanaka, K. Takahashi and Y. Takeuchi. 2006. Enhancement of growth and fruit maturity in 2-year-old grapevines cv. delavare by 5-aminolevulinic acid. *Plant Growth Regulation* 49(1): 35-42.
29. Watanab, K., T. Tanaka, Y. Hotta, H. Kuramochi and Y. Takeuchi 2000. Improving salt tolerance of cotton seedlings with 5-aminolevulinic acid. *Plant Growth Regulation*. 32 (1): 97-101.
30. Yousef, T. and M. A. Awad. 2008. Mechanisms of enhancing photosynthetic gas exchange in date palm seedlings (*Phoenix dactylifera* L.) under salinity stress by a 5-aminolevulinic acid-based fertilizer. *Journal of Plant Growth Regulation* 27:1-9.
31. Zhang, J., D. M. Li, Y. Gao, B. Yu, C. X. Xia and J. G. Bai. 2012. Pretreatment with 5-aminolevulinic acid mitigates heat stress of cucumber leaves. *Biologia Plantarum* 56: 4: 780-784.
32. Zhang, W. F., F. Zhang, R. Raziuddin, H. J. Gong, Z. M. Yang, L. Lu, Q. F. Ye and W. J. Zhou. 2008. Effects of 5-aminolevulinic acid on oilseed rape seedling growth under herbicide toxicity stress. *Journal of Plant Growth Regulation* 27: 159-169.
33. Zhang, Z. J., H. Z. Li, W. J. Zhou, Y. Takeuchi and K. Yoneyama. 2006. Effect of 5-aminolevulinic acid on development and salt tolerance of potato (*Solanum tuberosum* L.) microtubers in vitro. *Plant Growth Regulation* 49: 27-34.
34. Zhen, A., Z. I. Bie, Y. Huang, Z. Y. Liu and M. I. Fan. 2012. Effects of 5-aminolevulinic acid on the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content and antioxidative enzyme gene expression in NaCl-treated cucumber seedlings. *Biologia Plantarum* 56(3): 566-570.