J. Crop Prod. Process. 2026, 15(4), 35-54; DOI: 10.47176/jcpp.15.4.26735

Journal of Crop Production and Processing

Journal homepage: https://jcpp.iut.ac.ir/

Original Article

Effect of Calcium Chloride on γ-Aminobutyric Acid (GABA) Metabolic Pathway in Strawberry Plants Under Heat Stress Conditions

Elaheh Akbari, Mahdiyeh Gholami* and Bahram Baninasab

Department of Horticulture, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, 84156 83111 Isfahan, Iran

Extended Abstract

Introduction: Over the last century, the increase in the concentration of greenhouse gases due to the burning of fossil fuels is the major reason for the global warming associated with changing climate patterns. One of the serious consequences of heat stress is generation of reactive oxygen species (ROS). The accumulation of osmolytes during heat stress has been reported previously for proline, glycine betaine, and trehalose in different plant species. These osmolytes serve several functions in the cells subjected to stress, including turgor generation, protection of the integrity of membranes and enzymes, photosynthetic apparatus, and acting as antioxidants to maintain the redox balance. When plants experience stress, they often show a decrease in their mineral content. Adding essential mineral nutrients can help reduce the harmful effects of stress on these plants and greatly enhance the absorption of these nutrients during challenging situations. Calcium helps regulate plant responses to various adverse environmental conditions such as high temperature stress. Studies showed that external application of calcium chloride increased proline content, soluble sugar, calcium ion and chlorophyll content and decreased malondialdehyde content and relative electrical conductivity in tea plant leaves compared to plants without calcium treatment in under heat stress. Studies showed that external application of GABA and calcium chloride to rice seedlings under low temperature stress reduced the negative effects of abiotic stresses and promoted plant growth and development. Calcium binds to calmodulin to form a calcium/calmodulin complex, and this complex stimulates the activity of the enzyme glutamate decarboxylase and the accumulation of GABA (10). GABA can act as a protective substance (such as an antioxidant molecule, chelating agent, osmotic regulator) and is involved in energy metabolism in response to stress conditions. The aim of this study was to investigate the effect of exogenous calcium chloride as a GABA synthesis stimulant compound on the induction of high temperature stress tolerance in 'Camarosa' cultivar of strawberry. The results of this experiment indicate the effect of external application of calcium chloride in increasing endogenous GABA and regulating tolerance mechanisms under high temperature stress conditions by increasing the production of osmolytes and the relative expression of heat shock proteins in the 'Camarosa' strawberry.

Materials and Methods: Strawberry plants at the 5-6 fully expanded leaf stage received chemical and temperature treatments. Chemical treatments included calcium chloride at concentrations of 10, 15 and 20 mM as foliar spray for 3 consecutive days and heat stress started on the fourth day. After applying chemical treatments, plants were transferred to a growth chamber with a temperature of 25°C, relative humidity of 70%, 16 hours of light, 8 hours of darkness and 1200 lux of light. Heat stress was applied immediately for 10 h. Temperature treatments included 25 and 40°C. After 10 h of applying the desired temperature stress, the plants were taken out of the growth chamber and some morphological, physiological and biochemical traits were measured. Based on the obtained physiological and biochemical data, a concentration of 15 mM calcium chloride was used to investigate the changes in the expression of *SSADH*, *HSP70* and *HSP90* genes. The leaves of the plants were collected after 2 h of applying the temperature stress at 40 °C and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until the extraction of total RNA.

Received: March 18, 2025; Revised: Sep. 20, 2025; Accepted: Sep. 21, 2025; Published Online: Dec. 27, 2025.
* Corresponding Author: mah.gholami@iut.ac.ir

Journal of Crop Production and Processing

Journal homepage: https://jcpp.iut.ac.ir/

Results and Discussion: Application of 15 mM calcium chloride after imposing the temperature stress at 40 °C for 10 h in the 'Camarosa' cultivar caused a significant decrease in the apparent damage index and also an increase in the leaf soluble carbohydrate, proline, internal GABA, and total soluble protein concentrations, and maximum quantum efficiency of photosystem II compared to plants without chemical treatment. Calcium pretreatment increased the proline, soluble carbohydrates, and chlorophyll concentrations, but decreased the malondialdehyde concentration and relative electrical conductivity in *C. sinensis* leaves under heat stress, which is consistent with the enhanced leaf soluble carbohydrate and proline concentrations and photochemical efficiency of photosystem II in our experiment. During the storage of apple fruits, GABA concentration increased in response to external calcium application, indicating the effect of increasing intracellular calcium concentration in inducing an increase in GABA content. Strawberry plants exposed to 2 h of 40°C temperature stress and external application of 15 mM calcium chloride showed significant increase in the expression of *SSADH*, *HSP70* and *HSP90* genes compared to plants without chemical treatment. GABA is catalyzed by the activity of the enzyme GABA transaminase to succinic semialdehyde and by succinic semialdehyde dehydrogenase to succinic acid (37). External application of calcium chloride increases the activity of the GABA pathway by increasing the expression levels of the *MdGABA-T1/2* and *MdSSADH* genes (19). In strawberry plants, the upregulation of HSP 90-alpha 1-like gene increased with a gradual increase in temperature. Applying heat stress to creeping bentgrass significantly increased the relative expression of HSP 90-1 gene, which is consistent with the results of present experiment.

Conclusions: According to the results of this experiment, concomitant application of 40°C temperature stress and 15 mM calcium chloride significantly reduced the apparent damage index, despite increases in leaf soluble carbohydrates, proline, internal GABA, and total soluble protein concentrations and maximum quantum efficiency of photosystem II of strawberry plants of 'Camarosa' cultivar, compared to plants without chemical treatment. Also, exposure to 2 h of 40°C temperature stress and external application of 15 mM calcium chloride significantly increased the expression of *SSADH*, *HSP70* and *HSP90* genes compared to plants without chemical treatment. According to the results of this experiment, thus, external application of 15 mM calcium chloride was able to help tolerate high temperature stress conditions in strawberry plants of 'Camarosa' cultivar by inducing the GABA metabolic pathway.

Keywords: Abiotic stress, GABA shunt pathway, Heat shock protein, Succinic semialdehyde dehydrogenase

How to Cite: Akbari E., Gholami M., Baninasab B. Effect of calcium chloride on γ-aminobutyric acid (GABA) metabolic pathway in strawberry plants under heat stress conditions. *J. Crop Prod. Process*. 2026, 15(4), 35-54. (*In Persian*). DOI: 10.47176/jcpp.15.4.26735.

Copyright © 2026 Isfahan University of Technology, Published by Isfahan University of Technology press. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

نشریه تولید و فرآوری محصولات زراعی و باغی، ۱٤۰٤، دوره ۱۵، شماره ٤، صص. ٥٤-۳۵، DOI: 10.47176/jcpp.15.4.26735

نشریه تولید و فرآوری محصولات زراعی و باغی
صفحه خانگی نشریه: https://jcpp.iut.ac.ir/

مقاله پژوهشی

اثر کلرید کلسیم بر مسیرمتابولیکی گابا در گیاه توت فرنگی تحت شرایط تنش گرمایی

الهه اکبری، مهدیه غلامی* و بهرام بانی نسب

چکیده– گیاهان در طول رشد و تکامل خود با تنش‌های غیرزنده مختلفی روبرو می‌شوند که باعث کاهش رشد وعملکرد محصول در آن‌ها می‌شود. هدف از این آزمایش بررسی تاثیر کاربرد خارجی کلرید کلسیم به‌عنوان ترکیب محرک سنتز گابا بر القای تحمل به تنش دمای بالا در گیاهان توت فرنگی رقم کاماروسا بود. بدین منظور گیاهان توت فرنگی در مرحله ٦-٥ برگ کاملاً گسترش یافته تیمارهای شیمیایی و دمایی را دریافت کردند. تیمارهای شیمیایی شامل کلرید کلسیم با غلظت‌های ۱۰ ، ۱۵ و ۲۰ میلی مولار به‌صورت محلول پاشی در ۳ روز متوالی و شروع تنش حرارتی از روز چهارم است. پس از اعمال تیمارهای شیمیایی، گیاهان به اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۷۰ درصد، ١٦ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و ۱۲۰۰ لوکس نوری منتقل شدند. تنش حرارتی به‌صورت ناگهانی طی ۱۰ ساعت اعمال شد. تیمارهای دمایی شامل دمای ۲۵ و ٤۰ درجه سلسیوس بود. گیاهان پس از ۱۰ ساعت اعمال تنش دمایی مورد نظر از اتاقک رشد خارج و برخی صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی اندازه گیری شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی از غلظت ۱۵ میلی مولار کلرید کلسیم به‌منظور بررسی تغییر در بیان ژن‌های ***SSADH*** ، ***HSP90*** و ***HSP70*** استفاده شد. برگ‌های گیاهان پس از ۲ ساعت اعمال تنش دمای ٤۰ درجه سلسیوس جمع‌آوری و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شده و تا زمان استخراج آر ان ای کل در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. مطابق با نتایج آزمایش کاربرد ۱۵ میلی مولار کلرید کلسیم پس از اعمال ۱۰ ساعت تنش دمای ٤۰ درجه سلسیوس در رقم کاماروسا باعث کاهش معنی‌دار شاخص خسارت ظاهری و افزایش محتوای کربوهیدرات محلول برگ، محتوای پرولین، کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II، محتوای گابای درونی و محتوای پروتئین محلول کل نسبت به گیاهان بدون کاربرد تیمار شیمیایی شد. همچنین اعمال ۲ ساعت تنش دمای ٤۰ درجه سلسیوس در گیاهان با کاربرد خارجی ۱۵ میلی مولار کلرید کلسیم باعث افزایش معنی‌دار بیان نسبی ژن ***SSADH***، ***HSP70*** و ***HSP90*** نسبت به گیاهان بدون کاربرد تیمار شیمیایی شد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان‌دهنده اثر کاربرد خارجی کلرید کلسیم در افزایش گابای درونی و تنظیم مکانیسم‌های تحمل در شرایط تنش دمای بالا به وسیله افزایش تولید اسمولیت‌ها و بیان نسبی پروتئین‌های شوک حرارتی در رقم کاماروسا است.

واژه‌های کلیدی: پروتئین شوک حرارتی، تنش غیرزیستی، سوکسنیک سمی آلدهید دهیدروژناز، مسیر گابا شانت.

دریافت مقاله: ۱٤۰۳/۱۲/۲۸، بازنگری: ۱٤۰٤/۰٦/۲۹، پذیرش: ۱٤۰٤/۰٦/۳۰، اولین انتشار: ۱٤۰٤/۱۰/۰۷

گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

*: نویسنده مسئول، رایانامه: mah.gholami@iut.ac.ir

حق انتشار این مستند، متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است. ۱٤۰٤ ©.

این مقاله تحت گواهی زیر منتشر شده و هر نوع استفاده غیرتجاری از آن مشروط بر استناد صحیح به مقاله و با رعایت شرایط مندرج در آدرس زیر مجاز است:

Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

مقدمه

همراه با رشد جمعیت سریع و توسعه صنعت، افزایش معنی‌داری در استفاده از سوخت‌های فسیلی ایجاد شده است. در طول قرن گذشته افزایش در غلظت گازهای گلخانه‌ای به‌علت سوزاندن سوخت‌های فسیلی، دلیل عمده گرم شدن جهانی وابسته به تغییر الگوها است (۳۳). تنش حرارتی باعث تغییرات فراوان پاسخ‌های فیزیولوژیکی در گیاهان مانند از دست دادن آب سلول‌ها (۲۰)، کاهش فتوسنتز (١٤)، تخریب ساختار و نقش غشای سلولی (۵۰) و عدم تعادل متابولیسم اکسیژن فعال (۳۹) می‌شود. یکی از نتایج مهم تنش دمای بالا تولید گونه‌های فعال اکسیژن مانند پراکسید-های چربی، اکسیژن منفرد، رادیکال‌های سوپر اکسید، رادیکال-های هیدروکسیل و هیدروژن پراکسید است که می‌تواند به‌وسیله آسیب به رنگدانه‌ها، نوکلئیک اسیدها، پروتئین‌ها و غشاها باعث تشدید آسیب سلولی شود (٣٦). در پاسخ به دمای بالا در گونه-های گیاهی مختلف تجمع اسمولیت‌هایی مانند پرولین (٤٣)، گلایسین بتائین (٤١) و ترهالوز (٢٤) مشاهده شده است. این اسمولیت‌ها چندین نقش را در سلول‌های تحت تنش ایفا می‌کنند که شامل ایجاد فشار تورگر، حفاظت از یکپارچگی غشاها و آنزیم‌ها، حفاظت از دستگاه فتوسنتزی و فعالیت به‌عنوان آنتی-اکسیدان به‌منظور حفظ تعادل در احیا است (٣٦). هنگامی که گیاهان شرایط تنش را تجربه می‌کنند، اغلب کاهش محتوای مواد معدنی خود را نشان می‌دهند. افزودن مواد مغذی معدنی ضروری می‌تواند به کاهش اثرات مضر تنش بر این گیاهان کمک کند و جذب این مواد مغذی را در شرایط چالش برانگیز تا حد زیادی افزایش دهد (۱). کلسیم به تنظیم واکنش‌های گیاه به شرایط محیطی مختلف و نامناسب مانند تنش دمای بالا کمک می‌کند. مطالعات نشان داد کاربرد خارجی کلرید کلسیم در گیاه چای تحت تنش دمای بالا باعث افزایش محتوای پرولین، قند محلول، یون کلسیم و محتوای کلروفیل و کاهش محتوای مالون دی آلدهید و هدایت الکتریکی نسبی در برگ‌های گیاه چای نسبت به گیاهان بدون کاربرد تیمار کلسیم شد (٤٧). مطالعات نشان داد کاربرد خارجی گابا و کلرید کلسیم در دانهال‌های برنج تحت تنش دمای پایین باعث کاهش اثرات منفی تنش‌های غیر زیستی و توسعه رشد و نمو در گیاهان شد (۲۳). یون کلسیم به‌عنوان یک پیام رسان ثانویه درون سلولی در سلول‌های گیاهی عمل می‌کند و در تنظیم ارتباط سلولی نقش دارد. در پاسخ‌های تنش گیاهان، سیگنال‌های یون کلسیم می‌تواند با دیگر مولکول‌های سیگنال برای تنظیم واکنش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک درون سلولی جفت شوند. کلسیم به کالمودولین به‌منظور تشکیل کمپکس کلسیم/کالمودولین متصل می‌شود و این کمپلکس باعث تحریک فعالیت آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز و تجمع گابا می‌شود (۱۰). مطالعات نشان داد در انبارداری میوه هلو در دمای صفر درجه سلسیوس، کاربرد خارجی کلرید کلسیم باعث افزایش بیان و فعالیت آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز و افزایش محتوای گابا و بیان گابا ترانس آمیناز شد (۵۱). گابا یک آمینو اسید چهار کربنه غیر پروتئینی است که به‌عنوان سیگنال یا متابولیت مطرح شده است و باعث تنظیم فعالیت‌های حیات بیولوژیکی می‌شود. در برخی از گیاهان گابای درونی گیاه به سرعت به‌واسطه تحمل گیاه به تنش‌های مختلف مانند دمای بالا، دمای پایین، خشکی، شوری، آسیب مکانیکی، محیط اسیدی، آلودگی ویروسی و گیاهخواران تجمع می‌یابد (٤٨). بر اساس مطالعات، کاربرد گابا به گیاهان کمک می‌کند تا با اثرات منفی نشانه‌های تنش از طریق حفظ یکپارچگی غشای سلولی، بهبود متابولیسم آنتی‌اکسیدانی یا با مهار تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن مقابله کنند (۳۸). گابا می‌تواند به-عنوان یک ماده حفاظتی (مانند مولکول آنتی اکسیدان، عامل کلاته کننده، تنظیم کننده اسمزی) عمل کند و در متابولیسم انرژی در پاسخ به شرایط تنش درگیر است (۱۱). همچنین گابا نقش تنظیمی مثبتی را بر بیان *HSP70s* و *HSP90s* در گیاهان کیوی تحت تنش گرمایی دارد (۲۱). گابا توسط فعالیت آنزیم گابا ترانس آمیناز به سوکسینیک سمی آلدهید تبدیل و سپس توسط سوکسنیک سمی آلدهید دهیدروژناز به سوکسینیک اسید کاتالیز می‌شود و این محصول وارد چرخه تری کربوکسیلیک اسید می-شود وبیان کننده ارتباط قطعی بین تجمع و تجزیه گابا و متابولیسم

انرژی است (۳۷). هدف از این پژوهش بررسی اثر غلظت‌های مختلف کلرید کلسیم به‌عنوان ترکیب محرک سنتز گابا بر افزایش تولید محتوای گابای درونی در گیاهان تحت تنش دمای بالا و القای تحمل به تنش از طریق مسیرهای متابولیکی مرتبط با گاما آمینوبوتریک اسید در رقم توت فرنگی کاماروسا بود.

مواد و روش‌ها

به‌منظور مطالعه مکانیسم عمل کلرید کلسیم بر القای تحمل به تنش دمای بالا، نهال‌های توت فرنگی رقم کاماروسا در تاریخ ۱٤۰۱/۰۹/۱٦ پس از تهیه از تولید کننده تجاری نهال در کردستان، به گلخانه پژوهشی دانشگاه صنعتی اصفهان منتقل شدند. نشاها سپس در گلدان‌های پلاستیکی (۱٤×۱۲سانتی‌متر) و در بستر پرلیت و کوکوپیت (حجمی۵۰:۵۰) کشت و در گلخانه با شرایط دمایی ۲۰/۲۵ (روز/شب) درجه سلسیوس، شدت نور ۸۰۰۰ لوکس و رطوبت ۳۰ درصد به مدت ۳ هفته در گلخانه نگهداری شدند. آبیاری بر اساس نیاز به ازای هر گلدان تقریباً ۲۰۰ میلی‌لیتر همراه با محلول هوگلند۱/۳ انجام شد. گیاهان پس از استقرار و در مرحله ٦-۵ برگ کاملا گسترش یافته تیمارهای شیمیایی و دمایی را دریافت کردند. تیمار شیمیایی شامل کاربرد کلرید کلسیم با غلظت‌های ۱۰ ، ۱۵، ۲۰ میلی‌مولار همراه با توبین ۲۰ (۰/۰۱ درصد) به‌صورت محلول پاشی در ۳ روز متوالی و شروع تنش حرارتی از روز چهارم بود. در گیاهان بدون کاربرد تیمار شیمیایی محلول پاشی با آب مقطر انجام شد. پس از اعمال تیمارهای شیمیایی، گیاهان به اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۷۰ درصد، ۱٦ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و ۱۲۰۰ لوکس نوری منتقل شدند. تنش حرارتی به‌صورت ناگهانی طی ۱۰ ساعت اعمال شد. تیمارهای دمایی شامل ۲۵ و ٤۰ درجه سلسیوس بود. گیاهان پس از ۱۰ ساعت اعمال تنش دمایی مورد نظر از اتاقک رشد خارج و برخی صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی اندازه گیری شد. همچنین به‌منظور بررسی تغییرات مولکولی، جمع آوری نمونه‌های برگ تحت تنش حرارتی به‌منظور استخراج آر ان ای کل (total RNA) پس از ۲ ساعت اعمال تیمار دمایی ٤۰ درجه سلسیوس صورت گرفت و برگ‌ها بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شده و تا زمان استخراج آر ان ای در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

اندازه‌گیری شاخص خسارت ظاهری

به‌منظور تعیین میزان خسارت دمای بالا بر خصوصیات ظاهری گیاهان توت فرنگی، شماره دهی از یک تا پنج بر اساس مقیاس زیر صورت گرفت: عدد یک برای گیاهان بدون علایم قابل مشاهده و دارای رشد طبیعی، عدد دو برای گیاهان با آسیب جزئی که در آن حاشیه برگ‌های فوقانی به سمت داخل پیچیده شده بودند. عدد سه برای گیاهانی که علاوه بر پیچش، حاشیه برگ‌ها نکروزه شده بودند: عدد چهار نشانگر کلروزه شدن برگ‌ها به میزان متوسط (کمتر از ۵۰ درصد) و عدد پنج برای گیاهان با نکروزه شدید (بیشتر از ۵۰ درصد) است (۳٤).

ارزیابی شاخص پایداری غشا (MSI)

ارزیابی شاخص پایداری غشای سلول از طریق تعیین هدایت الکتریکی اجزای نشت‌شده از دیسک‌های برگ به آب دوبار تقطیر شده اندازه‌گیری شد (٤٦). ده دیسک از برگ‌های تازه با آب مقطر شسته شد و سپس در لوله های آزمایشی حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب دوبار مقطر قرار داده شدند. پس از ۳۰ دقیقه، هدایت الکتریکی محلول (EC1) توسط دستگاه هدایت سنج الکتریکی (CC-501، Elmetron ، لهستان) اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در آب با دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند و پس از کاهش دمای محلول به ۲۵ درجه سلسیوس هدایت الکتریکی محلول (EC2) اندازه گیری شد. شاخص پایداری غشا با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$MSI = \left[1 - \left(EC1/EC2\right)\right] \times 100$$

کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II

کارایی فتوسنتز توسط سنجنده کلروفیل فلوروسانس Plant Efficiency Analyzer (ساخت شرکت ELE International

انگلستان) و در ساعت ۱۰ تا ۱۳ اندازه‌گیری شد. بدین منظور برگ‌ها به‌صورت تکی توسط گیره‌هایی به مدت ۲۰ دقیقه در معرض تاریکی قرار گرفت و سپس با اتصال دیود به گیره و باز کردن دریچه و فشار دادن کلید روی دیود، کارایی فتوسنتز توسط دستگاه سنجش فلوروسنس ثبت شد.

شاخص سبزینگی برگ (SPAD)

شاخص سبزینگی برگ (غلظت نسبی کلروفیل) توسط دستگاه کلروفیل متر SPAD (KONICK MINOLTA, Japan) اندازه‌گیری شد. در ابتدا پس از روشن کردن دستگاه، یکبار آن را بدون قرار دادن برگ در محفظه برگ، قرائت کرده تا دستگاه کالیبره شود و سپس قرائت را از ۳ نقطه از هر برگ انجام و سپس میانگین سه نقطه با فشردن دگمه میانگین مشخص شد.

سنجش میزان پرولین

میزان پرولین بر مبنای روش بتس و همکاران (٤) همراه با کمی اصلاحات انجام شد. بدین منظور ۰/۵ گرم از بافت برگ همراه با ۱۰ میلی‌لیتر محلول سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد هموژن شد. پس از سانتریفیوژ در ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر از محلول رویی جمع آوری و به ۲ میلی‌لیتر محلول ناین هیدرین اسید تازه و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید در لوله‌های شیشه‌ای همراه با درهای پیچ شونده اضافه شد. نمونه‌ها در حمام آب گرم (۱۰۰ درجه سلسیوس) به مدت یک ساعت قرار داده شدند. سپس برای توقف واکنش در حمام آب یخ قرار گرفتند. چهار میلی‌لیتر تولوئن به محلول‌ها اضافه و نمونه‌ها ۲۰ ثانیه ورتکس شدند. جذب ماده رنگی قرمز در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت و با منحنی استاندارد پرولین مقایسه شد.

سنجش محتوای کربوهیدرات محلول

محتوای کربوهیدرات محلول طبق روش یم و ویلیس (٥٤) همراه با کمی اصلاحات انجام شد. بدین منظور ۰/۲ گرم نمونه همراه با ۵ میلی لیتر اتانول ۳ مرتبه عصاره گیری شد. عصاره تهیه شده به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانترفیوژ شد. صد میکرولیتر از محلول رویی همراه با ۳ میلی‌لیتر عامل آنترون ترکیب شد. نمونه‌ها سپس در حمام آب گرم (۹۵ درجه سلسیوس) به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند و بلافاصله روی یخ گذاشته شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج ٦٢٥ نانومتر قرائت شد.

سنجش غلظت گابا

غلظت گابا در برگ توسط روش کوماتسوزوکی و همکاران (۲۷) همراه با کمی تغییرات انجام شد. یک گرم از بافت برگ همراه با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد همگن و به مدت ۱ دقیقه ورتکس شد. سپس نمونه‌ها در ۱۰۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ٤ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. محلول رویی با عبور از کاغذ صافی فیلتر شد. مراحل عصاره گیری دومرتبه تکرار شد. عصاره به‌دست آمده توسط دستگاه سانتریفیوژ تغلیظ کننده خشک شده و ماده خشک شده در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر حل و پس از مشتق سازی توسط دستگاه HPLC (RF-20A, Shimadzu Corp, Japan) میزان گابا، محاسبه شد. سرعت جریان، دمای ستون و طول موج آشکارسازی به‌ترتیب ۱/۲ میلی لیتر بر دقیقه، ۳۰ درجه سلسیوس و ٤٥٠ نانومتر طول موج تابش و ۳۳۰ نانومتر طول موج بر انگیختگی است.

فعالیت آنزیم کاتالاز

به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز ابتدا ۰/۲گرم از بافت برگ در ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم سرد ۰/۰۵ مولار (پی اچ ۷) حاوی ۱ درصد پلی وینیل پیرولیدین و ۰/۵ میلی‌مولار آسکوربات سدیم، هموژن شد. سپس نمونه‌ها در دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. محلول رویی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد. به‌منظور اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار، پی اچ ۷)، ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیم و ٤/٥١ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳۳ درصد همگن و جذب در طول موج ٢٤٠ نانومتر به مدت ۲ دقیقه قرائت شد (۷).

فعالیت کاتالاز (U) = $(\Delta A \times TV \times D)/ \varepsilon \times EV$

فعالیت کاتالاز (U) / واحد حجم (ml) = فعالیت حجمی کاتالاز ($U.ml^{-1}$)

فعالیت حجمی (mg/ml) غلظت پروتئین عصاره / (U/ml)کاتالاز = فعالیت ویژه کاتالاز ($Protein\ U.ml^{-1}$)

فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز

فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز بر اساس مهار در کاهش فتوشیمیایی نیتروبلوتترازولیوم (NBT) با توجه به روش کرانتو و همکاران (۲۸) با کمی تغییر اندازه‌گیری شد. به‌منظور تهیه مخلوط واکنش دو میلی‌لیتر بافر فسفات (پی اچ ۷)، ۲۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم، ۲۰۰ میکرولیتر NBT، ٤۰۰ میکرولیتر متیونین، ۲۰۰ میکرولیتر ریبوفلاوین و ۵۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی ترکیب شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه زیر نور لامپ فلورسانس ۱۵ وات قرار گرفتند. پس از خاموش کردن لامپ واکنش متوقف و جذب مخلوط واکنش در طول موج ۵٦۰ نانومتر قرائت شد.

پروتئین‌های محلول کل

جهت اندازه گیری غلظت پروتئین‌های محلول کل از روش برادفورد (۵) استفاده شد. ابتدا ۰/۱ گرم برگ تازه در هاون چینی سائیده و یک میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (پی اچ ۷) به آن اضافه شد تا همگن شود. سپس عصاره با سرعت rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوس سانتریفیوژ و ۵۰ میکرولیتر از عصاره رویی همراه با ۳ میکرولیتر محلول بردفورد ترکیب شد و پس از ۱۰ دقیقه میزان جذب نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. برای رسم نمودار استاندارد از سرم آلبومین گاوی (Bovin serum albomin) استفاده و میزان پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ تعیین شد.

میزان بیان نسبی ژن *SSADH* (کد: XM_004293749.2)، *HSP 70* (کد: XM_004307119.2) و *HSP90* (کد: XM-004294852.2)

کل محتوای RNA بر اساس روش بادک و همکاران (۲) همراه با کمی اصلاحات انجام شد. پس از تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با کمک الکتروفورز ژل آگارز و دستگاه نانودراپ (Inplen, NP80, Germany)، برای تهیه cDNA از کیت استخراج cDNA ساخت شرکت یکتا تجهیز آزما و آغازگر (50 pmol/µl) Oligo (dT)18 طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. پس از آنکه با کمک نرم افزار Oligo 7، آغازگرهای رفت و برگشت برای ژن مورد نظر طراحی شد، کلیه‌ی ویژگی‌های آغازگرها شامل دمای اتصال، میزان تشکیل آغازگر- دایمر، تشکیل لوپ و همچنین واکنش PCR بررسی و در نهایت آغازگر اختصاصی (جدول ۱) طراحی و به‌منظور سنتز به شرکت متابیون آلمان ارسال شد.

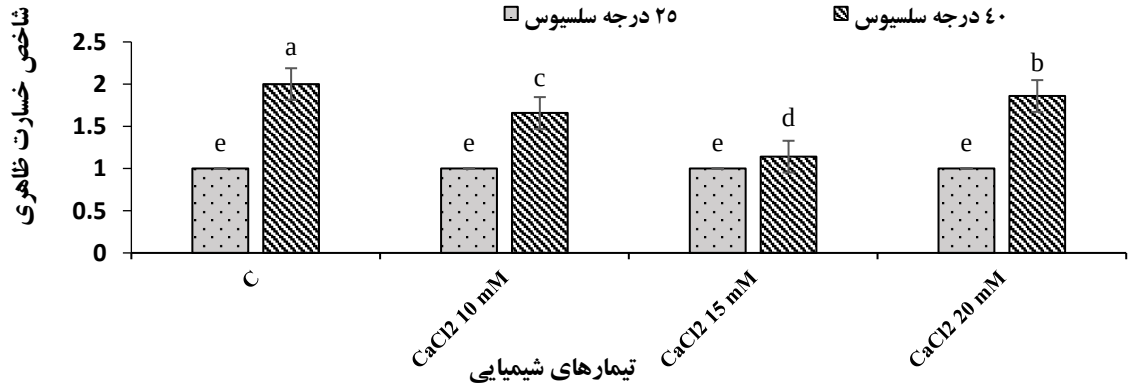
به‌منظور بررسی میزان بیان ژن سوکسینیک سمی آلدهید دهیدروژناز در نمونه‌ها از آزمایش PCR کمی (qPCR) و دستگاه Real Time PCR استفاده شد. میزان رونویسی هر ژن در مقایسه با ژن *18 s* با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ ارائه شده توسط لیواک واسکمیتژن (۳۱) انجام شد. واکنش qPCR به‌وسیله دستگاه ترموسایکر (step one 48 well) به روش (ΔΔCt) comperative Ct و بر طبق روش ارائه شده توسط شرکت سازنده (Biofact Co., Ltd. Daejeon, Republic Korea) انجام و در این واکنش از سایبرگرین ساخت شرکت Biofact حاوی SYBER ® Green I Dye و ROX استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

این تحقیق به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح تجزیه مرکب کاملاً تصادفی (دما) با ٤ تکرار انجام شد. در بخش فیزیولوژیک و بیوشیمیایی، فاکتورهای آزمایش شامل تیمار شیمیایی کلرید کلسیم در ٤ سطح (۰، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌مولار) و شرایط دمایی در ۲ سطح (۲۵ و ٤۰ درجه سلسیوس) و در بخش مولکولی این تحقیق، فاکتورهای آزمایش شامل تیمار کلرید کلسیم در دو سطح (۰ و ۱۵ میلی‌مولار) و زمان نمونه برداری در ۲ سطح (۰ و ۲ ساعت پس از شروع تنش ٤۰ درجه

جدول ۱. اطلاعات مربوط به توالی پرایمرها به‌منظور qRT-PCR

ژن	پرایمر	توالی پرایمر (5′→3′)
SSADH	Sense	TTCCATCACCTCTTGCCGAT
SSADH	Anti-sense	AGGGGTGTAAGTTCAGACGG
HSP70	Sense	AATCTCTTGGTAGTTTCCGTCT
HSP70	Anti-sense	TGGCATCTCTCTTCTCCTTGT
HSP90	Sense	CTTCATCCACATTATCCCCGAC
HSP90	Anti-sense	GAAACCAACACCAAACTGACCA
18 S rRNA	Sense	GATTCCGGTCCTATTGTGTTG
18 S rRNA	Anti-sense	TTTCGCAGTTGTTCGTCTTT



شکل ۱. اثر دما × تیمار شیمیایی بر شاخص خسارت ظاهری در گیاه توت فرنگی رقم کاماروسا. میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD هستند. بارها نشان‌دهنده‌ی خطای استاندارد است. (C: شاهد، $CaCl_2$ 10 mM: تیمار ۱۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم، $CaCl_2$ 15 mM: تیمار ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم، $CaCl_2$ 20 mM: تیمار ۲۰ میلی مولار کلرید کلسیم)

سلسیوس) بود. تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده توسط نرم افزار SAS 9.4 انجام شد. مقایسه میانگین صفات با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل (نسخه ۲۰۱۹) انجام شد.

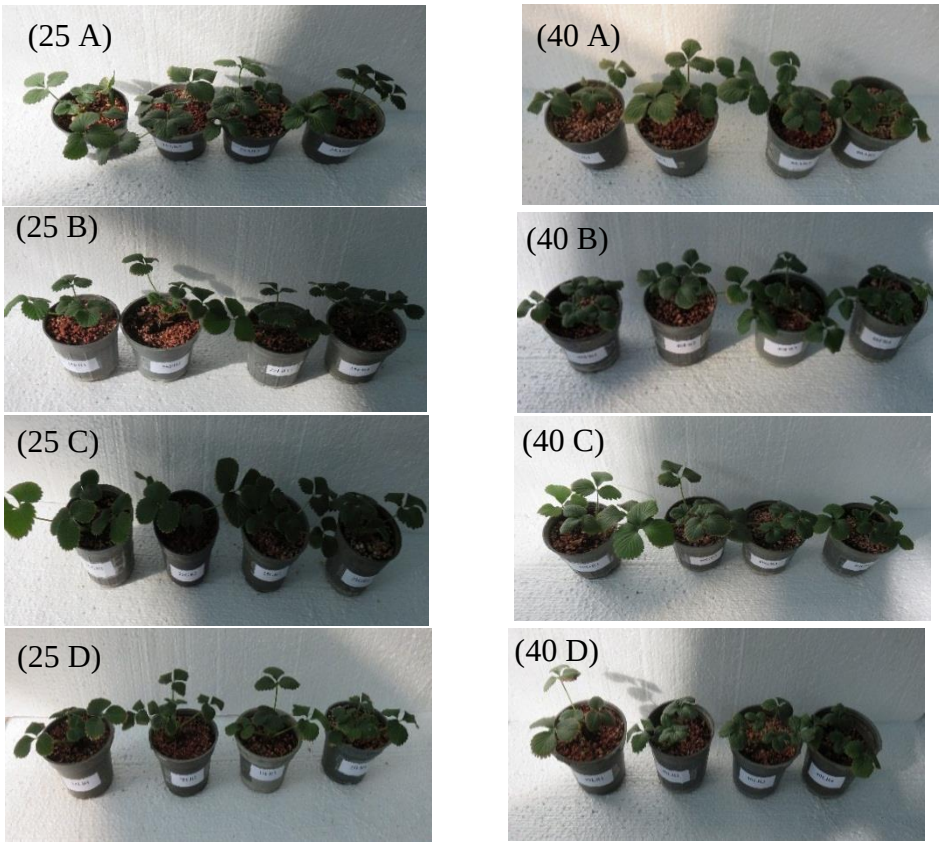
نتایج

شاخص خسارت ظاهری

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد اعمال ۱۰ ساعت تنش دمای ۴۰ درجه سلسیوس باعث افزایش معنی‌دار شاخص خسارت ظاهری در گیاهان بدون کاربرد تیمار شیمیایی و همچنین تیمارهای شیمیایی ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم شد. بیشترین شاخص خسارت ظاهری در دمای ۴۰ درجه سلسیوس و گیاهان شاهد مشاهده شد (افزایش ۲ برابری شاخص خسارت ظاهری). تیمار ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم در دمای ۴۰ درجه سلسیوس باعث کاهش شاخص خسارت ظاهری نسبت به سایر تیمارهای شیمیایی و گیاهان بدون کاربرد تیمار شیمیایی در آن دما شد (شکل ۱ و شکل ۲).

شاخص پایداری غشا (MSI)

اعمال ۱۰ ساعت تیمار دمای ۴۰ درجه سلسیوس در گیاهان همراه با کاربرد تیمار شیمیایی کلرید کلسیم و بدون کاربرد آن، باعث کاهش شاخص پایداری غشا نسبت به دمای ۲۵ درجه سلسیوس آن‌ها شد؛ اگرچه کمترین شاخص پایداری غشا در گیاهان بدون کاربرد تیمار شیمیایی مشاهده شد. در گیاهان تحت تنش دمای



شکل ۲. تصویر توت فرنگی رقم کاماروسا پس از اعمال ۱۰ ساعت تیمار دمایی. (25A: شاهد دمای ۲۵ درجه سلسیوس، 25B: تیمار ۱۰ میلی مولار کلرید کلسیم دمای ۲۵ درجه سلسیوس، 25C: تیمار ۱۵ میلی مولار کلرید کلسیم دمای ۲۵ درجه سلسیوس، 25D: تیمار ۲۰ میلی مولار کلرید کلسیم دمای ۲۵ درجه سلسیوس، 40A: شاهد دمای ٤۰ درجه سلسیوس، 40B: تیمار ۱۰ میلی مولار کلرید کلسیم دمای ٤۰ درجه سلسیوس، 40C: تیمار ۱۵ میلی مولار کلرید کلسیم دمای ٤۰ درجه سلسیوس، 40D: تیمار ۲۰ میلی مولار کلرید کلسیم دمای ٤۰ درجه سلسیوس)

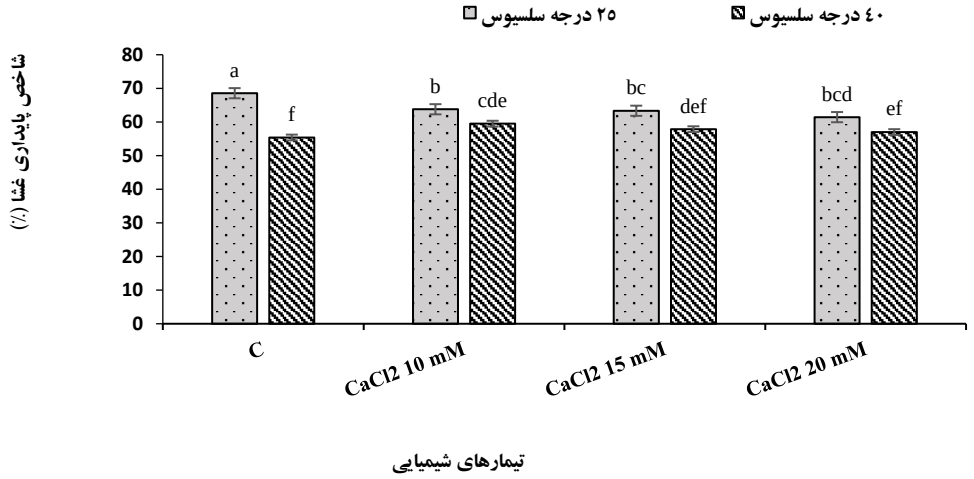
بالا، کاربرد ۱۰ و ۱۵ میلی مولار کلرید کلسیم به‌ترتیب باعث افزایش ۷/٤۳ و ٤/٤۷ درصدی شاخص پایداری غشا سلول نسبت به گیاهان بدون کاربرد تیمار شیمیایی شد (شکل ۳).

کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II

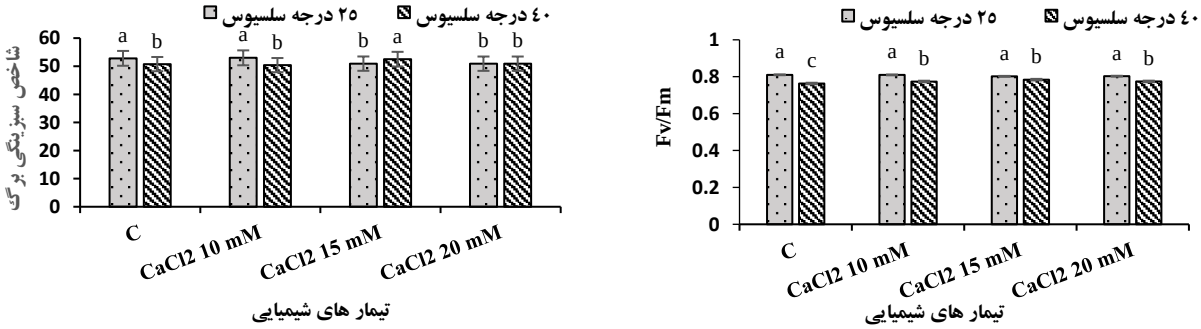
نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد اعمال تیمار حرارتی ٤۰ درجه سلسیوس در گیاهان همراه یا بدون کاربرد تیمار شیمیایی باعث کاهش معنی‌دار شاخص Fv/Fm نسبت به دمای ۲۵ درجه سلسیوس آن‌ها شد. در گیاهان تحت تنش دمای ٤۰ درجه سلسیوس بیشترین میزان کاهش در شاخص Fv/Fm در گیاهان بدون کاربرد تیمار شیمیایی (۵/۸۳ درصد) مشاهده شد. در گیاهان تحت تنش دمای بالا، کاربرد همه تیمارهای شیمیایی باعث افزایش معنی‌دار شاخص Fv/Fm نسبت به گیاهان بدون کاربرد تیمار شیمیایی شد (شکل ٤. الف).

شاخص سبزینگی برگ (غلظت نسبی کلروفیل برگ)

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در تیمار ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم با افزایش دما از ۲۵ به ٤۰ درجه سلسیوس شاخص سبزینگی برگ ۳/۰۹ درصد افزایش یافت. در تیمار ۲۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم با افزایش دما تفاوت معنی‌داری در شاخص سبزینگی برگ مشاهده نشد. اگرچه در تیمار ۱۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم و نیز گیاهان بدون کاربرد تیمار شیمیایی اعمال تیمار دمای



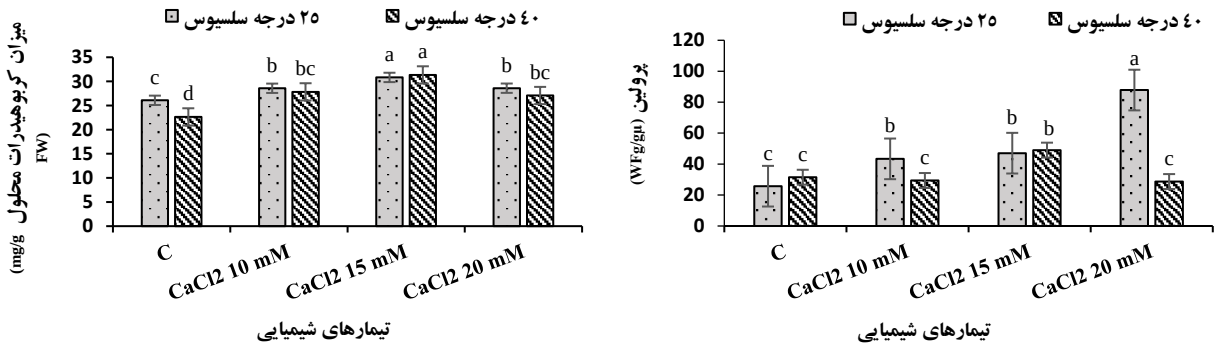
شکل ۳. اثر دما × تیمار شیمیایی بر شاخص پایداری غشا در گیاه توت فرنگی رقم کاماروسا. میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ آزمون LSD می‌باشند. بارها نشان دهنده‌ی خطای استاندارد است. (C: شاهد، $CaCl_2$ 10 mM: تیمار ۱۰ میلی مولار کلرید کلسیم، $CaCl_2$ 15 mM: تیمار ۱۵ میلی مولار کلرید کلسیم، $CaCl_2$ 20 mM: تیمار ۲۰ میلی مولار کلرید کلسیم)



ب الف

شکل ٤. اثر دما × تیمار شیمیایی بر شاخص Fv/Fm (الف) و شاخص سبزینگی برگ (ب) در گیاه توت فرنگی رقم کاماروسا. میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ آزمون LSD می‌باشند. بارها نشان دهنده‌ی خطای استاندارد است. (C: شاهد، $CaCl_2$ 10 mM: تیمار ۱۰ میلی مولار کلرید کلسیم، $CaCl_2$ 15 mM: تیمار ۱۵ میلی مولار کلرید کلسیم، $CaCl_2$ 20 mM: تیمار ۲۰ میلی مولار کلرید کلسیم)

۴۰ درجه سلسیوس باعث کاهش معنی‌دار شاخص سبزینگی برگ نسبت به دمای ۲۵ درجه سلسیوس آن‌ها شد. در دمای ۴۰ درجه سلسیوس بیشترین میزان شاخص سبزینگی برگ در تیمار ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم (۵۲/۵) مشاهده شد و به‌صورت معنی‌داری بیشتر از شاخص سبزینگی برگ در گیاهان بدون اعمال تیمار شیمیایی در آن دما بود (شکل ٤. ب).



الف ب

شکل ۵. اثر دما × تیمار شیمیایی بر میزان پرولین ($\mu g\ g^{-1}$ FW) (الف) و میزان کربوهیدرات محلول ($mg\ g^{-1}$ FW) (ب) در گیاه توت فرنگی رقم کاماروسا. میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ آزمون LSD می‌باشند. بارها نشان دهنده‌ی خطای استاندارد است. (C: شاهد، $CaCl_2$ 10 mM: تیمار ۱۰ میلی مولار کلرید کلسیم، $CaCl_2$ 15 mM: تیمار ۱۵ میلی مولار کلرید کلسیم، $CaCl_2$ 20 mM: تیمار ۲۰ میلی مولار کلرید کلسیم)

سنجش میزان پرولین

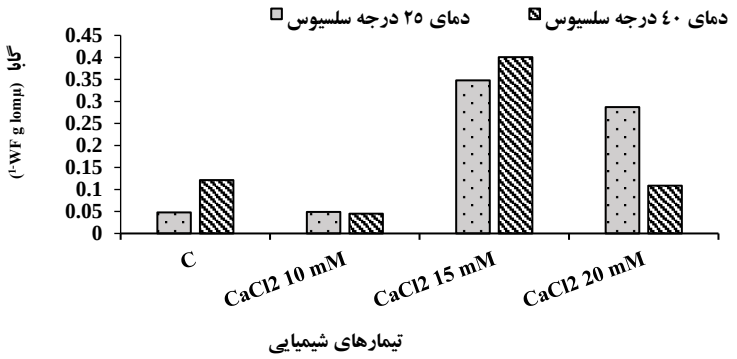
تنش دمای ٤۰ درجه سلسیوس تفاوت معنی‌داری را در میزان پرولین برگ در گیاهان شاهد نشان نداد. اگرچه کاربرد ۱۰و ۲۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم در دمای ٤۰ درجه سلسیوس باعث کاهش معنی‌دار میزان پرولین درونی برگ نسبت به دمای ۲۵ درجه سلسیوس آن شد. در تیمار دمای ٤۰ درجه سلسیوس کاربرد خارجی ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم، افزایش ۵۵/٦ درصدی پرولین را نسبت به گیاهان بدون کاربرد تیمار شیمیایی و تحت تنش دمای بالا نشان داد. بیشترین میزان پرولین در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و به‌ترتیب در تیمارهای ۲۰ (۸۷/۸ میکروگرم بر گرم وزن تر) و ۱۵ (٤۷/۱ میکروگرم بر گرم وزن تر) میلی‌مولار کلرید کلسیم مشاهده شد (شکل ۵. الف).

محتوای کربوهیدرات محلول

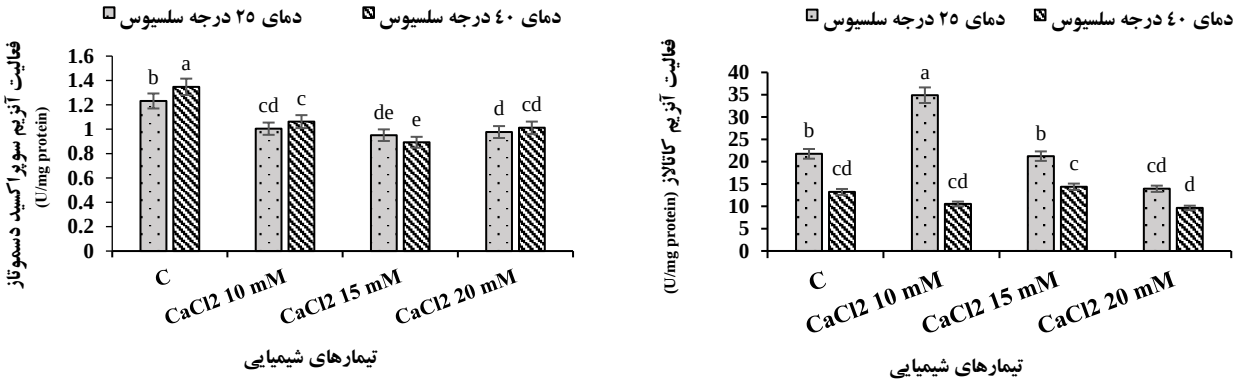
اعمال تیمار دمایی ٤۰ درجه سلسیوس در مدت ۱۰ ساعت و در گیاهان بدون کاربرد تیمار شیمیایی باعث کاهش ۱۳/۲ درصدی میزان کربوهیدرات محلول شد؛ اگرچه کاربرد کلرید کلسیم در هر سه غلظت، تفاوت معنی‌داری را در گیاهان تحت تنش دمای بالا نسبت به گیاهان بدون تنش دمایی نشان نداد. در دمای ٤۰ درجه سلسیوس کاربرد کلرید کلسیم در هر سه غلظت باعث افزایش معنی‌دار محتوای کربوهیدرات محلول برگ نسبت به گیاهان بدون اعمال تیمار شیمیایی شد. بیشترین میزان کربوهیدرات محلول در دمای ٤۰ درجه سلسیوس و در تیمار شیمیایی ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم (۳۱/۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مشاهده شد و افزایش ۳۸/٤ درصدی را نسبت به گیاهان بدون کاربرد تیمار شیمیایی و تحت تنش دمای بالا نشان داد (شکل ۵. ب).

سنجش غلظت گابا

کاربرد خارجی ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم باعث افزایش میزان گابای درونی در برگ گیاهان در دمای ۲۵ و ٤۰ درجه سلسیوس شد. بیشترین میزان گابای درونی در تیمار ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم و دمای ٤۰ (۰/٤ میکرومول بر گرم وزن تر) و ۲۵ درجه سلسیوس آن (۰/۳٤ میکرومول بر گرم وزن تر) مشاهده شد. در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نیز بیشترین محتوای گابای درونی در تیمارهای شیمیایی ۱۵ و ۲۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم نسبت به گیاهان بدون تیمار شیمیایی مشاهده شد (شکل ٦).



شکل ٦. اثر دما × تیمار شیمیایی بر میزان گاما آمینوبوتریک اسید (µmol g-1 FW) در گیاه توت فرنگی رقم کاماروسا. (C: شاهد، $CaCl_2$ 10 mM: تیمار ۱۰ میلی مولار کلرید کلسیم، $CaCl_2$ 15 mM: تیمار ۱۵ میلی مولار کلرید کلسیم، $CaCl_2$ 20 mM: تیمار ۲۰ میلی مولار کلرید کلسیم)



الف ب

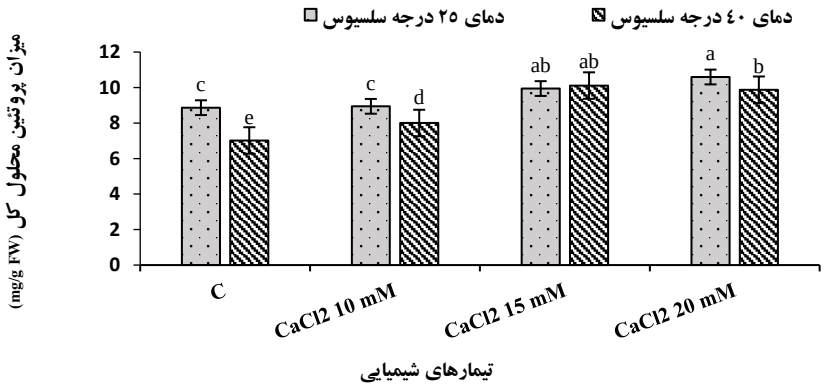
شکل ۷. اثر دما × تیمار شیمیایی بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز ($U\ mg^{-1}$ Protein) (الف) و فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز ($U\ mg^{-1}$ Protein) (ب) در گیاه توت فرنگی رقم کاماروسا. میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ آزمون LSD می‌باشند. بارها نشان دهنده‌ی خطای استاندارد است. (C: شاهد، $CaCl_2$ 10 mM: تیمار ۱۰ میلی مولار کلرید کلسیم، $CaCl_2$ 15 mM: تیمار ۱۵ میلی مولار کلرید کلسیم، $CaCl_2$ 20 mM: تیمار ۲۰ میلی مولار کلرید کلسیم)

فعالیت آنزیم کاتالاز

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد اعمال تنش دمای ٤٠ درجه سلسیوس باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار-های شیمیایی ۱۰ و ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم و گیاهان بدون دریافت تیمار شیمیایی نسبت به دمای ۲۵ درجه سلسیوس آن‌ها شد. در تیمار ۲۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم تفاوت معنی‌داری بین تیمار دمای ۲۵ و ٤٠ درجه سلسیوس آن مشاهده نشد. بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار ۱۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم (۳٤/۹ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) و دمای ۲۵ درجه سلسیوس مشاهده شد و افزایش ٦٠/٣ درصدی فعالیت آنزیم کاتالاز را نسبت به گیاهان بدون تیمار شیمیایی در آن دما نشان داد. (شکل ۷. الف).

فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز

تیمار دمایی ٤٠ درجه سلسیوس باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز در گیاهان بدون کاربرد تیمار شیمیایی



شکل ۸. اثر دما × تیمار شیمیایی بر میزان پروتئین محلول کل ($mg\ g^{-1}$ FW) در گیاه توت فرنگی رقم کاماروسا. میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ آزمون LSD می‌باشند. بارها نشان دهنده‌ی خطای استاندارد است. (C: شاهد، $CaCl_2$ 10 mM: تیمار ۱۰ میلی مولار کلرید کلسیم، $CaCl_2$ 15 mM: تیمار ۱۵ میلی مولار کلرید کلسیم، $CaCl_2$ 20 mM: تیمار ۲۰ میلی مولار کلرید کلسیم)

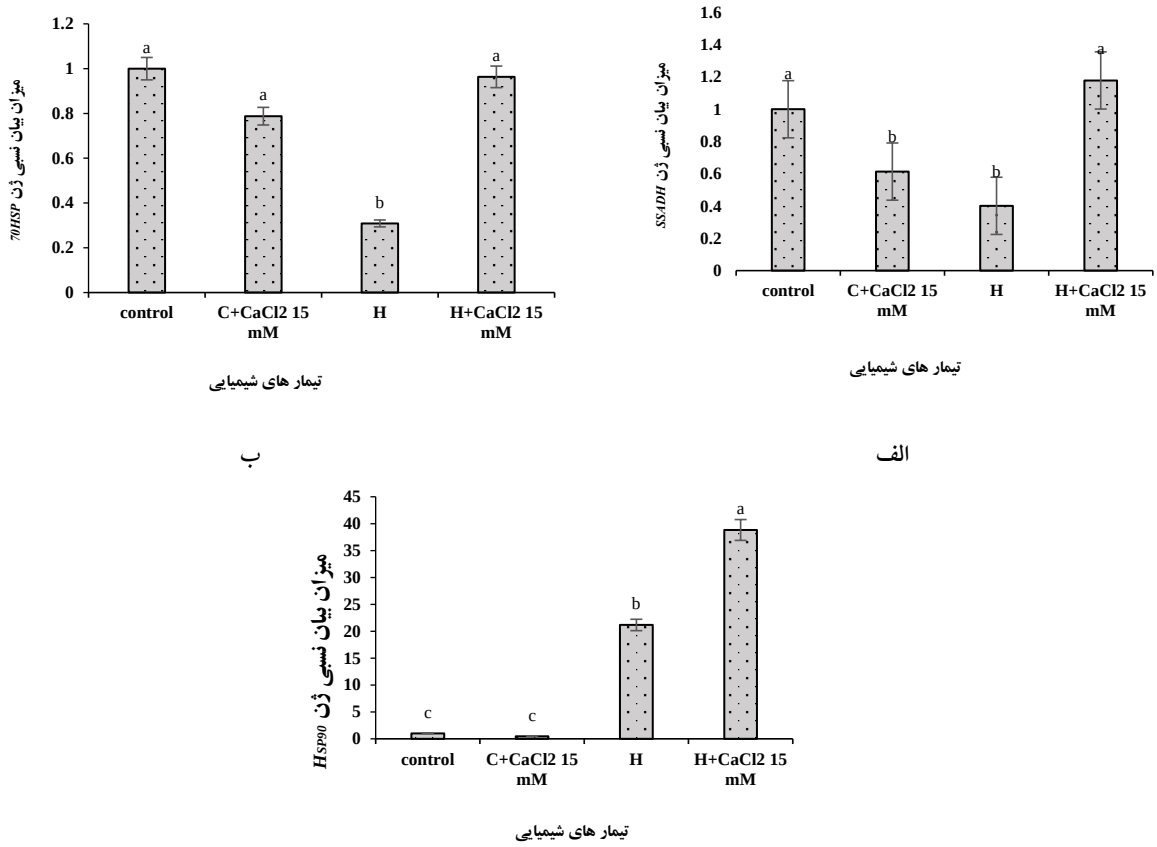
شد. کاربرد تمامی تیمارهای شیمیایی در دمای ۲۵ و ٤۰ درجه سلسیوس باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز نسبت به گیاهان بدون اعمال تیمار شیمیایی شد. کمترین فعالیت آنزیم در دمای ٤۰ درجه سلسیوس و تیمار شیمیایی ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم (۰/۸۹ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) مشاهده شد (شکل ۷. ب).

پروتئین‌های محلول کل

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان‌دهنده روند کاهش پروتئین در گیاهان تحت تنش دمایی و همراه با کاربرد ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم و نیز گیاهان بدون کاربرد تیمار شیمیایی نسبت به دمای ۲۵ درجه سلسیوس آن‌ها است. اعمال تنش دمایی در گیاهان تیمار شده با ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم تفاوت معنی‌داری را در میزان پروتئین محلول نسبت به دمای ۲۵ درجه خود نشان نداد. در گیاهان تحت تنش دمایی، کاربرد ۱۵ و ۲۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم به‌ترتیب باعث افزایش ٤٤/۱ و ٤۰/۷ درصدی پروتئین محلول کل نسبت به گیاهان بدون اعمال تیمار شیمیایی تحت تنش دمای ٤۰ درجه سلسیوس شد (شکل ۸)

میزان بیان نسبی ژن *SSADH* ، *HSP70* و *HSP 90*

اعمال تنش دمای ٤۰ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت باعث کاهش معنی‌دار بیان ژن *SSADH* در گیاهان بدون کاربرد تیمار-های شیمیایی نسبت به تیمار کلرید کلسیم شد. همچنین تنش دمای ٤۰ درجه سلسیوس در گیاهان بدون کاربرد تیمار شیمیایی باعث کاهش ۵۹/۸ درصدی بیان ژن *SSADH* نسبت به دمای ۲۵ درجه سلسیوس شد. (شکل ۹. الف). در دمای ٤۰ درجه سلسیوس کاربرد خارجی ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم باعث افزایش ۳/۱۲ برابری بیان نسبی ژن *HSP70* نسبت به گیاهان بدون کاربرد تیمار شیمیایی در آن دما شد. میزان بیان ژن *HSP70* پس از ۲ ساعت تیمار دمایی ٤۰ درجه سلسیوس در گیاهان بدون کاربرد تیمار شیمیایی کاهش معنی‌داری را نشان داد. کاربرد ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم در دمای ٤۰ درجه سلسیوس تفاوت معنی‌داری را در بیان نسبی ژن *HSP70* نسبت به دمای ۲۵ درجه سلسیوس آن نشان نداد (شکل ۹. ب). همچنین کاربرد خارجی ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم باعث افزایش ۸۳/٤ درصدی بیان نسبی ژن *HSP90* پس از ۲ ساعت تیمار دمای ٤۰ درجه سلسیوس نسبت به گیاهان بدون کاربرد تیمارهای شیمیایی و تحت تنش دمای بالا شد؛ اگرچه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس



شکل ۹. اثر دما × تیمار شیمیایی بر میزان بیان نسبی ژن *SSADH* (الف) ، *HSP70* (ب) و *HSP90* (ج) در گیاه توت فرنگی رقم کاماروسا. میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ آزمون LSD می‌باشند. بارها نشان دهنده‌ی خطای استاندارد است. (control: گیاهان بدون تیمار شیمیایی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس، C+CaCl2 15mM: تیمار ۱۵ میلی مولار کلرید کلسیم و دمای ۲۵ درجه سلسیوس ،H: گیاهان بدون تیمار شیمیایی و دمای ٤٠ درجه سلسیوس، H+CaCl2 15mM: تیمار ۱۵ میلی مولار کلرید کلسیم و دمای ٤٠ درجه سلسیوس)

کاربرد کلرید کلسیم تفاوت معنی‌داری را نسبت به گیاهان بدون کاربرد آن نشان نداد (شکل ۹. ج).

بحث

همراه با افزایش دما، کاهش حلالیت کربن دی‌اکسید در آب باعث افزایش الکترون‌ها برای تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن، شکسته شدن تعادل بین تولید و حذف گونه‌های فعال اکسیژن و القا بیشتر تنش اکسیداتیو می‌شود (١٦). هموستازی و وضعیت احیا گونه-های فعال اکسیژن با رشد و پیری سلول ارتباط زیادی دارد (٢٢). در مرحله رشد رویشی گیاهان، تنش شدید دمای بالا می‌تواند باعث تاخیر در رشد، کلروز، نکروز، آفتاب سوختگی، پیری و حتی از بین رفتن کامل گیاه شود (٣٦). کلسیم به تنظیم واکنش-های گیاه به شرایط محیطی نامناسب مانند تنش دمای بالا کمک می‌کند (٤٧). تعداد زیادی از مطالعات نشان دادند کاربرد خارجی کلسیم می‌تواند باعث القا تجمع گابا تحت تنش غیر زیستی شود (٥٥ و ٥٦) و همسو با کاربرد ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم در این

آزمایش است. گابا می‌تواند باعث کاهش آسیب‌های ناشی از تنش دمایی در گیاهان از طریق جلوگیری از پیری برگ، بهبود فتوسنتز و سرعت تعرق و تحریک فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی شود (٤۰).

سرعت بالای تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن باعث کاهش شاخص پایداری غشای سلولی می‌شود که نشانگر آسیب اکسیداتیو به پایداری و عملکرد غشا است (٤٤). گزارش شده است که تنش دمایی باعث القای تجمع پراکسید هیدروژن و افزایش نسبت تولید سوپر اکسید در گیاه گندم شد (۱۲). ما و همکاران (۳۲) دریافتند که کاربرد خارجی کلسیم برای کاهش تجمع پراکسید هیدروژن توسط افزایش سطح احیا در برنج مفید است. با توجه به اینکه افزایش غلظت یون کلسیم داخل سلولی می‌تواند باعث افزایش محتوای گابا شود (۱۹)، تیمار ۱۵ میلی-مولار کلرید کلسیم در این آزمایش می‌تواند به حفظ وضعیت احیا سلول‌ها و به‌طور کلی افزایش سطح گابا و القا افزایش میزان پرولین، کربوهیدرات محلول و حفظ یکپارچگی غشا سلولی کمک کند. فتوسنتز یا اجزا فعالیت فتوسنتزی بیشترین حساسیت را به دمای بالا نشان می‌دهند (۳۵). مطالعات نشان داد پیش تیمار کلرید کلسیم می‌تواند باعث افزایش فعالیت فتوسنتزی گیاهان در شرایط تنش شوری و یا خشکی شود (۵۲ و ۵۳). شاخص Fv/Fm در گیاهان برنج تحت تنش سرمایی و کاربرد خارجی گلوتامیک اسید، گابا و کلرید کلسیم در مقایسه با گیاهان تحت تنش بدون اعمال تیمارهای شیمیایی میزان بیشتری را نشان داد (۲۳). کلسیم به تنظیم واکنش‌های گیاه به شرایط محیطی مختلف و نامناسب مانند تنش دمای بالا کمک می‌کند. پیش تیمار کلرید کلسیم ۲۰ میلی‌مولار در گیاه چای تحت تنش دمای بالا باعث افزایش قند محلول شد (٤۷) که همسو با نتایج این آزمایش در تیمارهای کلرید کلسیم است و از این طریق می‌تواند به حفظ فشار تورگر برگ‌ها، یکپارچگی غشا سلولی و در نهایت کاهش آسیب به دستگاه فتوسنتزی کمک کند. از دست دادن کلروفیل در تنش دمای بالا می‌تواند درنتیجه جلوگیری از بیوسنتز کلروفیل، افزایش در تخریب آن و یا از بین رفتن ساختار کلروپلاست‌ها در اثر اکسیداسیون نوری باشد (۳٦). مطالعات اثر آسیب به کلروفیل تحت تنش دمای بالا را در گیاهان نخود (۲۵)، گوجه فرنگی (٦) و برنج (٤۲) نشان داد که ممکن است باعث کاهش ظرفیت فتوسنتزی شود. در این آزمایش نیز شاخص سبزینگی برگ در گیاهان تحت تنش دمایی و بدون کاربرد تیمارهای شیمیایی و همچنین گیاهان تحت تنش دمایی و تیمار شیمیایی ۱۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم نسبت به دمای ۲۵ درجه سلسیوس آن‌ها کاهش یافت. وانگ وهمکاران (٤۷) گزارش کردند پیش تیمار کلرید کلسیم ۲۰ میلی‌مولار در گیاه چای تحت تنش دمای بالا باعث افزایش محتوای کلروفیل در برگ‌های گیاه چای نسبت به گیاهان بدون کاربرد تیمار کلسیم شد و همسو با کاربرد ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم در این آزمایش است که می‌تواند به علت نقش کلرید کلسیم در تحریک افزایش گابا و اثرات گابا بر حفظ محتوای کلروفیل باشد.

پرولین نه تنها یکی از اسمولیت‌های مهم کمک کننده به گیاه تحت تنش برای حفظ و نگهداری وضعیت آب آن‌ها است، همچنین به‌عنوان یک کلات کننده فلز و یک مولکول دفاعی آنتی-اکسیدانی عمل می‌کند (۱۳ و ۳۰). هان و همکاران (۱۹) نشان دادند کاربرد خارجی کلرید کلسیم ٤ درصد به‌طور معنی‌داری باعث افزایش غلظت پرولین در انبارداری میوه سیب شد و همسو با نتایج این پژوهش در همه‌ی تیمارهای کلرید کلسیم در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تیمار ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم در دمای ٤۰ درجه سلسیوس است. محتوای کربوهیدرات محلول و پرولین به‌عنوان مهم‌ترین اسمولیت‌های سازگاری نسبی برای تنظیم اسمزی شناخته شده‌اند (۹). کاربرد خارجی کلرید کلسیم ٤ درصد در میوه سیب پس از برداشت در مقایسه با گیاهان بدون تیمار باعث افزایش میزان مواد جامد محلول تقریبا در تمام طول انبارداری شد (۱۹). در این آزمایش کاربرد خارجی ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم در گیاهان تحت تنش دمای بالا باعث افزایش معنی-دار میزان کربوهیدرات محلول در گیاهان تحت تنش نسبت به گیاهان بدون کاربرد تیمارهای شیمیایی شد. همچنین بیشترین میزان گابا در تیمار ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم و در دمای ۲۵ و ٤۰ درجه سلسیوس مشاهده شد؛ از اینرو می‌توان پیشنهاد کرد که

کاربرد ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم نقش قابل‌توجهی را در تحریک سنتز گابا و در نهایت القا بهبود فتوسنتز و افزایش تجمع کربوهیدرات محلول دارد.

در انبارداری محصول سیب درختی غلظت گابا در پاسخ به کاربرد خارجی کلسیم افزایش یافت (۱۹) که نشان‌دهنده تاثیر افزایش غلظت کلسیم درون سلولی در القا افزایش در محتوای گابا است. چی و همکاران (۱۰) گزارش کردند که کاربرد خارجی کلرید کلسیم ۰/۰۰۵ مول بر لیتر باعث افزایش محتوای گلبا در طول زمان نگهداری میوه برش خورده گلابی در دمای ٤ درجه سلسیوس در مقایسه با میوه‌های شاهد شد؛ اگرچه کاربرد خارجی لانتانیوم کلرید باعث کاهش محتوای گلبا در این مدت شد و این مطلب پیشنهاد کننده نقش کلسیم در تحریک تجمع گلبا و لانتانیوم کلرید، به‌عنوان یک بازدارنده کلنال کلسیم، در کاهش تجمع گابا است (۵۹) در این آزمایش نیز کاربرد ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم در دمای ۲۵ و ٤۰ درجه سلسیوس و کاربرد ۲۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم در دمای ۲۵ درجه سلسیوس باعث افزایش محتوای درونی گابا نسبت به گیاهان بدون کاربرد تیمارهای شیمیایی شد (شکل ٦).

پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز در تبدیل پراکسید هیدروژن به آب شرکت می‌کنند و باعث حفاظت از گیاه در برابر آسیب اکسیداتیو می‌شوند (۵۷). در گیاه برنج تحت تنش دمایی بازدارندگی شدید فعالیت آنزیم کاتالاز مشاهده شد (۳٦) و همسو با نتایج این آزمایش در گیاهان تحت تنش بدون کاربرد شیمیایی و تیمارهای کلرید کلسیم در هر سه غلظت است. آمینو اسیدهای غیرپروتئینی به‌عنوان یک ماده حفاظتی (مانند مولکول آنتی-اکسیدان، عامل کلاته کننده، تنظیم کننده اسمزی) عمل می‌کنند و در متابولیسم انرژی در پاسخ به شرایط تنش درگیر هستند (۱۱)؛ از اینرو در این آزمایش کاربرد تیمار کلرید کلسیم در هر ۳ غلظت اگرچه باعث افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان تحت تنش دمای ٤۰ درجه سلسیوس نشد اما با افزایش میزان پرولین (کلرید کلسیم ۱۵ میلی‌مولار)، کربوهیدرات محلول (کلرید کلسیم در هر ۳ غلظت) و گابا (کلرید کلسیم ۱۵ میلی‌مولار) باعث کاهش در روند افزایشی پراکسید هیدروژن نسبت به گیاهان بدون تیمار شیمیایی تحت تنش شد، که می‌تواند علت کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به دمای ۲۵ درجه خود باشد. نیر و همکاران (۳٦) بیان کردند فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز در گیاه برنج تحت تنش دمای بالا افزایش یافت و همسو با نتایج این پژوهش در گیاهان تحت تنش دمایی و بدون کاربرد تیمارهای شیمیایی بود. فان و همکاران (۱۵) گزارش کردند در گیاه ارکیده تحت شرایط تنش دمای ٤۰ درجه سلسیوس میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز افزایش یافت؛ اگرچه کاربرد ۲۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم نسبت به گیاهان تحت تنش دمای بالا و بدون کاربرد کلرید کلسیم شد و همسو با نتایج این آزمایش است. تیمار کلسیم می‌تواند باعث افزایش اتصال کلسیم به کالمودولین سیتوپلاسم و افزایش تحمل گیاه نسبت به شرایط تنش دمای بالا شود (۱۵).

تنش دمای بالا باعث تغییر در ساختار فضایی پروتئین، مایع شدن چربی، غیر فعال کردن آنزیم‌ها، جلوگیری از سنتز پروتئین-ها، اختلال در یکپارچگی غشا و تولید بسیار زیاد گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (۲۰). تحت شرایط تنش، تجزیه پروتئین افزایش می‌یابد و از سنتز آن جلوگیری می‌شود (٤۹). گلناری و همکاران (۱۷) گزارش کردند در شرایط تنش شوری در گیاه توت فرنگی محتوای پروتئین کل محلول کاهش معنی‌داری را نسبت به گیاهان شاهد نشان داد و همسو با گیاهان تحت تنش و بدون کاربرد تیمار شیمیایی و نیز ۱۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم در این آزمایش است. زی و همکاران (۵۱) گزارش کردند نگهداری پس از برداشت میوه هلو در دمای صفر درجه سلسیوس و کاربرد خارجی کلرید کلسیم باعث افزایش بیان کالمودولین و محتوای پروتئین شد و همسو با کاربرد ۱۵ و ۲۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم در این آزمایش بود.

گابا توسط فعالیت آنزیم گابا ترانس آمیناز به سوکسینیک سمی آلدهید و توسط سوکسنیک سمی آلدهید دهیدروژناز به سوکسینیک اسید کاتالیز می‌شود (۳۷). کاربرد خارجی کلرید کلسیم باعث افزایش فعالیت مسیر گابا توسط افزایش سطوح بیان

ژن‌های *MdGABA-T1/2* و *MdSSADH* می‌شود (۱۹). در این آزمایش نیز کاربرد ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم باعث افزایش معنی‌دار بیان نسبی ژن *SSADH* نسبت به گیاهان بدون کاربرد تیمار شیمیایی در دمای ٤۰ درجه سلسیوس شد. موتانت‌های *ssadh* به تنش دمای بالا و پرتو فرابنفش حساس هستند و میزان بالایی از گونه‌های فعال اکسیژن در آن‌ها تجمع یافت که باعث از بین رفتن سلول بافت‌های در معرض تنش شد (۲۹). جلوگیری از بیان *SSADH* باعث پیچیدگی برگ‌ها، فنوتیپ کوتاه و افزایش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط نرمال گیاه گوجه فرنگی شد و نشان‌دهنده نقش مسیر تولید و تجزیه گابا در متابولیسم گونه‌های فعال اکسیژن از طریق یک مسیر فرعی کاتابولیسم سوکسینیک سمی آلدهید به گاما هیدروکسی بوتیریت و در نهایت تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش است (۳) و اثر مهم تکمیل این مسیر در افزایش تحمل گیاه نسبت به شرایط تنش است. مطالعات نشان داد در ژنوتیپ‌های فلفل متحمل به گرما، بیان *HSP70* بیشتر از ژنوتیپ‌های حساس به حرارت بود که نشان‌دهنده محافظت بهتر در برابر تنش دمای بالا است (٤٥). کاهش سطوح نسبی mRNA ژن *HSP70* پس از ۲ ساعت در دمای ٤۰ درجه سلسیوس در رقم کاماروسا می‌تواند نشان‌دهنده حساسیت این رقم توت فرنگی به تنش دمای بالا باشد. مطالعات نشان داد بیان بیش از حد *HSP70* باعث افزایش تحمل حرارتی آرابیدوپسیس تراریخته شد (۸). گابا نقش تنظیمی مثبتی را بر بیان *HSP70s* و *HSP90s* در گیاهان کیوی تحت تنش گرمایی داشت (۲۱). در این آزمایش نیز کاربرد ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم می‌تواند از طریق القا سنتز گابا باعث افزایش بیان *HSP70* و *HSP90* شود. در گیاه توت فرنگی افزایش تنظیم ژن *HSP 90-alpha 1-like* همراه با افزایش تدریجی دما، بیشتر شد (۲٦). اعمال تنش حرارتی در گیا بنت گراس خزنده باعث افزایش معنی‌دار بیان نسبی ژن *HSP 90-1* شد (۵۸) و همسو با نتایج این آزمایش است. پروتئین‌های شوک حرارتی برای پاسخ گیاه به تنش‌های مختلف ضروری هستند. آن‌ها به ساخت مجدد ساختمان پروتئین طبیعی و حفظ هموستازی سلول کمک می‌کنند (۲٦). افزایش ناپایدار غلظت یون کلسیم آزاد سیتوزول گیاه، توسط شوک حرارتی القا می‌شود و کمپلکس کلسیم و کالمودولین باعث تنظیم فعالیت فاکتورهای رونویسی شوک حرارتی، بیان ژن‌های پروتئین‌های شوک حرارتی و تحمل دمای بالا در گیاهان می‌شود (۱۸). کاربرد خارجی ۲۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم در گیاه چای تحت تنش دمای بالا باعث افزایش سطوح بیان ژن‌های *HSP15.4* و *HSP17.8* شد (٤۷). در این آزمایش نیز کاربرد ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن *HSP90* نسبت به گیاهان بدون کاربرد تیمار شیمیایی شد.

نتیجه گیری کلی

مطابق با نتایج کلی این آزمایش، در گیاه توت فرنگی رقم کاماروسا تحت تنش دمای ٤۰ درجه سلسیوس کاربرد ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم باعث کاهش معنی‌دار شاخص خسارت ظاهری و نیز افزایش محتوای کربوهیدرات محلول برگ، محتوای پرولین، کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II، محتوای گابای درونی و پروتئین محلول کل نسبت به گیاهان بدون کاربرد تیمار شیمیایی شد. همچنین اعمال ۲ ساعت تنش دمای ٤۰ درجه سلسیوس در گیاهان با کاربرد خارجی ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم باعث افزایش معنی‌دار بیان نسبی ژن *SSADH*، *HSP70* و *HSP90* نسبت به گیاهان بدون کاربرد تیمار شیمیایی شد. مطابق با نتایج این آزمایش، کاربرد خارجی ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم توانست با القا مسیر متابولیکی گابا به تحمل شرایط تنش دمای بالا در گیاه توت فرنگی رقم کاماروسا کمک کند.

تشکر و قدردانی

این اثر تحت حمایت مادی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) برگرفته شده از طرح شماره (٤۰۰٤۷٦٤) انجام شده است.

منابع

1. Ayyaz, A., Y. Zhou, I. Batool, F. Hannan, Q. Huang, K. Zhang, K. Shahzad, Y. Sun, M. A. Farooq and W. Zhou. 2024. Calcium nanoparticles and abscisic acid improve drought tolerance, mineral nutrients uptake and inhibitor-mediated photosystem II performance in *Brassica napus*. *Journal of Plant Growth Regulation* 43: 516-537.
2. Badek, B., B. Napiorkowska, A. Masny and M. Korbin. 2014. Changes in the expression of three cold-regulated genes in 'Elsanta' and 'Selvik' strawberry (*Fragaria ananassa*) plants exposed of freezing. *Journal of Horticultural Research* 22(2): 53-61.
3. Bao, H., X. Chen, S. Lv, P. Jiang, J. Feng, P. Fan, L. Nie and Y. Li. 2015. Virus-induced gene silencing reveals control of reactive oxygen species accumulation and salt tolerance in tomato by γ-aminobutyric acid metabolic pathway: effects of GABA shunt on tomato salt tolerance. *Plant, Cell & Environment* 38: 600-613.
4. Bates, L. S., R. P. Waldren and I. D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
5. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2): 248-254.
6. Camejo, D. and W. Torres. 2001. High temperature effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) pigment and protein content and cellular viability *Cultivos Tropicales* 22(3): 13-17.
7. Chance, B. and S. K. Maehly. 1955. Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology* 2: 764-775.
8. Chen, S. and G. Qiu. 2022. Overexpression of *Zostera japonica* heat shock protein gene *ZjHsp70* enhances the thermotolerance of transgenic Arabidopsis. *Molecular Biology Reports* 49: 6189-6197.
9. Chen, T. H. H. and M. Murata. 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology* 5(3): 250-257.
10. Chi, Z., Y. Dai, S. Cao, Y. Wei, X. Shao, X. Huang, F. Xu and H. Wang. 2021. Exogenous calcium chloride (CaCl2) promotes γ-aminobutyric acid (GABA) accumulation in fresh-cut pears. *Postharvest Biology and Technology* 174: 111446.
11. Da Silva Rodrigues-Correa, K. C. and A. G. Fett-Neto. 2020. Abiotic stresses and non-protein amino acids in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 38: 411-430.
12. Djanaguiraman, M., D. L. Boyle, R. Welti, S. V. K. Jagadish and P. V. V. Prasad. 2018. Decreased photosynthetic rate under high temperature in wheat is due to lipid desaturation, oxidation, acylation, and damage of organelles. *BMC Plant Biology* 18: 55.
13. El Moukhtari, A., C. Cabassa-Hourton, M. Farissi and A. Savoure. 2020. How does proline treatment promote salt stress tolerance during crop plant development? *Frontiers in Plant Science* 11: 1127.
14. Essemine, J., S. Ammar and S. Bouzid. 2010. Impact of heat stress on germination and growth in higher plants: physiological, biochemical and molecular repercussions and mechanisms of defense. *Journal of Biological Sciences* 10(6): 565-572.
15. Fan, Y., J. Ma, Y. Liu, X. Tan, X. Li, E. Xu, L. Xu and A. Luo. 2023. Heat stress alleviation by exogenous calcium in the orchid *Dendrobium nobile* Lindl: A biochemical and Transcriptomic Analysis. *International Journal of Molecular Sciences* 24(19): 14692.
16. Farooq, M., H. Bramley, J. A. Palta and K. H. M. Siddique. 2011. Heat stress in wheat during reproductive and grain-filling phases. *Critical Reviews in Plant Sciences* 30(6): 491-507.
17. Golnari, S., Y. Vafaee, F. Nazari and N. Ghaderi. 2021. Gamma-aminobutyric acid (GABA) and salinity impacts antioxidative response and expression of stress-related genes in strawberry cv. Aromas. *Brazilian Journal of Botany* 44: 639-651.
18. Goswami, S., R. R. Kumar, S. K. Sharma, Y. K. Kala, K. Singh, R. Gupta, G. Dhavan, G. K. Rai, G. P. Singh, H. Pathak and R. D. Rai. 2015. Calcium triggers protein kinases-induced signal transduction for augmenting the thermotolerance of developing wheat (*Triticum aestivum*) grain under the heat stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 24: 441-452.
19. Han, S., H. Liu, Y. Han, Y. He, Y. Nan, W. Qu and J. Rao. 2021. Effects of calcium treatment on malate metabolism and γ-aminobutyric acid (GABA) pathway in postharvest apple fruit. *Food Chemistry* 334: 127479.
20. Hasanuzzaman, M., K. Nahar, M. M. Alam, R. Roychowdhury and M. Fujita. 2013. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 9643-9684.
21. Huo, L., Y. Chen, Y. Zhang, H. Zhang, H. Wang, K. Xu and X. Sun. 2023. Exogenous γ-aminobutyric acid enhances heat tolerance of kiwifruit plants by protecting photosynthetic system and promoting heat shock proteins expression. *Annals of Agricultural Sciences* 68: 137-147.

22. Jahan, M. S., S. Shu, Y. Wang, M. M. Hassan, A. A. EL-Yazied, M. N. Alabdallah, D. Hajjar, M. A. Altaf, J. Sun and S. Guo. 2021. Melatonin pretreatment confers heat tolerance and repression of heat-induced senescence in tomato through the modulation of ABA-and GA-mediated pathways. *Frontiers in Plant Science* 12: 650955.
23. Jia, Y., D. Zou, J. Wang, H. Sha, H. Liu, M. Ali Inayat, J. Sun, H. Zheng, N. Xia and H. Zhao. 2017. Effects of γ-aminobutyric acid, glutamic acid, and calcium chloride on rice (*Oryza sativa* L.) under cold stress during the early vegetative stage. *Journal of Plant Growth Regulation* 36: 240-253.
24. Kaplan, F., J. Kopka, D. W. Haskell, W. Zhao, K. C. Schiller, N. Gatzke, D. Y. Sung and C. L. Guy. 2004. Exploring the temperature-stress metabolome of Arabidopsis. *Plant Physiology* 136(4): 4159-4168.
25. Kaushal, N., K. Gupta, K. Bhandhari, S. Kumar, P. Thakur and H. Nayyar. 2011. Proline induces heat tolerance in chickpea *(Cicer arietinum* L.) plants by protecting vital enzymes of carbon and antioxidative metabolism. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 17(3): 203-213.
26. Kesici, M., A. Ipek, F. Ersoy, S. Ergin and H. Gulen. 2020. Genotype-dependent gene expression in strawberry (*Fragaria x ananassa*) plants under high temperature stress. *Biochemical Genetics* 58: 848-866.
27. Komatsuzaki, N., K. Tsukaharab, H. Toyoshimac, T. Suzukic, N. Shimizua and T. Kimuraa. 2007. Effect of soaking and gaseous treatment on GABA content in germinated brown rice. *Journal of Food Engineering* 78(2): 556-560.
28. Krantev, A., R. Yordanova, T. Janda, G. Szalai and L. Popova. 2008. Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. *Journal of Plant Physiology* 165: 920-931.
29. Li, L., N. Dou, H. Zhang and C. Wu. 2021. The versatile GABA in plants. *Plant Signaling & Behavior* 16(3): e1862565.
30. Liang, X., L. Zhang, S. K. Natarajan and D. F. Becker. 2013. Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants and Redox Signaling* 19(9): 9981011.
31. Livak, K. J. and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔctmethod. *Methods* 25(4): 402-408.
32. Ma, Y., X. Ren and C. H. Liang. 2021. Exogenous Ca^{2+} enhances antioxidant defense in rice to simulated acid rain by regulating ascorbate peroxidase and glutathione reductase. *Planta* 254: 41.
33. Manafi, H., B. Baninasab, M. Gholami, M. Talebi and S. Khanizadeh. 2022. Exogenous melatonin alleviates heat-induced oxidative damage in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch. cv. Ventana) plant. *Journal of Plant Growth Regulation* 41(1): 1-13.
34. McNellie, J. P., J. Chen, X. Li and J. Yu. 2018. Genetic mapping of foliar and tassel heat stress tolerance in maize. *Crop Science* 58: 2484-2493.
35. Naeem, M., J. R. Traub, H. U. R. Athar and W. Loescher. 2020. Exogenous calcium mitigates heat stress effects in common bean: a coordinated impact of photoprotection of PSII, up-regulating antioxidants, and carbohydrate metabolism. *Acta Physiologiae Plantarum* 42: 180.
36. Nayyar, H., R. Kaur, S. Kaur and R. Singh. 2014. γ-Aminobutyric acid (GABA) imparts partial protection from heat stress injury to rice seedlings by improving leaf turgor and upregulating osmoprotectants and antioxidants. *Journal of Plant Growth Regulation* 33(2): 408-419.
37. Palma, F., F. Carvajal, R. Jimenez-Munoz, A. Pulido, M. Jamilena and D. Garrido. 2019. Exogenous γ-aminobutyric acid treatment improves the cold tolerance of zucchini fruit during postharvest storage. *Plant Physiology and Biochemistry* 136: 188195.
38. Rastegar, S. and E. H. Khedr. 2025. GABA in Relation to Cold and Chilling Stress. pp. 243-262, In: S. Singh, D. K. Tripathi and V. P. Singh (eds), GABA in Plants: Biosynthesis, Plant Development, and Food Security. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
39. Satbhai, R. D., A. A. Kale and R. M. Naik. 2015. Protective role of osmolytes and antioxidants during high temperature stress in wheat. Int. J. Bio-Resour. *International Journal of Bio-resource and Stress Management* 6(2): 220-229.
40. Seifikalhor, M., S. Aliniaeifard, B. Hassani, V. Niknam and O. Lastochkina. 2019. Diverse role of γ-aminobutyric acid in dynamic plant cell responses. *Plant Cell Reports* 38: 847-867.
41. Shirasawa, K., T. Takabe, T. Takabe and S. Kishitani. 2006. Accumulation of glycinebetaine in rice plants that overexpress choline monooxygenase from spinach and evaluation of their tolerance to abiotic stress. *Annals of Botany* 98(3): 565-571.
42. Sohn, S. O. and K. Back. 2007. Transgenic rice tolerant to high temperature with elevated contents of dienoic fatty acids. *Biologia Plantarum* 51: 340-342.
43. Song, S. Q., Y. B. Lei and X. R. Tian. 2005. Proline metabolism and crosstolerance to salinity and heat stress in germinating wheat seeds. *Russian Journal of Plant Physiology* 52: 793-800.
44. Ur Rahman, S., Q. Xuebin, M. Kamran, G. Yasin, H. Cheng, A. Rehim, L. Riaz, M. Rizwan, S. Ali, A. A. Alsahli and M. N. Alyemeni. 2021. Silicon elevated cadmium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) by endorsing

nutrients uptake and antioxidative defense mechanisms in the leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 166: 148-159.
45. Usman, M. G., M. Y. Rafii, M. Y. Martini, O. A. Yusuff, M. R. Ismail and G. Miah. 2017. Molecular analysis of Hsp70 mechanisms in plants and their function in response to stress. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 33: 26-39.
46. Valizadeh-Kamran, R., M. Toorchi, M. Mogadam, H. Mohammadi and M. Pessarakli. 2017. Effects of freeze and cold stress on certain physiological and biochemical traits in sensitive and tolerant barley (*Hordeum vulgare*) genotypes. *Journal of Plant Nutrition* 41(1): 102-111.
47. Wang, M., X. Zhang, Q. Li, X. Chen and X. Li. 2018. Comparative transcriptome analysis to elucidate the enhanced thermotolerance of tea plants (*Camellia sinensis*) treated with exogenous calcium. *Planta* 249(3): 775-786.
48. Wang, T., X. Gu, L. Guo, X. Zhang and C. Li. 2024. Integrated metabolomics and transcriptomics analysis reveals γ-aminobutyric acid enhances the ozone tolerance of wheat by accumulation of flavonoids. *Journal of Hazardous Materials* 465: 133202.
49. Watanabe, M., S. Balazadeh, T. Tohge, A. Erban, P. Giavalisco, J. Kopka, B. Mueller-Roeber, A. R. Fernie and R. Hoefgen. 2013. Comprehensive dissection of spatiotemporal metabolic shifts in primary, secondary, and lipid metabolism during developmental senescence in Arabidopsis. *Plant Physiology* 162(3): 1290-1310.
50. Wu, Y. S. and C. Y. Yang. 2019. Ethylene-mediated signaling confers thermo tolerance and regulates transcript levels of heat shock factors in rice seedlings under heat stress. *Botanical Studies* 60(1): 23.
51. Xie, B., C. Ling, S. Hu, Y. Hou, Y. Zheng and P. Jin. 2021. CaM enhances chilling tolerance of peach fruit by regulating energy and GABA metabolism. *Postharvest Biology and Technology* 181: 111691.
52. Xu, C., X. Li and L. Zhang. 2013. The effect of calcium chloride on growth, photosynthesis, and antioxidant responses of *Zoysia japonica* under drought conditions. *PLoS One* 8: e68214.
53. Yang, R., Y. Guo, S. Wang and Z. Gu. 2015. Ca^{2+} and aminoguanidine on γ-aminobutyric acid accumulation in germinating soybean under hypoxia–NaCl stress. *Journal of Food and Drug Analysis* 23(2): 287-293.
54. Yemm, E. W. and A. J. Willis. 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal* 57(3): 508-514.
55. Yin, Y., R. Yang, Q. Guo and Z. Gu. 2014. NaCl stress and supplemental CaCl2 regulating GABA metabolism pathways in germinating soybean. *European Food Research and Technology* 238: 781-788.
56. Yin, Y., R. Yang and Z. Gu. 2014. Calcium regulating growth and GABA metabolism pathways in germinating soybean (*Glycine max* L.) under NaCl stress. *European Food Research and Technology* 239: 149-156.
57. Zarbakhsh, S., A. R. Shahsavar, A. Afaghi and M. Hasanuzzaman. 2024. Predicting and optimizing reactive oxygen species metabolism in *Punica granatum* L. through machine learning: role of exogenous GABA on antioxidant enzyme activity under drought and salinity stress. *BMC Plant Biology* 24: 65.
58. Zeng, W., M. J. Hassan, D. Kang, Y. Peng and Z. Li. 2021. Photosynthetic maintenance and heat shock protein accumulation relating to γ-aminobutyric acid (GABA)-regulated heat tolerance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *South African Journal of Botany* 141: 405-413.
59. Zhou, T., P. Wang, R. Yang, X. Wang and Z. Gu. 2018. Ca^{2+} influxes and transmembrane transport are essential for phytic acid degradation in mung bean sprouts. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98(5): 1968-1976.