Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Plant Production Research

Print ISSN: 2322-2050
Online ISSN: 2322-2778

The effect of gamma aminobutyric acid foliar application on some biochemical characteristics and expression pattern of *PAL* and *CHS* genes in Qızıl Uzum grape (*Vitis vinifera* L.)

Afsaneh Allahveran Oosalo[1], Lotfali Naseri[*2], Abolfazl Alirezalu[3], Reza Darvishzadeh[4], Samad Nejad Ebrahimi[5]

1. Ph.D. Student, Dept. of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. E-mail: a.allahveran11@gmail.com
2. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. E-mail: l.naseri@urmia.ac.ir
3. Associate Prof., Dept. of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. E-mail: a.alirezalu@gmail.com
4. Professor, Dept. of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. E-mail: darvish-r2001@yahoo.com
5. Associate Prof., Dept. of Phytochemistry, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. E-mail: s-ebrahimi@sbu.ac.ir

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 06.18.2022
Revised: 07.06.2022
Accepted: 09.01.2022

Keywords:
Flavan-3-ols,
Flavonol,
HPLC,
Phenolic compounds,
Phenylalanine ammonialyase

ABSTRACT

Background and Objectives: Grape is one of the most important fruit products globally and has a high nutritional value with strong antioxidant and anti-cancer activity. Today, the use of healthy natural compounds, including organic nitrogen compounds, has become very important to improve the qualitative performance of fruits. The use of amino acids as one of the natural compounds of nitrogen can increase the nutritional values of fruit crops. In the present study, gamma aminobutyric acid was used as a non-protein amino acid to improve the quality characteristics of Qizil-Uzum grape fruit.

Materials and Methods: The experiment was performed in two separate orchards located in two regions of Urmia city with different microclimatic conditions in a completely randomized design with GABA foliar application at 4 concentrations (0, 5, 10, 25 mM) in two stages (veraison stage and one week later) with 3 replications on 13-year-old cv. Qızıl Uzum grapevines. Some fruit quality characteristics include titratable acids (TA), total soluble solids (TSS), total antioxidant content, total phenol, total flavonoid, total anthocyanin, the activity of phenylalanine ammonialyase (PAL), catalase enzymes, phenolic compounds of fruit including flavonols, flavan-3-ols and phenolic acids, and also a relative expression of PAL and CHS genes were evaluated.

Results: Based on the results, GABA at a concentration of 10 mM, caused the highest content of titratable acids, total soluble solids, total phenol, total flavonoids, total antioxidant and total anthocyanin of fruit. The highest activity of PAL enzyme was also observed at this concentration. Catalase enzyme had the maximum activity at 25 mM. The phenolic compounds that were measured by HPLC in this study included the flavonol compounds: myricetin, quercetin, kaempferol, syringetin; the flavan-3-ols compounds: catechin; and the non-flavonoid compounds: gallic acid, caffeic acid, p-coumaric acid and resveratrol, most of which had the highest level at 10 mM, followed by 5 mM GABA. Also, PAL and CHS

genes had the highest expression at both sampling times (48 and 72 hours after foliar application) at the concentration of 10 mM GABA and their lowest expression was at the concentration of 25 mM GABA.

Conclusion: This study showed that GABA at the concentration of 10 mM at the veraison stage and one week later had an effect on increasing fruit quality indicators, including total soluble sugars, as a basic substrate for the biosynthetic pathway of effective fruit quality compounds, and with effect on antioxidant content improvement, as well as enhancing the expression of related genes for PAL enzyme activity, as a key enzyme of the biosynthesis of the phenolic compound, can improve fruit quality and marketability of grape fruit of Qızıl Uzum cultivar.

Cite this article: Allahveran Oosalo, Afsaneh, Naseri, Lotfali, Alirezalu, Abolfazl, Darvishzadeh, Reza, Nejad Ebrahimi, Samad. 2023. The effect of gamma aminobutyric acid foliar application on some biochemical characteristics and expression pattern of *PAL* and *CHS* genes in Qızıl Uzum grape (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Plant Production Research*, 30 (1), 125-148.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/JOPP.2022.20280.2938
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

شاپا چاپی: ۲۳۲۲-۲۰۵۰
شاپا آنلاین: ۲۳۲۲-۲۷۷۸

اثر کاربرد برگی اسید گاماآمینو بوتیریک بر برخی خصوصیات زیست شیمیایی و بیان ژن‌های *PAL* و *CHS* در انگور رقم قزل‌اوزوم (*Vitic vinifera* L.)

افسانه الهویرن اوصالو[۱]، لطفعلی ناصری*[۲]، ابوالفضل علیرضالو[۳]، رضا درویش‌زاده[۴]، صمد نژاد ابراهیمی[۵]

۱. دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: a.allahveran11@gmail.com
۲. نویسنده مسئول، دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: l.naseri@urmia.ac.ir
۳. دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: a.alirezalu@gmail.com
۴. استاد گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: darvish-r2001@yahoo.com
۵. دانشیار پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران. رایانامه: s-ebrahimi@sbu.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۲۸
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۰۴/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۱۰

واژه‌های کلیدی:
ترکیبات فنولی،
فلاوان-۳-اُل،
فلاونول،
فنیل آلانین آمونیالیاز،
HPLC

چکیده

سابقه و هدف: انگور یکی از مهم‌ترین محصولات میوه‌ای در سطح جهان است و دارای ارزش غذایی بالا با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی قوی است. امروزه استفاده از ترکیبات سالم طبیعی از جمله ترکیبات نیتروژن آلی برای بهبود کیفی میوه اهمیت زیادی پیدا کرده است. کاربرد اسیدهای آمینه به‌عنوان یکی از ترکیبات طبیعی نیتروژنه می‌تواند باعث افزایش کیفیت تغذیه‌ای میوه‌ها شود. در مطالعه حاضر از اسید گاما آمینوبوتیریک به‌عنوان یک اسیدآمینه غیرپروتئینی جهت بهبود خصوصیات کیفی میوه انگور رقم قزل‌اوزوم استفاده شد.

مواد و روش‌ها: آزمایش در دو باغ جداگانه واقع در دو منطقه ارومیه با شرایط آب و هوایی (میکروکلیما) متفاوت و در قالب طرح کاملاً تصادفی با محلول‌پاشی گابا در ۴ غلظت (۰، ۵، ۱۰ و ۲۵ میلی‌مولار) در دو مرحله زمانی (مرحله veraison و یک هفته بعد) با ۳ تکرار بر روی تاک‌های انگور رقم قزل‌اوزوم ۱۳ساله انجام گرفت. برخی خصوصیات کیفی میوه از جمله میزان اسیدهای قابل تیتر (TA)، مواد جامد محلول کل (TSS)، محتوای آنتی‌اکسیدان کل، فنول کل، فلاونوئید کل، آنتوسیانین کل، فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)، کاتالاز، میزان ترکیبات فنولی میوه از جمله فلاونول‌ها، فلاوان-۳-اُل‌ها و اسیدهای فنولیکی و هم‌چنین بیان نسبی ژن‌های *PAL* و *CHS* ارزیابی شدند.

یافته‌ها: بر اساس نتایج، گابا در غلظت ۱۰ میلی‌مولار باعث ایجاد بیش‌ترین میزان اسیدهای قابل‌تیتر، مواد جامد محلول کل، فنول کل، فلاونوئید کل، محتوای آنتی‌اکسیدان کل و آنتوسیانین میوه شد. بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم PAL نیز در همین غلظت گابا مشاهده گردید. آنزیم

کاتالاز در غلظت ۲۵ میلی‌مولار گابا بیش‌ترین فعالیت را داشت. ترکیبات فنولی یافت شده براساس روش HPLC در این پژوهش ترکیبات فلاونولی میریستین، کوئرستین، کامفرول، سیرینجتین، ترکیبات فلاوان-۳-اُل‌ها، کاتچین و ترکیبات غیر فلاونوئیدی اسید گالیک، اسید کافئیک، اسید پی‌کوماریک و رسوراترول اندازه‌گیری شدند که اغلب این ترکیبات در غلظت ۱۰ میلی‌مولار گابا بیش‌ترین مقدار را نشان دادند و بعد از آن غلظت ۵ میلی‌مولار گابا بیش‌ترین تأثیر را در افزایش این ترکیبات داشت. ژن‌های *PAL* و *CHS* نیز در دو زمان نمونه‌برداری بعد از محلول‌پاشی (۴۸ و ۷۲ ساعت) در غلظت ۱۰ میلی‌مولار گابا بیش‌ترین بیان ژنی را داشتند و کم‌ترین بیان آن‌ها در غلظت ۲۵ میلی‌مولار گابا بود.

نتیجه‌گیری: این پژوهش نشان داد که گابا در غلظت ۱۰ میلی‌مولار و در مرحله veraison و یک هفته بعد از آن با تأثیرگذاری بر افزایش میزان شاخص‌های کیفی میوه از جمله مواد جامد به‌عنوان سوبسترای اساسی مسیر بیوسنتزی ترکیبات مؤثر کیفیت میوه و محتوای آنتی‌اکسیدانی و هم‌چنین با تأثیر بر افزایش بیان ژن‌های دخیل در فعالیت آنزیم PAL به عنوان یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز ترکیبات فنولی، می‌تواند باعث بهبود کیفیت میوه و بازارپسندی بیش‌تر میوه انگور رقم قزل‌اوزوم گردد.

استناد: اله‌ویرن اوصالو، افسانه، ناصری، لطفعلی، علیرضالو، ابوالفضل، درویش‌زاده، رضا، نژاد ابراهیمی، صمد (۱۴۰۲). اثر کاربرد برگی اسید گاماآمینو بوتیریک بر برخی خصوصیات زیست شیمیایی و بیان ژن‌های *PAL* و *CHS* در انگور رقم قزل‌اوزوم (*Vitic vinifera* L.). *نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی*، ۳۰ (۱)، ۱۴۸-۱۲۵.
DOI: 10.22069/JOPP.2022.20280.2938

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

تاکنون از روش‌های مختلفی برای افزایش شاخص‌های کمی و کیفی میوه انگور استفاده شده است. کاربرد کودهای شیمیایی، کودهای زیستی و کودهای آلی تاکنون منجر به بهبود شاخص‌های کمی و کیفی شده است. هر یک از این کودها دارای مزایا و معایبی هستند که بر روی میزان مصرف آن‌ها تأثیرگذار است (۱). امروزه استفاده از ترکیبات سالم طبیعی برای بهبود عملکرد کیفی درختان میوه اهمیت زیادی پیدا کرده است. از جمله این ترکیبات سودمند می‌توان به ترکیبات نیتروژنه طبیعی اشاره کرد (۲). اسیدهای آمینه پیش‌ساز اساسی سنتز پروتئین بوده و هم‌چنین نقش اساسی در بیوسنتز مواد نیتروژنه غیرپروتئینی از جمله رنگدانه‌ها، ویتامین‌ها، کوآنزیم‌ها، پورین و پیریمیدین دارند (۲). هم‌چنین اسیدهای آمینه از اجزا مهم سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان بوده و نقش کلیدی در پاسخ‌های تنشی و سوخت‌وساز ثانویه در گیاهان دارند. این ترکیبات به‌عنوان پیش‌ساز سنتز ترکیبات آروماتیک با دخالت در سنتز ترکیبات عطر و طعم، باعث بهبود کیفیت میوه می‌شوند (۳).

ترکیبات فنولی مهم‌ترین گروه ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در گیاهان به شمار می‌روند که شامل گروه وسیعی از مواد بیوشیمیایی می‌باشند. ترکیبات فنولی حبه انگور شامل ۱. غیرفلاونوئیدی‌ها مانند الف) اسیدهای فنولیک (اسید گالیک، اسید کافئیک، اسید فرولیک و اسید p–کوماریک و ...) و ب) رسوراترول. ۲. فلاونوئیدها مانند الف) فلاونوئیدها (فلاونول‌ها: مایرستین، کوئرستین و کامفرول). ب) فلاوان–۳–اُل‌ها (کاتچین، اپی‌کاتچین، گالوکاتچین و ...) و ج) آنتوسیانین‌ها (دلفینیدین–۳–گلوکوزید، سیانیدین–۳–گلوکوزید، مالویدین–۳–گلوکوزید، پلارگونیدین–۳–O–گلوکوزید می‌باشند (۱). این ترکیبات به عنوان بخشی از سیستم آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی نقش مهمی در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و کاهش اثرات تنش اکسیداتیو دارند (۴).

اسید گاما آمینوبوتیریک (گابا) یک اسید آمینه غیرپروتئینی ۴ کربنه، مولکول سیگنال‌دهنده درونی است که نقش مهمی در تنظیم واکنش‌های رشد و نموی گیاهان و مقابله با تنش‌ها دارد (۵). این ترکیب یک متابولیت کلیدی در مسیرهای متابولیسمی اولیه و ثانویه است که به‌صورت یک واسطه در متابولیسم نیتروژن و بیوسنتز سایر اسیدهای آمینه عمل می‌کند. گابا از طریق گیرنده‌های مالات فعال‌شونده با آلومینیوم، باعث تنظیم تعدادی از فرایندهای بیولوژیکی مانند بسته شدن روزنه، تغذیه و مقاومت به تنش می‌گردد. از طرفی نقش گابا در محصولات باغبانی را می‌توان به خواص آنتی‌اکسیدانی و تأثیر آن در افزایش تولید پرولین و تجمع فنل کل نسبت داد (۵). تحریک فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی، افزایش گابا درونی، جلوگیری موقتی از فعالیت آنزیم‌های پلی‌گالاکتروناز، پکتین متیل استراز و پلی‌فنل اکسیداز و تحریک فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز از جمله مکانیزم‌های گزارش شده کاربردهای پس از برداشت گابا در محصولات باغبانی می‌باشد (۱ و ۶).

گابا در برگ، خوشه و شاخه‌های انگور یافت می‌شود و در پیچک‌ها مقدار آن ۵ برابر بیش‌تر است. گزارش شده است که تیمار پیچک‌های انگور با گابا باعث تأثیر مثبت کوتاه‌مدت و برگشت‌پذیر روی پیچک‌ها شد (۷). تأثیرات رشدی گابا از طریق نقش متابولیکی آن در چرخه اسید سیتریک (TCA) و سیگنال‌دهی آن در متابولیسم نیتروژن و جذب نیترات و هم‌چنین نقش متابولیکی آن به‌صورت منبع کربن و نیتروژن ایجاد می‌گردد (۸). هم‌چنین افزایش پارامترهای رشدی در اثر کاربرد گابا می‌تواند به‌دلیل نقش آن در حفظ تورژسانس سلولی، افزایش بیوسنتز

کلروفیل و کاهش صدمات اکسیداتیو از طریق تنظیم فرایندهای بیوشیمیایی مختلف باشد (۹).

بیان شده است که گابا با دخالت در جذب و انتقال نیترات و بیان شدن ژن‌های انتقال نیترات منجر به بهبود رشد فیزیولوژیکی گیاه می‌گردد (۱۰). این عملکرد با سیگنال‌دهی گابا جهت جذب نیترات، با دخالت آن در تنظیم اسمزی، تغییر pH، هموستازی گلوتامات و عملکرد آن می‌باشد و این عملکرد در واکنش‌های گیاه در برابر عوامل خارجی نیز مهم می‌باشد (۱۱). هم‌چنین گابا با تأثیر بر افزایش فعالیت فتوسیستم I و II و دخالت در مکانیسم‌های فتوسنتزی باعث افزایش سنتز رنگدانه‌های فتوسنتزی از جمله کاروتنوئیدها می‌گردد (۱۲).

کاربرد گابا در میوه مرکبات با افزایش میزان اسیدهای آمینه و سیترات باعث افزایش کیفیت میوه و توسعه عمر انباری آن گزارش گردید (۳). هم‌چنین در میوه بلوبری، کاربرد گابا باعث افزایش میزان فلاونوئیدها و فنول کل شد (۱۳). رستگار و همکاران (۲۰۱۹) نیز نتایج مشابهی را با تیمار بعد از برداشت گابا روی میوه‌های انبه نشان دادند، آن‌ها گزارش کردند کاربرد گابا می‌تواند روی میزان اسید آسکوربیک، فنول، فلاونوئیدها مؤثر باشد و سفتی میوه در سطح بالایی حفظ و موجب بهبود کیفیت میوه گردید (۱۴). در پژوهشی دیگر تیمار میوه موز با گابا باعث حفظ کیفیت میوه و افزایش عمر انباری میوه‌ها گردید (۱۵).

نتایج کاربرد گابا در گلابی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL)، ۴-کومارات لیگاز (4CL) و سینامات ۴-هیدروکسیلاز (C_4H^+) و فعال شدن مسیر ساخت متابولیت‌های ثانویه گردیده و با تولید پیش‌سازهای تولید لیگنین و ترکیبات مقاومتی دیگر منجر به افزایش عمر انباری، مقاومت در برابر پوسیدگی کپک آبی و آلودگی‌های میکروبی شد (۱۶).

هم‌چنین در میوه مرکبات نیز نشان داده شد تیمار با گابا باعث فعال شدن آنزیم‌های کیتیناز، ۱ و ۳-گلوکوناز و PAL شد و مقاومت بر علیه پاتوژن در اثر فعالیت این آنزیم‌ها ایجاد گردید (۱۷). تیمار میوه‌های گریپ‌فروت با گابا باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های PAL و CHI و منجر به بیان شدن ژن کیتیناز و تجمع پروتئین و القاء مقاومت در برابر پوسیدگی گردید (۱۷). در همین زمینه ژانگ و همکاران (۲۰۱۱) نیز در نتایج مشابهی با تیمار میوه‌های سیب با گابا، افزایش فعالیت آنزیم‌های CHI و GLU و القاء مقاومت در برابر پوسیدگی کپک آبی را گزارش کردند (۱۸).

بیان شده است که گابا در گیاهان می‌تواند باعث ایجاد مقاومت‌های موضعی و سیستمیک گردد و کاربرد آن در یک قسمت از گیاه باعث افزاش مقاومت در قسمت‌های دیگر گیاه می‌شود (۱۹). القا مقاومت در برابر پاتوژن‌ها بوسیله گابا می‌تواند به‌صورت بازدارندگی مستقیم و یا از طریق القا واکنش‌های دفاعی و یا مجموعه‌ای از هر دو مکانیزم باشد، این عملکرد گابا به‌صورت یک متابولیت و یک سیگنال، گیاهان را قادر به تحمل شرایط سخت می‌کند (۸).

هدف پژوهش حاضر بهبود خصوصیات کیفی، تغذیه‌ای و بازارپسندی انگور رقم قزل‌اوزوم با محلول‌پاشی گابا طی مراحل رشد و تأثیر آن بر برخی خصوصیات زیست شیمیایی، کیفی و بیان ژن‌های *PAL* و *CHS* بخش میوه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در دو باغ جداگانه واقع در دو منطقه ارومیه (باغ حصار ۱۵ کیلومتری جنوب ارومیه و باغ زینالو ۹ کیلومتری غرب ارومیه) با محلول‌پاشی گابا در ۴ غلظت (۰، ۵، ۱۰ و ۲۵ میلی‌مولار) در دو

مرحله زمانی (زمان veraison و یک هفته بعد) در مرداد ۱۳۹۹ بر روی تاک‌های انگور ۱۳ ساله رقم قزل‌اوزوم انجام گرفت. آبیاری تاک‌ها به‌طور مرتب به‌صورت آبیاری قطره‌ای انجام گردید و در ۳ مرحله مبارزه با آفات و بیماری‌ها انجام شد. در طول فصل رشد تاک‌ها به‌طور مرتب هرس سبز شدند و از هیچ تیمار کودی در طول فصل رشد استفاده نشد. در زمان رسیدگی تجاری (بر اساس حداقل مواد جامد محلول کل، تعداد روز بعد از گل‌دهی و رنگ‌گیری کامل بیش از سه چهارم حبه‌ها که در سال آزمایش موردنظر ۱۰ مهرماه بود)، از هر تاک ۴ خوشه در جهات مختلف برداشت شد و از هر خوشه تعداد ۱۰ حبه جهت بررسی خصوصیات کمی و کیفی میوه از جمله میزان اسیدها قابل تیتر، مجموع مواد جامد محلول کل، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، فنول کل، فلاونوئید کل، آنتوسیانین کل میوه، فعالیت آنزیم‌های PAL و آنزیم کاتالاز و هم‌چنین محتوای ترکیبات فنولی میوه به روش HPLC در گوشت و پوست میوه اندازه‌گیری شد. هم‌چنین در میوه‌های برداشت شده از تاک‌های باغ حصار میزان بیان ژن‌های *PAL* و *CHS* نیز بررسی گردید. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. هر واحد آزمایشی شامل یک تاک و در کل از ۲۴ بوته انگور استفاده شد.

مواد جامد محلول و اسیدهای قابل تیتر: برای اندازه‌گیری میزان مواد جامد محلول میوه‌ها از دستگاه قندسنج دستی مدل Atago و برای اندازه‌گیری اسیدها قابل تیتر از روش تیتراسیون با هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد با pH=۸/۲ استفاده شد (۲۰).

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی: محتوای آنتی‌اکسیدان کل با استفاده از روش درصد مهار رادیکال‌های آزاد (DPPH) تعیین شد. برای این منظور مقدار ۵۰ میکرولیتر عصاره میوه با ۹۵۰ میکرولیتر DPPH مخلوط و بعد از ۳۰ دقیقه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Unico مدل ۲۱۰۰ UV/Vis) با طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد (۲۱).

محتوای فنول کل: اندازه‌گیری ترکیبات فنولی با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو انجام شد. بدین‌منظور ۵۰ میکرولیتر عصاره میوه در داخل لوله آزمایش ریخته و ۱۸۰ میکرولیتر آب مقطر به آن اضافه شد، سپس ۱۲۰۰ میکرولیتر فولین ۱۰ درصد به آن‌ها اضافه و بعد از ۱۰-۵ دقیقه، ۹۶۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد به آن اضافه کرده و با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر صورت گرفت. میزان فنول کل عصاره‌ها بر اساس میلی‌گرم معادل اسید گالیک در گرم وزن تر میوه گزارش گردید (۲۲).

فلاونوئید کل: برای سنجش میزان فلاونوئید کل به ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره میوه، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول (۸۰ درصد)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلراید (۱۰ درصد)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط بعد از گذشت ۴۰ دقیقه در طول موج ۴۱۵ نانومتر نسبت به شاهد قرائت گردید. میزان فلاونوئید کل عصاره‌ها براساس میلی‌گرم معادل کوئرسیتین در یک گرم وزن تر میوه گزارش گردید (۲۳).

آنتوسیانین کل: برای اندازه‌گیری محتوای آنتوسیانین کل از روش اختلاف pHها استفاده شد. ابتدا دو بافر با pHهای ۱ و ۴/۵ تهیه، سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از بافر یک را با ۱۰۰ میکرولیتر عصاره مخلوط و جذب در دو طول موج ۷۰۰ و ۵۳۰ نانومتر قرائت شد، سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از بافر دو (pH=۴/۵) را با ۱۰۰ میکرولیتر عصاره مخلوط و جذب آن نیز در دو طول موج ۷۰۰ و ۵۳۰ نانومتر قرائت گردید (۲۴).

فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز: برای سنجش فعالیت آنزیم PAL، ۰/۵گرم از گوشت میوه با پوست با استفاده از ۱/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج با pH=۷ کوبیده، سپس به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. محتوی نمونه برای سنجش آنزیم حاوی ۳۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۱ میلی‌لیتر بافر سنجش (بافر بورات ۰/۱ مولار، ۰/۱ درصد پلی‌وینیل پیرولیدون و ۱/۴ میلی‌مولار مرکاپتواتانول) با pH=۸/۸ و ۱ میلی‌لیتر L- فنیل‌آلانین ۱۲ میلی‌مولار بود که به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد. فعالیت آنزیم بر حسب nmol trans- cinnamic acid mg^{-1} protein min^{-1} محاسبه گردید (۲۵).

آنزیم کاتالاز: سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش ابی (۱۹۸۴) انجام شد (۲۶). ۰/۵گرم از حبه‌های انگور (گوشت به‌همراه پوست) با ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۵ درصد پودر شده و سپس به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. فعالیت آنزیم کاتالاز به‌صورت کاهش در جذب طی یک دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر محاسبه شد.

ترکیبات فنولی (فلاونوئیدی و غیرفلاونوئیدی): ۱۰۰ میلی‌گرم از گوشت حبه به همراه پوست در ۱۰ میلی‌لیتر متانول به‌مدت ۲۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک در سه تکرار استخراج شد و سپس در ۲۰۰۰ دور به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. جداسازی و تعیین اسیدهای فنولیک با استفاده از آرایه فتودیود کروماتوگرافی مایع فوتودیود با عملکرد بالا (HPLC-PDA, Water Alliance 2695 Separation Module)، مجهز به ستون C18 (۲۵۰ میلی‌متر × ۴/۶ میلی‌متر، ۵ میکرومتر، waters) و یک آشکارساز UV (Water 2487) انجام شد. یک محلول استوک برای نمونه‌های استاندارد اسید گالیک، اسید کافئیک، اسید کلروژنیک، روتین، کوئرستین، اسید کوماریک، اسید سینامیک، اپی‌ژنین و رسوراترول به‌صورت جداگانه در استونیتریل خالص تهیه شد و سپس برای رسم منحنی استاندارد در محدوده غلظت (۱۰۰-۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) رقیق شد (۳۰). پیک‌ها در طول موج‌های ۲۵۴، ۲۷۵، ۳۰۵ و ۳۲۰ نانومتر بررسی شدند. حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر بود و دما در ۲۵ درجه سانتیگراد حفظ شد. همه تزریق‌ها سه بار تکرار شدند.

بررسی بیان ژن با تکنیک Real time PCR: جهت بررسی بیان ژن‌های *PAL* و *CHS* نمونه‌برداری از میوه‌های انگور (گوشت به‌همراه پوست) در باغ حصار (از هر تاک ۴ خوشه در جهات مختلف و از هر خوشه ۱۰ حبه در دو مرحله زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از محلول‌پاشی گابا) انجام گرفت و برای هر کدام ۲ تکرار در نظر گرفته شد. آزمایش‌های مولکولی با تکنیک PCR و دستگاه Real Time انجام شد. استخراج RNA با استفاده از بافر CTAB انجام گرفت. از دستگاه اسپکتروفتومتر برای بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده استفاده شد و برای ارزیابی کیفیت RNA از شاخص A260/280 استفاده شد. نسبت های بین ۲-۱/۸ از لحاظ کیفیت مناسب بود. از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد برای ارزیابی کیفی RNA استخراج شده استفاده شد. فرآیند جداسازی توسط الکتروفورز با ولتاژ ۹۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد و پس از عکسبرداری، صحت RNA بررسی شد. با توجه به مشاهده باندهای مربوط به rRNA (18S و 28S) بر روی ژل صحت RNA تأیید شده و برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفت. برای ساختن cDNA از کیت Thermo scientific Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit استفاده شد. جهت بررسی

بیان ژن‌های مورد نظر با استفاده از واکنش Real time PCR از دستگاه Rotor gene Q-Pure Detection-Qiagen و کیت Maxima SYBR Green/Fluorescein Qpcr Master Mix (2x) #K0241 شرکت فرمانتاز استفاده شد. از ژن Actin به عنوان ژن مرجع و برای نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد. تجزیه داده‌های حاصل از میزان نسبی بیان ژن‌های مورد مطالعه بر پایه طرح کاملاً تصادفی و تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام گرفت.

تجزیه آماری داده‌ها: تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه (۹/۱) و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام گرفت. هم‌چنین برای رسم نمودار از نرم‌افزار Excel سری ۲۰۱۰ استفاده گردید.

نتایج و بحث

اسید قابل تیتراسیون: بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس گابا در سطح احتمال ۱ درصد و مکان در سطح احتمال ۵ درصد بر اسید قابل تیتراسیون اثر معنی‌داری داشت ولی اثر متقابل آن‌ها معنی‌دار نبود (جدول ۱). بیش‌ترین میزان اسید قابل تیتراسیون در غلظت ۵ میلی‌مولار گابا با افزایش بیش از ۴۳ درصد مشاهده شد. این تیمار تفاوت معنی‌داری با غلظت‌های ۱۰ و ۲۵ میلی‌مولار نداشت (شکل ۱-A) و بین دو باغ نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. مشابه این نتایج در پژوهشی، تیمار پس از برداشت میوه‌های انگور با گابا باعث افزایش قابل‌توجه اسیدهای قابل تیتراسیون در مقایسه با شاهد شد. در این پژوهش میزان بالای اسیدهای قابل تیتراسیون در میوه‌های انگور تیمار شده با گابا به تجزیه پایین اسیدهای آلی و فعالیت بالای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت داده شد (۳). هم‌چنین، گابا باعث افزایش معنی‌دار اسید سیتریک، بهبود و حفظ کیفیت میوه، افزایش عمر انباری و کاهش پوسیدگی در میوه مرکبات گردید (۳۷). در پژوهش دیگری نیز در میوه‌های هلو با کاربرد گابا در غلظت ۵ میلی‌مول اسید کل میوه در بالاترین میزان نسبت به شاهد گزارش گردید (۳۵). در پژوهش‌های وانگ و همکاران (۲۰۱۶) نیز تیمار با گابا در میوه های گیلاس با پایین نگه داشتن میزان تنفس میوه باعث حفظ اسیدهای آلی گردید (۴۵). بیان شده است که حفظ میزان بالای اسیدهای آلی در میوه‌های تیمار شده با گابا می‌تواند به‌دلیل شرکت این اسید آمینه در چرخه اسید سیتریک و تولید اسیدهای آلی باشد (۲).

مجموع مواد جامد محلول: بر اساس نتایج تجزیه واریانس گابا و مکان هر دو در سطح احتمال ۱ درصد بر میزان مواد جامد محلول کل اثر معنی‌داری داشتند ولی اثر متقابل آن‌ها معنی‌دار نبود (جدول ۱). بیش‌ترین مواد جامد محلول کل در غلظت ۲۵ میلی‌مولار گابا با افزایش بیش از ۲۹ درصد مشاهده شد و بین غلظت‌های دیگر آن تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۱-B) در حالی‌که تفاوت بین دو باغ معنی‌دار بود. در نتایج مشابهی تیمار پس از برداشت میوه‌های انگور با گابا باعث افزایش قابل‌توجه مواد جامد محلول کل در مقایسه با شاهد شد (۳). هم‌چنین در پژوهش‌های شنگ و همکاران (۲۰۱۱) تیمار میوه‌های هلو با گابا با تأثیر معنی‌داری بر روی مجموع مواد جامد محلول میوه باعث حفظ میزان مجموع مواد جامد محلول در سطح بالا شد (۳۵). بیان شده است که میزان بالای مواد جامد محلول کل در میوه‌های تیمار شده با گابا می‌تواند به‌دلیل جلوگیری از مصرف بالای قندها توسط گابا باشد (۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر محلول‌پاشی گابا بر برخی خصوصیات زیست شیمیایی انگور رقم قزل‌اوزوم.

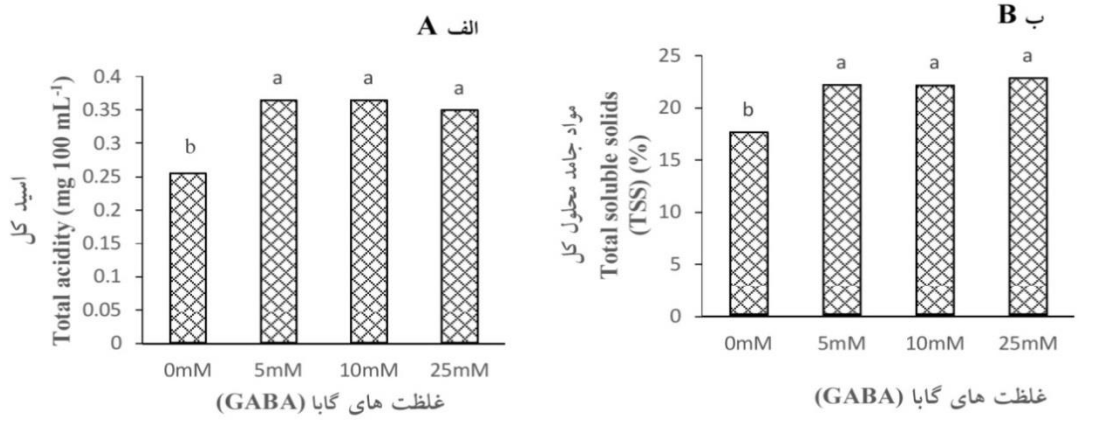
Table 1. Variance analysis of the effect of foliar spraying with GABA on some biochemical charectrization of 'Qizil Uzum' table grape.

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	اسیدهای قابل‌تیتراسیون Total Acidity (TA)	مواد جامد محلول کل Total Soluble Solids (TSS)	آنتی اکسیدان DPPH	فنول کل TPC	فلاونوئید کل TFC	آنتوسیانین کل TAC	فنیل‌آلانین آمونیالیاز PAL	کاتالاز CAT
میانگین مربعات (Mean of Squares)									
گابا GABA	3	0.0168^{**}	31.416^{**}	478.05^{**}	332.879^{**}	1.4570^{**}	3.8202^{**}	2177.98^{**}	0.0301^{**}
مکان Location	1	0.0135^{*}	16.055^{**}	81.254^{**}	527.062^{**}	1.7334^{**}	4.4118^{**}	8.3544^{ns}	0.00003^{ns}
گابا * مکان GABA * Location	3	0.004^{ns}	0.834^{ns}	50.873^{**}	163.977^{**}	0.7971^{*}	0.7277^{*}	111.400^{**}	0.00143^{ns}
اشتباه آزمایشی Error	16	0.0031	0.439	2.562	1.7036	0.1561	0.1635	12.583	0.00223
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)	-	16.68	4.32	2.81	5.64	8.17	20.99	3.03	17.93

^{ns}، * و ** به ترتیب نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

^{ns}, ** and * are non-significant and significant at 1 and 5% probability levels, respectively

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس، گابا و مکان و اثرات متقابل آن‌ها در سطح احتمال ۱ درصد بر میزان آنتی‌اکسیدان کل اثر معنی‌داری داشتند (جدول ۱). گابا در غلظت ۵ میلی‌مولار در باغ حصار با افزایش بیش از ۸۶ درصد و در غلظت ۱۰ میلی‌مولار در باغ زینالو با افزایش بیش از ۹۶ درصد بیش‌ترین میزان آنتی‌اکسیدان کل را نشان داد (شکل ۲-A).



شکل ۱- تأثیر محلول‌پاشی با غلظت‌های مختلف گابا (۰، ۵، ۱۰، ۲۵ میلی‌مولار) بر اسیدها قابل تیتراسیون (پانل الف)، درصد مواد جامد محلول کل (پانل ب) میوه انگور رقم قزل‌اوزوم. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد با آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشد.

Fig. 1. Effect of foliar spraying with different doses (0, 5, 10, 25 mM) of GABA on TA (Panel A) and TSS (Panel B) content of Qızıl Uzum table grape berries. Means indicated with different letters are significantly different at P ≤ 0.01 according to Duncan's Multiple Range Test.

سیستم آنتی‌اکسیدانی با فعالیت آنزیم‌هایی هم‌چون سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و کاتالاز نقش مهمی در جلوگیری و کم کردن خسارت رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در سلول‌های گیاهی دارد (۴۵). گابا در سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی هم خود به عنوان یک ملکول سیگنال‌دهنده عمل کرده و هم شروع‌کننده سیگنال‌های مسیرهای متابولیسمی از جمله تولید رادیکال‌های آزاد، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، عمل متقابل با هورمون‌های گیاهی و واکنش‌های دفاعی بر علیه پاتوژن‌ها می‌باشد (۳۲). بر اساس پژوهش‌های یک رابطه بین تنش، تجمع گابا و واکنش‌های فیزیولوژیکی گیاهان وجود دارد و گزارش شده است که در شرایط تنش، Ca^{2+} سلولی تجمع یافته و سپس با فعالیت آنزیم کلسیم کالمودلیم Ca^{2+}/CaM و آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز (GAD)، گلوتامات تبدیل به گابا می‌گردد (۳۲). از جمله این اثرات القایی گابا در سیستم‌های دفاعی در گیاهان چوبی از جمله انگور گزارش شده است (۳۰).

گزارش شده است که در تنش‌های زنده و غیرزنده گابا با ایفای نقش در مسیر فنیل پروپانوئید که مسیر اصلی سنتز متابولیت‌های ثانویه در میوه‌ها و سبزی‌ها است و با افزایش میزان پرولین و گابا درونی و هم‌چنین افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و حفظ یکپارچگی غشا از طریق ایجاد فعالیت پایین آنزیم لیپوکسی اکسیژناز (LOX)، نقش اساسی در سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی ایفا می‌کند (۴۹). در نتایج مشابهی تیمار میوه‌های انگور با گابا باعث حفظ فعالیت بالای آنتی‌اکسیدانی گردید و این امر به حفظ ترکیبات فنولیکی از اکسیداسیون، کاهش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز و فعالیت بالای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در میوه‌های تیمار شده با گابا نسبت داده شد. (۳). مشابه نتایج این پژوهش تیمار میوه‌های انبه با گابا باعث افزایش قابل‌توجه آنتی‌اکسیدان کل میوه‌های مورد تیمار شد و این تأثیر به توانایی گابا در افزایش سنتز ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند فنول‌ها و فلاونوئیدها نسبت داده شد (۳۳). هم‌چنین در میوه‌های هلو نیز کاربرد گابا باعث افزایش معنی‌دار آنتی‌اکسیدان کل میوه گردید (۲). علاوه بر آن در نتایج مشابهی در پژوهش‌های ژانگ و همکاران (۲۰۱۱)، تیمار میوه‌های سیب با گابا باعث افزایش آنتی‌اکسیدان کل گردید.

گابا با عملکرد چندجانبه و فراگیر دارای اثرات مختلفی در دامنه وسیعی از واکنش‌های فیزیولوژیکی از جمله بیان ژن، تولید H_2O_2، سنتز آمینواسیدها و فرایندهای فتوسنتزی می‌باشد (۳۱). بیش‌ترین تجمع گابا در واکوئل در محدوده pH ۵/۵-۳/۵ ایجاد می‌شود. آسیب‌های مکانیکی موجب تخریب غشاهای واکوئل و آزاد شدن اسیدهای آلی به داخل سیتوسول و اسیدی شدن آن و در نتیجه باعث فعال شدن آنزیم GAD می‌گردد و در این شرایط گابا تولیدی می‌تواند در واکوئل تجمع یابد. در شرایطی که سیتوسول اسیدی می‌شود عمدتاً گلوتامین قابل دسترسی بوده و می‌تواند به‌وسیله GAD برای سنتز گابا مورد استفاده قرار گیرد (۳۶).

گزارش شده است که در هلو، تیمار با گابا با افزایش نسخه‌برداری ژن‌ها و فعالیت آنزیم‌های مرتبط با دفاع و هم‌چنین افزایش استحکام دیواره سلولی، تجمع لیگنین در دیواره سلول و دخالت در متابولیسم انرژی با حفظ سطح بالای انرژی باعث افزایش مقاومت سیستم دفاعی گردید (۴۶). هم‌چنین در مرکبات نیز کاربرد گابا با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باعث ایجاد مقاومت در برابر بیماری‌ها شد (۳۷). در مورد مکانیزم القا مقاومت توسط گابا در برابر تنش‌های مختلف بیان شده است که گابا می‌تواند از طریق تحریک از هم پاشیدگی غشا پلاسمایی و نشت پروتئین‌ها و قندهای بین سلولی باعث جلوگیری از ورود پاتوژن‌های قارچی گردد.

فنول کل: بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس، محلول‌پاشی گابا، مکان و اثرات متقابل آن‌ها در سطح احتمال ۱ درصد بر میزان فنول کل اثر معنی‌داری داشتند (جدول ۱). کاربرد گابا در غلظت ۱۰ میلی‌مولار در باغ حصار با افزایش سه برابری و در غلظت ۲۵ میلی‌مولار در باغ زینالو با افزایش ۱۱۷ درصدی بیش‌ترین میزان فنول کل را نشان داد و تفاوت بین غلظت‌های دیگر با هم و با شاهد معنی‌دار بودند (شکل ۲-B).

ترکیبات فنولی از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه سنتزی از مسیر اسید شیکمیک بوده و نقش مهمی را در متابولیسم گیاه بر عهده دارند. این ترکیبات باعث ایجاد خصوصیات ارگانولوپتیکی و طعم از جمله گسی یا تلخی، رنگ و ماندگاری میوه می‌شوند (۱۵). توزیع ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها بستگی به درجه رسیدگی، فصل رشد، منطقه جغرافیایی، مدیریت باغی، رقم و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی دارد (۴۷). در نتایجی مشابه با این پژوهش، تیمار میوه‌های بلوبری با گابا باعث افزایش میزان فنول کل و فلاونوئیدهای میوه گردید و با تأثیر بر سنتز لیگنین‌ها و ترکیبات مقاومتی دیگر باعث مقاومت به بیماری‌ها گردید (۵۰). در پژوهش رستگار و همکاران (۲۰۱۹) تیمار میوه‌های انبه با گابا باعث حفظ میزان بالای فنول و فلاونوئید گردید (۳۳). علاوه بر آن میوه‌های گیلاس تیمار شده با گابا در طول انبارداری نسبت به شاهد، میزان فنول بالاتری را نشان دادند (۴۵). مشابه این نتایج، با تیمار میوه‌های موز با گابا، میزان فنول کل افزایش نشان داد که این افزایش به فعالیت بالای آنزیم PAL نسبت داده شد (۴۴).

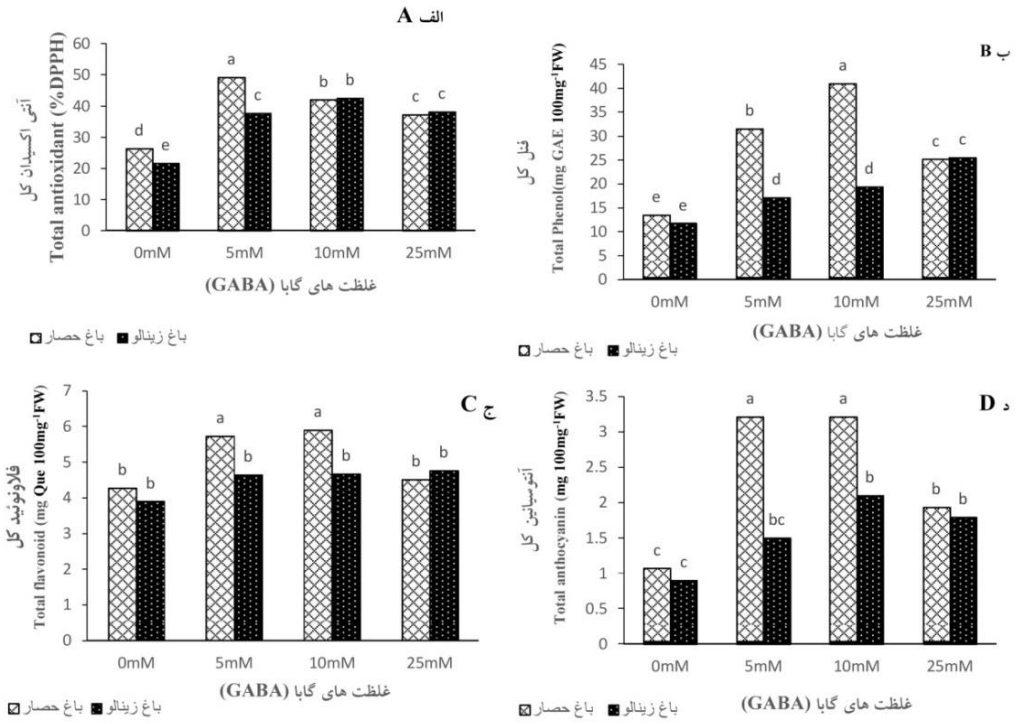
فلاونوئید کل (TFC): نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که گابا و مکان هر دو در سطح احتمال ۱ درصد و اثر متقابل آن‌ها در سطح احتمال ۵ درصد بر محتوی فلاونوئید کل معنی‌دار بودند (جدول ۱). گابا در غلظت ۱۰ میلی‌مولار در باغ حصار با افزایش بیش از ۳۷ درصد بعد از تیمار ۵ میلی‌مولار (۳۴ درصد افزایش) بیش‌ترین تأثیر را داشت. در باغ زینالو بین شاهد و تیمارهای مختلف گابا تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۲-C).

ترکیبات فنولی شامل ترکیبات فلاونوئیدی مانند آنتوسیانین‌ها، فلاونول‌ها، فلاوانول‌ها و ترکیبات غیرفلاونوئیدی مانند استیل‌بنز و اسیدهای فنولیکی می‌باشند. در بین این ترکیبات فلاونوئیدها دارای بیش‌ترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بوده و تأثیر زیادی بر روی پارامترهای کیفی انگور دارند (۴۱). بیوسنتز فلاونوئیدها در گیاهان از دو مسیر شیکیمات و اسید مالونات انجام می‌گیرد که هر دو مسیر در ترکیب فلاونوئیدها تعیین‌کننده می‌باشند. در مسیر شیکیمات علاوه بر فلاونوئیدها، تعدادی از متابولیت‌های ثانویه از جمله فنولات‌ها، لیگنین، لیگنان و استیلبن‌ها نیز سنتز می‌گردند (۱۲).

موافق با نتایج این پژوهش در تیمار پس از برداشت میوه‌های انگور با گابا بیش‌ترین میزان فلاونوئیدها نسبت به شاهد مشاهده گردید (۳). هم‌چنین تیمار میوه‌های بلوبری با گابا با تأثیر بر مسیر فنیل‌پروپانوئید و تنظیم متابولیسم ROS، باعث افزایش میزان فنول کل و فلاونوئیدها گردید (۵۰). در نتایج مشابهی تیمار میوه‌های انبه با گابا باعث حفظ میزان بالای فنول و فلاونوئید گردید (۳۳). در پژوهش ونگ و همکاران (۲۰۱۶) نیز میوه‌های گیلاس تیمار شده با گابا میزان بالای فلاونوئید را در طول انبارداری نسبت به شاهد داشتند (۴۵). افزایش میزان فلاونوئیدها با تیمار گابا در میوه هلو نیز گزارش شده است (۲). مکانیزم اثر گابا در افزایش میزان فلاونوئیدها می‌تواند به‌علت تحریک سنتز آنزیم PAL باشد که این آنزیم شروع‌کننده مسیر فنیل پروپانوئید بوده و باعث سنتز ترکیبات فنولی مانند فلاونوئیدها می‌گردد (۲۵).

آنتوسیانین کل: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد گابا و مکان هر دو در سطح احتمال ۱ درصد و اثرات متقابل آن‌ها در سطح احتمال ۵ درصد بر میزان آنتوسیانین کل اثر معنی‌داری داشتند (جدول ۱). بالاترین میزان آنتوسیانین در هر دو باغ در غلظت‌های ۱۰ میلی‌مولار گابا با افزایش ۳ برابری در باغ حصار و افزایش بیش از ۲ برابری در باغ زینالو مشاهده شد و بین غلظت‌های دیگر گابا هم تفاوت معنی‌داری از نظر آماری وجود داشت (شکل ۲-D).

آنتوسیانین‌ها در زمان رسیدگی میوه عمدتاً در پوست حبه انگور تجمع می‌یابند و غلظت آن‌ها تحت‌تأثیر عوامل مختلف ژنتیکی، محیطی از جمله دما، نور و عملیات زراعی قرار می‌گیرد. هم‌چنین عملیات مدیریتی مانند حذف برگ، تنک خوشه و حلقه‌زنی نیز می‌تواند بر میزان آنتوسیانین انگور تأثیر بگذارد. زمان برداشت انگور نیز تأثیر قابل‌توجهی در میزان آنتوسیانین‌های استیله انگور دارد (۱۷). براساس پژوهش‌های در انگور آنتوسیانین‌ها شامل گلیکوزیدهای دی‌هیدروکسیله سیانیدین و پئونیدین و گلیکوزیدهای تری هیدروکسیله دلفینیدین، پتونیدین و مالویدین می‌باشند، اگرچه بسته به رقم انگور تفاوت‌هایی در ترکیبات آنتوسیانینی انگور وجود دارد، ولی مالویدین ۳-گالاکتوزید بیش‌ترین ترکیب آنتوسیانینی انگور گزارش شده است و مشتقات مالویدین، آنتوسیانین‌های اصلی انگور محسوب می‌گردند (۳۹). در نتایج مشابهی در پژوهش اصغریان و همکاران (۲۰۲۲) تیمار میوه‌های انگور با ۴۰ میلی‌مول گابا باعث افزایش میزان آنتوسیانین میوه‌ها گردید (۳).



شکل ۲- تأثیر محلول‌پاشی با غلظت‌های مختلف گابا (۰، ۵، ۱۰، ۲۵ میلی‌مولار) بر محتوای آنتی‌اکسیدان کل (پانل الف)، فنول کل (پانل ب)، فلاونوئید کل (پانل ج) و آنتوسیانین کل (پانل د) میوه انگور رقم قزل اوزوم. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد با آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشد.

Fig. 2. Effect of foliar spraying with different doses (0, 5, 10, 25 mM) of GABA on DPPH (Panel A), TPC (Panel B), TFC (Panel C) and TAC (Panel D) content of Qızıl Uzum table grape berries. Means indicated with different letters are significantly different at $P \leq 0.01$ according to Duncan's Multiple Range Test.

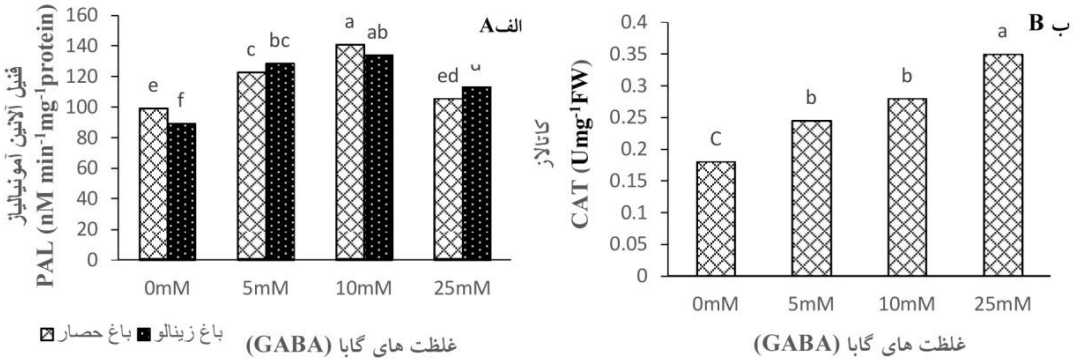
آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز: بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس، گابا در سطح احتمال ۱ درصد بر فعالیت آنزیم PAL اثر معنی‌داری داشت ولی اثر مکان غیرمعنی‌دار بود و اثرات متقابل گابا و مکان نیز در سطح احتمال ۱ درصد بر فعالیت این آنزیم معنی‌دار بود (جدول ۱). در هر دو باغ در غلظت ۱۰ میلی‌مولار گابا، بیش‌ترین فعالیت آنزیم PAL با افزایش ۴۲ درصد در باغ حصار و افزایش ۵۰ درصد در باغ زینالو مشاهده شد و هم‌چنین تفاوت ایجاد شده در فعالیت این آنزیم بین غلظت‌های دیگر گابا در مقایسه با هم و با شاهد معنی‌دار بود (شکل ۳-A).

PAL یک آنزیم کلیدی در مسیر متابولیسم فنیل پروپانوئیدها با دآمیناسیون غیراکسیداتیو باعث تبدیل L-فنیل‌آلانین به اسید ترانس‌سینامیک و ایجاد ارتباط بین متابولیسم اولیه و ثانویه و تولید فنیل پروپانوئیدهای مختلف و مشتقات آن‌ها از جمله فلاونوئیدها، ایزوفلاونوئیدها، رسوراترول، کومارین‌ها، استیل بنز، آنتوسیانین‌ها، لیگنین و ترکیبات فنولیکی دیگر می‌گردد و فعالیت آن تحت‌تأثیر عوامل مختلفی از جمله ژنوتیپ، مرحله رشدی گیاه، نوع اندام و بافت گیاه قرار می‌گیرد (۲۱). مشابه نتایج ما، در میوه‌های بلوبری تیمار با گابا باعث افزایش فعالیت آنزیم PAL و ایجاد مقاومت بر علیه پوسیدگی و آلودگی‌های میکروبی گردید (۵۰). هم‌چنین در میوه‌های گلابی کاربرد گابا باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های PAL و CHI و القا مقاومت بر علیه بیماری شدند (۵۱). ونگ و همکاران (۲۰۱۸) این افزایش فعالیت آنزیم‌های PAL، 4CL و C_4H را با کاربرد گابا در میوه هلو گزارش کردند (۴۶). نتایج مشابهی نیز توسط پورات و همکاران (۲۰۰۳) با تیمار میوه‌های گریپ‌فروت با گابا گزارش گردید و با افزایش فعالیت آنزیم‌های PAL و CHI موجب القا مقاومت در برابر پوسیدگی شد. در این پژوهش افزایش فعالیت آنزیم PAL با افزایش تجمع پروتئین چیتیناز منجر به القا مقاومت بر علیه پاتوژن‌ها گردید (۲۸).

فعالیت آنزیم کاتالاز: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که گابا در سطح احتمال ۱ درصد بر فعالیت آنزیم کاتالاز اثر معنی‌داری داشت ولی مکان و اثرات متقابل گابا و مکان اثر معنی‌داری بر فعالیت این آنزیم نشان ندادند (جدول ۱). گابا در غلظت ۲۵ میلی‌مولار با افزایش نزدیک ۲ برابری در هر دو باغ بالاترین فعالیت کاتالاز را ایجاد کرد و بین غلظت‌های ۱۰ و ۵ میلی‌مولار تفاوت معنی‌داری نبود (شکل ۳-B).

آنزیم کاتالاز از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی خنثی‌کننده و گیرنده پراکسید هیدروژن می‌باشد که باعث حفاظت سلول از خسارت اکسیداتیو می‌گردد. میزان بالای پراکسید هیدروژن می‌تواند در چرخه آسکوربات-کاتالاز با همکاری بین گیرنده‌های H_2O_2 از جمله کاتالاز و سوپراکسیداز کاهش یابد (۱۴). بیان شده است که مکانیزم اثر گابا در سیستم‌های دفاعی می‌تواند با تأثیر بر تجمع پروتئین‌های مرتبط با پاتوژن (PR) از جمله تجمع چیتیناز و ۱ و ۳-گلوکوناز باشد (۴۹). اما این تنها مکانیزم القا مقاومت گابا نبوده بلکه گابا می‌تواند باعث القا واکنش‌های فوق حساسیتی (hypersensitivity)، رسوب کالوز و تجمع لیگنین گردد. هم‌چنین گابا می‌تواند القا مقاومت به پاتوژن را از طریق فعال کردن مسیرهای سیگنال‌دهی وابسته به اسید سالسیلیک، اسید جازمونیک و یا اتیلن انجام دهد. بر اساس پژوهش اصغریان و همکاران (۲۰۲۲) در تیمار میوه‌های انگور با ۴۰ میلی‌مول گابا باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله کاتالاز تا ۳۵ درصد گردید (۳). در نتایج مشابهی با

نتایج فوق، تیمار با گابا در میوه‌های بلوبری باعث افزایش فعالیت کاتالاز شد و با تأثیرگذاری بر مسیر فنیل پروپانوئید و متابولیسم ROS باعث افزایش عمر انباری و تأخیر پیری میوه گردید (۵۰). هم‌چنین کاربرد گابا در گل‌های شاخه بریده آنتوریوم و هلو با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز در چرخه آسکوربات و گلوتاتیون (AsA-GSH) باعث افزایش مقاومت به سرمازدگی بعد از برداشت گردید (۲ و ۵۰). در مرکبات نیز کاربرد گابا با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، باعث افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها گردید (۳۷). رستگار و همکاران (۲۰۱۹) در نتایج مشابهی افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله کاتالاز را با تیمار گابا در میوه‌های انبه گزارش کردند (۳۳).



شکل ۳- تأثیر محلول‌پاشی با غلظت‌های مختلف گابا (۰، ۵، ۱۰، ۲۵ میلی‌مولار) بر فعالیت آنزیم‌های PAL (پانل الف) و کاتالاز (پانل ب) میوه انگور رقم قزل‌اوزوم. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد با آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشد.

Fig. 3. Effect of foliar spraying with different doses (0, 5, 10, 25 mM) of GABA on PAL (Panel A) and CAT (Panel B) enzyme activity of Qızıl Uzum table grape berries. Means indicated with different letters are significantly different at P ≤ 0.01 according to Duncan's Multiple Range Test.

ترکیبات پلی فنولیک: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد گابا و مکان و اثرات متقابل آن‌ها در سطح احتمال ۱ درصد بر میزان ترکیبات فنولیکی اثر معنی‌داری نشان دادند (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که در نمونه‌های تیمار شده با غلظت ۵ میلی‌مولار گابا، بالاترین میزان کوئرستین، کامفرول، سیرینجتین و در غلظت ۱۰ میلی‌مولار بالاترین میزان میریستین، کاتچین، اسیدکافئیک، اسیدگالیک، رسوراترول و اسید پی‌کوماریک مشاهده گردید و هم‌چنین تفاوت بین غلظت‌های دیگر با هم و با شاهد از نظر آماری معنی‌دار بود (جدول ۳ و شکل‌های ۴ و ۵).

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر محلول‌پاشی گابا بر برخی ترکیبات فنولی در انگور رقم قزل‌اوزوم.

Table 2. Variance analysis of the effect of foliar spraying with GABA on some phenolic compounds of 'Qizil Uzum' table grape.

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات (Mean of Squares)									
		میریستین Myricetin	کوئرستین Quercetin	کامفرول Kaempferol	سیرینجتین Syringetin	کاتچین Catechin	اسید گالیک Gallic acid	اسید کافئیک Caffeic acid	اسید پی کوماریک p-Coumaric acid	رسوراترول Resveratrol
گابا GABA	3	5.9292**	758.27**	20.463**	124.19**	81.399**	9.470**	8.4937**	33.463**	2.2037**
مکان Location	1	0.001^{ns}	107.10**	0.8437**	42.533**	25.153**	6.6150**	16.833**	23.403**	0.033^{ns}
گابا * مکان GABA * Location	3	0.228^{ns}	282.06**	7.0037**	7.853**	6.7494**	0.005^{ns}	3.9937*	5.713*	0.1337**
اشتباه آزمایشی Error	16	1350	8.3129	0.0950	0.9684	0.6324	0.5222	0.7762	1.350	0.0100
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)	-	17.33	11.29	6.43	5.07	4.23	17.00	32.18	30.27	10.95

^{ns}، * و ** به ترتیب نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

^{ns}, ** and * are non-significant and significant at 1 and 5% probability levels, respectively

ترکیبات فلاونولی: بر اساس نتایج این پژوهش میریستین، کوئرستین، کامفرول و سیرینجتین ترکیبات فلاونولی غالب موجود در نمونه‌های مورد تیمار بودند که به‌طور معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد تحت‌تأثیر این محلول‌پاشی قرار گرفتند (جدول ۲). بالاترین میزان کوئرستین، کامفرول، سیرینجتین در غلظت ۵ میلی‌مولار گابا با افزایش بیش از ۳ برابری کوئرستین و سیرینجتین و افزایش نزدیک ۲ برابری کامفرول در هر دو باغ مشاهده شد (جدول ۳) و بالاترین میزان میریستین با افزایش نزدیک ۳ برابری نیز در غلظت ۱۰ میلی‌مولار گابا ایجاد گردید (جدول ۳) و غلظت‌های دیگر گابا هم تفاوت معنی‌داری از نظر آماری نسبت به هم و شاهد ایجاد کردند.

جدول ۳- تأثیر محلول‌پاشی با غلظت‌های مختلف گابا (۰، ۵، ۱۰، ۲۵ میلی‌مولار) بر میزان ترکیبات فلاوانول (میریستین، کوئرستین، کامفرول و سیرینجتین) میوه انگور رقم قزل‌اوزوم.

Table 3. Effect of foliar spraying with different doses (0, 5, 10, 25 mM) of GABA on flavonol compounds (myricetin, Quercetin, Kaempferol, Syringetin) of Qızıl Uzum table grape berries.

گابا GABA (mM)		ترکیبات فلاوانولی Flavonol compounds (µg g^{-1}FW)			
		میریستین Myricetin	کوئرستین Quercetin	کامفرول Kaempferol	سیرینجتین Syringetin
0	باغ حصار Hesar orchard	1.17^{d}	10.80^{d}	2.20^{f}	15.10^{d}
	باغ زینالو Zeynalo orchard	1.17^{d}	20.30^{c}	2.80^{ef}	12.00^{e}
5	باغ حصار Hesar orchard	1.50^{d}	34.27^{b}	7.50^{a}	27.30^{a}
	باغ زینالو Zeynalo orchard	1.67^{d}	44.00^{a}	6.10^{b}	21.80^{b}
10	باغ حصار Hesar orchard	3.27^{ab}	38.43^{ab}	7.00^{a}	20.50^{bc}
	باغ زینالو Zeynalo orchard	3.60^{a}	22.30^{c}	4.20^{d}	20.50^{bc}
25	باغ حصار Hesar orchard	2.60^{bc}	10.20^{d}	3.20^{e}	20.05^{bc}
	باغ زینالو Zeynalo orchard	2.03^{cd}	24.00^{c}	5.30^{c}	18.00^{c}

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد با آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشد

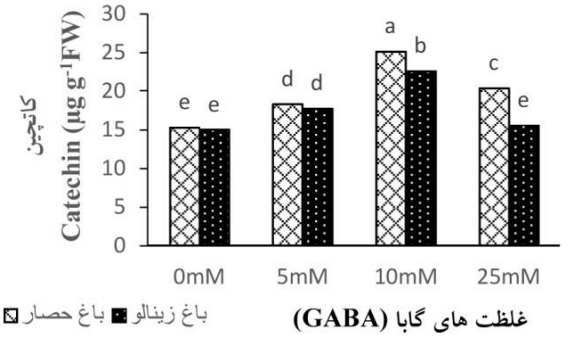
Means indicated with different letters are significantly different at $p \leq 0.01$ according to Duncan's Multiple Range Test

فلاونول‌ها از ترکیبات مؤثر کیفی در انگور بوده و در ایجاد تلخی و گسی میوه مؤثر می‌باشند. هم‌چنین همراه آنتوسیاین‌ها از جمله کوفاکتورهای مهم در رنگ‌گیری ارقام قرمز انگور بوده و باعث پایداری رنگ قرمز آنتوسیانین‌ها می‌گردند، علاوه بر آن همراه آنتوسیانین‌ها با جذب امواج ماوراءبنفش A و B باعث حفاظت نوری می‌گردند (۱۵). فلاونوئیدهای اساسی انگور شامل میریستین، کوئرستین، کامفرول و اشکال متیله آن‌ها از جمله ایزورامنتین می‌باشند که تحت‌تأثیر عوامل محیطی مانند نور به‌ویژه نور ماورابنفش سنتز می‌شوند. در ارقام قرمز انگور سنتز فلاونوئیدها در ارتباط نزدیکی با سنتز آنتوسیانین‌ها می‌باشد زیرا فلاونول‌ها از جمله محصولات مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها، در بسیاری از نقاط این مسیر مشترک می‌باشند (۲۹). از آنجائی‌که فلاونول‌ها در خصوصیات کیفی انگور تأثیرگذار می‌باشند، از این‌رو میزان بالای این ترکیبات می‌تواند بیانگر کیفیت مطلوب میوه باشد (۹).

ترکیبات فلاوان ۳ اُل: بر اساس نتایج پژوهش حاضر، کاتچین، ترکیب فلاوان ۳ اُل غالب نمونه‌های مورد تیمار بود که در سطح احتمال ۱ درصد تحت‌تأثیر محلول‌پاشی گابا قرار گرفت (جدول ۲). بالاترین

میزان کاتچین در هر دو باغ در غلظت ۱۰ میلی‌مولار گابا با اافزایش بیش از ۱/۵ برابری در هر دو باغ (۱/۶۴ برابر برای باغ حصار و ۱/۵ برابر برای باغ زینالو) مشاهده شد. (شکل ۴).

فلاوان ۳ اُل‌ها یک گروه از ترکیبات فنلی می‌باشند که نقش اساسی در ایجاد خصوصیات ارگانولپتیکی انگور از جمله گسی و تلخی داشته و باعث پایداری رنگ انگور می‌گردند و نقش اساسی در کیفیت و ارزش تغذیه‌ای انگور دارند (۲۳). علاوه‌بر آن فلاوان ۳ اُل‌ها، واحدهای ساختاری پروآنتوسیانیدین‌ها و تانن‌ها نیز به شمار می‌روند. تفاوت‌های مشاهده شده در ترکیبات فلاوان ۳ اُل در بین پژوهش‌های مختلف می‌تواند به دلیل تفاوت ارقام انگور و منطقه پرورش آن‌ها باشد (۳۸).



شکل ۴- تأثیر محلول‌پاشی با غلظت‌های مختلف گابا (۰، ۵، ۱۰، ۲۵ میلی‌مولار) بر میزان ترکیب فلاوان ۳ اُل **کاتچین میوه انگور رقم قزل‌اوزوم. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد با آزمون دانکن چنددامنه‌ای می‌باشد.**

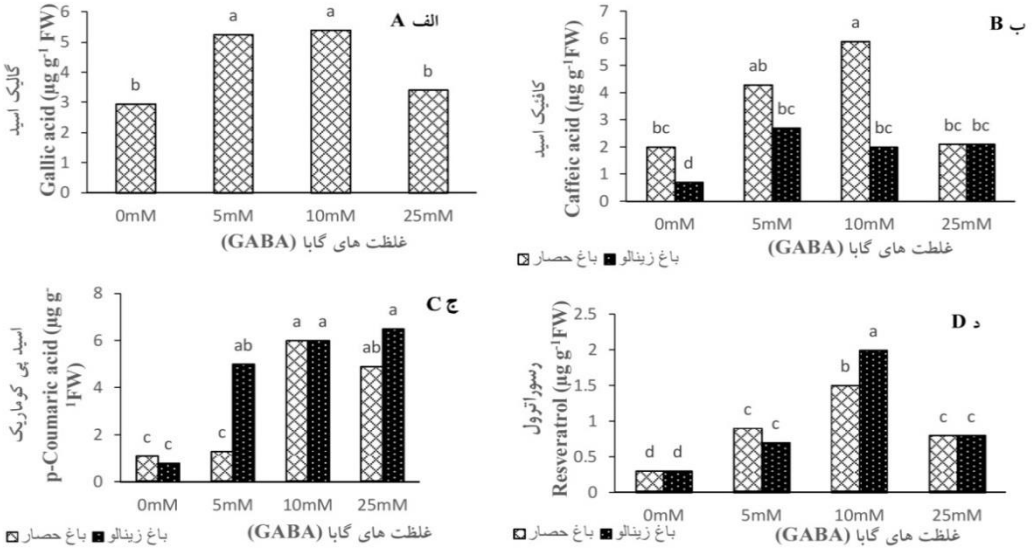
Fig. 4. Effect of foliar spraying with different doses (0, 5, 10, 25 mM) of GABA on flavanol compound: Catechin of Qızıl Uzum table grape berries. Means indicated with different letters are significantly different at P ≤ 0.01 according to Duncan's Multiple Range Test.

ترکیبات غیرفلاونوئیدی: بر اساس نتایج پژوهش حاضر اسیدگالیک، اسیدکافئیک، اسیدپی‌کوماریک و رسوراترول، ترکیبات غیرفلاونوئیدی غالب نمونه‌های مورد تیمار بودند که به‌طور معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد تحت‌تأثیر تیمار حاضر قرار گرفتند (جدول ۲). بالاترین میزان اسیدگالیک و اسیدکافئیک در غلظت ۱۰ میلی‌مولار گابا با افزایش ۱/۸۳ برابری اسید گالیک و نزدیک به ۳ برابری اسید کافئیک (۲/۹۵ و ۲/۸۶ برابر به ترتیب در باغ حصار و زینالو) در هر دو باغ مشاهده شد (شکل ۵-A و B). اسید پی‌کوماریک با افزایش حدود ۵/۵ برابری نیز بالاترین میزان را در غلظت ۱۰ میلی‌مولار نشان داد و تفاوت بین غلظت‌های دیگر هم معنی‌دار بود (شکل ۵-C). رسوراترول هم در همین غلظت با افزایش ۵ برابری در باغ حصار و ۶/۵ برابری در باغ زینالو بالاترین میزان را داشت (شکل ۵-D).

ترکیبات غیرفلاونوئیدی یک گروه از اسیدهای فنولیکی هستند که شامل اسیدهای هیدروکسی سینامیک و اسیدهای هیدروکسی بنزوئیک می‌باشند. اسیدهای هیدروکسی سینامیک، نقش اساسی در تشکیل رنگدانه‌ها داشته و باعث تشکیل رنگدانه‌های پایدار هیدروکسی فنیل پیرانو آنتوسیانین‌ها می‌شوند که یک گروه از رنگدانه‌های قرمز نارنجی مشتق از آنتوسیانین هستند و در پایداری رنگ نقش دارند. هم‌چنین این ترکیبات نقش اساسی در القاء مقاومت و بهبود شاخص‌های سلامت در گیاه دارند (۶).

بر اساس پژوهش حاضر اسید گالیک، اسید هیدروکسی بنزوئیک اصلی در انگورهای تحت تیمار تشخیص داده شد، هم‌چنین اسیدکافئیک، اسید پی‌کوماریک و رسوراترول نیز هیدروکسی سینامیک اسیدهای اصلی یافت شدند که در سطح احتمال ۱ درصد تحت‌تأثیر این تیمار قرار گرفتند (جدول ۲). عوامل محیطی، وضعیت تغذیه‌ای گیاه و شرایط اقلیمی می‌توانند بر واکنش انگور در برابر محلول‌پاشی، تأثیرگذار باشند مانند افزایش سنتز ترکیبات فنولیکی یا متابولیت‌های ثانویه دیگر که نسبت به کاربرد تیمارها حساس هستند، هم‌چنین زمان برداشت نیز تأثیر زیادی بر روی ترکیبات فنلی انگور دارد (۲۹). در نتایج مشابهی تیمار میوه‌های انگور با گابا در غلظت ۴۰ میلی‌مول باعث ایجاد بیش‌ترین اسیدهای فنولیکی از جمله اسید گالیک، اسید کافئیک، اسید پی‌کوماریک و رسوراترول در مقایسه با شاهد شد (۳).

در پژوهش حاضر رسوراترول که از جمله استیلبن‌های اصلی می‌باشد به‌صورت معنی‌داری تحت‌تأثیر تیمار قرار گرفت. استیلبن‌ها یک نوع از فیتوالکسین‌های موجود در انگور می‌باشند که تأثیرات زیادی در کیفیت تغذیه‌ای انگور دارند. رسوراترول دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدسرطانی می‌باشد. این ترکیبات در انگور در مقابله با عوامل خارجی به‌صورت ترکیبات دفاعی فعال سنتز می‌گردند و هم‌چنین به‌صورت ترکیبات برطرف‌کننده و زداینده در سیستم دفاعی گیاهان توسط پاتوژن‌ها نیز تولید می‌گردند (۹). رسوراترول از جمله مهم‌ترین فیتوآلکسین‌های استیلبنی تولیدی در انگور است که می‌تواند به تنش‌های زنده و غیرزنده پاسخ دهد و باعث افزایش ارزش تغذیه‌ای انگور می‌گردد (۱۶). در نتایج مشابهی در پژوهش‌های اصغریان و همکاران (۲۰۲۲) تیمار میوه‌های انگور با گابا باعث افزایش ترکیبات پلی‌فنولیکی بویژه رسوراترول گردید (۳).



شکل ۵- تأثیر محلول‌پاشی با غلظت‌های مختلف گابا (۰، ۵، ۱۰، ۲۵ میلی‌مولار) بر میزان ترکیبات غیرفلاونوئیدی، اسید گالیک (پانل الف)، اسید کافئیک (پانل ب)، اسید پی کوماریک (پانل ج) و رسوراترول (پانل د) میوه انگور رقم قزل‌اوزوم.

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد با آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشد.

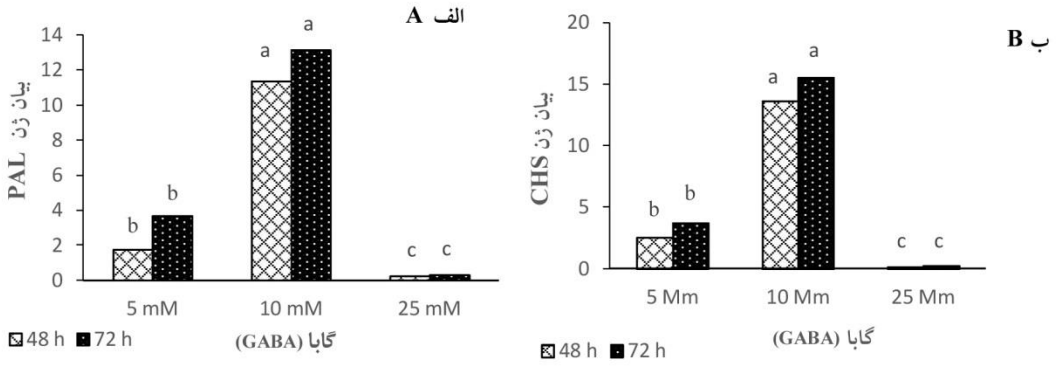
Fig. 5. Effect of foliar spraying with different doses (0, 5, 10, 25 mM) of GABA on non flavonoid compounds, Gallic acid (Panel A), Caffeic acid (Panel B), p-Coumaric acid (Panel C) and Resveratrol (Panel D) of Qızıl Uzum table grape. Means indicated with different letters are significantly different at P ≤ 0.01 according to Duncan's Multiple Range Test.

اثر محلول‌پاشی گابا بر بیان ژن *PAL* و *CHS*: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد گابا و زمان و اثرات متقابل آن‌ها در سطح احتمال ۱ درصد بر میزان بیان ژن *PAL* اثر معنی‌داری داشتند. گابا در غلظت ۱۰ میلی‌مولار در هر دو زمان نمونه‌برداری (۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از محلول‌پاشی) باعث بیش‌ترین بیان ژن *PAL* شد و بعد از آن غلظت ۵ میلی‌مولار گابا بیش‌ترین تأثیرگذاری را در بیان این ژن نشان داد و کم‌ترین بیان این ژن نیز در غلظت ۲۵ میلی‌مولار گابا مشاهده گردید (شکل ۶-A). هم‌چنین گابا در سطح احتمال ۱ درصد و زمان در سطح احتمال ۵ درصد بر میزان بیان ژن *CHS* اثر معنی‌داری داشتند ولی اثرات متقابل گابا و زمان بر میزان بیان این ژن معنی‌دار نبود. در غلظت ۱۰ میلی‌مولار گابا بیش‌ترین بیان ژن *CHS* مشاهده شد و بعد از آن در غلظت ۵ میلی‌مولار گابا این ژن بیان بیش‌تری داشت و کم‌ترین بیان آن در غلظت ۲۵ میلی‌مولار گابا مشاهده شد (شکل ۶-B).

در مسیر فنیل پروپانوئید آنزیم PAL یک آنزیم کلیدی می‌باشد که با تبدیل L- فنیل‌آلانین به ترانس اسید سینامیک به منزله پیش‌ساز سنتز فنیل پروپانوئیدهای مختلف از جمله لیگنین‌ها، اسیدهای فنولیکی، کومارین‌ها و فلاونوئیدها باعث تنظیم بیوسنتز ترکیبات فنولیکی می‌گردد (۲۱). این آنزیم توسط چندین خانواده ژنی کدگزاری می‌گردد. عوامل متعددی با تأثیر بر پیشرفت نسخه‌برداری و ترجمه ژن‌های *PAL* باعث فعالیت آنزیم PAL می‌گردند. در انگور چندین پروتئین خانواده MYB کنترل‌کننده مسیر فنیل پروپانوئید شناسایی شده‌اند. بر اساس گزارش‌های *PAL* یک ژن کلیدی در اولین مرحله سنتز ترکیبات فنولیکی می‌باشد که باعث کدگزاری آنزیم PAL می‌گردد (۴۲).

در این پژوهش محلول‌پاشی گابا باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن *PAL* به‌ویژه در غلظت ۱۰ میلی‌مولار و سپس غلظت ۵ میلی‌مولار گابا در هر دو زمان نمونه‌برداری (۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از محلول‌پاشی) گردید (شکل ۶-A). با افزایش غلظت گابا میزان بیان این ژن ضرورتاً افزایش پیدا نکرد و حتی در بالاترین غلظت (۲۵ میلی‌مولار) کم‌ترین بیان ژنی مشاهده گردید. بر این اساس ۱۰ میلی‌مولار گابا غلظت بهینه جهت افزایش بیان ژن *PAL* بیان گردید، هم‌چنان که در همین غلظت بالاترین درصد مواد جامد محلول ملاحظه گردید. مواد جامد محلول از جمله سوبسترای اساسی مسیر فنیل پروپانوئیدها است که با فعال شدن این مسیر منجر به بیان ژن‌های این مسیر از جمله *PAL* و *CHS* می‌گردد. گابا به‌عنوان یک متابولیت کلیدی در مسیرهای اولیه و ثانویه، به‌صورت یک واسطه در متابولیسم نیتروژن و بیوسنتز اسیدهای آمینه عمل می‌کند و با عملکرد چندجانبه و فراگیر در دامنه وسیعی از واکنش‌های فیزیولوژیکی از جمله بیان ژن نقش دارد (۳۱). بر اساس پژوهش‌ها ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها از جمله ژن *PAL* و *CHS* به‌طور چشمگیری تحت‌تأثیر تیمار گابا قرار گرفتند که نشان‌دهنده ارتباط نزدیک مسیر گابا شانت با متابولیسم فلاونوئیدها می‌باشد (۴۸).

ژن *CHS* نیز به‌عنوان یکی از ژن‌های مسیر فنیل پروپانوئید، دارای نقش تنظیم‌کنندگی سنتز ترکیبات فنولیکی از جمله اسیدهای فنولیکی و استیل بنز می‌باشد (۲۴). در پژوهش حاضر بیان ژن *CHS* به‌طور معنی‌داری تحت‌تأثیر محلول‌پاشی گابا به‌ویژه در غلظت ۱۰ میلی‌مولار قرار گرفت (شکل ۶-B). مشابه الگوی بیان ژنی *PAL* بیان این ژن نیز در بیش‌ترین غلظت گابا (۲۵ میلی‌مولار) افزایش چندانی را نسبت به شاهد نشان نداد و حتی کم‌ترین میزان را در بین غلظت‌های کاربردی داشت. بر اساس نتایج موجود افزایش میزان ترکیبات فنولیکی با کاربرد گابا می‌تواند به افزایش بیان ژن‌ها و آنزیم‌های مسیر سنتزی این ترکیبات نسبت داده شود.



شکل ۶- تأثیر محلول‌پاشی با غلظت‌های مختلف گابا (۰، ۵، ۱۰، ۲۵ میلی‌مولار) در دو مرحله زمانی (۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از محلول‌پاشی) بر بیان ژن‌های *PAL* (پانل الف) و *CHS* (پانل ب) میوه انگور رقم قزل‌اوزوم.
حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد با آزمون دانکن می‌باشد.

Fig. 6. Effect of foliar spraying with different doses (0, 5, 10, 25 mM) of GABA on *PAL* (Panel A) and *CHS* (Panel B) genes expression of Qızıl Uzum table grape berries. Means indicated with different letters are significantly different at P ≤ 0.01 according to Duncan's Multiple Range Test.

نتیجه‌گیری

محلول‌پاشی گابا به‌ویژه در غلظت ۱۰ میلی‌مولار و در مرحله veraison با تأثیر بر افزایش میزان اسیدهای آلی، TSS و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله آنزیم کاتالاز باعث افزایش کیفیت میوه انگور رقم قزل‌اوزوم گردید. هم‌چنین گابا با تأثیرگذاری بر افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم PAL به‌عنوان یک آنزیم کلیدی در مسیر سنتز ترکیبات فنولی باعث افزایش معنی‌دار ترکیبات فنلی از جمله فلاونوئیدها، فلاونول‌ها، فلاوان-۳-اُل‌ها و اسیدهای فنولیکی و ارتقاء ارزش تغذیه‌ای میوه گردید. علاوه بر آن گابا با افزایش بیان ژن‌های *PAL* و *CHS* و افزایش فعالیت آنزیم‌های PAL و CHS موجب افزایش سنتز ترکیبات مفید سنتزی مسیر فنیل‌پروپانوئیدها از جمله آنتوسیانین و بهبود رنگ‌گیری میوه گردید. از این‌رو گابا به‌عنوان یک ترکیب طبیعی و سالم می‌تواند جایگزین مناسب ترکیبات شیمیایی در جهت بهبود کیفیت انگور قزل‌اوزوم باشد.

منابع

1.Asgarian, Z.S., Karimi, R., Ghabooli, M. and Maleki, M. 2021. Biochemical changes and quality characterization of cold-stored 'Sahebi' grape in response to postharvest application of GABA. Food Chem. 131401.
2.Buchanan, B.B., Gruissem, W. and Jones, R.L. 2015. Biochemistry and molecular biology of plants, Second edition. John Wiley & Sons, UK. 1264p.
3.Sheng, L., Shen, D., Luo, Y., Sun, X., Wang, J., Luo, T., Zeng, Y., Xu, J., Deng, X. and Cheng, Y. 2017. Exogenous γ-aminobutyric acid treatment affects citrate and amino acid accumulation to improve fruit quality and storage performance of postharvest citrus fruit. Food Chem. 216: 138-145.
4.Karimi, R., Mirzaei, F. and Rasouli, M. 2017. Phenolic acids, flavonoids, antioxidant capacity and minerals content in fruit of five grapevine cultivars. Iran. J. Hort. Sci. Tech. 18: 1. 89-102.

5.Shelp, B.J., Bozzo, G.G., Trobacher, C.P., Zarei, A., Deyman, K.L. and Brikis, C.J. 2012. Hypothesis/review: contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress. Plant Sci. pp. 193-194.

6.Aghdam, M.S., Razavi, F. and Karamneghad, F. 2015. Maintaining the postharvest nutritional quality of peach fruits by γ-Aminobutyric acid. Iran. J. Plant Physiol. 5: 4. 1457-1463. (In Persian)

7.Malabarba, J., Reichelt, M., Pasqualil, G. and Mithöfer, A. 2018. Tendril coiling in Grapevine: Jasmonates and a new role for GABA. J. Plant Growth Regul. 37p.

8.Ramos-Ruiz, R., Poirot, E. and Flores-Mosquera, M. 2018. GABA, a non-protein amino acid ubiquitous in food matrices. Cogent Food Agric. 4: 1534323.

9.Li, W., Liu, J., Ashraf, U., Li, G., Li, Y. and Lu, W. 2016. Exogenous γ-aminobutyric acid (GABA) application improved early growth, net photosynthesis, and associated physiobiochemical events in maize. Frot. Plant Sci. 7: 919.

10.Beuve, N., Rispail, N., Laine, P., Clquent, J.B., Ourry, A. and Le Deunff, E. 2004. Putative role of γ-aminobutyric acid (GABA) as a long distance signal in upregulation of nitrate uptake in *Brassica napus* L. Plant Cell Environ. 27: 1035-1046.

11.Masclaux-Daubresse, C., Valadier, M.H., Carrayol, E., Reisdorf-Cren, M. and Hirel, B. 2002. Diurnal changes in the expression of glutamate dehydrogenase and nitrate reductase are involved in the C/N balance of tobacco source leaves. Plant Cell Environment, 25: 1451-1462.

12.Vijayakumari, K. and Puthur, J.T. 2016. γ-aminobutyric acid (GABA) priming enhances the osmotic stress tolerance in *piper nigrum* Linn. plants subjected to peg-induced stress. Plant Growth Regul. 78: 57-67.

13.Yonghong, G., Bin, D., Canying, L., Tang, Q., Xue, L., Meilin, W., Chen, Y. and Jianrong, L. 2018. ϒ -Aminobutyric acid delays senescence of blueberry fruit by regulation of reactive oxygen species metabolism and phenylpropanoid pathway. Sci. Hort. 240: 303-309.

14.Rastegar, S., Hassanzadeh, H. and Rahimzadeh, M. 2019. Effect of γ-aminobutyric acid on the antioxidant system and biochemical changes of mango fruit during storage. J. Food Meas. Charact. 14: 778-789. (In Persian)

15.Wang, Y., Luo, Z., Huang, X., Yang, K., Gao, S. and Du, R. 2014. Effect of exogenous γ-aminobutyric acid (GABA) treatment on chilling injury and antioxidant capacity in banana peel. Sci. Hort. 168: 132-137.

16.Yu, C., Zeng, L., Sheng, K., Chen, F., Zhou, T., Zheng, X. and Yu, T. 2014. γ-aminobutyric acid induces resistance against *penicillium expansum* by priming of defence responses in pear fruit. Food Chem. 159: 29-37.

17.Porat, R., Vinokur, V., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A. and Goldschmidt, E.E. 2003. Induction of resistance to Penicillium digitatum in grapefruit by b-aminobutyric acid. Eur. J. Plant Pathol. 109: 901-907.

18.Zhang, C.F., Wang, J.M., Zhang, J.G., Hou, C.J. and Wang, G.L. 2011. Effects of b-aminobutyric acid on control of postharvest blue mould of apple fruit and its possible mechanisms of action. Postharvest Biol. Technol. 61: 145-151.

19.Thevenet, D., Pastor, V., Baccelli, I., Balmer, A., Vallat, A. and Neier, R. 2017. The priming molecule β-aminobutyric acid is naturally present in plants and is induced by stress. New Phytologist, 213: 552-559.

20.Ayala-Zavala, J.F., Wang, S.Y. and Gonzalez-Aguilar, G.A. 2007. High oxygen treatment increases antioxidant capacity and postharvest life of strawberry fruit. Food Technol. Biotech. 45: 166-173.

21.Chiou, A., Karathanos, V.T., Mylona, A., Salta, F.N., Preventi, F. and Andrikopoulos, N.K. 2007. Grape (*Vitis vinifera* L.) Content of simple phenolics and antioxidant activity. Food Chem. 102: 516-522.

22.Ebrahimzadeh, M.A., Hosseinimehr, S.J., Hamidinia, A. and Jafari, M. 2008. Antioxidant and free radical scavenging activity of Feijoa Sallowiana fruits peel

and leaves. J. Pharmacol-online, 1: 7-14. (In Persian)
23. Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J. Food Drug Anal. 10: 178-182.
24. Chung, Y.C., Chen, S.J., Hsu, C.K., Chang, C.T. and Chou, S.T. 2005. Studies on the antioxidative activity of graptopetalum paraguayense E. Walther. Food Chem. 91: 419-424.
25. Karthikeyan, M., Radhika, K., Mathiyazhagan, S., Bhaskaran, R., Samiyappan, R. and Velazhahan, R. 2006. Induction of phenolics and defense-related enzymes in coconut (*Cocos nucifera* L.) roots treated with biocontrol agents. Brazilian J. Plant Physiol. 18: 367-377.
26. Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. Meth. Enzymol. 105: 121-126.
27. Rabiei, V. and Jozqasemi, S. 2013. Applied laboratory practices in horticultural sciences. Urmia Univ. Press, 264p. (In Persian)
28. Shang, H., Shifeng, C., Zhenfeng, Y., Yuting, C. and Yonghua, Z. 2011. Effect of exogenous γ-aminobutyric acid treatment on proline accumulation and chilling injury in peach fruit after long-term cold storage. J. Agric. Food Chem. 59: 1264-1268.
29. Wang, L., Zhang, H., Jin, P., Guo, X., Li, Y., Fan, C., Wang, J. and Zheng, Y. 2016. Enhancement of storage quality and antioxidant capacity of harvested sweet cherry fruit by immersion with β-aminobutyric acid. Postharvest Biol. Technol. 118: 71-78.
30. Yang, A.S., Cao, Z., Yang, Y.C. and Zheng, Y. 2011. γ-Aminobutyric acid treatment reduces chilling injury and activates the defense response of peach fruit. Food Chem. 129: 1619-1622.
31. Ramesh, S.A., Tyerman, S.D., Xu, B., Bose, J., Kaur, S., Conn, V., Domingos, P., Ullah, Ramesh, S.A., Tyerman, S.D., Gilliham, M. and Bo, X. 2016. γ-aminobutyric acid (GABA) signalling in plants. Cell. Mol. Life Sci. 74: 1557-1603.
32. Wang, J., Cao, C.H., Wang, L., Wang, X., Jin, P. and Zheng, Y. 2018. Effect of β-Aminobutyric acid on disease resistance against rhizopus rot in harvested peaches. Front. Microbiol. 9: 1505.
33. Gonzalo-Diago, A., Dizy, M. and Fernández-Zurbano, P. 2014. Contribution of low molecular weight phenols to bitter taste and mouthfeel properties in red wines. Food Chem. 154: 187-198.
34. Wei, X., Ju, Y., Ma, T., Zhang, J., Fang, Y. and Sun, X. 2020. New perspectives on the biosynthesis, transportation, astringency perception and detection methods of grape proanthocyanidins. Food Sci. Nutr. 61: 14. 2372-2398.
35. Tsao, R. 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. Nutrients, 2: 1231-1246.
36. Devies, P.J. and Sun, T.P. 2004. Plant hormones: gibberellin signal transduction in stem elongation and leaf growth. Kluer Academic. London.
37. Ma, Y., Wang, P., Wang, M., Sun, M., Gu, Z. and Yang, R. 2019. GABA mediates phenolic compounds accumulation and the antioxidant system enhancement in germinated hulless barley under NaCl stress. Food Chem. 270: 593-601.
38. Hattori, T., Chen, Y., Enoki, Sh., Igarashi, D. and Suzuki, Sh. 2019. Exogenous isoleucine and phenylalanine interact with abscisic acid-mediated anthocyanin accumulation in grape. Folia Hort. 31: 1. 147-157.
39. Soubeyrand, E., Basteau, C., Hilbert, G., Van Leeuwen, C., Delrot, S. and Gomès, E. 2014. Nitrogen supply affects anthocyanin biosynthetic and regulatory genes in grapevine cv. Cabernet Sauvignon berries. Phytochem. 103: 38-49.
40. Kong, J.Q. 2015. Phenylalanine ammonia-lyase a key component used for phenylpropanoids production by metabolic engineering. Royal Society of Chemistry, 5: 62587-62603.

41.Ge, Y.H., Deng, H.W., Bi, Y., Li, C.Y., Liu, Y.Y. and Dong, B.Y. 2015. Postharvest ASM dipping and DPI pre-treatment regulated reactive oxygen species metabolism in muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruit. Postharvest Biol. Technol. 99: 160-167.
42.Zimmerli, L., Metraux, J.P. and Mauch-Mani, B. 2001. β-Aminobutyric acid-induced protection of Arabidopsis against the necrotrophic fimgus Botrytis cinerea. Plant Physiol. 126: 517-523.
43.Portu, J., González-Arenzana, L., Hermosín-Gutiérrez, I., Santamaría, P. and Garde-Cerdán, T. 2015. Phenylalanine and urea foliar applications to grapevine: Effect on wine phenolic content. Food Chem. 180: 55-63.
44.Cheng, X., Wang, X., Zhang, A., Wang, P., Chen, Q., Ma, T., Li, W., Liang, Y., Sun, X. and Fang, U. 2020. Foliar phenylalanine application promoted antioxidant activities in cabernet sauvignon by regulating phenolic biosynthesis. J. Agric. Food Chem. 10: 1021.
45.Li, L. and Sun, B. 2019. Grape and wine polymeric polyphenols: Their importance in enology. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 59: 563-579.
46.Shi, P., Song, C., Chen, H., Duan, B., Zhang, Zh. and Meng, J. 2018. Foliar applications of iron promote flavonoids accumulation in grape berry of Vitis vinifera cv. Merlot Grown in the iron deficiency soil. Food Chem. 253: 164-170.
47.Bimpilas, A., Panagopoulou, M., Tsimogiannis, D. and Oreopoulou, V. 2016. Anthocyanin copigmentation and color of wine: the effect of naturally obtained hydroxycinnamic acids as cofactors. Food Chem. 197: 39-46.
48.Hasan, M. and Bae, H. 2017. An overview of stress-induced resveratrol synthesis in grapes: Perspectives for resveratrol-enriched grape products. Molecules, 22: 294.
49.Villegas, D., Handford, M., Alcalde, J.A. and Perez-Donoso, A. 2016. Exogenous application of pectin-derived oligosaccharides to grape berries modifies anthocyanin accumulation, composition and gene expression. Plant Physiol. Biochem. 104: 125-133.
50.Xie, T., Ji, J., Chen, W., Yue, J., Du, C., Sun, J. and Shi, S. 2019. γ-Aminobutyric acid is closely associated with accumulation of flavonoids. Plant Signal. Behav. 14: 7. 1604015.
51.Lingua, M.S., Fabani, M.P., Wunderlin, D.A. and Baroni, M.V. 2016. From grape to wine: changes in phenolic composition and its influence on antioxidant activity. Food Chem. 208: 228-238.