

حفاظت کلسیم کلرید از گیاه پریش *Catharanthus roseus* تحت تنش شوری با القاء سیستم دفاع آنتی اکسیداتیو و افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی

مهری عسکری^{۱*}، فریبا امینی^۲، سهیلا شکری^۳

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۲۲

تاریخ تصویب: ۹۴/۱۲/۱۱

چکیده

در این مطالعه اثرات کلسیم کلرید به عنوان یک عامل تعدیل‌کننده تنش شوری بر گیاه پریش بررسی شد. گیاهان ۴۹ روزه با غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (۰، ۳۵، ۷۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) به تنهایی و توأم با غلظت‌های مختلف کلرید کلسیم (۰، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار) به مدت ۲۱ روز تیمار شدند. سپس درصد بازدارندگی رادیکال دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل (% \bar{I})، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، سطح و تعداد برگ، وزن تر و خشک بخش هوایی و مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی اندازه‌گیری شد. نتایج کاهش معنی‌دار مقدار رنگیزه‌ها،

*۱ استادیار فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، (نویسنده مسئول m-askary@araku.ac.ir)

۲ استادیار فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

۳ دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

وزن تر و خشک بخش هوایی، سطح و تعداد برگ را تحت تنش شوری نشان داد. تیمار توام گیاهان با کلرید سدیم و کلرید کلسیم، مقادیر رنگیزه‌ها، سطح برگ، وزن تر و خشک بخش هوایی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و درصد بازدارندگی رادیکال دی‌فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل ۱% را در مقایسه با گیاهان رشد یافته تحت تنش شوری به تنهایی افزایش داد. بیشترین افزایش فاکتورهای بالا، در تیمارهای ترکیبی (۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم + ۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم) مشاهده شد. بنابراین کلسیم اثرات زیان‌آور تنش شوری را کاهش داد و رشد و متابولیسم گیاه پریوش را تحریک کرد.

واژه‌های کلیدی: دی‌فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل، سوپراکسید دیسموتاز، شاخص رشد، کاتالاز، گایاکول پراکسیداز

مقدمه

می‌شود (Hsu and Kao (2003) این پاسخ منجر به کاهش NADP^+ (پذیرنده‌ی نهایی الکترون در فتوسیستم I) می‌شود. به دنبال کاهش NADP^+ جریان الکترون به O_2 منتقل می‌شود و تشکیل رادیکال سوپراکسید O_2^- افزایش می‌یابد (Gaber, (2010); Hsu and Kao (2003) همچنین با کاهش CO_2 درونی و واکنش‌های چرخه‌ی کالوین، تنفس نوری به ویژه در گیاهان C_3 ، افزایش می‌یابد که منجر به تولید H_2O_2 بیشتر در پراکسی‌زوم می‌شود (Ghannoum, (2009). گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (ROS) سبب آسیب‌های شدید غشاء و مولکول‌های مهم مثل DNA و کلروفیل، از طریق به راه انداختن یک سری واکنش‌های زنجیره‌ای می‌شوند (Foyer and Noctor, (2005). در وضعیت پایدار، مولکول‌های ROS توسط مکانیسم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه زوده می‌شوند ولی در تنش‌های محیطی تعادل میزان ROS و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها تغییر می‌کند که نتیجه‌ی آن آسیب اکسیداتیو است (Foyer and Noctor, (2005). برای بقا در شرایط تنشی، گیاهان به آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی از قبیل سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز مجهز می‌شوند (Jaleel, (2007). از راه‌های ممکن برای کاهش اثر شوری بر تولیدات گیاهی افزودن کلسیم به محیط رشد گیاه است. غنی کردن محیط با کلسیم،

شوری خاک یکی از تنش‌های محیطی است که بر تولید محصولات ۸۰۰ میلیون هکتار از زمین‌های کشاورزی اثر می‌گذارد (Rengasamy, (2010). حدود ۱۲/۵ درصد از اراضی ایران نمکی و شورزارها هستند (Alkhani and Ghorbani (1992). شوری خاک به عنوان یک تنش محیطی، سبب تغییرات شدید در رشد، فیزیولوژی و متابولیسم گیاهان می‌شود و عامل تهدیدکننده کشت گیاهان در سراسر جهان است. سدیم بیش از حد، رشد گیاهان حساس به شوری و گلیکوفیت‌ها که شامل اغلب گیاهان زراعی هستند را ممانعت می‌کند (Gobinathan et al., (2009). شوری از راه‌های مختلفی مثل کاهش جذب آب، تجمع یون‌ها در سطوح سمی، کاهش قابلیت دسترسی به مواد مغذی و افزایش پتانسیل اسمزی در محیط ریشه، رشد گیاهان را کاهش می‌دهد (Tunçtürk et al., (2011). همچنین با کاهش دسترسی به نیتروژن، می‌تواند سبب کاهش محتوای کلروفیل شود (Duran et al., (2011). شوری باعث تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (ROS: Reactive Oxygen Species) به طرق مختلف می‌شود. گیاهان در پاسخ به تنش شوری و جلوگیری از هدر رفت آب، هدایت روزنه‌ای را کاهش می‌دهند (Hsu and Kao (2003). با این کار غلظت CO_2 درونی و احیای CO_2 در چرخه‌ی کالوین کم

مواد و روش‌ها:

تهیه و آماده سازی بذر: بذر گیاه پریش (*Catharanthus roseus*) از شرکت پاکان بذر اصفهان (۱۳۹۱) تهیه شد. ابتدا بذرها توسط اتانول ۷۰٪ به مدت دو دقیقه و سپس هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت پنج دقیقه ضد عفونی سطحی و سپس ۵ بار با آب مقطر شستشو شدند Wang and Oyaizu, (2009). پس از ضد عفونی و جوانه زنی بذرها در پتری دیس، گیاهک‌ها به گلدان‌های حاوی پرلیت و خاک زراعی (خاک لومی رسی با $pH=7/6$ به نسبت ۱:۱ (وزنی/وزنی) انتقال یافت. گیاهان ۴۹ روزه به مدت ۳ هفته، یعنی روزهای ۴۹، ۵۶ و ۶۳ اعمال تنش شدند. آزمایش در سه تکرار، به صورت فاکتوریل و در قالب کاملاً تصادفی در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه اراک انجام شد. فاکتور اول سطوح مختلف شوری (۰، ۳۵، ۷۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار کلرورسدیم) و فاکتور دوم سطوح مختلف کلسیم کلرید (۰، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار) بود که به طور هم‌زمان اعمال شد. محلول هوگلند فاقد کلرید سدیم و فاقد کلسیم به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. سایر محلول‌های غذایی دارای مواد محلول هوگلند اما بدون نیترات کلسیم بودند. برداشت نهایی یک هفته بعد از آخرین تنش یعنی روز ۷۰ انجام شد. شاخص‌های رشد مثل تعداد، سطح برگ (با کمک کاغذ شطرنجی) و وزن تر بخش هوایی (شامل

رشد مهار شده توسط تنش شوری را در گیاهان گلیکوفیت بهبود می‌دهد Kader and Lindberg, (2010). اثر کلسیم بر کاهش اثرات سوء تنش شوری بر گیاهان مختلف مثل پنبه (Amuthavalli et al., (2012)، کاسنی (Arshi, 2010b)، گندم، Duran et al., (2011)، برنج (Cha-um et al., (2012) و توت‌فرنگی (Khayyat et al., (2009) گزارش شده است. کلسیم نقش ساختاری مهمی در تولید بافت‌های گیاهی و تواناسازی آنها برای رشد بهتر دارد. کاتیون کلسیم به دلیل توانایی تشکیل پیوند بین مولکول‌ها، نقش مهمی در حفظ تمامیت و ساختار غشا و دیواره‌ی سلولی دارد. همچنین کلسیم مقاومت بافت‌های گیاهی تحت تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی را افزایش می‌دهد (Kader and Lindberg, (2010).

گیاه پریش *Catharanthus roseus* از خانواده خرزهره یک گیاه دارویی و منبع آکالوئیدهای ضد توموری مثل وین‌بلاستین و وین‌کریستین است که در شیمی‌درمانی لوسمی و درمان سرطان لنفاوی استفاده می‌شود. ریشه‌های این گیاه منبع اصلی آکالوئید ضد فشارخون آجمالیسین هستند (Jaleel et al. (2007); Sreevalli et al., (2004). با توجه به افزایش اراضی شور ایران (Sadeghi, 2011)، هدف از این مطالعه بررسی نقش کلسیم بر تعدیل اثرات تنش شوری بر گیاه پریش است.

برگ و ساقه) ۳ گیاه از هر تیمار توسط ترازو اندازه‌گیری شد. سپس وزن خشک بخش هوایی همان گیاهان با قرار دادن به مدت ۲۴ ساعت در آون 75°C تا رسیدن به وزن ثابت اندازه‌گیری شد. میزان کلروفیل *a*، *b* و کارتنوئیدها (روش Lichtenthaler and wellbum, 1983) بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ اندازه‌گیری شد. ارزیابی فعالیت جاروب‌کنندگی رادیکال آزاد ۱،۱-دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل DPPH توسط عصاره گیاه: روش فوق بر اساس تک الکترون رادیکال آزاد DPPH با جذب ماکزیمم در ۵۱۷ nm با رنگ بنفش استوار است. زمانی که الکترون تک رادیکال DPPH با یک هیدروژن از یک ترکیب آنتی‌اکسیدان واکنش می‌دهد و فرم احیای DPPH-H را تشکیل می‌دهد رنگ بنفش به زرد تبدیل می‌شود. در این روش از بی‌رنگ شدن رنگ بنفش استفاده می‌شود.

تهیه عصاره گیاهی برای ارزیابی فعالیت DPPH: ۱۰۰ میلی‌گرم برگ پریوش در ازت مایع پودر و در ۱ میلی‌لیتر اتانول ۹۰٪ به مدت ۲۴ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. مواد جامد نامحلول با استفاده از سانتریفیوژ ۳۵۰۰ g به مدت ۵ دقیقه جدا شد. مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از محلول استخراجی را با ۸۰۰ میکرولیتر از DPPH محلول در اتانول ۰/۵ میلی‌مولار مخلوط شد

و میزان جذب در ۵۱۷ نانومتر پس از ۳۰ دقیقه تاریکی قرائت شد (Abe et al., 1998). تهیه عصاره گیاهی برای تعیین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: ۰/۱ گرم برگ در نیتروژن مایع سائیده و در ۱ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) حاوی ۱ میلی‌مولار EDTA حل شد. ترکیب حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. از محلول شفاف رویی که حاوی عصاره آنزیمی بود، جهت تعیین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گایاکول پراکسیداز (GPOX) استفاده شد. سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز SOD به روش Giannopolitis و Ries (1977): اساس این روش بر اندازه‌گیری اثر بازدارندگی SOD با احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم (NBT) است. ۳ میلی‌لیتر از مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، نیتروبلوتترازولیوم (NBT) ۷۵ میکرومولار، ریبوفلاوین ۲۰ میکرومولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره در غیاب نور ترکیب شد. واکنش با برداشتن فویل آلومینیومی و قرار دادن نمونه‌ها در زیر نور فلورسانت شروع شد. پس از ۱۵ دقیقه نور قطع شد و بلافاصله جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل T80+PG Instruent

مدت ۲۴ ساعت در آون 75°C تا رسیدن به وزن ثابت اندازه‌گیری شد. میزان کلروفیل *a*، *b* و کارتنوئیدها (روش Lichtenthaler and wellbum, 1983) بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ اندازه‌گیری شد. ارزیابی فعالیت جاروب‌کنندگی رادیکال آزاد ۱،۱-دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل DPPH توسط عصاره گیاه: روش فوق بر اساس تک الکترون رادیکال آزاد DPPH با جذب ماکزیمم در ۵۱۷ nm با رنگ بنفش استوار است. زمانی که الکترون تک رادیکال DPPH با یک هیدروژن از یک ترکیب آنتی‌اکسیدان واکنش می‌دهد و فرم احیای DPPH-H را تشکیل می‌دهد رنگ بنفش به زرد تبدیل می‌شود. در این روش از بی‌رنگ شدن رنگ بنفش استفاده می‌شود.

تهیه عصاره گیاهی برای ارزیابی فعالیت DPPH: ۱۰۰ میلی‌گرم برگ پریوش در ازت مایع پودر و در ۱ میلی‌لیتر اتانول ۹۰٪ به مدت ۲۴ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. مواد جامد نامحلول با استفاده از سانتریفیوژ ۳۵۰۰ g به مدت ۵ دقیقه جدا شد. مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از محلول استخراجی را با ۸۰۰ میکرولیتر از DPPH محلول در اتانول ۰/۵ میلی‌مولار مخلوط شد

UV/Vis Spectrometer) ثبت شد. میزان

بیان گردید.

نتایج

فعالیت آنزیم برحسب یک واحد در دقیقه به ازای میلی گرم پروتئین محاسبه گردید.

تنش شوری به تنهایی و تیمار کلسیم کلرید به تنهایی بر مقدار رنگیزه‌ها، سطح برگ، وزن تر و خشک بخش هوایی، میزان I% (درصد بازدارندگی رادیکال DPPH در ۲۵ میکرولیتر عصاره)، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، گایاکول پراکسیداز و کاتالاز برگ گیاهان پریوش ($P \leq 0/01$) اثر معنی داری نشان دادند. اثر متقابل هر دو تیمار (شوری و کلسیم کلرید) بر مقدار رنگیزه‌ها، سطح برگ، وزن تر و خشک بخش هوایی ($P \leq 0/01$) و میزان I%، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، گایاکول پراکسیداز و کاتالاز ($P \leq 0/05$) معنی دار بود. تیمار کلسیم کلرید به تنهایی و تاثیر متقابل تنش شوری و تیمار کلسیم کلرید بر تعداد برگ اثر معنی داری نداشتند.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) به روش Cakmak و Marschner (1992): ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به همراه ۲ میلی لیتر از محلول بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی مولار حاوی ۱۰ میلی مولار H_2O_2 به روش نورسنجی در طول موج ۲۴۰ نانومتر تعیین شد. جذب نمونه‌ها پس از قرار داده شدن در دستگاه بلافاصله و سپس بدون خارج کردن نمونه از دستگاه بعد از گذشت یک دقیقه برای بار دوم ثبت شد. نمونه شاهد در این آزمایش ۲ میلی لیتر بافر حاوی H_2O_2 فاقد عصاره آنزیمی است. میزان فعالیت آنزیم برحسب میکرومول پراکسید هیدروژن مصرف شده در دقیقه بر میلی گرم پروتئین بیان گردید.

نتایج رنگیزه‌های فتوسنتزی: بیشترین مقدار کلروفیل a ، کلروفیل b ، کلروفیل کل و کاروتنوئید در تیمار شاهد (بدون شوری) به ترتیب با میانگین‌های ۱/۵۴، ۰/۸۸، ۲/۴۳ و ۱/۱۲ میلی گرم در گرم وزن تر برگ مشاهده شد. با افزایش شوری مقدار رنگیزه‌ها کاهش معنی داری نشان دادند. کمترین مقدار کلروفیل a ، کلروفیل b ، کلروفیل کل و کاروتنوئید در تیمار ۱۰۰ میلی مولار شوری به ترتیب با میانگین‌های ۱/۲۷، ۰/۵۸، ۱/۸۵ و ۰/۸۷ میلی گرم در گرم وزن تر برگ مشاهده

سنجش فعالیت گایاکول پراکسیداز (GPOX) بر اساس روش Polle و همکاران (۱۹۹۴): ۳ میلی لیتر از مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی مولار، گایاکول ۲۰ میلی مولار، H_2O_2 ۱۰ میلی مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی مخلوط شد. جذب بر اساس اکسیداسیون گایاکول با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر به مدت ۳ دقیقه در طول موج ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت آنزیم برحسب میکرومول تتراکسید گایاکول تولید شده در دقیقه به ازای میلی گرم پروتئین

شد که به ترتیب ۱۷/۵۴، ۳۴/۱، ۲۳/۸۷ و ۲۲/۳۳ درصد نسبت به رنگیزه‌های گیاه شاهد کاهش نشان می‌دهد (جدول ۱). تیمار کلسیم به تنهایی مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی پریوش را افزایش داد. تیمار ۵ میلی‌مولار کلسیم کلرید مقدار کلروفیل a ، b ، کلروفیل کل و کاروتنوئید را نسبت به تیمار ۰ میلی‌مولار کلسیم کلرید ۴/۲۵، ۱۱/۴۲، ۶/۱۳ و ۵/۴۵ درصد و تیمار ۱۰ میلی‌مولار کلسیم کلرید مقدار همین رنگیزه‌ها را به

ترتیب ۲/۸۳، ۸/۵۷، ۴/۷۳ و ۲/۸۲ درصد افزایش داد (جدول ۲). با کاربرد کلسیم کلرید میزان کاهش رنگیزه‌ها تحت سطوح شوری کمتر شد. کاهش ۱۷/۵۴، ۳۴/۱ و ۲۳/۸۷ و ۲۲/۳۳ درصدی کلروفیل a و b ، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار نسبت به شاهد با افزودن ۵ میلی‌مولار کلسیم به ترتیب به ۱۴/۶۵، ۲۵/۸۱، ۱۹/۱۳ و ۲۰ درصد و با کاربرد ۱۰ میلی‌مولار کلسیم کلرید به ترتیب ۱۶/۵۷، ۲۹/۰۴، ۲۱/۵۲ و ۲۱/۷۴ درصد

جدول ۱- مقایسه میانگین‌های اثر تیمار شوری بر رنگیزه‌ها (mg/g وزن تر برگ)، سطح برگ (cm^2)، تعداد برگ، وزن تر و خشک بخش هوایی (گرم)، درصد تخریب (I%) DPPH، فعالیت SOD (unit mg -1 protein)، Gpox (میکرومول تترایاکول تولید شده در دقیقه به ازای ۱ میلی‌گرم پروتئین) و CAT (میکرومول پراکسید هیدروژن مصرف شده در دقیقه به ازای ۱ میلی‌گرم پروتئین) گیاهان ۷۰ روزه پریوش. حروف یکسان نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0/05$) بین میانگین‌ها مطابق آزمون دانکن است. داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm SD$ و مقایسه برای هر ردیف جداگانه انجام شده است.

| تیمار شوری (میلی‌مولار) | | | | شاخص‌ها |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| 100 | 70 | 35 | 0 | |
| 1/72 ^d ±0/80 | 1/44 ^c ±0/430 | 1/5 ^b ± 0/610 | 1/54 ^a ±0/02 | کلروفیل a (mg/g وزن تر برگ) |
| 1/0± ^d 58/0 | 0/37 ^c ±0/10 | 0/08 ^b ±0/20 | 0/88 ^a ±0/88 | کلروفیل b (mg/g وزن تر برگ) |
| 1/85 ^d ±0/2 | 2/17 ^c ±0/04 | 2/30 ^b ±0/03 | 2/43 ^a ±0/07 | کلروفیل کل (mg/g وزن تر برگ) |
| 0/78 ^d ± 0/60 | 1/700 ^c ± 0/30 | 1/70 ^b ± 0/810 | 1/12 ^a ± 0/03 | کاروتنوئید (mg/g وزن تر برگ) |
| 71/1± ^d 3/12 | 49/1± ^c 08/17 | ^b 48/20± 675/1 | ^a ±13/24 29/1 | سطح برگ کل (Cm^2) |
| 7/87 ^d ±0/766 | 9/87 ^c ±0/766 | 11/33 ^b ±1 | 0± ^a 14 | تعداد برگ |
| 0/92 ^d ±0/430 | 0/63 ^c ±0/620 | /34 ^b ± 0/430 | 0/15± ^a 0/630 | وزن تر بخش هوایی (گرم) |
| 0/920 ^d ±0/300 | 0/630 ^c ±0/200 | 0/340 ^b ±0/300 | 0/050 ^a ±0/300 | وزن خشک بخش هوایی (گرم) |
| 53/70± ^d 3/28 | 32/711 ^b ±2/47 | 41/819 ^c ± 2/73 | 9/837± ^d 1/6 | درصد تخریب DPPH (%) |
| 26/5 ^a ±4/48 | 74/22 ^b ±6/7 | 03/38 ^c ±9/2 | 51 ^d ±3/57 | فعالیت سوپراکسید دیسموتاز SOD |
| 0/740 ^a ±0/6300 | 0/430 ^b ±0/9100 | 0/420 ^c ±0/6100 | 0/710 ^d ±0/9100 | فعالیت گایاکول پراکسیداز GPOX |
| 0/740 ^a ±0/300 | 0/30 ^b ±0/300 | 0/20 ^c ±0/400 | 0/210 ^d ±0/2100 | فعالیت کاتالاز CAT |

جدول ۲- مقایسه میانگین‌های اثر تیمار کلسیم کلرید بر مقدار رنگیزه‌ها (mg/g) وزن تر برگ، سطح برگ کل (Cm²)، وزن تر و خشک بخش هوایی (گرم) درصد تخریب (I%) DPPH، فعالیت SOD (unit mg⁻¹ protein) ، Gpox (میکرومول تترایاکول تولید شده در دقیقه به ازای ۱ میلی‌گرم پروتئین) و CAT (میکرومول پراکسید هیدروژن مصرف شده در دقیقه به ازای ۱ میلی‌گرم پروتئین) گیاهان ۷۰ روزه پریوش. حروف یکسان نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها مطابق آزمون دانکن است. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ±SD و مقایسه برای هر ردیف جداگانه انجام شده است.

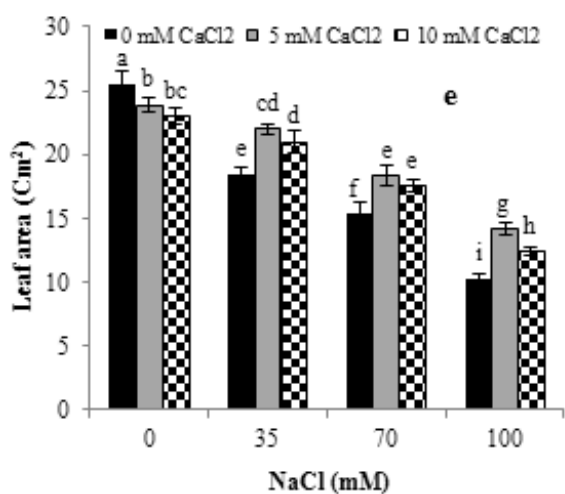
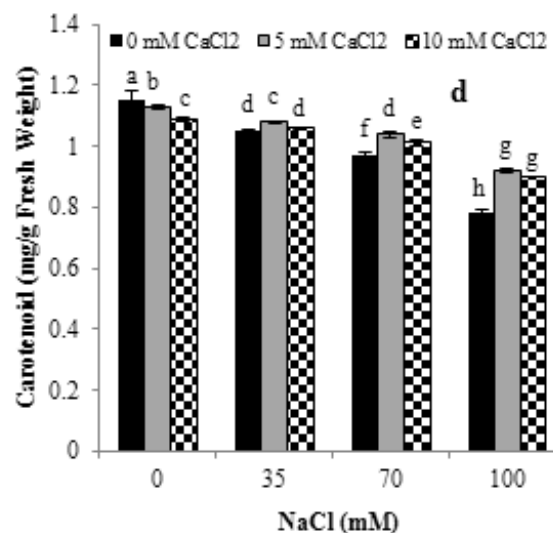
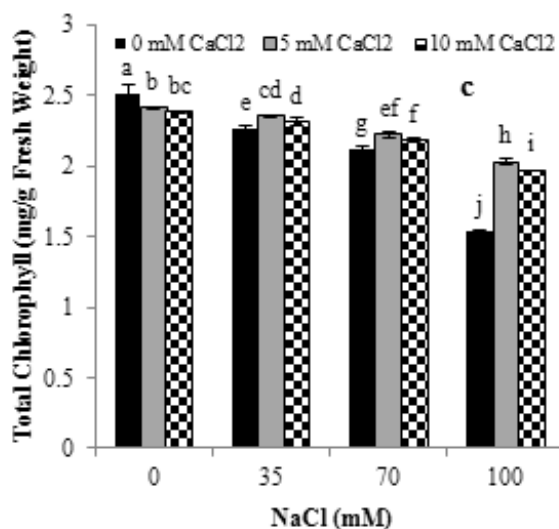
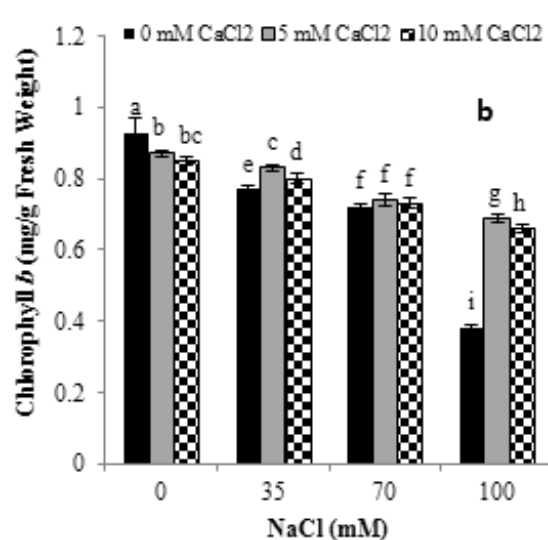
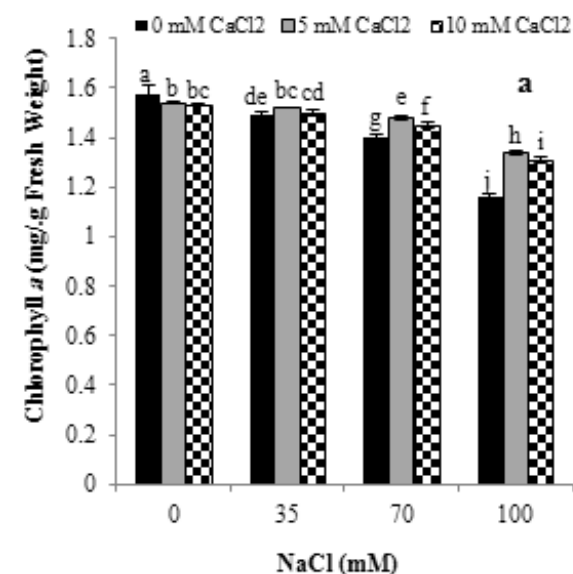
| تیمار کلسیم کلرید (میلی مولار) | | | شاخص‌ها |
|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| 10 | 5 | 0 | |
| 1/54 ^b ±0/80 | 1/74 ^{a±} 0/80 | 1/14 ^{c±} 0/61 | کلروفیل a (وزن تر برگ) |
| 0/67 ^{b±} 0/70 | 0/87 ^{a±} 0/70 | 0/07 ^{c±} 0/2 | کلروفیل b (وزن تر برگ) |
| 2/12 ^{b±} 0/51 | 2/52 ^{a±} 0/41 | 2/11 ^{c±} 0/3 | کلروفیل کل (وزن تر برگ) |
| 1/810 ^{b±} 0/70 | 1/440 ^{a±} 0/70 | 0/99 ^{c±} 0/41 | کاروتنوئید (وزن تر برگ) |
| 81/74b ±4/52 | 91/16a± 3/98 | 71/24±c 5/87 | سطح برگ کل |
| 0/04 ^{b±} 0/60 | 0/24 ^{a±} 0/70 | 0/83 ^{c±} 0/11 | وزن تر بخش هوایی (گرم) |
| 0/930 ^{b±} 0/600 | 0/140 ^{a±} 0/700 | 0/730 ^{c±} 0/10 | وزن خشک بخش هوایی (گرم) |
| 12/391 ^{b±} 01/10 | 32/390 ^{a±} 11/71 | 71/748± ^c 9/100 | درصد تخریب (I) DPPH (%) |
| 83/45 ^{b±} 81/3 | 54 ^{a±} 91/7 | 33/521 ^{c±} 81/8 | فعالیت سوپراکسید دیسموتاز SOD |
| 0/030 ^{b±} 0/110 | 0/330 ^{a±} 0/210 | 0/820 ^{c±} 0/10 | فعالیت گایاکول پراکسیداز GPOX |
| 0/820 ^{b±} 0/410 | 0/30 ^{a±} 0/410 | 0/420 ^{c±} 0/310 | فعالیت کاتالاز CAT |

تغییر کرد (شکل ۱)

نتایج تعداد و سطح برگ:

(جدول ۲). تیمار کلسیم به تنهایی و اثر متقابل تنش شوری و کلسیم بر تعداد برگ گیاهان پریوش اثر معنی‌داری نشان نداد. ولی تیمار ۵ میلی‌مولار کلسیم باعث افزایش سطح برگ گیاهان تحت تنش شوری شد. به طوری که کاهش ۴۹/۰۳ درصدی سطح برگ گیاه پریوش تحت تنش شوری ۱۰۰ میلی‌مولار نسبت به شاهد در اثر کاربرد ۵ میلی‌مولار کلسیم کلرید به ۴۴٪/۳۸ تغییر

سطح و تعداد برگ با افزایش شوری کاهش معنی‌داری یافتند، این کاهش در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار به ترتیب ۴۹/۰۳ و ۴۴/۴۳ درصد نسبت به گیاهان شاهد رسید (جدول ۱). تیمار ۵ و ۱۰ میلی‌مولار کلسیم کلرید به تنهایی مقدار سطح برگ کل گیاهان را نسبت به شاهد ۱۲/۵۷ و ۶/۰۲ درصد افزایش داد



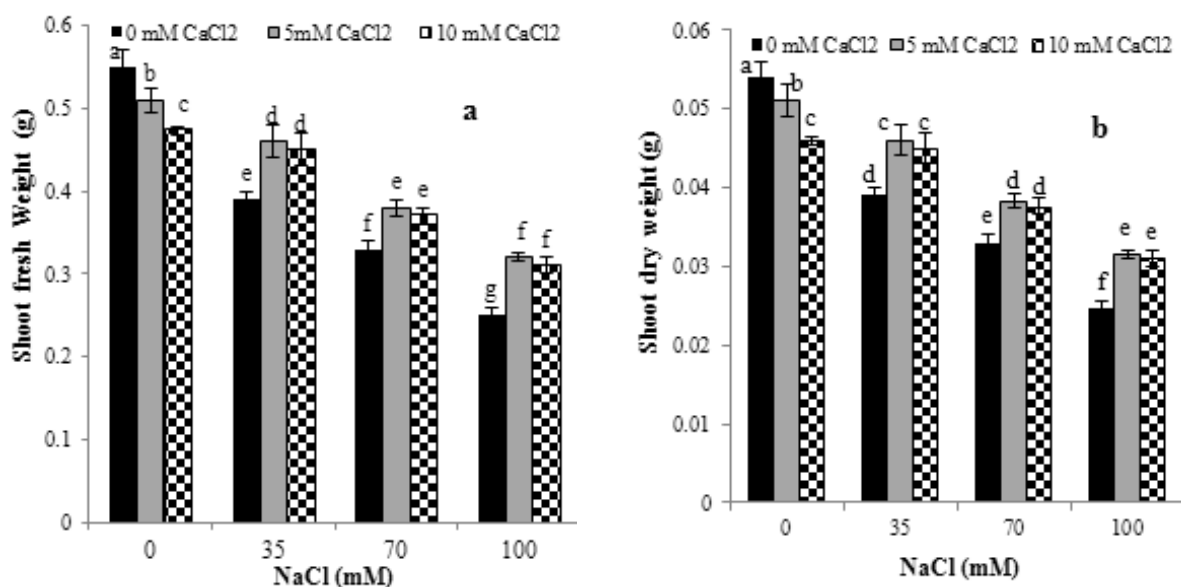
شکل ۱- مقایسه میانگین‌های اثر متقابل تیمار شوری و تیمار کلسیم کلرید بر مقدار (a) کلروفیل a ، (b) کلروفیل b ، (c) کلروفیل کل ، (d) کاروتنوئید ، (e) وزن تر برگ (mg/g) و (f) سطح برگ Cm² گیاهان ۷۰ روزه پریش. حروف یکسان نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0/05$) بین میانگین‌ها مطابق آزمون دانکن است. داده‌ها میانگین ۳ تکرار \pm SD و مقایسه برای هر شاخص جداگانه انجام شده است

کرد (شکل ۱).

نتایج وزن تر و خشک بخش هوایی:

بیشترین مقدار وزن تر و خشک بخش هوایی در تیمار شاهد (بدون شوری) به ترتیب با میانگین‌های ۰/۵۱ و ۰/۰۵ گرم مشاهده شد. کمترین مقدار وزن تر و خشک بخش هوایی در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار شوری به ترتیب با میانگین‌های ۰/۲۹ و ۰/۰۲۹ گرم مشاهده شد. با افزایش شوری مقدار وزن تر و خشک بخش هوایی کاهش معنی‌داری پیدا کردند (جدول ۱). تیمار ۵ میلی‌مولار کلسیم کلرید

مقدار وزن تر و خشک بخش هوایی را نسبت به تیمار شاهد (۰ میلی‌مولار کلسیم کلرید) به ترتیب ۱۰/۵۲ و ۱۰/۸۱ درصد افزایش داد. تیمار ۱۰ میلی‌مولار کلسیم کلرید نیز مقدار وزن تر و خشک بخش هوایی را نسبت به تیمار شاهد ۵/۲۶ و ۵/۴ درصد افزایش داد (جدول ۲). کاهش ۴۳/۱۴ و ۴۲ درصدی وزن تر و خشک بخش هوایی در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار با کاربرد ۵ میلی‌مولار کلسیم کلرید به ترتیب به ۴۱/۸۲، ۴۱/۴۹ تغییر یافت (شکل ۲).



شکل ۲- مقایسه میانگین‌های اثر متقابل تیمار شوری (۰، ۳۵، ۷۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) و تیمار کلسیم کلرید (۰، ۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار) بر مقدار وزن تر بخش هوایی (a) و وزن خشک بخش هوایی (b) (گرم) گیاهان ۷۰ روزه پریوش. حروف یکسان نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار ($P > 0.05$) بین میانگین‌ها مطابق آزمون دانکن است. داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm SD$ و مقایسه برای هر شاخص جداگانه انجام شده است.

با افزایش شوری میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گایاکول پراکسیداز (GPOX) و کاتالاز (CAT) نیز افزایش معنی‌داری را نشان دادند، به طوری که در شوری ۳۵، ۷۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار میزان فعالیت آنزیم SOD نسبت به شاهد به ترتیب ۲، ۳/۱۴ و ۴/۱۶ برابر، میزان فعالیت آنزیم GPOX به ترتیب ۱/۴۱، ۲ و ۲/۷۶ برابر و میزان فعالیت آنزیم CAT در همین سطوح شوری نسبت به شاهد به ترتیب ۱/۶۶، ۲/۵ و ۳/۹۱ برابر افزایش را نشان داد. بیشترین اثر افزایشی تنش شوری به تنهایی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مربوط به SOD، سپس کاتالاز و کمترین مربوط به GPOX بود (جدول ۱).

اعمال کلسیم‌کلرید ۵ و ۱۰ میلی‌مولار به تنهایی به ترتیب میزان فعالیت SOD را ۱/۳۵ و ۱/۱۶ برابر نسبت به شاهد افزایش داد. همچنین اعمال کلسیم‌کلرید ۵ و ۱۰ میلی‌مولار میزان فعالیت آنزیم GPOX را به ترتیب ۱/۱۷ و ۱/۰۷ برابر و میزان فعالیت آنزیم کاتالاز را ۱/۲۵ و ۱/۱۶ برابر نسبت به شاهد افزایش داد. سطح ۵ میلی‌مولار کلسیم اثر افزایشی بیشتری نسبت به سطح ۱۰ میلی‌مولار کلسیم بر مقدار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نشان داد. اثر افزایشی کلسیم‌کلرید به تنهایی بر مقدار هر سه آنزیم آنتی‌اکسیدانت فوق از اثر تنش شوری، حتی شوری ۳۵ میلی‌مولار، کمتر

نتایج درصد بازدارندگی رادیکال DPPH،

I% عصاره برگ گیاه پریوش:

کمترین میزان I% (درصد تخریب رادیکال DPPH) در تیمار ۰ میلی‌مولار شوری (شاهد) با میانگین ۹/۷۳۸ و بیشترین میزان I% در ۱۰۰ میلی‌مولار شوری با میانگین ۳۵/۰۷ اندازه‌گیری شد. با افزایش شوری میزان I% افزایش معنی‌داری را نشان داد، به طوری که میزان I% در شوری ۳۵، ۷۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار نسبت به شاهد به ترتیب ۱/۵۳، ۲/۳۷ و ۳/۶۰ برابر افزایش داشت (جدول ۱). با تیمار کلسیم‌کلرید میزان فعالیت I% نسبت به تیمار ۰ کلسیم‌کلرید افزایش یافت. اعمال کلسیم‌کلرید ۵ و ۱۰ میلی‌مولار به ترتیب میزان فعالیت I% را ۲۹ و ۱۸ درصد نسبت به شاهد (۰ میلی‌مولار کلسیم‌کلرید) افزایش داد (جدول ۲).

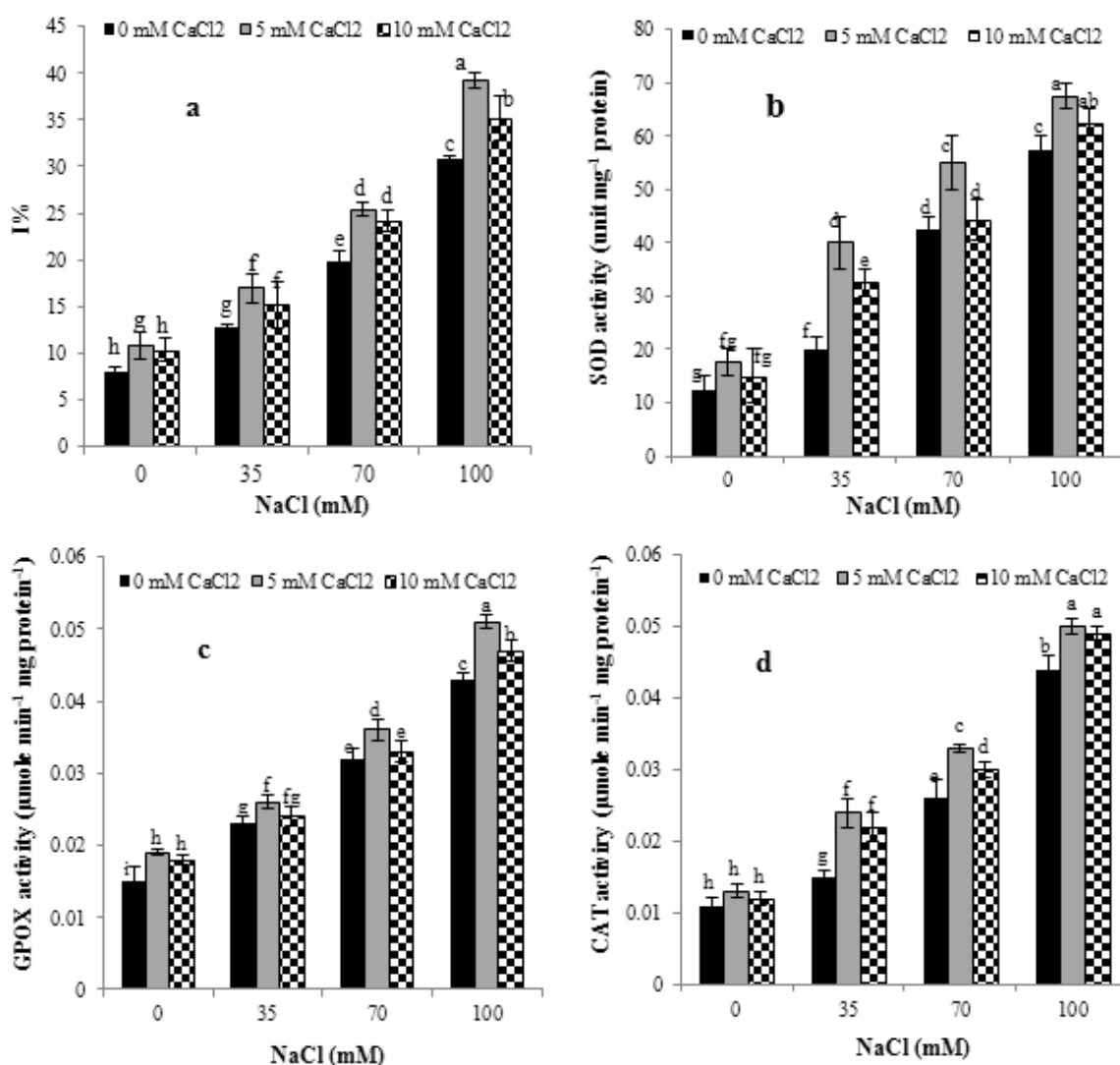
اعمال تیمار ۵ و ۱۰ میلی‌مولار کلسیم تحت تنش شوری باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (I%) گیاه پریوش نسبت به تیمارهای شوری تنها و شاهد شد. تیمار ۵ و ۱۰ میلی‌مولار کلسیم‌کلرید مقدار I% را در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار به ترتیب تا ۴/۸۵ و ۴/۳۴۷ برابر نسبت به شاهد افزایش داد. در سایر سطوح شوری نتایج مشابهی مشاهده گردید (شکل ۲).

نتایج فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز و کاتالاز:

شاهد است. در تیمار شوری ۱۰۰ میلی مولار میانگین میزان فعالیت GPOX برابر $\mu\text{mol}/0/043 \text{ mg protein min}^{-1}$ است که $2/76$ برابر میزان فعالیت GPOX شاهد است. کلسیم ۵ میلی مولار نسبت به ۱۰ میلی مولار میزان فعالیت آنزیم GPOX را در تمام سطوح شوری بیشتر افزایش داد (شکل ۳). کمترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز CAT در شاهد با میانگین $0/011 \mu\text{mol}/\text{mg protein min}^{-1}$ و بیشترین میزان فعالیت در تیمار ۱۰۰ میلی مولار شوری همراه با دریافت ۵ میلی مولار کلسیم با میانگین $0/051 \text{ min}^{-1} \mu\text{mol}/\text{mg}$ مشاهده می شود. این میزان فعالیت آنزیم کاتالاز $4/54$ برابر میزان فعالیت آنزیم CAT گیاه شاهد است. در گیاهان تیمار شده با ۱۰ میلی مولار کلسیم کلرید همراه با ۱۰۰ میلی مولار شوری میزان فعالیت آنزیم CAT $4/45$ برابر میزان فعالیت آنزیم CAT در گیاهان شاهد اندازه گیری شد، البته در این غلظت از شوری تفاوت بین ۵ و ۱۰ میلی مولار کلسیم در افزایش فعالیت کاتالاز معنی دار نیست. در تیمار شوری ۱۰۰ میلی مولار (بدون دریافت کلسیم) میانگین میزان فعالیت CAT برابر $0/044 \mu\text{mol}/\text{mg protein min}^{-1}$ است که ۴ برابر میزان فعالیت CAT گیاهان شاهد است (شکل ۳).

بود (جدول ۲). استفاده از غلظت ۵ و ۱۰ میلی مولار کلسیم کلرید تحت تنش شوری باعث افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی سوپرکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز و کاتالاز پریوش نسبت به تیمارهای شوری و شاهد شد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم SOD در تیمار ۱۰۰ میلی مولار شوری همراه با دریافت ۵ میلی مولار کلسیم با میانگین $5/67 \text{ unit mg}^{-1} \text{ protein}$ مشاهده شد. این میزان فعالیت آنزیم سوپرکسید دیسموتاز $5/4$ برابر میزان فعالیت آنزیم SOD گیاه شاهد است. در گیاهان تحت تیمار ۱۰۰ میلی مولار شوری و ۱۰ میلی مولار کلسیم کلرید نیز میزان فعالیت SOD بالا و ۵ برابر میزان فعالیت آنزیم SOD در گیاهان شاهد محاسبه شده است. کلسیم ۵ میلی مولار نسبت به ۱۰ میلی مولار میزان فعالیت آنزیم SOD را در تمام سطوح شوری بیشتر افزایش داد (شکل ۳).

بیشترین میزان فعالیت آنزیم GPOX در تیمار ۱۰۰ میلی مولار شوری همراه با دریافت ۵ میلی مولار کلسیم کلرید با میانگین $051/0 \text{ min}^{-1} \mu\text{mol}/\text{mg}$ مشاهده شد. این میزان فعالیت آنزیم $3/4$ برابر میزان فعالیت آنزیم GPOX گیاه شاهد است. در گیاهان تیمار شده با ۱۰ میلی مولار کلسیم کلرید میزان فعالیت آنزیم GPOX $3/13$ برابر میزان فعالیت آنزیم GPOX در گیاهان



شکل ۳- مقایسه میانگین‌های اثر متقابل تیمارشوری و کلسیم‌کلرید بر (a) میزان I%، (b) میزان فعالیت آنزیم آنزیم SOD (unit mg⁻¹ GPOX) (میکرومول تتراگایاکول تولید شده در دقیقه به ازای ۱ میلی‌گرم پروتئین) و (d) آنزیم CAT (میکرومول پراکسید هیدروژن مصرف شده در دقیقه به ازای ۱ میلی‌گرم پروتئین) گیاهان ۷۰ روزه پریش. حروف یکسان نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار ($\geq 0.05/P$) بین میانگین‌ها مطابق آزمون دانکن است. داده‌ها میانگین ۳ تکرار \pm SD و مقایسه برای هر شاخص جداگانه انجام شده است.

گزارش شده است (Duran et al., 2011).

کاهش محتوای کلروفیل‌ها در اثر تنش شوری، احتمالاً به افزایش فعالیت آنزیم کلروفیل‌لاز، القا تخریب ساختار کلروپلاست و بی‌ثباتی کمپلکس پروتئین رنگدانه در

بحث

در این مطالعه میزان تمامی رنگیزه‌های فتوسنتزی در اثر تیمار شوری کاهش معنی‌داری را نشان دادند، نتایج مشابه در وارپته‌های مختلف گندم تحت تیمار شوری

تنش شوری مربوط می‌شود (Jaleel et al., 2007). کاهش در سطح پیگمان‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل‌های a و b و رنگدانه‌های کمکی از قبیل کاروتنوئیدها با قرارگرفتن در معرض تنش‌های زیستی و غیرزیستی در بسیاری از گونه‌ها مشاهده شده است (Lau et al., 2006). کاروتنوئیدها از اجزای ضروری آنتن‌های فتوسنتزی و کمپلکس‌های مرکز واکنش هستند. بنابراین نقشی مهم در جذب، به‌دام‌اندازی و انتقال انرژی نورانی برای فرایندهای فتوسنتزی بازی می‌کنند. در تحقیقی اثر تنش شوری بر بیان ژن‌های کاروتنوئیدهای برگ گیاه گوجه‌فرنگی مطالعه شد (Babu et al., 2011). بیان ۴ ژن مهم مسیر سنتز کاروتنوئید مثل فیتوئن‌سنتاز phytoene synthase، فیتوئن‌دساچوراز phytoene desaturase، زئاکاروتن‌دساچوراز zeta carotene desaturase و لیکوپن‌بتاسیکلاز lycopene beta cyclase با افزایش غلظت نمک در گوجه‌فرنگی‌های مورد آزمایش کاهش یافتند. لیکوپن‌بتاسیکلاز، آنزیمی که لیکوپن را به بتاکاروتن تبدیل می‌کند، در مقایسه با دیگر ژن‌های مورد مطالعه بسیار بیشتر تحت تاثیر شوری قرار گرفت (Babu et al., 2011). در ۲ واریته گیاه تنباکو نیز میزان کاروتنوئیدها با افزایش غلظت شوری کاهش را نشان دادند (Celik and Atak, 2012). پیگمان‌های فتوسنتزی

ماکرومولکول‌های مهم گیاهی هستند که نقشی حیاتی در فتوسنتز دارند و فتوسنتز هم مسئول رشد گیاه و تولید وزن خشک است (Siddiqui et al., 2012). در این تحقیق تیمار کلسیم به تنهایی میزان تمامی رنگیزه‌های فتوسنتزی را نسبت به شاهد افزایش داد. نتایج مشابه برای گیاه باقلای تیمار شده با کلسیم و پتاسیم (Siddiqui et al., 2012) و نخود گزارش شده است (Howladar and Rady, 2012). کلسیم می‌تواند به عنوان پیامبر ثانویه در افزایش فعالیت سیتوکینین نقش ایفاء کند و بنابراین در بهبود سنتز کلروفیل عمل کند. همچنین کلسیم می‌تواند در مسیر سنتز کلروفیل با نور برهم‌کنش داشته باشد (Siddiqui et al., 2012). در مطالعه اخیر در گیاهان تحت تنش شوری افزودن کلسیم به محیط، اثرات منفی تنش شوری را بر مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی بهبود داد. مشابه نتایج گزارش شده در ارقام گندم که مقدار کلروفیل، a، b و کاروتنوئیدها در اثر تیمار شوری به طور معنی‌داری کاهش یافتند و با افزودن کلسیم به محیط، اثرات منفی شوری بر مقدار رنگیزه‌ها بهبود یافت. تحت تنش شوری، فعالیت‌های متابولیکی گیاه کاهش می‌یابد، زیرا که شوری ضمن افزایش جذب سدیم در حد سمیت، جذب عناصر پرمصرف مثل کلسیم، پتاسیم، نیتروژن،

تقسیم و توسعه‌ی سلولی و متعاقبا توسعه برگگی را مهار می‌کند. Hernandez et al., (2001). به طور کلی در هنگام تنش‌های غیرزیستی مثل شوری، گیاه تلاش می‌کند به منظور صرفه‌جویی انرژی با کاهش سطح برگ، با شرایط موجود مقابله کند (Jaleel et al., (2008). کاهش سطح برگ تحت شوری برای گیاه کاسنی گزارش شده است (Arshi et al., (2010b). در این تحقیق افزایش سطح برگ در اثر تیمار کلسیم به تنهایی مشاهده شد. همچنین کلسیم اثرات منفی شوری را بر سطح برگ بهبود بخشید. مشابه افزایش سطح و وزن خشک برگ گیاه کاسنی با افزودن کلسیم در تنش شوری که توسط محققین گزارش شده است (Arshi et al., (2010b). کلسیم یک ضرورت برای حفظ تمامیت غشای پلاسمایی و دیواره محسوب می‌شود، به طوری که کاهش در دسترسی به کلسیم رشد گیاهان را کاهش می‌دهد (Arshadet al., (2012). بنابراین افزودن کلسیم باعث افزایش پارامترهای رشد می‌شود. کلسیم برای تقسیم سلولی، طویل شدن سلول و افزایش دسترسی به نیتروژن مورد نیاز است (Hirschi (2004). در گیاهان رشد یافته با نسبت بالای سدیم به کلسیم، هدایت هیدرولیکی کاهش می‌یابد، افزودن کلسیم رشد را به وسیله‌ی برگرداندن هدایت هیدرولیکی به حالت قبل مثل گیاه شاهد بهبود می‌دهد (Cramer, (1992).

فسفر و منیزیم را کاهش می‌دهد، بنابراین شوری فعالیت و تولید کلروفیل را به طور منفی متاثر می‌کند (Duran et al., (2011). ولی تیمار خارجی کلسیم، نفوذپذیری غشای سلولی در برابر سدیم را کاهش می‌دهد و با جلوگیری از انتقال غیرفعال سدیم، از تجمع سدیم و در نتیجه سمیت سدیم در گیاه ممانعت می‌کند (Whittington and Smith, (1992). همچنین کلسیم جذب مواد معدنی را از عرض غشای پلاسمایی سلول تنظیم می‌کند (White, (2000). کاهش اثرات تنش شوری بر رنگیزه‌ها توسط کلسیم در گزارشات مختلفی ذکر شده است. در سویا بیشترین میزان کاهش کلروفیل کل در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار برابر ۳۴٪ گزارش شده که با افزودن ۱۰ میلی‌مولار کلسیم این کاهش به ۲۷ درصد نسبت به شاهد رسید، یعنی کلسیم کلرید اثر کاهشی و منفی شوری بر مقدار کلروفیل را بهبود داد (Arshi et al., (2010a).

در مطالعه اخیر وزن تر و خشک بخش هوایی، سطح و تعداد برگ پریوش در اثر تیمار شوری کاهش معنی‌داری را نشان دادند. میزان کاهش رشد برگ ناشی از افزایش شوری خاک به علت اثر اسمزی شوری است. شوری با کاهش رشد طولی و تقسیم سلولی، تولید آهسته‌تر برگ و کوچکتر شدن اندازه نهایی برگ‌ها را سبب می‌شود (Munns and Tester, (2008). تنش شوری،

کاهش اثرات تنش شوری بر شاخص‌های رشد توسط کلسیم در گزارشات مختلفی ذکر شده است. در پنبه *Gossypium hirsutum* L. افزودن ۵ میلی‌مولار کلسیم به گیاه تحت شوری ۵۰ میلی‌مولار باعث افزایش پارامترهای رشد (وزن تر و خشک گیاه و ارتفاع بخش هوایی و عمق ریشه) شد (Amuthavalli et al., 2012). بنابراین تحت تنش شوری، افزودن کلسیم می‌تواند اثرات مهاری شوری را در گیاه تنش‌دیده، کاهش دهد (Munns and Tester, 2008). در این مطالعه میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز، گایاکول‌پراکسیداز، کاتالاز و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل I% (درصد تخریب رادیکال DPPH) با افزایش غلظت سطوح شوری، افزایش معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد نشان دادند، همچنین تیمار کلسیم نیز باعث افزایش پارامترهای فوق شد و اعمال کلسیم در گیاهان پریوش تحت تنش شوری باعث افزایش بیشتر فعالیت همه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی حتی بیش از تنش شوری به تنهایی شد. مشابه افزایش فعالیت تخریب رادیکال DPPH در گیاه *Cakile maritime* Ksouri et al., (2007) و *Sorghum bicolor* Kafi et al., (2011) که توسط محققین گزارش شده است. به طور کلی یکی از پیامدهای شوری در گیاهان تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (ROSها) مثل آنیون سوپراکسید - O₂ مخصوصا در کلروپلاست و میتوکندری است (Mittler, 2002). تحت شرایط طبیعی فیزیولوژیکی SOD سریعا - O₂ را به H₂O₂ و اکسیژن مولکولی تبدیل می‌کند و از این نظر نقش حیاتی‌تری را نسبت به کاتالاز و پراکسیداز ایفا می‌کند (Shi et al., 2007). سوپراکسید دیسموتاز در تحمل گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی نقش ویژه‌ای دارد و اولین خط مقاومت نسبت به سطوح بالای ROS را فراهم می‌کند. رادیکال سوپراکسید معمولا اولین رادیکال آزادی است که طی تنش‌ها تولید می‌شود (Gill and Tuteja, 2010). گیاهان سویا تحت تیمار شوری یک افزایش وابسته به سطح شوری را در فعالیت SOD نشان می‌دهند (Arshi et al., 2010a). همچنین فعالیت SOD در گیاه *Pennisetum typoidies* تحت تنش شوری در مقایسه با گیاه شاهد افزایش یافت (Gobinathan et al., 2009). یکی دیگر از ROSهایی که هنگام تنش شوری تولید می‌شود H₂O₂ است (Mittler, 2002). کاتالاز در از بین بردن H₂O₂ و تبدیل آن به آب و اکسیژن نقش مهمی ایفا می‌کند (Gill and Tuteja, 2010). فعالیت CAT نیز مستقیما توسط مقدار ROS تنظیم می‌شود. افزایش فعالیت کاتالاز در *Pennisetum typoidies* Gobinathan et al., (2009) و کولتیوارهای سویا Arshi et al., (2010a) تحت شوری گزارش شده

دارند را نیز تحریک می‌کند. تغییر ساختار فضایی این پروتئین‌ها در پاسخ به کلسیم باندشده اتفاق می‌افتد، پروتئین کالمودولین مکانیسم‌های متنوعی شامل انتقال یون، تنظیم ژن، رشد، تکثیر سلولی، مرگ سلول و تحمل تنش را تنظیم می‌کند. Park et al., (2008). همچنین کلسیم با کاهش مقدار هیدروژن پراکسید در ثبات غشاء موثر است Hirschi, (2004). کلسیم از طرفی تولید ROS را مهار می‌کند (Arshi et al., 2010a) و از سوی دیگر تولید آنزیم‌های جاروب کننده H₂O₂ مختلف مثل SOD, GPOX, CAT و همچنین آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی را افزایش می‌دهد. دیده شده که میزان H₂O₂ با اعمال ۵ میلی‌مولار کلسیم در گیاه فیلانتوس آماروس تحت تنش شوری نسبت به اعمال شوری تنها، کاهش می‌یابد. در همین گیاه ۵ میلی‌مولار کلسیم باعث افزایش میزان SOD, GPOX, CAT نسبت به گیاهانی که کلسیم دریافت نکردند، شده است (Jaleel et al., 2007). در گیاه هالوفیت *Cakile maritima* مقاومت به شوری همراه با کلسیم با بیشترین فعالیت پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، آسکورات پراکسیداز، مونو دهیدرو آسکورات رداکتاز و گلوکاتین رداکتاز همراه است. در عدم حضور کلسیم گیاهان *Cakile maritime* تحت تنش شوری، حداقل فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را نشان

است. گایاکول پراکسیداز نیز در دفاع در برابر تنش‌های زیستی به وسیله‌ی تخریب H₂O₂ نقش دارد. فعالیت این آنزیم با توجه به گونه‌ی گیاهی و نوع تنش متفاوت است (Gill and tuteja, 2010). در ۲ واریته از گیاه تنباکو میزان فعالیت GPOX با افزایش غلظت شوری افزایش یافت Celik and Atak, (2012). در گیاه *Dioscorea rotundata* نیز تنش شوری باعث افزایش فعالیت پراکسیداز GPOX در مقایسه با گیاه شاهد شد (Jaleel et al., 2008). افزایش کلسیم سیتوزولی، به عنوان یک سیگنال مولکولی، بیان ژن و فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مختلفی را تنظیم می‌کند (Alam et al., 2011). اثر افزایش تیمار کلسیم بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه شلغم گزارش شده است (Alam et al., 2011). این افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در اثر تیمار کلسیم باعث حفاظت غشاها و ارتقاء مقاومت به تنش‌های غیرزیستی می‌شود (Jiang and Huang, 2001). از نظر برخی محققین کلسیم از طریق بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاهان تحت تنش، در افزایش تحمل گیاه به تنش‌های غیرزیستی موثر است (Siddiqui et al., 2011). کلسیم به عنوان یک پیامبر ثانویه به تحریکات خارجی عمل می‌کند و پروتئین‌هایی مثل کالمودولین را که با کلسیم برهم‌کنش

مخرب سدیم، تاثیر چندانی در افزایش کلر و خطرات احتمالی ناشی از غلظت بالای آن مشاهده نشد (Tabatabaeian, 2014).

نتیجه‌گیری

با در نظر گرفتن اثرات متقابل شوری و تیمار کلسیم کلرید می‌توان گفت که تیمار کلسیم کلرید می‌تواند اثرات مخرب شوری را تعدیل کند و به این شکل توانایی گیاه پریوش را برای رشد و بقا در شرایط شوری بهبود دهد. افزایش رنگیزه‌ها، وزن تر و خشک بخش هوایی، سطح برگ و آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی سازوکارهایی هستند که کلسیم به واسطه آنها تحمل گیاه پریوش را جهت بقا و تحمل شوری افزایش می‌دهد. همچنین کلسیم با افزایش آنتی‌اکسیدانت‌های پریوش در بهبود کیفیت گیاه دارویی فوق می‌تواند موثر باشد.

می‌دهند و مقاومت به شوری با غلظتی متوسط از کلسیم بهبود می‌یابد Ben Amor et al., (2010). بنابراین یک سازوکار مهم برای تسهیل تحمل شوری در گیاهان، مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (Jaleel et al., 2007). در آزمایشی اثر توام کلرید سدیم (شوری) و کلرید کلسیم بر گیاه گوجه‌فرنگی بررسی شد. نتایج افزایش معنی‌دار مقدار سدیم و کلر برگ و کاهش معنی‌دار مقدار کلسیم را با افزایش شوری نشان داد. در محلول غذایی شامل کلرید سدیم + کلرید کلسیم، مقدار سدیم و کلسیم برگ به ترتیب کاهش و افزایش معنی‌دار داشتند ولی مقدار کلر تغییر معنی‌داری نشان نداد. به عبارتی درصد کلر برگ‌های گیاه گوجه‌فرنگی تفاوت معنی‌داری را در محلول غذایی شامل کلرید سدیم و کلرید کلسیم در غلظت‌های مختلف نشان نداد، بنابراین استفاده از کلرید کلسیم برای کاهش اثرات

منابع

- Abe, N., Murata, T. Hirota, A. (1998) Novel 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl-radical scavengers, bisorbicillin and demethyltrichodimerol, from a fungus. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 62: 61-662.
- Alam, R., Iqbal, A., Khan, I., Ali, I. (2011) Enhanced antioxidant defense after exogenous application of Ca²⁺ and K⁺ in *Brassica napus* seedlings under water deficit stress. *African Journal of Biotechnology*. 10(64): 14052-14060.
- Alkhani, H., Ghorbani, M. A. (1992) Contribution to the halophytic vegetation and flora of Iran. In: `Towards the Rational Use of High Salinity Tolerance Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 1: 35-44.
- Amuthavalli, P., Anbu, D., Sivasankaramoorthy, S. (2012) Effect of calcium chloride on growth and biochemical constituents of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) under salt stress. *International Journal of Research in Botany*. 2(3):9-12.
- Arnon, DI. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*. 24: 1-15.
- Arshad, M., Saqib, M., Akhtar, J., Asghar, M. (2012) Effect of calcium on the salt tolerance of different wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes. *Pakistan Journal Agricultural Science*. 49(4):497-504.
- Arshi, A., Ahmad, A., Aref, IM., Iqbal, M., (2010a) Calcium interaction with salinity-induced effects on growth and metabolism of soybean (*Glycine max* L.) cultivars. *Journal of Environmental Biology*. 31(5) 795-801.
- Arshi, A., Ahmad, A., Aref, IM., Iqbal, M., (2010b) Effect of calcium against salinity-induced inhibition in growth, ion accumulation and proline contents in *Cichorium intybus* L. *Journal of Environmental Biology*. 31(6) 939-944.
- Babu, M. A., Singh, D., Gothandam, K. M., (2011) Effect of salt stress on expression of *carotenoid pathway* genes in tomato. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*. 7 (3):87-94.

- Ben Amor, N., Megdiche, W., Jiménez, A., Abdelly, C. (2010) The effect of calcium on the antioxidant systems in the halophyte *Cakile maritima* under salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*.32:453-461.
- Cakmak, I., Marschner, H. (1992) Manganese deficiency in *Oryza sativa* and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiology*. 98: 1222-1227.
- Celik, O., Atak, C. (2012) The effect of salt stress on antioxidative enzymes and proline content of two Turkish tobacco varieties. *Turkish Journal of Biology*. 36: 339-356.
- Cha-um, S., Pal Singh, H., Samphumphuang, T., and Kirdmanee, C., (2012) Calcium-alleviated salt tolerance in indica rice (*Oryza sativa* L. spp. indica). Physiological and morphological changes. *Australian Journal Crop Science* 6(1):176-182.
- Cramer, G R. (1992) Kinetics of maize leaf elongation. II. Response of a Na-excluding cultivar and a Na including cultivar to varying Na/Ca salinities, *Journal of Experimental Botany*. 43: 857-864.
- Duran, RE., Coskun, Y., Savaskan, C. (2011) The examination of Na-Ca effect on some qualitative and quantitative characters in durum wheat plants. *African Journal of Biotechnology*. 10(64): 14013-14023.
- Foyer, C.H., Noctor, G. (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*. 17: 1866-1875.
- Gaber, M. (2010) Antioxidative defense under salt stress. *Plant signaling and Behavior*. 5(4): 369-374.
- Ghannoum, O. (2009) C4 photosynthesis and water stress. *Annals of Botany*. 103: 635-44.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K. (1977) Superoxide dismutases: I. occurrence in higher plants. *Plant Physiology*. 59: 309-314.
- Gill, S.S., Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*.

48: 909-930.

- Gobinathan, P., Sankar, B., Murali, P.V., Panneerselvam, R. (2009) Interactive Effects of Calcium Chloride on Salinity-Induced Oxidative Stress in *Pennisetum typoides*. Botany Research International. 2 (3): 143-148.
- Hsu, S.Y., Kao, C.H. (2003) Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. Plant Growth Regulation. 39:83-90.
- Hernandez, J.A., Ferrer, M.A., Jimenez, A., Barcelo, A.R., Sevilla, F., (2001) Antioxidant system and $O_2^{\bullet-}/H_2O_2$ production in the apoplast of *Pisum sativum* L. leaves: its relation with NaCl-induced necrotic lesions in minor veins, Plant Physiology. 127: 817-831.
- Hirschi, K.D. (2004) The calcium conundrum. Both versatile nutrient and specific signal. Plant Physiology. 136: 2438-2442.
- Howladar, S.M., Rady, M.M. (2012) Effects of calcium paste as a seed coat on growth, yield and enzymatic activities in NaCl stressed-pea plants. African Journal of Biotechnology. 11(77):14140-14145.
- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Lakshmanan, G.M.A., Sridharan, R., and Panneerselvam, R. (2007) NaCl as a physiological modulator of proline metabolism and antioxidant potential in *Phyllanthus amarus*. Comptes Rendus Biologies. 330: 806-813.
- Jaleel, C.A., Gopi, R., Gomathinayagam, M., Panneerselvam, R. (2008) Effect of calcium chloride on metabolism of salt stressed *Dioscorea Rotundata*. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica. 50(1): 63-67.
- Jiang, Y.W., Huang, B.G., (2001) Effects of calcium on antioxidant activities and water relations associated with heat tolerance in two cool-season grasses. Journal of Experimental Botany. 35: 341-349.
- Kader, M.A., Lindberg, S., (2010) Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress. Plant Signaling and Behavior. 5 (3):233-238.
- Kafi, M., Nabati, J., Masoumi, A., Mehrgerdi, M.Z., (2011) Effect of salinity and silicon application on oxidative damage of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) monech. Pakistan journal of Botany. 43(5): 2457-2462.
- Khayat, M., Rajae, S., Sajjadinia, A., Eshghi, S., and Tafazoli, E. (2009) Calcium

- effects on changes in chlorophyll contents, dry weight and micronutrients of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) plants under salt-stress conditions. *Fruits* 64: 53–59
- Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., and Abdelly, C., (2007) Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 45: 244-249.
- Lau, T.S.L., Eno, E., Goldstein, G., Smith, C., Christopher, D.A., (2006) Ambient levels of UV-B in Hawaii combined with nutrient deficiency decrease photosynthesis in nearisogenic maize lines varying in leaf flavonoids: Flavonoids decrease photoinhibition in plants exposed to UV-B. *Photosynthetica*. 44: 394-403.
- Lichtenthaler, H.K., and Wellburn, A.R., (1983) Determinations of total carotenoids and *chlorophylls a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11: 591-592.
- Mittler, R., (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends Plant Science*. 7:405–410.
- Munns, R., Tester, M., (2008) Mechanism of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 651-681.
- Park, H.Y., Kim, S.A., Korlach, J., Rhoades, E., Kwok, L.W., Zipfel, W.R., Waxham, M.N., Webb, W.W. and Pollack, L. (2008) Conformational changes of calmodulin upon Ca²⁺ binding studied with a microfluidic mixer. *Proceedings of the National Academy of Sciences, United States of America*. 105, 542–547.
- Polle, A., Otter, T., Seifert, F. (1994) Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea Abies* L.). *Plant Physiology*. 106: 53-56.
- Rengasamy, P. (2010) Soil processes affecting crop production in salt affected soils. *Functional Plant Biology*. 37: 613–620.
- Sadeghi, H. (2011) Differential response to salinity in two Iranian barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *Romanian agricultural research*. 28: 57-64.
- Shi, Q., Ding, F., Wang, X., Wei, M. (2007) Exogenous nitric oxide protects cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. *Plant*

- Physiology and Biochemistry. 45: 542-550.
- Siddiqui, M.H., Al-Wahaibi, M.H., Basalah, M.O. (2011) Interactive effect of calcium and gibberellin on nickel tolerance in relation to antioxidant systems in *Triticum aestivum* L. Protoplasma. 248: 503–511.
- Siddiqui, M.H., Al-Wahaibi, M.H., Sakran, A.M., Basalah, M.O., Ali, H.M. (2012) Effect of Calcium and Potassium on Antioxidant System of *Vicia faba* L. Under Cadmium Stress. International Journal of Molecular Sciences. 13, 6604-6619.
- Sreevalli, Y., Kulkarni, R.N., Baskaran, K., Chandrashekara, R.S. (2004) Increasing the content of leaf and root alkaloids of high alkaloid content mutants of periwinkle through nitrogen fertilization, Industrial Crops and Products. 19: 191–195.
- Tabatabaeian, J., (2014). The effects of calcium on improvement of salt stress damages in tomato. Journal plant production research, gorgan university of agricultural sciences and natural resources. 21(2): 125-137, (In Persian).
- Tunçtürk, M., Tunçtürk, R., Yildirim, B., Çiftçi, V. (2011) Effect of salinity stress on plant fresh weight and nutrient composition of some Canola (*Brassica napus* L.) cultivars. African Journal of Biotechnology. 10:1827-1832.
- Wang, Y. X., and Oyaizu, H. (2009) Evaluation of the phytoremediation potential of four plant species for dibenzofuran-contaminated soil. Journal of Hazardous Materials 168: 760-764.
- White, P.J. (2000) Calcium channel in higher plant. Biochimica et Biophysica Acta. 1465:171-189.
- Whittington, J., Smith, F.A. (1992) Calcium-salinity interactions affect ion transport in *Chara corallina*. Plant, Cell and Environment. 15: 727-733.

