Journal of Horticultural Science
Vol. 30, No. 2, Summer 2016, P. 185-191
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۰، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵، ص. ۱۹۱-۱۸۵
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

بررسی نقش حفاظتی نیتریک اکسید در کاهش صدمات ناشی از تنش شوری در گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis* L. cv. Gitan Orange)

مریم جبارزاده[۱*]- علی تهرانی‌فر[۲]- جعفر امیری[۳]- بهرام عابدی[٤]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۱۶

چکیده

شوری یکی از فاکتورهای مهم محیطی است که رشد و نمو گیاهان را تحت تاثیر قرار داده و تولید گیاهان را محدود می‌کند. سدیم نیترو پروسید (SNP) به طور معمول به عنوان ترکیب رها کننده نیتریک اکسید (NO) در گیاهان استفاده می‌شود. نیتریک اکسید رادیکال گازی نسبتاً پایداری است که در غلظت‌های پایین با ممانعت از تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن مانع خسارت آن‌ها می‌گردد. این پژوهش به صورت فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار، تیمار کلرید سدیم در پنج سطح صفر (شاهد)، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار و سدیم نیتروپروسید به صورت محلول پاشی برگی درچهار غلظت صفر (شاهد)، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار انجام شد. بنابر نتایج بدست آمده در این پژوهش، تنش شوری باعث کاهش رشد رویشی گردید و با افزایش غلظت نمک، بیشتر ویژگی‌های مورفولوژیک گیاه تحت تاثیر منفی تنش قرار گرفتند. تنش شوری، نیز دارای اثرات منفی قابل توجهی بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی بود به گونه‌ای که باعث کاهش کلروفیل شد و از طرفی باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، پرولین، قند محلول و نشت الکترولیت در گیاه گردید. تیمارهای مختلف سدیم نیتروپروسید توانست به طور معنی‌داری اثر منفی شوری به ویژه در سطوح پایین شوری بر گیاه را کاهش دهد. در بین غلظت‌های مختلف سدیم نیتروپروسید، غلظت ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌مولار بر روی بهبود صفات مورفولوژیکی، غلظت های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار بر روی بهبود صفات فیزیولوژیکی و غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی مولار بر روی بهبود صفات بیوشیمیایی موثر واقع شدند.

واژه‌های کلیدی: پرولین، گونه‌های فعال اکسیژن، سدیم نیتروپروسید، قند محلول

مقدمه

شوری، از مشکلات عمده در مناطق خشک و نیمه خشک جهان است و برآوردها، حاکی از آن است که بیش از ۸۰۰ میلیون هکتار برابر با بیش از ۶ درصد زمین‌های جهان تحت تاثیر سطوح مختلف شوری هستند (۱۶). تنش شوری موجب کاهش پتانسیل اسمزی می‌شود. تنظیم اسمزی در گیاهان، یکی از مهم‌ترین راهکارهای اجتناب از تنش‌های خشکی در محیط های شور می‌باشد. افزایش پرولین، نشان دهنده نقش این اسید آمینه در تنظیم پتانسیل اسمزی به عنوان یک اسمولیت سازگار می‌باشد (۴). از راه‌های دیگر مقاومت در برابر تنش شوری در گیاهان تجمع یون‌های فلزی ضروری مانند K^+ و قندهای محلول شامل ساکارز، فروکتوز، گلوکز، ترهالوز و رافینوز می باشد (۳۳). افزایش در غلظت ساکارز و سطح قندهای محلول در شرایط تنش شوری احتمالاً در سازگاری و ایجاد تحمل به شوری نقش دارد و از بین ترکیبات آلی مختلف، قندها بیش از ۵۰ درصد مجموع مواد تشکیل دهنده پتانسیل اسمزی را تشکیل می‌دهند (۱۷). اثر شوری در دیواره سلولی گیاهان با کاهش بزرگ شدن سلول‌های آن‌ها به دلیل از دست رفتن فشار تورگر مشخص می‌شود (۱۹). شوری با افزایش لیگنین (۷)، باعث ضخیم تر و سخت تر شدن دیواره گشته (۳۵) و در نتیجه با کاهش قابلیت ارتجاعی آن، بزرگ شدن سلول را دچار اختلال می‌نماید. در تنش شوری تولید گونه‌های فعال اکسیژن در محیط سلول، موجب ایجاد تنش ثانویه‌ای به نام تنش اکسیداتیو نیز می‌گردد (۱۱). دفاع آنتی اکسیدانی برای محافظت از یاخته‌ها در برابر تاثیرهای خطرناک گونه‌های اکسیژن فعال وارد عمل می‌شود. گیاهان سیستم‌های سلولی و زیر سلولی خود را از تاثیرهای

۱، ۲ و ۴- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*-نویسنده مسئول: Email: Jabbarzadehmaryam214@yahoo.com)
۳-استادیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

گونه‌های اکسیژن فعال به وسیله آنزیم‌هایی از قبیل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز، پلی فنل اکسیداز و آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی نظیر آسکوربات و گلوتاتیون محافظت می‌کنند (۱). نیتریک اکسید (NO) یا مونوکسید نیتریک به صورت رادیکال آزاد گازی می‌باشد. این مولکول محتوی یک الکترون جفت نشده است. NO سرعت انتشار بالایی دارد و به صورت یک رادیکال چربی دوست می‌تواند در سراسر غشای سلولی منتشر شود و همچنین از طریق سیتوپلاسم با تعداد معینی از مولکول‌ها مانند پروتئین‌ها، لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک و غیره واکنش دهد (۱۳). در گیاهان NO از منابع آنزیمی مثل نیتریک اکسید سینتاز، نیترات ردوکتاز، گزانتین اکسید ردوکتاز و گزانتین دی هیدوژناز تولید می‌شود (۳۴). گزارش شده است که NO در جوانه‌زنی (۶)، رشد و تکثیر سلولی (۳۷)، بلوغ و پیری (۱۳) و حرکت روزنه‌ها (۳۱) نقش دارد. NO در پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده از جمله تنش خشکی (۳۰)، تنش گرمایی (۴۲)، فلزات سنگین (۴۱) و اشعه UV (۳۹) دخیل می‌باشد. در شرایط شوری، کاربرد NO با کاهش آسیب‌های اکسیداتیوی (۴۹) و با تحریک فعالیت پمپ‌های پروتئینی و آنتی پورتر Na^+ / H^+ درغشاء تونوپلاست واکوئل (۴۵ و ۴۸) و افزایش نسبت K^+/Na^+ در سیتوزول (۳۴ و ۴۵) موجب افزایش تحمل به شوری می‌شود. فان و همکاران (۱۵) نشان دادند که کاربرد خارجی نیتریک اکسید در غلظت ۱۰۰میکرومولار به طور معنی‌داری باعث کاهش صدمه شوری و نیز باعث افزایش رشد دانهال‌های خیار شد. ژانگ و همکاران (۴۸) گزارش کردند، پیش تیمار ذرت با ۱۰۰ میکرومولار سدیم نیتروپروسید در شرایط تنش شوری باعث بهبود رشد، افزایش تجمع ماده خشک، میزان کلروفیل و کاهش نشت الکترولیت شد. سدیم نیتروپروسید باعث افزایش میزان کلروفیل در کاهو، سیب زمینی و آرابیدوپسیس شد (۶). کاربرد سدیم نیتروپروسید در دو رقم از گوجه فرنگی در شرایط تنش شوری نشان داد که نیتریک اکسید باعث افزایش شاخص‌های رشدی و قندهای محلول شد (۴۶). گیاه همیشه بهار *Calendula officinalis* L. گیاهی علفی، یکساله و بندرت دوساله با ساقه منشعب و سفت می باشد. همیشه بهار رشد سریعی دارد، به طوری که ۵۰-۴۰ روز بعد از سبز شدن به گل می‌نشیند. زمان گلدهی از اوایل خرداد ماه شروع و تا شروع فصل سرما ادامه دارد و به مدت ۱۲۰-۷۰ روز گل می‌دهد. بذر های این گیاه به صورت فندقه می‌باشد و اندازه آن از انتها به مرکز کاهش می‌یابد (۱۷). در این پژوهش، اثر تیمار سدیم نیتروپروسید به عنوان ترکیب رها کننده NO در تخفیف صدمات ناشی از تنش شوری در گیاه همیشه بهار مطالعه و مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در گلخانه نهالستان سازمان پارک‌ها و فضای سبز ارومیه در تابستان ۱۳۹۲به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار به اجرا درآمد. بذرهای همیشه بهار *Calendula officinalis* cv. Gitan Orange ابتدا در سینی های کشت توپی کشت شدند و سپس در مرحله ۴ برگی به گلدان‌های سفالی حاوی محیط کشت شامل ۲ قسمت خاک مزرعه، ۱ قسمت ماسه و ۱ قسمت خاکبرگ منتقل گردیدند. پس از استقرار کامل گیاهان (در مرحله ۶-۴ برگ کامل) به منظور اعمال تنش شوری از نمک کلرید سدیم در پنج غلظت صفر (شاهد)، ۲۵، ۵۰ ، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار به مدت ۱۴ روز استفاده شد. همچنین هفته ای یک بار، شستشوی کامل محیط ریشه گیاهان با آب مقطر انجام گرفت تا تغییرات EC وpH ناشی از تجمع نمک ها در بستر کاشت در اثر انجام عمل آبشویی به کمترین حد ممکن برسد. هم زمان با تیمار شوری، از ماده سدیم نیترو پروسید به عنوان منبع نیتریک اکسید در غلظت‌های صفر (شاهد)، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار به صورت محلول پاشی برگی در دو مرحله (در زمان شروع تیمار شوری و ۹ روز بعد از اولین تیمار) استفاده شد. اندازه‌گیری داده‌ها ۱۴روز بعد از اعمال تیمار شوری و نیتریک اکسید انجام شد. اندازه‌گیری سطح برگ با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری سطح برگ (Leaf area meter AM 200) و تعداد برگ با شمارش دستی انجام گرفت. برای اندازه‌گیری نشت الکترولیت غشاء سلول‌های برگ به صورت درصد با روش لوتیس و همکاران (۲۶) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

نشت الکترولیت غشاء برگ (درصد) = $[EC_1/EC_2]\times100$

برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی و ارزیابی فعالیت خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد از روش DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl) (۹) استفاده گردید. برای اندازه‌گیری کلروفیل a و b و کارتنوئید از روش دری و همکاران (۱۴) استفاده شد، سپس جذب فاز بالایی هر یک از نمونه‌های سانتریفیوژ شده، توسط اسپکتروفتومتر (Cecil 2502) در طول موج های ۶۵۳ ، ۶۶۶ و ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد، برای اندازه‌گیری پرولین و قندهای محلول، عصاره گیری از برگ از روش ایریگوئن و همکاران (۲۰) صورت گرفت. برای تعیین غلظت پرولین، استانداردهایی از پرولین از غلظت صفر تا ۰/۱ میکرومول بر میلی‌لیتر تهیه گردید و نهایتا میزان جذب محلول‌های استاندارد و نمونه‌ها در طول موج ۵۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (۵). برای اندازه‌گیری قندهای محلول، از روش ایریگوئن و همکاران (۲۰) استفاده شد و نهایتا میزان جذب نمونه‌ها، در طول موج ۶۲۵ نانومتر، با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید.

نتایج حاصل به کمک نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل

آماری قرار گرفت و میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح آماری پنج درصد مقایسه شد.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به سطح برگ و تعداد برگ نشان داد بین غلظت های متفاوت شوری و همچنین سطوح مختلف نیتریک اکسید اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱). از سوی دیگر برهمکنش شوری و نیتریک اکسید نیز بر مقادیر سطح برگ و تعداد برگ به ترتیب در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد معنی‌دار بود. با افزایش شوری سطح برگ و تعداد برگ کم شد. بدین ترتیب، تیمار شوری ۱۰۰ میلی‌مولار سطح برگ و تعداد برگ را در مقایسه با شاهد به ترتیب برابر ۶۶/۸۶ و ۶۷/۵۴ درصد کاهش داد (جدول ۱). کاربرد سدیم نیتروپروسید ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌مولار تا شوری ۵۰ میلی‌مولار باعث افزایش سطح برگ و تعداد برگ شد، ولی از شوری ۵۰ میلی‌مولار به ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار کاربرد سدیم نیتروپروسید موثر واقع نشد. در شوری ۵۰ میلی‌مولار میزان کاهش سطح برگ ۴۱/۹۹ درصد در مقایسه با شاهد بود. با کاربرد سدیم نیتروپروسید به میزان ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌مولار میزان کاهش این شاخص ۲۵/۹۴ و ۲۰/۸۲ درصد شد (جدول). در غلظت ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، کاربرد سدیم نیتروپروسید به میزان ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌مولار در مقایسه با شاهد تعداد برگ را به ترتیب (۱۱/۱۲، ۷/۶۹ درصد) و (۱۶/۲۵، ۱۴/۵۳ درصد) افزایش داد (جدول ۱). کاهش سطح برگ در اثر شوری یا در نتیجه کاهش تعداد برگ به علت کاهش فتوسنتز و یا کاهش اندازه برگ در اثر کاهش فشار تورژسانس است (۳۶). افزایش سطح برگ توسط SNP از طریق نقش آن در تنظیم آنزیم های β-D- گلوکوناز درونی و بیرونی در دیواره سلولی است (۲ و ۴۴). آنزیم های β-D-گلوکوناز در هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی بین واحدهای گلوکز داخل دیواره سلول نقش دارند که این باعث شل شدن و افزایش توسعه‌پذیری سلول می‌شود (۴۷). کاربرد NO باعث افزایش سطح برگ در گوجه فرنگی شد (۱۸). نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد اثرهای ساده شوری و نیتریک اکسید و همچنین بر همکنش دو تیمار مورد بررسی روی نشت الکترولیت به ترتیب در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد معنی‌دار بود. بدون کاربرد سدیم نیتروپروسید در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار میزان نشت الکترولیت ۲/۹۴ برابر در مقایسه با شاهد بود. با کاربرد سدیم نیتروپروسید به میزان ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌مولار تا شوری ۵۰ میلی مولار باعث کاهش نشت الکترولیت شد، اما با افزایش شوری (به ویژه در ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار)، از تاثیر این ترکیبات بر نشت الکترولیت غشا یاخته‌های برگ کاسته شد (جدول). تنش‌های محیطی از طریق ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن در داخل سلول، موجب کاهش پایداری غشا و نشت مواد سیتوپلاسمی از آن شده و افزایش نسبت هدایت الکتریکی قبل از اتوکلاو به بعد از آن را به دنبال دارد (۳). افزایش نشت الکترولیت غشاء در اثر شوری در همیشه بهار (۱۰) و گوجه فرنگی (۴۳) به اثبات رسیده است که نتایج بدست آمده در این پژوهش با آن‌ها همسویی دارد. همچنین کاربرد NO به همراه کلرید سدیم در جو نیز باعث کاهش درصد نشت الکترولیت در مقایسه با کاربرد کلرید سدیم به تنهایی شد (۲۵). NO می‌تواند باعث بهبود کشش سلول‌های دیواره، لایه فسفولیپیدی و فلاونوئیدهای غشائی شود که این باعث بهتر شدن فرایندهای غشایی و رشد بهتر گیاه می‌گردد (۲۴). نتایج نشان می دهد که اثر سطوح مختلف شوری و نیتریک اکسید و اثر متقابل این دو فاکتور بر غلظت قندهای محلول در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). با افزایش شوری میزان قندهای محلول افزایش یافت. بیشترین میزان قندهای محلول در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار بدون کاربرد سدیم نیتروپروسید ۴/۱۶ برابر نسبت به شاهد مشاهده شد. کاربرد سدیم نیتروپروسید ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار در سطوح شوری مختلف باعث افزایش میزان قندهای محلول شد به طوری که اختلاف آماری معنی‌داری بین تیمارها وجود نداشت. با کاربرد سدیم نیتروپروسید به میزان ۰/۵ میلی‌مولار در شوری ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار به ترتیب ۴/۰۱، ۴/۲۸ و ۳/۶۹ برابر و در غلظت ۰/۷۵ میلی‌مولار سدیم نیتروپروسید در شوری ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار به ترتیب ۳/۵۴، ۳/۶۶ و ۳/۸۷ برابر در مقایسه با شاهد باعث افزایش میزان قندهای محلول شد. قندهای محلول نقش مهمی در متابولیسم گیاه دارند و به عنوان محافظ اسمزی از طریق تثبیت غشا سلولی و حفظ فشار تورژسانس عمل می‌کنند (۱۲). در سلول‌های گیاهی مولکول‌های پلیمری به مولکول‌های کوچک‌تر شکسته می‌شوند به عنوان مثال نشاسته به ساکارز و سپس به مولکول‌های کوچک‌تری مانند گلوکز و فروکتوز تبدیل می‌شوند (۳۲). کاربرد نیتریک اکسید به طور قابل توجهی قندهای محلول را افزایش داد. نیتریک اکسید باعث افزایش قندهای محلول در بذرهای گندم (۵۰) و گوجه فرنگی (۴۶) در تنش شوری می‌شوند. با توجه به نتایج حاصل در جدول اثر سطوح مختلف شوری و نیتریک اکسید و همچنین اثرهای متقابل این دو فاکتور بر میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کارتنوئید از نظر آماری معنی‌دار بودند. با افزایش شوری میزان کلروفیل a و کلروفیل b کاهش یافت طوری که کمترین میزان کلروفیل a و کلروفیل b در تنش شوری ۱۰۰ میلی مولار مشاهده شد. کاربرد سدیم نیتروپروسید بر روی میزان کلروفیل a و کلروفیل b تا حدودی مثبت بود ولی در سطوح شوری بالا ضعیف عمل نمود. با کاربرد سدیم نیتروپروسید به میزان ۰/۷۵ میلی مولار در شوری ۵۰ میلی مولار میزان کاهش کلروفیل a به ۲۰/۲۲ درصد رسید (جدول ۱). میزان کاهش کلروفیل b در سطوح شوری ۵۰ میلی مولار با کاربرد ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار سدیم

نیتروپروسید به ترتیب ۳۹/۶۷، ۴۰/۱۴ و ۲۷/۴۹ درصد در مقایسه با شاهد بود (جدول ۱). با افزایش تنش شوری میزان کارتنوئید هم افزایش یافت. با کاربرد ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار سدیم نیتروپروسید در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار میزان کاهش کارتنوئید به ترتیب ۲/۱۰ و ۲/۳۵ برابر در مقایسه با شاهد شد (جدول ۱). کلروفیل b و کارتنوئیدها به عنوان رنگدانه های کمکی و حفاظتی از کلروفیل a واقع در فتوسیستم‌های کلروپلاست عمل کرده و در جذب و انتقال انرژی نورانی دریافتی به کلروفیل a نقش موثری دارد (۱).

جدول ۱- اثر سطوح مختلف کلرید سدیم و نیتریک اکسید بر روی صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی همیشه بهار رقم Gitan Orange

Table - Effect of different concentrations of NaCl and NO on morphological, physiological and biochemical traits of *Calendula officinalis* cv. Gitan Orange

کلرید سدیم NaCl (mM)	نیتریک اکسید NO (mM)	سطح برگ Leaf area (cm^2)	تعداد برگ Leaf number	نشت الکترولیت Ion electrolyte (%)	قند محلول Soluble Sugar (mg/gFW)	کلروفیل a Chlorophyll a (µm/g FW)	کلروفیل b Chlorophyll b (µm/g FW)	کارتنوئید Cartooned (µm/g FW)	پرولین Proline (mg/gFW)	ظرفیت آنتی اکسیدانی DPPH radical activity (%)
0	0	36.15 a	39 a	20.58 hi	0.813 ij	24.67 ab	12.73 a	2.53 gh	72.59 i	35.28 gh
	0.25	33.57 ab	37.33 ab	19.45 i	1.211 h-j	25.57 a	9.28 b	1.95 h	77.59 i	33.23 hi
	0.5	34.62 a	37 ab	19.79 i	0.703 j	22.65 a-c	10.28 bc	2.72 gh	83.65 i	41.72 ef
	0.75	32.01 a-c	36 ab	19.53 i	0.877 ij	23.50 a-c	11.14 b	2.31 gh	93.52 hi	37.81 fg
25	0	25.17 de	30.33 c-e	30.16 fg	1.45 h	20.47 b-d	8.87 cd	2.91 f-h	117.13 gh	49.77 d
	0.25	28.13 b-d	34.66 a-c	24.16 g-i	1.314 hi	19.66 cd	7.51 d	3.2 fg	186.81 bc	46.33 de
	0.5	30.87 a-c	36 ab	22.51 hi	2.58 d-f	22.73 a-c	9.08 cd	2.30 gh	231.25 a	56.18 c
	0.75	23.54 d-f	28 de	28.17 gh	1.994 g	23.67 a-c	11.41 ab	2.04 h	142.32 fg	55.04 c
50	0	20.97 e-g	27 e	39.81 e	2.069 fg	15.16 ef	5.04 e	4.39 de	141.92 fg	59.43 bc
	0.25	26.77 cd	32.66 b-d	27.4 gh	2.271 e-g	12.31 f-h	7.68 d	3.96 ef	204.52 b	61.75 b
	0.5	28.62 b-d	33/33 b-d	21.01 hi	3.252 a-c	17.35 de	7.62 d	3.23 fg	244.99 a	75.13 a
	0.75	19.60 fg	28 de	36.48 ef	2.87 b-d	19.68 cd	9.23 c	2.97 f-h	150.32 ef	73.91 a
75	0	15.95 gh	19 f	52.14 b-d	3.09 a-d	13.03 e-g	3.61 e-h	5.83 bc	155.72 d-f	31.04 h-j
	0.25	9.01 ij	17 fg	49.05 cd	2.685 c-e	14.21 e-g	3.96 e-g	6.91 ab	181.25 b-d	29.92 h-j
	0.5	12.08 hi	17.33 f	47.28 d	3.473 a	12.06 f-h	4.18 ef	7.49 a	184.39 b-d	34.91 gh
	0.75	10.70 h-j	15 f-h	50.74 b-d	2.971 a-d	12.15 f-h	3.51 e-h	6.64 ab	160.99 c-f	26.88 jk
100	0	11.98 hi	12.66 gh	60.52 a	3.37 ab	8.08 hi	3.25 f-h	6.87 ab	173.65 c-e	28.87 ij
	0.25	6.5 ij	10.33 h	57.48 ab	3.06 a-d	9.76 g-i	2.51 gh	7.06 a-c	169.39 c-f	23.02 k
	0.5	9.2 ij	11.33 h	52.95 b-d	2.995 a-d	6.85 i	3.62 e-h	5.32 cd	168.79 c-f	33.56 g-i
	0.75	5.91 j	10.66 h	55.84 a-c	3.145 a-d	7.81 hi	2.02 h	5.97 bc	167.32 c-f	30.13 h-j

حروف غیر مشترک در هر ستون نشان می‌دهد، از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد طبق آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری وجود دارد.

Different letters in the same column indicate significant differences between treatments at <0.05 according to Duncan's multiple rang test.

شوری باعث شکسته شدن کلروپلاست‌ها و عدم پایداری ترکیب‌های رنگیزه پروتئینی و در نهایت کاهش میزان کلروفیل می‌گردد. در اثر شوری تشکیل پلاستیدهای جدید کلروفیل a و b کاهش یافته و نسبت کلروفیل a به کلروفیل b تغییر می‌یابد (۴۰). کلروفیل و پرولین هر دو از پیش ماده مشترکی به نام گلوتامات سنتز می‌شوند، بنابراین می‌توان گفت افزایش سنتز پرولین در شرایط تنش شوری منجر به کاهش سنتز کلروفیل می‌گردد به عبارتی دیگر کاهش میزان کلروفیل می‌تواند به دلیل تغییر متابولیسم نیتروژن در رابطه با ساخت ترکیب هایی نظیر پرولین باشد که در تنظیم اسمزی به کار می روند. دوام فتوسنتز و حفظ کلروفیل برگ در شرایط تنش از جمله شاخص های فیزیولوژیکی تحمل به تنش است (۳۸). به نظر می رسد که اثر NO به واکنش آن با گونه فعال اکسیژن (ROS) برمی‌گردد، زیرا رادیکال های آزاد اکسیژن اصلی ترین عاملی هستند که در شرایط تنش باعث خسارت و شکستن رنگیزه‌های فتوسنتزی و پروتئین های ساختاری دستگاه فتوسنتزی می شوند (۲۲ و ۲۳). علاوه بر این، پروتئین هایی که در متابولیسم کلروفیل شرکت می‌کنند نیز می توانند هدف ROS ها قرار گرفته و تخریب شوند (۶). همچنین در برخی بررسی‌ها گزارش شده است که در حضور NO دسترسی گیاه به آهن بیشتر است و این نیز می تواند یکی از نقش‌های NO در حفظ محتوی کلروفیل گیاه باشد (۳۱). با توجه به نتایج جدول اثر سطوح مختلف شوری و نیتریک اکسید و اثر متقابل این دو فاکتور روی میزان پرولین در سطح یک درصد معنی‌دار بود. تنش شوری باعث افزایش میزان پرولین شد ، اگر چه بین تیمارها اختلاف معنی‌دار نبود. کاربرد سدیم نیتروپروسید تا شوری ۵۰ میلی‌مولار باعث افزایش پرولین شد ولی از شوری ۵۰ به ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار تاثیری نداشت به گونه‌ای که با تیمار شاهد در همین غلظت‌ها اختلاف آماری معنی‌داری نداشت. سدیم نیتروپروسید ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌مولار در شوری ۲۵ میلی‌مولار ۲/۵۷ ، ۳/۱۸ برابر و در شوری ۵۰ میلی‌مولار ۲/۸۱، ۳/۳۷ برابر باعث افزایش پرولین شد و بیشترین تاثیر را بر روی میزان پرولین داشت (جدول ۱). پرولین دارای اثر مستقیم در ثبات بخشیدن به ماکرومولکول‌ها و لایه‌های هیدراسیون آن‌ها بوده و همچنین به علت خواص آنتی‌اکسیدانی خود یک عمل حفاظتی غیر مستقیم نیز بروز می‌دهد. نقش آنتی اکسیدانی پرولین در توانایی آن برای غیرفعال کردن رادیکال‌های هیدروکسیل و سایر ترکیبات دارای فعالیت بالا که تحت شرایط تنش تولید شده و در انتقال الکترون در کلروپلاست‌ها و میتوکندری‌ها اختلال ایجاد می‌کنند، تظاهر می‌یابد و از این طریق پروتئین‌ها و غشاها را در برابر آسیب محافظت می‌نماید (۸). افزایش تجمع پرولین در شرایط شوری را می‌توان به کاهش میزان پرولین اکسیداز نسبت داد که باعث تجزیه پرولین می‌گردد همچنین افزایش در میزان ۵-کربوکسیلات سنتتاز (P5Cs) که سنتز پرولین را افزایش می‌دهد، می تواند از دیگر دلایل افزایش میزان پرولین باشد (۲۷). وُو و همکاران گزارش کردند که کاربرد NO به همراه شوری باعث افزایش میزان پرولین در گوجه‌فرنگی می‌شود (۴۶). با توجه به نتایج جدول اثرات شوری و نیتریک اکسید و نیز برهمکنش دو تیمار مورد بررسی بر روی درصد ظرفیت آنتی اکسیدانی به ترتیب در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. با افزایش تنش شوری تا ۵۰ میلی‌مولار ظرفیت آنتی اکسیدانی افزایش یافت ولی بعد از آن کاهش یافت هر چند اختلاف آماری معنی‌داری بین تیمار ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار وجود نداشت. بیشترین ظرفیت آنتی اکسیدانی در تیمار ۵۰ میلی‌مولار با کاربرد سدیم نیتروپروسید به میزان ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار ۲/۱۲ و ۲/۰۹ برابر شاهد مشاهده شد (جدول ۱). فعالیت آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی با اندازه‌گیری میزان فعالیت مهار رادیکال DPPH انجام می‌گیرد (۲۱). شرایط تنش موجب تجمع گونه‌های اکسیژن فعال ROS در گیاهان می‌شود که باعث صدمات اکسیداتیو به چربی و پروتئین‌ها شده و باعث مرگ گیاه می‌شود (۲۸). NO به عنوان یک مولکول سیگنالی سیستم آنتی اکسیدانی سلول را فعال می‌کند و به طور مستقیم اکسیژن فعال را به پروکسی نیتریت تبدیل کرده و از سمیت آن به مراتب می‌کاهد در نتیجه آسیب سلولی را محدود می‌کند (۲۹). بنابراین، در مطالعه ما بر روی گیاه همیشه بهار تحت تنش شوری، به نظر می‌رسد که تیمارهای مختلف سدیم نیتروپروسید توانست به طور معنی‌داری اثر منفی شوری به ویژه در سطوح پایین شوری بر گیاهان را کاهش دهد. در اکثر موارد در بین غلظت‌های مختلف سدیم نیتروپروسید مورد استفاده غلظت های ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌مولار بر روی ویژگی‌های مورفولوژیکی، غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار بر روی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار بر روی ویژگی‌های بیوشیمیایی موثر واقع شدند.

منابع

1-Agarwal S., and Pandy V. 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. Biologia Plantarum, 48: 555-560.

2-An L., Liua Y., Zhang M., Chen T., and Wang X. 2005. Effects of nitric oxide on growth of maize seedling leaves in the presence or absence of ultraviolet-B radiation. Journal of plant physiology, 162:317–326.

3-Azari A., Modares Sanavi S.A.M., Askari H., Ghanati F., Naji A.M., and Alizadeh B. 2012. Effect of salt stress on

morphological and physiological traits of two species of rapeseed (*Brassica napus* and *B. rapa*). Iranian Journal of Crop Sciences, 14(2):121-135. (in Persian with English abstract)

4-Bajji M., Lutts S., and Kinet J.M. 2001. Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars performing differently in arid conditions. Plant Science, 160: 669-681.

5-Bates L.S., Waldran R.P., and Teare I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water studies. Plant Soil, 39: 205–208.

6-Beligni M.V., Lamattina L. 2000. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light inducible responses in plants. Planta, 210:215–221.

7-Brayant J.P., Chapin F.S., and Klein D.R. 1983. Carbon nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. Oikos, 40: 357-368.

8-Bohnert H.J., and Jensen R.G. 1996. Strategies for engineering water stress tolerance in plants. Trends Biotechnol, 14: 89–97.

9-Celep E., Aydin A., Kirmizibekmez H., and Yesilada E. 2013. Appraisal of in vitro and in vivo antioxidant activity potential of cornelian cherry leaves. Food and Chemical Toxicology, 62: 448-455.

10-Chaparzadeh N., Amico M. D'., Khavari-Nejad R., Izzo R., and Navari-Izzo F. 2004. Antioxidative responses of *Calendula officinalis* under salinity conditions. Plant Physiology and Biochemistry, 42: 695–701.

11-Chinnusamy V., Jagendorf A.,and Zhu J.K. 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. Crop Sciences, 45: 437-448.

12-Coue´e I., Sulmon C., Gouesbet G., and Amrani A. 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany, 57:449–459.

13-Corpas F.J., Barroso J.B., Carreras A., Quiros M., Leo´n A.M., Romero- Puertas M.C., Esteban F.J., Valderrama R., Palma J.M., and Sandalio LM. 2004. Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. Plant Physiology, 136:2722–2733.

14-Dere S., Gines T. and Sivaci R. 1998. Spectrophotometric determination of chlorophyll- a, b and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. Turkish Journal of Botany, 22: 13-17.

15-Fan H., Guo S., Jiao Y., and Zhang R, Li. 2007. Effects of exogenous nitric oxide on growth, active oxygen species metabolism, and photosynthetic characteristics in cucumber seedlings under NaCl stress. Frontiers of Agriculture in China, 1:308–314.

16-FAO. 2011. FAO land and plant nutrition management service. Available at: http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush/. Accessed 25 November 2011.

17-Geholt H. S., Purohit A., and Shekhawat N.S. 2005 Metabolic changes and protein patterns associated with adaptation to salinity in *Sesamun indicum* cultivars. Journal of Cell and Molcular Biology, 4: 31-39.

18-Hayat S., Yadav S., Wani A., Irfan M., and Ahmad A. 2011. Nitric Oxide Effects on Photosynthetic Rate, Growth, and Antioxidant Activity in Tomato, International Journal of Vegetable Science, 17: 333-348.

19-Iraki N.M., Bressan R.A., Hasegawa P.M. and Carpita N.C. 1989. Alteration of the Physical and Chemical Structure of the Primary Cell Wall of Growth-Limited Plant Cells Adapted to Osmotic Stress. Plant Physiology, 91: 39-47.

20-Irigoyen J.J., Emerich D.W., and Sa´nchez-D´ıaz M. 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. Physiologia Plantarum, 84**:** 55–60.

21-Kang H. M. and Saltveit M.E. 2002. Effect of chilling on antioxidant enzymes and DPPH-radical scavenging activity of high- and low-vigour cucumber seedling radicles. Plant Cell Environment, 25: 1233-1238.

22-Kim J.H. and Lee C.H. 2005. In vivo deleterious effects specific to reactive oxygen species on photosystem II afterphotooxidative treatment of rice leaves. Plant Sciences, 168: 1115-1125.

23-Laspina N.V., Groppa M.D., Tomaro M L., and Benavides M.P. 2005. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. Plant Sciences, 169: 323-330.

24-Leshem Y.Y., and Hamaraty E. 1996. Plant aging: the emission of NO and ethylene and effect of NO-releasing compounds on growth of pea (Pisum sativum L.) foliage. Journal of Plant Physiology, 148, 258–263.

25-Li Q., Niud H., Yind J., Wanga M., Shaob H., Dengd D., Chend X., Rend J., and Li Y. 2008. Protective role of exogenous nitric oxide against oxidative-stress induced by salt stress in barley (*Hordeum vulgare*) . Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 65: 220–225.

26-Luttes S., Kinet J.M., and Bouharmont J. 1995. Changes in Plant response to NaCl during development of rice *(Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. Journal of Experimental Botany, 46,1843-1852.

27-Misra N., and Saxena P. 2009. Effect of salicylic acid on proline metabolism in lentil grown nder salinity stress. Plant Science, 177: 181-188.

28-Molassiotis A., Sotiropoulos T., Tanou G., Diamantidis G., and Therios I. 2006. Boron-induced oxidative damage and antioxidant and nucleolytic responses in shoot tips culture of the apple rootstock EM9 (*Malus domestica* Borkh). Environmental and Experimental Botany, 56: 54–62.

29-Martinez G.R., Mascio P.D., Bonini M.G., Augusto O., Briviba K., and Sies H. 2000. Peroxynitrite does not decompose to singlet oxygen (1gO2) and nitroxyl (NO-). Proceedings of the National Academy of Sciences, 97:10307–10312.

30-Nasibi F, and Kalantari K.M. 2009. Influence of nitric oxide in protection of tomato seedling against oxidative stress induced by osmotic stress. Acta Physiologia Plantarum, 31:1037–1044.

31-Neill S., Desikan R., Clarke A., and Hancock J.T. 2002 Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signalling in stomatal guard cells. Plant Physiology, 128:13–16.

32-Pessarakli M. 1999: Handbook of Plant and Crop Stress. Second Edition. Marcel Dekker, Inc. New York. 545p.

33-Prabijot K.G., Arun D.S., Prabhjeet S., and Singh B. 2001. Effect of various abiotic steress on the grown in light and darkness. Bulg. Journal of Plant Physiology, 27: 72-84.

34-Qiao W., Xiao S., Yu L., and Fan L.M. 2009. Expression of a rice gene OsNOA1 re-establishes nitric oxide synthesis and stress-related gene expression for salt tolerance in Arabidopsis nitric oxideassociated 1 mutant Atnoa1. Environmental and Experimental Botany, 65:90–98.

35-Radin J.W., and Ackerson, R.C. 1981. Water relations of cotton plants under nitrogen deficiency .II. Stomatal conductance, photosynthesis and abscisic acid. Plant Physiology, 67,115-119.

36-Rawson H.M., long M.j., and Munnus R. 1988. Growth and development in NaCl treated plant. Journal of Plant Physiology, 15:519-527.

37-Ribeiro E.A., Cunha F.Q., Tamashiro W.M.S.C., and Martins I.S. 1999. Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. FEBS Letters, 445:283–286.

38-Rosa-Ibara M.D.L., and Maiti R.K. 1995. Biochemical mechanism in glossay sorgum lines for resistance to salinity stress. Plant Physiology, 146:515-519.

39-Shi S.Y., Wang G., Wang Y.D., Zhang L.G., and Zhang L.X. 2005. Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B radiation. Nitric Oxide, 13:1–9.

40-Singh A.K., and Dubey R.S. 1995. Changes in chlorophyll a and b contents and activities of photosystems 1 and 2 in rice seedlings induced by NaCl. Photosythetica, 31: 489–499.

41-Singh H.P., Batish D.R., Kaur G., Arora K., and Kohli R.K. 2008 Nitric oxide (as sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots. Environmantal and Experimental Botany, 63:158–167

42-Song L.L., Ding W., Zhao M.G., Sun B.T., and Zhang L.X. 2006. Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed. Plant Science, 171:449–458.

43-Stevens J., Senaratna T., and Sivasithamparam K. 2006. Salicylic acid induces salinity tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Roma): associated changes in gas exchange, water relations and membrane stabilisation. Plant Growth Regulation, 49: 77–83.

44-Terasaki S., Sakurai N., Yamamoto R., Wada N., and Nevins D.J. 2001. Changes in cell wall polysaccharides of kiwifruit and the viscoelastic properties detected by laser Doppler method .Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 70:572–580.

45-Wang H.H., Liang X.L., Wan Q., Wang X.M., and Bi Y.R. 2009. Ethylene and nitric oxide are involved in maintaining ion homeostasis in Arabidopsis callus under salt stress. Planta, 230:293–307.

46-Wu X., Zhu W., Zhang H., Ding H., and Zhang H . J. 2011. Exogenous nitric oxide protects against salt-indaced oxidative stress in the leaves from two genotypes of tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.). Acta Physiologiae Plantarum, 33:1199-1209.

47-Zhang M., An L., Feng H., Chen T., Chen K., Liu Y., Tang H., Chang J., and Wang X. 2003. The cascade mechanisms of nitric oxide as a second messenger of ultraviolet-B in inhibiting mesocotyl elongations. Photochemistry and Photobiology, 77:219–225.

48-Zhang Y.Y., Wang L.L., Liu Y.L., Zhang Q., Wei Q.P.,and Zhang W.H. 2006. Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na?/H? antiport in the tonoplast. Planta, 224:545–555.

49-Zhang Y., Han X., Chen X., Jin H., and Cui X. 2009. Exogenous nitric oxide on antioxidative system and ATPase activities from tomato seedlings under copper stress. Scientia Horticulturae, 123:217–223.

50-Zheng C.F., Dong J.G., Liu F.L., Dai T.B., Liu W.C., Jing Q., and Cao W.X. 2009. Exogenous nitric oxide improves seed germination in wheat against mitochondrial oxidative damage induced by high salinity. Environmental and Experimental Botany, 67:222–227.