DOR: 20.1001.1.23832592.1400.34.4.13.6

بررسی اثر همزمان نمک های کلریدسدیم و کلریدکلسیم بر صفات رشدی و بیوشیمیایی "گلابی" درگزی (*Pyrus communis* cv. Dargazi) در شرایط درون شیشه ای

فاطمه ظفری[۱]، علیرضا نوروزی شرف[۲] و پرویز الماسی[۲*]

[۱] **ایران، زنجان، دانشگاه زنجان، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی**

[۲] **ایران، اسدآباد، دانشگاه سید جمال الدین اسدآبادی، گروه علوم و مهندسی باغبانی و فضای سبز**

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۷

چکیده

شوری یکی از مهمترین عوامل محدود کننده پرورش محصولات کشاورزی است. افزایش غلظت نمک سبب عدم توازن یونی در سلول‌ها و در نتیجه سمیت یونی و تنش اسمزی می‌شود. استفاده از تکنیک کشت درون شیشه‌ای برای مطالعه و انتخاب گونه-های گیاهی مقاوم به شوری، خشکی و سایر تنش‌ها متداول است، زیرا کنترل بیشتری نسبت به شرایط بیرون وجود دارد. این مطالعه به منظور ارزیابی واکنش‌های رشدی و بیوشیمیایی گلابی رقم "درگزی" به سطوح مختلف تنش شوری انجام شده است. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با تیمارهای کلرید کلسیم (سه سطح ۰، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار) و کلرید سدیم (پنج سطح ۰، ۴۰، ۸۰، ۱۲۰ و ۱۶۰ میلی‌مولار) که به صورت برهم‌کنش دو نمک در محیط کشت موراشیک و اسکوگ با شش تکرار انجام گردید. پارامترهای رشد (شامل وزن تر، وزن خشک، طول شاخه، تعداد برگ و تعداد جوانه های جدید) و نیز مقدار پروتئین، فعالیت آنزیم کاتالاز، پرولین و قندهای محلول اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که با افزایش سطح شوری وزن تر کاهش یافت در حالی که وزن خشک در تیمار ۴۰ میلی مولار NaCl +پنج میلی‌مولار $CaCl_2$ بالاترین مقدار را داشت، که احتمالاً نشان دهنده نقش کلسیم در کاهش اثرات منفی شوری است. پروتئین و قندهای محلول در تمامی غلظت های NaCl بعلاوه پنج میلی مولار $CaCl_2$ بالاتر از غلظت ۱۰ میلی مولار آن بود. بالاترین غلظت پرولین در تیمار ۱۶۰ میلی مولار NaCl + پنج میلی مولار $CaCl_2$ بدست آمد. بالاترین قند محلول در تیمار ۱۲۰ میلی‌مولار NaCl + پنج میلی مولار $CaCl_2$ حاصل شد.

واژه های کلیدی: رشد، شرایط درون شیشه‌ای کلریدسدیم،کلریدکلسیم، گلابی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۱۳۳۱۱۷۸۰۷ ، پست الکترونیکی: parviz_almasi@yahoo.com

مقدمه

شوری یکی از مهمترین عوامل محدود کننده رشد و توسعه محصولات کشاورزی است (۱۴ و ۱۵). افزایش شوری خاک‌ها و آب‌های کشاورزی از مهم‌ترین مشکلات موجود به شمار می رود و افزایش غلظت نمک سبب عدم توازن یونی در سلولها و در نتیجه سمیت یونی و تنش اسمزی می‌شود (۱۱ و ۱۸). پاسخ گیاهان به افزایش شوری پیچیده است و باعث تغییراتی در ویژگی های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و متابولیسم گیاه می‌شود (۲۰). به نظر می‌رسد اثرات تخریبی یون Na^+ در گیاهان با افزایش غلظت Ca^{2+} برون‌زا بهبود یابد (۲۲ و ۱۴). مشخص شده است که Ca^{2+} در طویل شدن سلول، تقسیم سلول، پایداری ساختار و نفوذ پذیری غشاء سلولی، تنظیم تعادل آنیون ها و کاتیون ها و فعالیت آنزیم ها نقش دارد (۱۹).

استفاده از تکنیک کشت بافت و شرایط درون شیشه‌ای برای مطالعه و انتخاب گونه های گیاهی مقاوم به شوری،

DOR: 20.1001.1.23832592.1400.34.4.13.6

خشکی و سایر تنش‌ها متداول است، زیرا کنترل بیشتری نسبت به شرایط بیرون وجود دارد (۲۸ و ۲۹) و تعداد زیادی از ژنوتیپ‌ها می‌توانند در یک فضای محدود و در زمان کوتاه ارزیابی شوند (۲۸). همچنین رشد هم‌گروهی گیاه تحت شرایط تغذیه‌ای و آب و هوایی کنترل شده را فراهم نموده و امکان انجام آزمایش‌ها را در شرایط یکسان، در تمام طول سال میسر می‌سازد (۳۵). به عنوان مثال تنش شوری در کشت درون شیشه‌ای پایه‌های سیب (۲۷ و ۳۲)، کیوی فروت (۳۰ و ۳۴)، پایه گیلاس Gisela 5 (۱۴)، جوجوبا (۳۳)، پایه های هلو (۳۱)، پایه‌های انگور (۸) و پایه‌های پسته (۱۰) مورد بررسی قرار گرفته است. در پژوهشی اثر همزمان تنش شوری NaCl و$CaCl_2$ بر روی پایه سیب M_4 در شرایط درون شیشه‌ای بررسی شد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت NaCl و$CaCl_2$، غلظت پرولین و قندهای محلول در گیاهچه‌ها افزایش یافت، در حالیکه میزان کلروفیل برگ و رشد شاخه در مقایسه با شاهد کاهش یافت (۳۲). ردی و همکاران (۲۰۱۳) طی یک آزمایش بر روی نوعی حبوبات به نام ماش سیاه (*Vigna mungo* L. Hepper) گزارش کردند که $CaCl_2$ با پایین نگهداشتن میزان پراکسیداسیون لیپیدی، فعالیت پروتئاز، ATPase و بالا بردن میزان فعالیت پرولین اکسیداز، تأثیر تنش سدیم را تعدیل می نماید (۲۴).

رقم گلابی درگزی از ارقام منتخب محلی است، درختی هرمی شکل هرسال بار، زود گل، زود رس (نیمه آخر شهریور) و پرمحصول است که میوه‌های آن دوام انباری خوب (سه- پنج ماه) و قابلیت حمل بالایی دارند. رنگ میوه زرد طلایی با گونه قرمز، کمی ریگدار و درشت است (۱). تاکنون مطالعه‌ای در زمینه مقاومت این رقم به شوری صورت نگرفته است. در این پژوهش، میزان تحمل و واکنش‌های رشدی و بیوشیمیایی گلابی رقم درگزی در شرایط تنش شوری ایجاد شده با کلریدسدیم و کلریدکلسیم در شرایط درون شیشه ای مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

مواد و روشها

بررسی‌ها در آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی و آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه اصلاح نباتات دانشگاه زنجان انجام شد. این آزمایش در محیط کشت موراشیک و اسکوگ (MS) (۲۱) در قالب طرح کاملاً تصادفی با نه تیمار شامل: شاهد، ۴۰ میلی‌مولار NaCl + میلی‌مولار $CaCl_2$ ۴۰، $CaCl_2$ ۱۰ + NaCl ۸۰، $CaCl_2$ ۵ + NaCl ۸۰، $CaCl_2$ ۱۰ + NaCl ۱۲۰، $CaCl_2$ ۵ + NaCl ۱۲۰، $CaCl_2$ ۱۰ + NaCl ۱۶۰، $CaCl_2$ ۵ + NaCl ۱۶۰، $CaCl_2$ ۱۰ + NaCl و در شش تکرار اجرا گردید. مواد گیاهی اولیه به صورت شاخساره‌های درون شیشه‌ای از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی در کرج تهیه شد. ریز نمونه‌ها ابتدا طی چند مرحله واکشت، تکثیر شده و سپس شاخساره‌هایی که از نظر اندازه و تعداد برگ تقریباً یکسان بودند (به طول حدود دو تا سه سانتی متر و تعداد پنج تا شش برگ) در ظروف کشت به حجم ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت جامد موراشیک و اسکوگ (MS) حاوی یک میلی گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین (BAP) و یک دهم میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید(NAA) به اضافه غلظت‌های صفر، ۴۰، ۸۰، ۱۲۰، ۱۶۰ میلی مولار کلریدسدیم در ترکیب با دو غلظت پنج و ده میلی مولار کلریدکلسیم، واکشت شدند. قبل از اضافه کردن آگار و اتوکلاو، pH محیط کشت روی ۵/۷ تنظیم گردید. ظروف حاوی محیط کشت، داخل اتوکلاو در ۱۲۱ درجه سانتی گراد، تحت فشار ۱/۵ کیلوگرم بر سانتی مترمربع به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید. گیاهچه‌ها پس از انتقال به محیط کشت در اتاق رشد تحت شرایط دمایی ۱±۲۲ درجه سانتی گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور ۲۵۰۰ لوکس و هشت ساعت تاریکی متناوب به مدت هشت هفته نگهداری شدند.

بعد از هشت هفته، ریز نمونه‌ها از ظروف کشت خارج شده و ابتدا با آب مقطر شستشو داده و خشک شدند.

DOR: 20.1001.1.23832592.1400.34.4.13.6

سپس شاخص‌های مختلف از جمله وزن تر، وزن خشک، طول شاخه و تعداد برگ بررسی شد. مقدار پرولین با روش باتز اندازه‌گیری شد و محتوای پرولین با استفاده از منحنی استاندارد و با واحد میکرو مول/گرم وزن تر ($\mu molg^{-1}$ fw) بیان شد (۶). ماده تر گیاهی (یک دهم گرم) در ۱۰ میلی لیتر از سولفو سالیسیلیک اسید ۳ درصد یکنواخت و سپس صاف شد. پس از صاف کردن دو میلی لیتر معرف ناین هیدرین(یک و بیست و پنج صدم میلی گرم ناین هیدرین در ۳۰ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال و ۲۰ میلی لیتر از H_3PO_4، شش مولار) به دو میلی لیتر از نمونه اضافه شد و سپس برای یک ساعت در آب ۱۰۰ $^{\circ}C$ قرار داده شد. واکنش با قرار دادن در حمام یخ متوقف شد و سپس به هر نمونه چهار میلی لیتر تولوئن اضافه شد. بعد از گرم شدن در ۲۵ $^{\circ}C$ میزان جذب در فاز رنگی محلول در ۲۵۰ nm و با استفاده از استاندارد قرائت شد.

مقدار قند محلول برگ مطابق روش اریگون (۱۵)، استخراج و آنالیز شد. ابتدا مقدار سه دهم گرم برگ تر در پنج میلی لیتر اتانول ۹۸ درصد همولیز و یکنواخت شد، یک دهم میلی لیتر از سطح رویی با سه میلی لیتر معرف آنترون ترکیب شد، سپس میزان جذب محلول در ۶۲۵ nm با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. مقدار پروتئین کل مطابق روش برادفورد (۸) با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با شیوه چانس بر پایه تجزیه H_2O_2 اندازه‌گیری شد (۹). میزان جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ nm و فعالیت آنزیم کاتالاز بر حسب میزان جذب در دقیقه/ مقدار پروتئین اندازه‌گیری شد.

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 انجام گرفت (۲۶). برای مقایسه میانگین‌ها نیز از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد استفاده شد و نمودارها توسط نرم‌افزار اکسل رسم گردیدند.

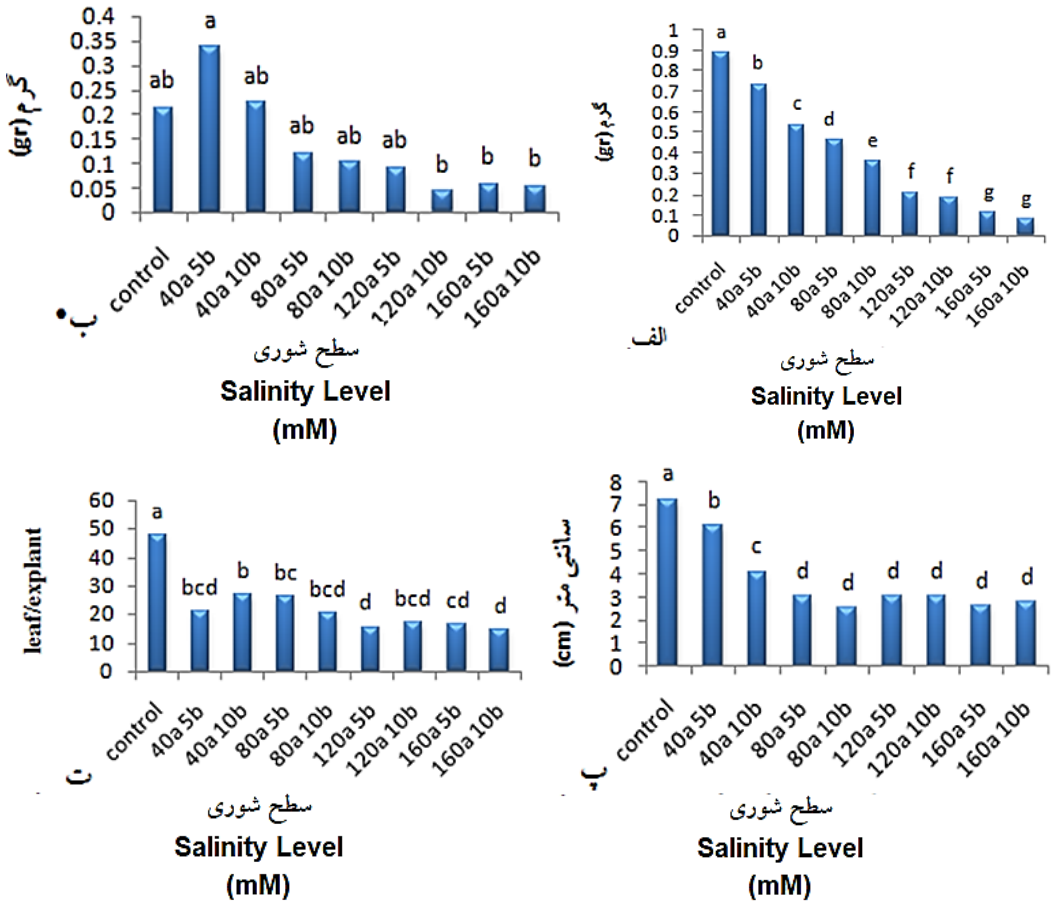
نتایج

نتایج نشان داد که بعد از هشت هفته با افزایش سطح شوری میزان وزن تر کاهش یافت. بیشترین وزن تر مربوط به شاهد (۰/۸۸۹ گرم) و کمترین مقدار (۰/۷۰۶ گرم) مربوط به ۱۶۰ میلی مولار کلریدسدیم در ترکیب با ۱۰ میلی مولار کلریدکلسیم بود (شکل ۱–الف). وزن خشک نیز تحت تاثیر تنش شوری قرارگرفت و بیشترین وزن خشک مربوط به تیمار ۴۰ میلی مولار کلریدسدیم در ترکیب با پنج میلی مولار کلریدکلسیم بود (شکل ۱–ب). همچنین طول شاخه و تعداد برگ تحت تأثیر تیمار های شوری قرار گرفتند. بیشترین طول شاخه (۷/۲۲۵ سانتی متر) در شاهد و کمترین میزان آن در تیمار ۸۰ میلی مولار کلریدسدیم در ترکیب با ۱۰ میلی مولار کلریدکلسیم (۲/۵ سانتی متر) حاصل شد (شکل ۱–پ و شکل ۴). بیشترین تعداد برگ نیز در شاهد (۴۷/۷۵) و کمترین آن در تیمار ۱۶۰ میلی مولار کلریدسدیم در ترکیب با ۱۰ میلی مولار کلریدکلسیم (۱۴/۵) بدست آمد (شکل ۱–ت).

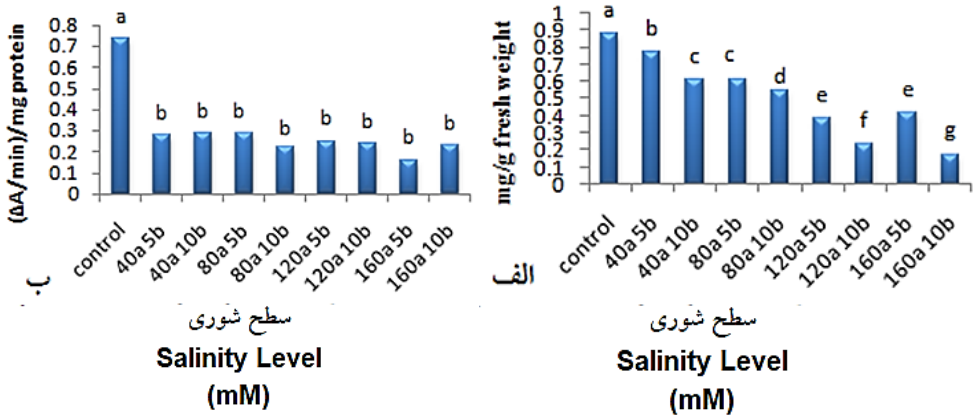
با افزایش سطح شوری میزان پروتئین محلول به طور قابل توجهی تحت تاثیر قرار گرفت. بیشترین میزان پروتئین در تیمار شاهد و کمترین میزان آن در تیمار ۱۶۰ میلی مولار کلریدسدیم در ترکیب با ۱۰ میلی مولار کلریدکلسیم بود (شکل ۲–الف). فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تنش شوری در مقایسه با کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد در حالیکه بین سطوح مختلف شوری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۲–ب).

پرولین نیز با افزایش شوری به میزان قابل توجهی تحت تاثیر قرار گرفت. کمترین میزان پرولین در تیمار شاهد۰/۱۷۱ میکرو مول بر گرم وزن تر و بیشترین میزان آن در تیمار ۱۶۰ میلی مولار کلریدسدیم در ترکیب با پنج میلی مولار کلریدکلسیم به میزان ۱/۲۴۹ میکرو مول بر گرم وزن تر بدست آمد (شکل ۳–الف).

DOR: 20.1001.1.23832592.1400.34.4.13.6



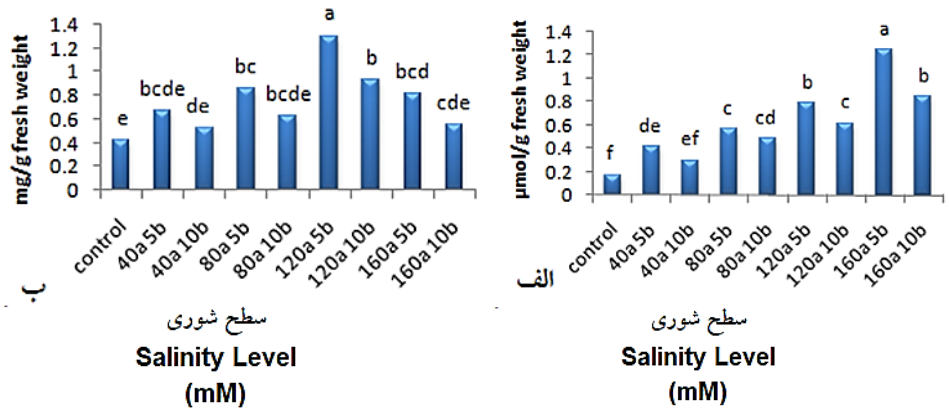
شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف کلریدسدیم و کلریدکلسیم بر وزن تر (الف) وزن خشک (ب)، طول شاخه (پ) و تعداد برگ (ت) گلابی "درگزی"، هشت هفته بعد از کشت در شرایط درون شیشه‌ای. (a) کلریدسدیم و (b) کلریدکلسیم.



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف کلریدسدیم و کلریدکلسیم بر پروتئین (الف)و آنزیم کاتالاز (ب) گلابی "درگزی"، هشت هفته بعد از کشت در شرایط درون شیشه‌ای. (a) کلرید سدیم و (b) کلرید کلسیم.

DOR: 20.1001.1.23832592.1400.34.4.13.6

با افزایش شوری قند محلول هم به طور معنی داری تغییر داشت. کمترین میزان قند محلول در تیمار شاهد (۰/۴۱۸میلی گرم بر گرم وزن تر) و بیشترین میزان قند محلول در تیمار ۱۲۰ میلی مولار کلریدسدیم در ترکیب با پنج میلی مولار کلریدکلسیم به میزان (۱/۲۹۹ میلی گرم بر گرم وزن تر) حاصل شد (شکل ۳-ب).



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف کلریدسدیم و کلریدکلسیم بر پرولین (الف) و قندهای محلول(ب) گلابی "درگزی"،هشت هفته بعد از کشت در شرایط درون شیشه‌ای. (a) کلرید سدیم و (b) کلرید کلسیم.

شکل ۴- اثر سطوح مختلف کلریدسدیم و کلریدکلسیم بر روی رشد گلابی"درگزی"در شرایط درون شیشه ای بعد از هشت هفته از اعمال تیمارها.

بحث و نتیجه گیری

با توجه به اینکه در نتایج آزمایشات اولیه معلوم شد که پارامترهای رشد از قبیل وزن تر، وزن خشک، طول شاخساره، تعداد برگ با اِعمال سطوح مختلف تنش شوری (۰، ۴۰، ۸۰، ۱۲۰ میلی مولار کلرید سدیم) کاهش یافته و با افزایش تنش شوری تعداد برگ کلروزه و نکروزه افزایش یافت و این با نتایج محسنی و همکاران (۴) همخوانی دارد که گزارش کردند که تیمار شوری، غلظت رنگدانه‌های کلروفیل و کارتنوئید را در اسفناج کاهش داد، نتایج کاربرد همزمان دو تیمار نمکی کلرید سدیم و کلرید کلسیم در این مطالعه نیز نشان می‌دهد که حضور کلریدکلسیم احتمالاً باعث کاهش اثرات مضر کلریدسدیم می‌گردد و این نتیجه همگام و مؤید آزمایشاتی است که توسط محققین دیگر صورت گرفته است. دونوفریو و مورینی (۲۰۰۲) گزارش کردند که حضور کلریدکلسیم به طور آشکاری می‌تواند اثرات تنش شوری را تعدیل بخشد (۱۳). آنها همچنین گزارش کردند که در شرایط درون شیشه‌ای وجود پنج میلی مول در لیتر کلریدسدیم در حضور سه دهم یایک میلی مول در لیتر کلریدکلسیم روی جنین سوماتیکی و تشکیل ریشه پایه‌های کلونی، اثر مطلوبی داشته است. رنگل (۱۹۹۲) نشان داد که Ca^{2+}، اثرات نامطلوب تنش شوری را در گونه‌های مختلف گیاهان تعدیل می‌نماید (۲۵). کاربرد Ca^{2+} می‌تواند تحت تنش شوری، رشد گیاه سورگوم را افزایش دهد (۷). بعلاوه اثر متقابل Ca^{2+} بر Na^{+} روی فتوسنتز مشاهده شده است (۷). مشخص شده است که افزایش غلظت Ca^{2+} آزاد

DOR: 20.1001.1.23832592.1400.34.4.13.6

سیتوسولی، می‌تواند عمل رونویسی بیان ژن‌های تنظیم کننده اسمزی را از طریق آنزیم‌های مرتبط در بیوسنتز پرولین را القا کند (۳۱) . کلسیم عنصر مغذی مهمی در مقابله با شوری است. اثرات حفاظتی Ca^{2+} در گیاهان تحت شوری منجر به حفظ و نگهداری غشا شده است. حضور کلسیم برای نگهداری نسبت K^+/Na^+ ضروری است و از آسیب به غشا سلولی با جایگزینی Ca^{2+} با Na^+ جلوگیری می‌کند (۲۷).

در این آزمایش با بررسی مقدار پرولین مشخص شد که با افزایش تنش شوری، میزان پرولین نیز افزایش می‌یابد و بیشترین میزان پرولین در بالاترین سطح شوری ایجاد می‌گردد. این افزایش نیز با نتایج آزمایشات دیگر که در آنها اثر تنش شوری و میزان پرولین بررسی گردیده است، مطابقت دارد (۲ و ۳). کاربرد پرولین به عنوان منبع قوی برای کربن و نیتروژن و از بین بردن رادیکالهای آزاد است (۱۰ و ۱۲). پرولین همچنین تثبیت کننده ساختارهای سلولی مانند غشا و پروتئین و منشا حفظ پتانسیل سلولی تحت شرایط تنش می‌باشد. تجمع پرولین در سیتوسول در پاسخ به تنش شوری، نشان‌دهنده نقش آن به عنوان تنظیم کننده اسمزی است (۱۹). علاوه بر آن دیگر ترکیبات حاوی نیتروژن از قبیل آمینو اسیدها، پلی آمین‌ها و پروتئین‌های محلول می‌توانند بافت گیاه را در برابر تنش اسمزی حفظ کنند (۱۶ و ۲۳). پیشنهاد شده است که پرولین به عنوان یک آنتی اکسیدان در محافظت از سلولها در برابر تنش های مختلف غیر زیستی عمل کند ، زیرا پرولین موجب پاکسازی رادیکال های آزاد شده و تجمع انواع اکسیژنهای فعال را مهار می کند (۱۷).

نتایج آزمایش کاربرد همزمان نمک های سدیم و کلسیم آشکار نمود که هر چند تیمار شاهد در تمامی صفات رشدی از نظر آماری تفاوت معنی داری با سایر تیمارها نشان می‌دهد و گیاه رشد، وزن تر، تعداد برگ و طول شاخه بیشتری داشته است ولی با افزایش شوری، به علت حضور کلسیم در ترکیب تیمارها، از نظر آماری تفاوت معنی داری در وزن خشک ریزنمونه ها بین تیمارهای به کار رفته تا سطح ۱۲۰ میلی مولار NaCl وجود ندارد که این موضوع بر نقش مهم کلسیم در کاهش اثرات شوری تأکید می‌کند. ضمناً با توجه به اینکه تیمار پنج میلی مولار کلرید کلسیم و ۴۰ میلی مولار کلرید سدیم از نظر وزن تر و طول شاخه پس از شاهد بیشترین مقدار را داشت میتواند به عنوان تیمار مطلوب در نظر گرفته شود و در شرایط تنش شوری این تیمار قابل توصیه است. از طرف دیگر نتایج آزمایش حاکی از آن است که گلابی درگزی گیاهی است که احتمالا نمی‌تواند تنش شوری را تحمل کند، زیرا با افزایش شوری از سطح شاهد به ۴۰ میلی مولار کاهش معنی داری در وزن تر، تعداد برگ ها و طول شاخه بوجود آمد.

منابع

۱- منیعی ع. ۱۳۷۹. گلابی و به و پرورش آنها. چاپ دوم. شرکت انتشارات فنی ایران.

۲- راسخ، فاطمه، روشن، وحید، وزیری، خلدبرین، بهمن. ۱۳۹۸. ا ثر تنش شوری بر ویژگی های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه داروئی بابونه(*Matricaria chamomilla*) . مجله پژوهش های گیاهی. ۳۲(۳): 659-673.

۳- رستمی، مجید، جوادی، احمد، حسینی زاده، سید مجید. ۱۳۹۹. القای مقاومت به تنش شوری در بذرهای بدست آمده از بوته های گندم محلول پاشی شده با نانواکسید روی و آهن. مجله پژوهش های گیاهی . ۳۳(۳): 553-565.

۴- محسنی، زهرا، مرادیان، فاطمه، راهداری، پروانه. ۱۲۹۸. بررسی فعالیت آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز و میزان سدیم، پتاسیم و محتوای رنگدانه در گیاه هالوفیت اسفناج (*Spinacia oleracea* L.) نسبت به تنش کلریدسدیم. ۳۲(۴): 698-712.

5- Alizadeh, M., Singh S. K., Patel, V. B., Bhattacharya, R. C. and Yadav, B. P. 2010. In vitro responses of grape rootstocks to NaCl. Biol. Plantarum. 54 (2): 381-385.

DOR: 20.1001.1.23832592.1400.34.4.13.6

6- Bates, L.S., R.P. Weldren, and I.D. Tear. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil. 39: 205-207.

7- Bernstein, N., Lauchli, A. and Silk, W. K. 1993. Kinematics and dynamics of sorghum (*Sorghum bicolor L.*) leaf development at various Na/Ca salinities (I. Elongation growth). Plant Physiol. 103: 1107-1114.

8- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. biochem. 72: 248-254.

9- Chance, B. and Maehly, A. C. 1995. Assay of catalase and peroxidase In: Colowick S.P. and N.D. Kaplan (eds). Methods in Enzymology. Academic Press. New York, 2: 764-791.

10- Chelli-Chaabouni Mosbah, A. B., Maalej, M., Gargouri, K., Gargouri-Bouzid, R.and Drira, N. 2010. In vitro salinity tolerance of two pistachio rootstocks (*Pistacia vera L.*) and (*P. atlantica* Desf). Environ. and Exp. Bot. 69: 302-312.

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

12- Dermiral, T. and Turkan, I. 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defence system and proline content in root of two rice cultivars differing in salt tolerance. Environ and Exp Bot. 53(3): 247-257.

13- D' onofrio, C. and Morini, S. 2002. Increasing NaCl and CaCl2 concentrations in the growth medium of quince leaves: I, Effects on somatic embryo and root regeneration. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 38: 366-372.

14- Erturk, U., Sivritepe, N., Yerlikaya, C., Bor. M., Ozdemir, F. and Turkan, I. 2007. Response of the cherry rootstock to salinity in vitro. Biol. Plantrum. 51(3): 597-600.h

15- Irigoyen, J. J., Emerich, D. W., and Sanchez-Diaz, M. 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicage sativa*) plants. Plantarum. 84: 67-72.

16- Jaleel, C. A., Gopi, B., Sankar, P., Manivannan , A., Kishorekumar, R. S. and Panneers, L. 2007, Studies on germination, seedling vigor, Lipid peroxidation and proline metabolism in Catharanthus roseus seedling under salt stress. S. Afr. J. Bot. 73(2): 190-195.

17- Kibria, M. G., Hossain, M., Murata, Y. and Hoque, A. (2017). Antioxidant Defense Mechanisms of Salinity Tolerance in Rice Genotypes. Rice Science, 24, 155-162.

18- Kozlowski, T. T. 1997. Responses of woody plants to flooding and salinity. Tree physiology, 17(7), 1-29.

19- Mandhania, S., Madan, S. and Sawheny, V. 2006. Antioxidant defence mechanism under salt stress in wheat seedlings. Biol. Plantarum. 50(2): 227-231.

20- Mattioni, C., Lacerenza, N. G., Troccoli, A., Leonardis . A. M., and. Fonzo, N. 1997. Water and salt stress-induced alterations in proline metabolism of (*Triticum durum*) seedlings. Physiol. Plantarum. 101: 787-792.

21- Murashige., T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Plant Physiol. 15: 473-497.

22- Parida, A. K. and Das, A. B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plant: a review. Ecotoxicol. Environ. Saf. 60: 324-349.

23- Rai, V. K. 2002. Role of amino acids in plant responses to stresses. Biol. Plant. 45: 481-487.

24- Reddy, A.K., Yugandhar, P. and Savithramma, N. 2013. Calcium chloride ameliorated sodium chloride salt stress in seedling growth of black gram (Vigna mungo L. Hepper). Int.J.Adv.Sci.Tech.Res., 5(3): 151-161.

25- Rengel, Z. 1992. The role of calcium in salt toxicity. Plant Cell Environ. 15: 625-632.

26- SAS. 2001. SAS User's Guide: Statistics. Version 9.1. SAS Institute. Cary, NC, USA.

27- Shibli, R., Mohammad, M., Abu-Ein, A. and Shatnawi, M. 2000. Growth and micronutrient acquisition of some apple varieties in response to gradual in vitro induced salinity. J. Plant Nutr. 23(9):1209-1215.

28- Shiyab, M. S., Shibli , R. A., Mohammad, M. M. 2003. Influence of sodium chloride salt stress on growth and nutrient acquisition of sour orange in vitro. J. Plant Nutr. 26 (5): 985–996.

29- Smith, T .K., 1978. Role of calcium in serine transport into tobacco cells. Plant Physiol. 62: 1941-948.

30- Sotiropoulos, T. E. and Dimassi, K. 2004. Response to increasing rates of boron and NaCl on shoot proliferation and chemical composition

DOR: 20.1001.1.23832592.1400.34.4.13.6

of in vitro kiwifruit shoot tip cultures. Plant Cell Tissue Organ cult.79: 285-289.

31- Sotiropoulos, T. E., Dimassi, K. N, Tsirakoglou, V. and Therios, I. N. 2006. Responses of two *Prunus* rootstock to KCl induced salinity in vitro. Biol. Plant. 50 (3): 477-480.

32- Sotriopoulos, T. E. 2007. Effect of NaCl and $CaCl_2$ on growth and contents of minerals, chlorophyll, proline and sugar in the apple rootstock M4 cultured in vitro. Biol. Plant. 51 (1): 177-180.

33- Roussos, P. A.and Pontikis, C.A. 2003. Long term effects of sodium chloride salinity on growing in vitro, proline and phenolic compound content of jojoba explants. Eur. J. Hortic. Sci. 68 (1): 38–44.

34- Zhang, Y. J., Qian, Y. Q., Mu, X., Cai, Q. G., Zhou, Y. L. and Wei, X. P. 1998. Plant regeneration seedling leaf protoplasts of (*Actinidia eriantha* Benth). Plant Cell Rep.17: 819-821.

35- Zhu, J., Hasegawa, B. and Bressan, R. A. 1997. Molecular aspects of osmotic stress in plants. Crit. Rev. Plant Sci. 16: 253-277.

Effects of NaCl and $CaCl_2$ on growth and biochemical responses of pear (*Pyrus communis* cv. "Dargazi") in vitro

Zafari F.[1], Noroozisharaf A.[2] and Almasi P.[2]

[1] Dept. of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, I.R. of Iran.

[2] Dept. of Horticulture and Landscape Engineering, Sayyed Jamaleddin Asadabadi University, Asadabad, I.R. of Iran.

Abstract

This study was conducted to evaluate the growth and biochemical responses of Pear (Pyrus communis cv. Dargazi) to salinity created by NaCl and CaCl2. The experiment was set up as a completely randomized design wth 9 treatments and 6 replications. The treatments were included control, 40 mM NaCl + 5 mM CaCl2, 40 mM NaCl + 10 mM CaCl2, 80 NaCl + 5 mM CaCl2, 80 mM NaCl + 10 mM CaCl2, 120 NaCl + 5 mM CaCl2 , 120 mM NaCl + 10mM CaCl2, 160 mM NaCl + 5 mM CaCl2, 120 mM NaCl + 10 mM CaCl2 which added to Murashige and Skoog (MS) medium. Shoots were grown in vitro for 8 weeks. Growth parameters such as fresh and dry weight, shoot length, leaf numbers and biochemical parameters like protein content, catalase activity, proline and soluble sugar were studied. Salt stress decreased fresh and dry weight significantly. The highest dry weight was observed in 40 mM NaCl + 5 mM CaCl2 treatment that mean the Ca role in decreasing destructive salinity effect. Catalase activity was not affected by salinity. Proline, protein and soluble sugars were affected by salinity. The dry weight, protein, proline and soluble sugars contents in NaCl + 5 mM CaCl2 treatment were more than NaCl + 10 mM CaCl2. The highest proline concentration was obtained in 160 mM NaCl + 5 mM CaCl2. The highest soluble sugars concentration was observed in 120 mM NaCl + 5 mM CaCl2.

Key words: Pear, NaCl, $CaCl_2$, Growth, In vitro.