تاثیر نانوذرات کلسیم بر سرمای دیررس بهاره

حسنا کیافر[۱*]، موسی موسوی[۲]، علی عبادی[۳]، نورا... معلمی[۴] و محمد رضا فتاحی مقدم[۵]

۱-دانش-آموخته دکتری، گروه باغبانی، دانشگاه شهید چمران اهواز ، اهواز

۲-استادیار، گروه باغبانی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز،

۳-استاد، گروه باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۴-استاد، گروه باغبانی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز

۵-استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

*- ایمیل نویسنده مسئول: hosnakia@yahoo.com

چکیده

سرمازدگی دیررس بهاره باعث آسیب به جوانه‌های گل هلو می‌گردد. صدمه سرما به جوانه‌های گل یکی از مشکلات مهم و جدی تولیدکنندگان هلو در مناطق معتدله کشور باشد و باعث کاهش میزان تولید این محصول گردد. همزمان با گسترش علوم مختلف استفاده از تنکنولوژی نانو ذرات نیز گسترش یافته است. ازجمله عناصر موثر در کنترل تنش سرمایی می‌توان به عنصر کلسیم اشاره نمود و لذا هدف این تحقیق بررسی تاثیر نانو ذرات کلسیم بر تغییرات آنزیمی هلو (رقم ولدآبادی) تحت تنش سرما می‌باشد. پژوهش حاضر در طی سال های زراعی (۱۳۹۴ الی۱۳۹۶) به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار در باغ تجاری واقع در هشتگرد کرج اجرا گردید. فاکتورهای آزمایش شامل سه غلظت ۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات کلسیم بود که در زمان قبل از تورم کامل جوانه گل‌ها و در مرحله مرحله باز شدن شکوفه‌ها بر روی درختان محلول‌پاشی گردید. سپس شاخه‌ها به مدت ۵ ساعت در دستگاه سرماساز در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس میزان پروتئین کل، پرولین کل، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و میزان آنتی‌اکسیدان کل اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که نانو ذرات کلسیم باعث افزایش ، میزان پروتئین، پرولین کل، میزان آنزیم‌های کاتالاز و آنتی‌اکسیدان کل در مقایسه با شاهد گردید. با افزایش غلظت ،نانوذرات کلسیم میزان پروتئین، پرولین کل، میزان آنزیم‌های کاتالاز و آنتی‌اکسیدانی کل افزایش یافت و تیمار ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات کلسیم بیشترین اثربخشی را در افزایش تحمل به سرما داشت.

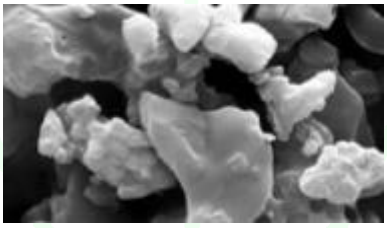
واژه‌های کلیدی : اکسیداسیون غشا سلولی، تحمل به سرما، سرمازدگی بهاره، نانوذرات کلسیم، هلو.

مقدمه

میوه هلو به دلیل جذابیت ظاهری و طعم عالی یکی از میوه‌های پرطرفدار در سراسر دنیا است. (Scot and Chen, 2013). دما مهمترین عامل تعیین و توزیع گونه‌های گیاهی در روی زمین محسوب می‌شود و می‌تواند هم عملکرد و هم توزیع محصولات زراعی و باغی را محدود کند (Ashworth, 1992) در سال‌های اخیر استفاده از نانو ذرات بسیار گسترش یافته است (Aslani *et al*., 2014). به طور کلی به موادی که ساختار آن‌ها کوچکتر از ۱۰۰ نانومتر باشد نانوذرات گفته می‌شود. نانوذرات به دلیل کوچک بودن ابعاد از ویژگی‌ها و تفاوت‌های خاصی برخوردارند که این ویژگی‌ها باعث تغییر در توان فیزیکی، واکنش شیمیایی و هدایت الکتریکی آن‌ها می‌گردد .فن‌آوری نانو به عنوان یک علم نوظهور و در حال رشد سریع می‌تواند در بهبود بسیاری از این عوامل استرس‌زا کمک کند از جمله می‌توان به فعال نمودن مکانیسم‌های مختلفی از جمله سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی اشاره نمود (Hashemi deh kordi *et al*. 2016). یون‌های کلسیم یکی از مهمترین عناصر سیستم سیگنالینگ درون سلولی در گیاهان هستند. کلسیم تنظیم کننده متابولیسم مؤثر در کلیه سیستم‌های سلولی است که این مهم از طریق تغییر در میزان غلظت‌های Ca^{+2} اتفاق می‌افتد (Reddy and Savithramma, 2013). سیگنال‌های تنش توسط سنسورهای گیرنده کلسیم دریافت می‌شود (Allen *et al*., 1995) و در نتیجه منبع فسفوریلاسیون پروتئین‌ها در داخل سلول‌ها فعال شده و به دنبال آن تغییر در فعالیت آنزیم‌ها، ژن‌ها و کانال‌های یونی ایجاد می‌گردد. این فرایند باعث بیان یکسری ژن‌ها بسته به شرایط محیطی می‌گردد و پاسخ‌هایی از طرف گیاه به شرایط تنش داده می‌شود که می‌تواند تحمل گیاه، کنترل رشد گیاه و یا مرگ آن را به دنبال داشته باشد (Bowler *et al*., 1994). با توجه به مزایای ذکر شده درباره کلسیم و نانوذرات در این تحقیق به بررسی تاثیر نانوذرات کلسیم بر میزان تحمل به سرما در رقم ولد آبادی پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در هشتگرد کرج در مختصات جغرافیایی ۳۵ درجه شمالی و۵۰ درجه شرقی و ارتفاع ۱۲۰۰ متر از سطح دریا بر روی درختان هلو چهار ساله پایه بذری انجام گرفت. به منظور اجرای آزمایش از هر درخت ۴ شاخه مشابه از نظر قطر، طول و تعداد گل نسبتا برابر انتخاب گردید و برای هر غلظت از هر رقم ۳ درخت به عنوان تکرار انتخاب گردید و سپس با غلظت صفر (آب مقطر)، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات کلسیم با سایز ذره ۸۵ نانومتر (شکل۱) خریداری شده از شرکت سپهر پارمیس در زمان قبل از تورم کامل جوانه گل‌ها و در مرحله باز شدن کامل تمام جوانه های گل محلول‌پاشی گردید و سپس شاخه‌ها به منظور تیمار سرمایی مصنوعی به آزمایشگاه انتقال یافتند و به مدت ۵ ساعت در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد تیمار گردیدند (بلانیان، ۱۳۹۴). میزان پروتئین کل، پرولین کل، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسداز و ظرفیت انتی‌اکسیدانی کل محاسبه گردید. میزان کلسیم در هر کدام از تیمارها و شاهد با استفاده از طیف سنج جذب اتمی(Perkin Elmer, Model 3110) نتایج بر مبنای میلی‌گرم در گرم وزن خشک اندازه‌گیری شد (طباطبایی، ۱۳۸۸).



شکل۱- تصویر SEM نانو ذرات کلسیم تولید شده توسط شرکت سپهر پارمیس

برای اندازه‌گیری میزان پروتئین کل از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده گردید. برای این منظور ۱ سی‌سی محلول برادفورد داخل تیوب‌های ۱/۵ سی‌سی ریخته شد و سپس ۵۰ میکرولیتر به آن عصاره اضافه شد و پس از ۲۰ دقیقه جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان پرولین با استفاده از ماده نایین هیدرین اندازه‌گیری شد. ابتدا ۰/۲ گرم از بافت چوانه‌های گل در هاون چینی همراه با ۳ میلی‌لیترسولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد خرد گردید و سپس به مدت ۱۵ دقیقه (۱۸۰۰۰ دور در دقیقه) سانتریفیوژ گردید و در مرحله بعد دو میلی‌لیترمعرف نایین هیدرین و دو میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال اضافه گردید. سپس لوله‌های آزمایش به مدت یک ساعت در حمام آب گرم قرار داده شدند و بعد از سرد شدن به آن چهار میلی‌لیتر تولوئن اضافه گردید. سپس روشناورکه حاوی پرولین بود به کمک سمپلر برداشته و همراه با نمونه‌های استاندارد در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد (Girija *et al*., 2002). فعالیت آنزیم کاتالاز (EC 1.11.1.6) از طریق اندازه‌گیری میزان کاهش جذب ناشی از تجزیه سوبسترای پراکسید هیدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر به روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. یک واحد یا یونیت فعالیت آنزیم کاتالاز به عنوان مقدار آنزیم مورد نیاز برای تجزیه 1 میلی مول سوبسترای پراکسید هیدروژن در یک دقیقه در نظر گرفته می‌شود. فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز به صورت یونیت بر میلی گرم پروتئین بیان شد (Obinger *et al*., 1997). فعالیت آنزیم پراکسیداز (EC 1.11.1.7) از طریق اندازه‌گیری میزان افزایش جذب ناشی از تشکیل تتراگایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر به روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. محلول آزمایش حاوی بافر سیترات فسفات بورات ۰/۱ مولار، گایاکول با غلظت 15 میلی‌مولار، عصاره گیاهی (حاصل از گل‌ها) و H_2O_2 با غلظت 3 میلی‌مولار مورد استفاده قرار گرفت .یک یونیت فعالیت آنزیم پراکسیداز به عنوان مقدار آنزیم مورد نیاز برای تشکیل 1 میلی‌مول تتراگایاکول در یک دقیقه در نظر گرفته می‌شود. فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز به صورت یونیت بر میلی‌گرم پروتئین ثبت شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش DPPH تعیین گردید (Miliauskas and Van Beek, 2004). به این منظور ۲۵میکرولیتر از عصاره متانولی با ۲۵ میکرولیتر آب مقطر مخلوط گردید و در مرحله بعدی ۱۹۵۰ میکرولیتر محلول تازه DPPH (۹۸/۸ میکرومول در متانول) به آن اضافه گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه و در شرایط تاریکی تا زمان یکنواختی محلول نگهداری شدند. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. جهت ثبت داده‌ها، نرم افزار Excel مورد استفاده قرار گرفت و پس از آزمون نرمال بودن توزیع کلیه داده‌ها، تجزیه تحلیل واریانس به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با سه تکرار با نرم افزار (SAS) انجام گرفت.

نتایج و بحث

همانطور که در جدول (۱) نشان داده شده است بین غلظت‌های مختلف نانوذرات کلسیم از نظر خصوصیات بیوشیمایی تحت بررسی اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد وجود دارد. افزایش غلظت نانو ذرات کلسیم باعث افزایش در تمام خصوصیات شیمیایی

گردید که این مهم می‌تواند باعث افزایش تحمل به سرما در مرحله شکوفایی گل‌های هلو گردد. بر خلاف سایر عناصر پرمصرف بخش عمده کلسیم در دیواره سلول بافت‌های گیاهی قرار دارد. پس از تنش سرما از هم‌پاشیدگی اجزا دیواره سلولی و قهوه‌ای شدن اندام‌ها قابل مشاهده می‌باشد که دلیل آن از هم‌پاشیدگی دیواره سلولی و نشت یون‌ها می‌باشد که کلسیم می‌تواند تا مقدار قابل توجهی آن را کنترل نماید (صالحی، ۱۳۸۵). در زمان مواجه شدن با شرایط سرما، غلظت کلسیم درگیاهان سازگار شده با سرما به صورت موقتی افزایش می‌یابد. گرچه اطلاعات کمی در مورد میزان کلسیم و شوک سرما و مقاومت به سرما وجود دارد اما نتایج بیانگر آن است که کاربرد کلسیم به صورت یک کود موجب افزایش مقاومت به یخزدگی در درخت سپیدار شده‌است (Scalet *et al.*, 1995) که با نتایجبه‌دست آمده در این تحقیق مطابقت دارد. میزان پروتئین موجود به عنوان معیاری جهت ارزیابی مقاومت به سرما در گیاهان مورد مطالعه می‌باشد. نتایج نجف‌زاده (۱۳۸۹) بیانگر افزایش پروتئین در برگهای لیموآب شیراز تحت تیمار با اسپرمین و کلسیم در تنش سرمایی بود و تیمار کلسیم و اسپرمیدین موجب حفظ پروتئین و کاهش تجزیه آنها در برگ‌های لیموآب تحت تنش شده بود. نتایج این تحقیق بیانگر افزایش میزان پروتئین بود که احتمالاً باید به دلیل حفظ ساختار فضایی پروتئین‌های تحت تیمار با نانوذرات کلسیم باشد که در تحقیق جاری نیز تیمار با نانوذرات کلسیم باعث افزایش میزان پروتئین گردید. همچنین نتایج مرتضوی و همکاران (۱۳۸۱) بیانگر تاثیر مثبت تیمارهای حاوی کلسیم بر حفظ میزان پروتئین در گل رز شاخه بریده می باشد به طور کلی می‌توان از پرولین به عنوان یک شاخص معتبر در ارزیابی اثرات تنش‌های محیطی استفاده نمود. نقش پرولین حفاظت از غشاء تیلاکوئیدها در برابر نشت الکترولیت‌ها در زمان مواجهه با تنش سرما می‌باشد (Ruiz *et al.*, 2002). پرولین برای سازگاری در گیاهان به انواع تنش‌ها ضروری است. پرولین در تنظیم اسمزی، عمل آنتی‌اکسیدانی، اثرات حمایتی از سلول، ذخیره کربن و انرژی نقش اساسی دارد (Kuznetsov and Shevyakova, 1999). همچنین نتایج این آزمایش با نتایج آزمایشات نتایج نجف‌زاده (۱۳۸۹) بر روی لیمو آب مطابق است. افزایش درون سلولی غلظت یون کلسیم منجر به فعال شدن بعضی از آنزیم‌ها می‌شود. این آنزیم‌ها به نوبه خود موجب فعال شدن آنزیم‌های دیگری مانند پروتئین فسفاتاز و پروتئین کیناز می‌شوند. برخی از این آنزیم‌ها مانند ATPase که تولید انرژی می‌کند در فرآیند انتقال یون‌ها دخالت داشته و فعال شدن آنها موجب انتقال کلسیم به خارج از سیتوپلاسم و کاهش غلظت آن درسیتوپلاسم می‌شود. کلسیم با فعال کردن ژن‌های مختلف در تنظیم فرآیندهای بیوشیمیایی سلول در راستای سازگاری با شرایط محیط موثر است (کافی و مهدوی دهقانی، ۱۳۸۱). رسولی صدقیانی و همکاران (۱۳۹۶) به بررسی تاثیر منابع مختلف کلسیم بر فعالیت آنتی اکسیدانی و آنزیمی سیب پرداختند و بیان نمودند به طور کلی تیمار با کلسیم باعث بهبود خصوصیات کمی و کیفی در سیب می گردد و این در حالی است که این مهم با تاثیر این عنصر بر سیستم آنزیمی مانند آنزیم های کاتالاز و آنتی اکسیدان کل می‌باشد. برای جلوگیری از ایجاد خسارت توسطROS ها، آنتی‌اکسیدان‌ها با دادن الکترون به آن‌ها، اکسید شده و قدرت اکسیدکنندگی و ایجاد خسارت توسط ROS ها را از بین می‌برند لذا تیمار های حاوی کلسیم با حفظ انتی اکسیدان ها به حفظ گیاه کمک می نمایند که نتایج فوق با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

جدول ۱- جدول تجزیه مرکب برخی خصوصیات بیوشیمایی تحت تیمار با نانوذرات کلسیم

	درجه آزادی Df	پروتئین کل	کاتالاز	پرولین	پراکسیداز	ظرفیت آنتی اکسیدان کل
سال	۱	۰/۲۶ ns	۰/۰۵ ns	۰/۱۰ ns	۰/۰۴ ns	۰/۰۳ ns
تکرار×سال	۴	۰/۱۰ ns	۰/۱۵ ns	۰/۰۱ ns	۰/۰۸ ns	۱/۵۴ ns
غلظت	۲	۴۱/۹۷**	۲۳۶/۶۹**	۵۵/۸۴**	۱۰۵/۲۰۲**	۲۵/۱۰۵**
غلظت×سال	۲	۰/۰۰۲ ns	۰/۰۵ ns	۰/۰۴ ns	۰/۰۰۰۰۰۰ ns	۰/۲۲ ns
خطا آزمایش	۸	۰/۱۲	۰/۳۱	۰/۲۲	۰/۰۱	۰/۸۵

ns، * و ** به ترتیب عدم وجود اختلاف معنی دار، معنی دار در سطح ۵ و ۱ درصد را نشان می دهد.

منابع

بلانیان، ح. ۱۳۹۴. بررسی برخی از شاخص‌های مرتبط با مقاومت به یخ زدگی در تعدادی از ارقام و ژنوتیپ های انار. دانشگاه تهران. تهران. رساله دکتری.

رسولی صدقیانی، م.، مقدس گرانی، م.، اشرفی سعیدلو، س. و سپهری، ا. ۱۳۹۶. تأثیر کاربرد منابع مختلف کلسیمی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، آنزیمی و خصوصیات کیفی سیب (*Malus domestica*). تولید و فرآوری محصولات زراعی و باغی. ۲ :۸۷-۷۳.

صالحی، ف. ۱۳۸۵. شناخت خاک و تغذیه پسته. سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، موسسه تحقیقات پسته کشور، ۹۹ صفحه

کافی، م . و ع. مهدوی دامغانی، ۱۳۸۱ . مکانیسم های مقاومت گیاهان به تنش های محیطی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ۴۷۲ صفحه.

مرتضوی، س.، و نادری، ر.، و کافی، م.، و خلیقی، ا.، و بابالار، م. و علی زاده، ه. ۱۳۸۷. بررسی اثرات مصرف کلسیم و سیتوکنین بر صفات مورفوفیزیولوژیکی رز شاخه بریده رقم الونا. مجله علوم باغبانی ایران. ۳۹: ۸۱-۸۸.

نجف زاده، م. ۱۳۸۹. بررسی کاربرد پلی‌آمین و کلسیم بر مقاومت به دمای پایین در گیاهچه‌های لیموآب (*Citrus aurantifolia*) پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه گیلان.

Ashwort, E. N. 1991. Formation and spread of ice in plant tissues. Scientia Horticulturae, 13: 215-225.

Aslani, F., Bagheri, S., Julkapli, N. M., Juraimi, A. S., Hashemi, F.S.G., Baghdadi, A. 2014. Effects of engineered nano materials on plants growth: an overview. Scientific World Journal, 64: 165–177.

Bowler, C., Neuhaus, G., Yamagata, H., Chua, N. H. 1994. Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome photo transduction. Cell, 77: 73–81.

Hashemi dehkourdi, E., mousavi, M., moallemi, N., ghafarian moghare, M. H. 2016. Effect of nanoparticles of titanium dioxide (anatase) on some physiological and morphological characteristics of strawberry (*Fragaria ananassa* c.v.Queen Elisa) in hydroponic condition. Journal of plant process Function, 5:1-8.

Kuznetsov, V. I. V., Shevyakova, N. I. 1999. Proline under stress: Biological role, metabolism and regulation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 46: 274-287.

Miliauskas G. P.R., and Van Beek T. A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chemistry, 85: 231-237.

Reddy, A., Savithramma, N. 2013. Effect of calcium chloride on growth and biochemical changes of black gram (*Vigna mungo* L.) under salt stress. Golden Research Thoughts, 3: 1-6.

Ruiz, M. J., Sanchez, P. C., Garcia, L. R., Lopez-Lefebre, R. M. Rivero, L., Romero, L. 2002. Proline metabolism and NAD kinase activity in green bean plants subjected to cold-shock. Photochemistry, 59: 473–478.

Scott, N., Chen, H. 2013. Nanoscale science and engineering for agriculture and food systems. Industrial Biotechnology,1: 8-20.

Effect of calcium nanoparticles on late spring frost

Hosna Kiafar[1]*, Mousa Mousavi[2]*, Ali Ebadi [3], Noorollah Moallemi [4] and Mohamad Reaz Fattahi Moghadam [5]

[1] PhD Student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz

[2] Assistant Professor, Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz

[3] Professor Faculty of Agriculture, University of Tehran

[4] Professor, Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz

[5] Professor Faculty of Agriculture, University of Tehran

Corresponding Author: hosnakia@yahoo.com

Abstract

Late spring frosts can damage peach blossom buds. Cold damage to flower buds is one of the most important and serious problems of peach growers in temperate regions of the country and reduces the production of this product. Simultaneously with the development of various sciences, the use of nanoparticle technology has also expanded. One of the effective elements in controlling cold stress is calcium and therefore the aim of this study was investigate the effect of calcium nanoparticles on enzymatic changes of peach flowers (Valadabadi cultivar) under cold stress. The present study was carried out during the cropping years (2015-2017) in a factorial form in a randomized complete block design with three replications in the commercial garden located in Hashtgerd, Karaj. Experimental factors included three concentrations of 0, 10 and 20 mg / l calcium nanoparticles that were sprayed on popcorn stage and fullbloom. The shoots were placed in the refrigerator for 4 hours at 4 ° C. Then total protein, total proline, catalase activity and total antioxidant were measured. The results showed that calcium nanoparticles increased protein, total proline, catalase and total antioxidants compared to the control. With increasing concentration, calcium nanoparticles increased the amount of protein, total proline, the amount of catalase enzymes and total antioxidants, and treatment of 20 mg / l of calcium nanoparticles was most effective in increasing cold tolerance.

***Keywords*:** calcium nanoparticles, Cell membrane oxidation, cold tolerance, peach, spring frost tolerance**.**