

اثر کاربرد کلسیم بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و عملکرد دانه سویا در شرایط آلودگی خاک به سرب

امید صادقی‌پور*

دانشیار گروه زراعت، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: osadeghipour@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۱/۲۰

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۰۱

چکیده

کلسیم نقش مهمی در رشد و نمو گیاه و واکنش به تنش‌های محیطی ایفا می‌کند. با این وجود اثر آن در واکنش گیاه به تنش فلزات سنگین به‌طور گسترده‌ای مورد بررسی قرار نگرفته است. لذا به‌منظور بررسی نقش کلسیم در تحمل به تنش سرب در سویا آزمایشی گلدانی در منطقه واوان واقع در جنوب تهران انجام شد. این تحقیق به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. تیمارها شامل سه سطح سرب (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم نیترات سرب بر کیلوگرم خاک) و سه سطح کلسیم (صفر، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم کلرید کلسیم بر کیلوگرم خاک) بود. نتایج نشان داد که تنش سرب غلظت سرب ریشه، پراکسیداسیون چربی‌ها و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را افزایش داد. سمیت سرب هم‌چنین موجب کاهش صفات شاخص سبزی‌نگی، محتوای آب نسبی، سطح برگ، زیست توده و عملکرد دانه سویا شد. از سوی دیگر تحت شرایط تنش سرب، کاربرد کلسیم به‌ویژه ۴۰۰ میلی‌گرم کلرید کلسیم بر کیلوگرم خاک موجب کاهش جذب سرب و پراکسیداسیون چربی‌ها و فعالیت بیش‌تر آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز شد. کاربرد کلسیم باعث بهبود صفات مرتبط با رشد از جمله شاخص سبزی‌نگی، محتوای آب نسبی، سطح برگ، زیست توده و عملکرد دانه سویا شد. این نتایج نشان داد که کلسیم می‌تواند از طریق کاهش جذب سرب، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، بهبود وضعیت آبی گیاه و محتوای کلروفیل به‌عنوان ابزاری مفید در تحمل به تنش سرب در سویا مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: حبوبات، عملکرد دانه، فلزات سنگین و محتوای آب نسبی.

مقدمه

افزایش تقاضای سویا (*Glycine max* L.) به‌عنوان منبع روغن خوراکی، پروتئین و سایر محصولات صنعتی مانند شیر سویا، سوخت زیستی و خوراک دام از جمله عواملی هستند که افزایش تولید آن را توجیه می‌کنند با این وجود تولید این گیاه در اثر عوامل زیستی و غیر زیستی محدود می‌شود (Paudel *et al.*, 2017). آلودگی خاک‌های کشاورزی به فلزات سنگین به‌دلیل اثرات نامطلوب اکولوژیکی تبدیل به یک نگرانی جدی زیست محیطی شده است. سرب به‌عنوان یک آلاینده فلزی به‌علت تشدید فعالیت‌های انسانی بر محیط زیست توجه زیادی را به‌خود جلب کرده است. علاوه‌بر فرایندهای هوازدگی طبیعی، منابع اصلی آلودگی سرب، دودهای خروجی از خودروها، دودکش‌های کارخانه‌های استفاده‌کننده از سرب، صنایع باتری‌سازی، معدن‌کاوی و ذوب‌کاری سنگ‌های معدنی حاوی سرب، فاضلاب، کودهای شیمیایی، آفت‌کش‌ها و مواد افزودنی به رنگیزه‌ها و بنزین می‌باشند (Nagajyoti *et al.*, 2010; Sadeghipour, 2017). سرب عنصری ضروری برای رشد گیاه محسوب نمی‌شود. گیاهانی که در خاک‌های آلوده به سرب رشد می‌کنند، اختلالاتی در فعالیت‌های آنزیمی، وضعیت تغذیه‌ای، آبی، هورمونی و ساختار غشایی خود نشان می‌دهند. تنش سرب هم‌چنین موجب تخریب ساختار کلروپلاست، کاهش ساخت کلروفیل، ممانعت از انتقال الکترون، جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های چرخه کلوین، کاهش فتوسنتز، توقف رشد و کاهش عملکرد می‌شود. مسمومیت سرب هم‌چنین از طریق افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال^۱ (ROS) باعث پراکسیداسیون چربی‌ها و آسیب به اسیدهای نوکلئیک و در نهایت مرگ سلول می‌گردد (Pourrut *et al.*, 2011; Sharma and Dubey, 2005). کلسیم یک عنصر غذایی ضروری برای گیاه به‌شمار می‌رود. به‌عنوان یک کاتیون دوظرفیتی (Ca^{2+}) برای فعالیت‌های ساختاری دیواره و غشای سلول، یک کاتیون متقابل برای آنیون‌های آلی و غیر آلی درون واکوئل و یک پیام‌رسان درون سلولی لازم است. کلسیم نقش مهمی در تنظیم رشد و نمو گیاه ایفا می‌کند. این عنصر با اتصال به فسفولیپیدها، لایه‌های چربی را پایدار کرده و در نهایت موجب یکپارچگی ساختار غشاهای سلولی می‌شود. نتایج برخی پژوهش‌ها نشان داده که کاربرد کلسیم اثر نامطلوب تنش‌های غیر زیستی از جمله شوری (Kaya *et al.*, 2002)، خشکی (Ibrahim *et al.*, 2016)، گرما (Jiang and Huang, 2001) و کادمیوم (Suzuki, 2005) را در گیاهان کاهش می‌دهد. اثر مثبت کلسیم در بهبود تحمل به تنش‌های غیر زیستی به تنظیم روابط آبی، فعالیت سیستم‌های آنتی-اکسیدانی، انباشت اسمولیت‌ها، بهبود محتوی رنگدانه‌های فتوسنتزی و تعادل تغذیه‌ای نسبت داده شده است. در آزمایشی مسمومیت کادمیوم موجب کاهش رشد گیاهچه‌های ذرت شد، با این وجود کاربرد کلسیم از طریق افزایش جذب پتاسیم و

¹ Reactive Oxygen Species

کاهش جذب کادمیوم موجب بهبود رشد گیاهچه‌ها شد (Kurtyka et al., 2008). در تحقیق دیگری، کادمیوم ارتفاع بوته، زیست توده، محتوی کلروفیل و پروتئین شبدر سفید را کاهش و تولید رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون چربی‌ها را افزایش داد. با این حال، کاربرد خارجی کلسیم با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان، تحمل بوته‌ها به تنش کادمیوم را افزایش داد (Wang and Song, 2009). گزارش شده که کاربرد کلسیم به واسطه کاهش جذب کادمیوم، بهبود جذب عناصر غذایی ضروری، افزایش میزان پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان، موجب بهبود تحمل گیاهچه‌های خردل هندی به تنش کادمیوم شد (Ahmad et al., 2015). در آفتابگردان برگ‌پاشی کلسیم از طریق بهبود وضعیت آبی گیاه، میزان کلروفیل، فندهای محلول و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان موجب بهبود رشد و عملکرد تحت تنش آبی شد (Ibrahim et al., 2016). کاربرد خارجی کلسیم با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان، رنگدانه‌های فتوسنتزی و پرولین و همچنین کاهش جذب کادمیوم و تخریب غشاهای زیستی، بوته‌های باقلا را به تنش کادمیوم متحمل نمود (Siddiqui et al., 2012). با وجود این که نتایج آزمایش‌های قبلی به اهمیت کلسیم در بهبود تحمل گیاهان زراعی به تنش‌های غیر زیستی اشاره دارند اما اطلاعات اندکی در خصوص نقش کلسیم در تحمل به مسمومیت سرب به‌ویژه در سویا وجود دارد، لذا پژوهش حاضر به منظور بررسی اثر کاربرد کلسیم در افزایش تحمل به تنش سرب در سویا طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش گلدانی در تابستان سال ۱۳۹۴ در منطقه واوان واقع در جنوب تهران با مختصات طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۲۸ دقیقه، عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ۳۵ دقیقه و ارتفاع ۱۰۰۰ متر از سطح دریا انجام شد. این منطقه دارای اقلیمی خشک با تابستانی گرم و خشک و زمستانی سرد و خشک است. میانگین دما و بارندگی بلند مدت آن به ترتیب ۲۰/۴ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۱/۷ میلی‌متر است (بی‌نام، ۱۳۹۶). این تحقیق به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. تیمارها شامل سه سطح سرب (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم نیتрат سرب بر کیلوگرم خاک) و سه سطح کلسیم (صفر، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم کلرید کلسیم بر کیلوگرم خاک) بودند. هر گلدان پلاستیکی با قطر و ارتفاع ۴۰ سانتی‌متر حاوی ۱۵ کیلوگرم خاک به نسبت مساوی از خاک زراعی، کود دامی کاملاً پوسیده و خاک برگ بود. به منظور انجام زهکشی مناسب، کف هر گلدان چند سوراخ ایجاد و حدود پنج سانتی‌متر سنگریزه ریخته شد. ویژگی‌های خاک گلدان‌ها قبل از اعمال تیمارها در جدول ۱ ارائه شده است. سطوح تیمارهای سرب و کلسیم مطابق طرح به خاک هر گلدان اضافه شد. بذره‌های سالم و یکنواخت سویا (رقم ویلیامز) به مدت پنج دقیقه با هیپوکلریت سدیم پنج درصد ضدعفونی و سپس به خوبی با آب مقطر شستشو شدند. سپس در اواخر اردیبهشت ۱۳۹۴ تعداد ۱۵ بذر به عمق سه سانتی‌متر در هر

گلدان کشت شده و گلدان‌ها در شرایط مزرعه قرار داده شدند. پس از کاشت، آبیاری گلدان‌ها به‌طور منظم و دفع علف‌های هرز با دست انجام گرفت. در مرحله دو برگ، پس از تنک کردن، در هر گلدان شش بوته قوی و سالم حفظ شد.

جدول ۱: ویژگی‌های خاک گلدان‌ها

هدایت الکتریکی (dS/m)	اسیدیتته	مواد خنثی شونده (%)	کربن آلی (%)	نیترژن کل (%)	فسفر قابل جذب (ppm)	پتاس قابل جذب (ppm)	سرب (mg/kg)	بافت خاک
۱/۱	۷/۱	۱۰/۲	۲/۹	۰/۲۷	۱۸/۹	۴۶۱	۱/۲۱	شنی لومی

در شروع مرحله گل‌دهی، شاخص سبزینه‌گی برگ، محتوی آب نسبی^۲ (RWC) و سطح برگ بوته‌ها به شرح ذیل اندازه‌گیری شد. شاخص سبزینه‌گی برگ توسط دستگاه کلروفیل‌سنج (Chlorophyll Content Meter CL-01, Hansatech Instruments Ltd. England) از جوان‌ترین برگ‌های کاملاً توسعه یافته دو بوته و هر کدام دو قرائت ثبت گردید (Bharwana *et al.*, 2014). برای تعیین محتوی آب نسبی برگ، دیسک‌هایی به قطر یک سانتی‌متر از جوان‌ترین برگ‌های کاملاً توسعه یافته بوته‌ها انتخاب و به سرعت توزین شدند و وزن تر آن‌ها محاسبه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ظرف‌های محتوی آب مقطر در محیط تاریک قرار گرفته و وزن اشباع آن‌ها محاسبه شد. پس از آن نمونه‌ها برای ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و وزن خشک آن‌ها تعیین شد. از تقسیم تفاضل وزن تر و خشک بر تفاضل وزن اشباع و خشک، محتوی آب نسبی برگ‌ها به‌دست آمد (Jiang and Huang, 2001; Ibrahim *et al.*, 2016). برای تعیین سطح برگ بوته نیز برگ‌های دو بوته از هر گلدان به‌طور کامل جدا شده و توسط دستگاه سطح برگ‌سنج (Leaf Area Meter CI-202, CID, Bio-Science, USA) مورد محاسبه قرار گرفت (Bharwana *et al.*, 2014). همچنین نمونه‌هایی از برگ‌های بالایی و کاملاً توسعه یافته بوته جدا شده و در ظروف محتوی یخ جهت سنجش صفات بیوشیمیایی بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت استخراج آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ۰/۵ گرم از نمونه‌های برگ در هاون چینی محتوی ۳ میلی‌لیتر بافر سولفات پتاسیم (pH = ۷/۸) حاوی ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، PVP، ۱ درصد (وزنی-حجمی)، تریتون X-100 ۰/۵ درصد و گلیسرول ۲۰ درصد به خوبی ساییده شدند. سپس نمونه‌های هموژن شده با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از آن، مایع شناور به دقت جدا شده و جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان استفاده شد (Kumari *et al.*, 2010). فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز براساس سنجش مهار احیای نوری نیترو بلو تترازولیوم اندازه‌گیری شد (Beyer and Fridovich, 1987). سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز توسط پایش تجزیه H₂O₂ در

^۲ Relative Water Content

طول موج ۲۴۰ نانومتر انجام گرفت (Aebi, 1984). تعیین میزان مالون دی آلدئید به عنوان یکی از آخرین فرآورده‌های پراکسیداسیون چربی غشاها به روش Heath و Packer (۱۹۸۹) انجام شد. در انتهای فصل رشد (اواخر شهریور ماه) نیز سه بوته باقی مانده در هر گلدان برداشت شده و به ریشه و اندام هوایی تفکیک شدند. عملکرد دانه پس از آفتاب خشک شدن (با رطوبت ۱۳٪) تعیین شد. سپس تمام اندام هوایی و ریشه‌ها به طور جداگانه و به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و وزن خشک آن‌ها به دست آمد. جهت تعیین غلظت سرب ریشه، ۰/۲ گرم از نمونه ریشه‌ها آسیاب شده و هضم آن‌ها به روش هضم تر صورت گرفت. به این منظور ترکیبی از نیتریک اسید و پرکلریک اسید به کار رفت. بعد از هضم کامل نمونه‌ها، محلول‌ها با کاغذ صافی صاف شده و با آب مقطر به حجم ۲۵ میلی لیتر رسانده شدند (Wang et al., 2013). اندازه گیری غلظت سرب نمونه‌ها به وسیله دستگاه طیف سنج جذب اتمی (Shimadzu, Japan) انجام شد. در نهایت تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار آماری MSTAT-C، مقایسه میانگین‌ها به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد و رسم نمودارها نیز با نرم افزار اکسل انجام شد.

نتایج و بحث

میزان سرب ریشه

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر اصلی و هم‌چنین برهمکنش کاربرد سرب و کلسیم بر غلظت سرب ریشه سویا در سطح احتمال یک معنی دار بود به این معنی که کاربرد کلسیم در شرایط عدم مصرف و مصرف سرب اثر متفاوتی بر غلظت سرب ریشه داشت (جدول ۲). با افزایش میزان سرب خاک، به طور معنی داری بر غلظت سرب ریشه افزوده شد به طوری که در مقادیر ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم سرب بر کیلوگرم خاک، غلظت سرب ریشه به ترتیب معادل ۱۰ و ۵۰ برابر در مقایسه با تیمار عدم مصرف سرب افزایش یافت. هم‌چنین در شرایط عدم تنش سرب، با توجه به غلظت پایین این عنصر در خاک، کاربرد کلسیم اثر معنی داری بر غلظت سرب ریشه نداشت اما با افزایش میزان سرب خاک، اثر مثبت کلسیم بر جلوگیری از جذب این فلز سنگین نمایان شد، به طوری که به عنوان مثال در تیمار ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم سرب بر کیلوگرم خاک، کاربرد ۴۰۰ میلی گرم کلسیم بر کیلوگرم خاک میزان جذب سرب را به ترتیب معادل ۵۰ و ۳۱ درصد کاهش داد (جدول ۳). زمانی که سرب جذب سیستم ریشه‌ای گیاه می شود ممکن است در ریشه تجمع یافته و یا به بخش‌های هوایی گیاه منتقل شود. در اکثر گیاهان قسمت اعظم سرب جذب شده در ریشه باقی می ماند و تنها بخش کوچکی از آن به اندام هوایی انتقال می - یابد (Bharwana et al., 2014; Gupta et al., 2010). وقتی سرب وارد ریشه می شود عمدتاً از طریق آپوپلاست و جریان آب حرکت کرده تا به آندودرم برسد. چند دلیل وجود دارد که چرا انتقال سرب از ریشه به اندام هوایی محدود می -

شود. این دلایل عبارتند از: غیر متحرک شدن توسط بار منفی پکتین‌های موجود در دیواره سلول، رسوب نمک‌های نامحلول سرب در فضاهای بین سلولی، تجمع در غشاهای پلاسمایی و یا محبوس شدن در واکوئل‌های سلول‌های ریشه (Pourrut *et al.*, 2011). از سوی دیگر در پژوهش حاضر مشاهده شد که کاربرد کلسیم میزان جذب سرب توسط ریشه سویا را کاهش داد (جدول ۳). این امر می‌تواند به دلیل رقابت بین کلسیم و فلزات سنگین برای انتقال به سلول‌های ریشه از طریق ناقل‌ها باشد (Kurtyka *et al.*, 2008). همچنین چون معمولاً سطح غشای پلاسمایی دارای بار منفی است، سطوح بالای یون‌های مثبت کلسیم، این ویژگی غشای پلاسمایی را پوشش داده و خسارت کاتیون‌های سمی را کم می‌کنند. ضمن این‌که جذب فلزات سنگین از طریق کانال‌های مشابه کلسیمی نیز محدود می‌شود (Suzuki, 2005). مشابه با نتایج آزمایش حاضر، بسیاری از تحقیقات در مورد گونه‌های مختلف گیاهی نیز تایید می‌کنند که کاربرد کلسیم جذب فلزات سنگین را کاهش می‌دهد که همین امر یکی از مهم‌ترین عوامل بهبود تحمل به فلزات سنگین در اثر کاربرد کلسیم است. (Kurtyka *et al.*, 2008; Nazar *et al.*, 2012; Suzuki, 2005; Ahmad *et al.*, 2015; Siddiqui *et al.*, 2012)

مالون‌دی‌آلدئید (MDA)

اثر اصلی و برهمکنش کاربرد سرب و کلسیم بر میزان مالون‌دی‌آلدئید برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). کاربرد کلسیم در سطوح مصرف و عدم مصرف سرب اثر متفاوتی بر محتوی مالون‌دی‌آلدئید برگ داشت. به عبارت دیگر در شرایط عدم تنش سرب، کاربرد کلسیم اثر معنی‌داری بر این صفت نداشت اما تحت تنش سرب که موجب تخریب غشاهای زیستی و افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید شد، کاربرد کلسیم، تخریب غشاها و در نتیجه محتوی مالون‌دی‌آلدئید را کاهش داد. در غلظت‌های سرب ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک، محتوی مالون‌دی‌آلدئید برگ‌های سویا به ترتیب معادل ۴۱ و ۹۲ درصد در مقایسه با عدم مصرف سرب کاهش یافت. این در حالی است که با کاربرد کلسیم، از اثر سوء تنش سرب بر غشاهای زیستی و در نتیجه افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید به‌طور معنی‌داری کاسته شد (جدول ۳). شدت پراکسیداسیون چربی‌های غشاهای زیستی با تعیین محتوی MDA اندازه‌گیری می‌شود که یکی از محصولات پراکسیداسیون چربی‌هاست. سطح بالای MDA نشان‌دهنده افزایش تشکیل گونه‌های اکسیژن فعال و خسارت اکسیداتیو است. ثابت شده که سرب از طریق افزایش تولید ROS باعث ایجاد تنش اکسیداتیو و در نتیجه بالا رفتن سطح MDA در گونه‌های مختلف گیاهی می‌شود (Bharwana *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2008). از سوی دیگر نتایج تحقیق حاضر نشان داد که کاربرد کلسیم میزان MDA را کاهش داد. این اثر مثبت کلسیم در کاهش خسارت اکسیداتیو به نقش بالقوه این ماده غذایی در پایداری غشاها و همچنین اثر آن در کاهش تیوباربوتیریک‌اسید و H_2O_2 نسبت داده شده است (Ahmad *et al.*, 2015). اثر مثبت کلسیم در کاهش محتوی MDA می‌تواند مربوط به نقش آن

در کنترل کارکرد و ساختار غشاء از طریق اتصال به فسفولیپیدها باشد که موجب ثبات لایه‌های چربی غشاء شده و باعث حفظ یکپارچگی ساختاری در غشاهای سلولی می‌شود (Siddiqui et al., 2012). هم‌چنین در آزمایش حاضر مشخص شد که کاربرد کلسیم، با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان موجب کاهش خسارت اکسیداتیو و در نتیجه کم شدن سطح MDA شد. این یافته با مشاهدات سایر محققان کاملاً منطبق است (Siddiqui et al., 2012, Li et al., 2003).

جدول ۲: خلاصه تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در واکنش به تنش سرب و کاربرد کلسیم

منابع تغییرات	درجه آزادی	میزان سرب ریشه	مالون دی آلدئید	سوپراکسید دیسموتاز	کاتالاز	شاخص سبزینگی	محتوی آب نسبی	سطح برگ	زیست توده	عملکرد دانه	میانگین مربعات	
تنش سرب	۲	۹۴۸/۱۰**	۳۶۹/۴۴**	۱۸۳۴/۹۷**	۶۴۰۸/۶۶**	۹۹۴/۲۶**	۱۹۵۷/۶۴**	۱۴۹۴۰۶/۸۱**	۱۱۹۲/۷۴**	۲۵۳/۲۶**		
کاربرد کلسیم	۲	۱۸/۸۵**	۴۹/۷۸**	۱۷۸/۵۱**	۸۱۲/۳۱**	۲۱۵/۳۸**	۴۳/۵۴**	۴۹۶۲۱/۴۶**	۲۴۸/۵۳**	۵۳/۳۲**		
سرب × کلسیم	۴	۱۱/۰۶**	۹/۱۱**	۷۹/۳۲**	۱۸۵/۳۷**	۳۹/۵۴ ^{ns}	۰/۲۲ ^{ns}	۳۶۷۳/۱۵ ^{ns}	۴۳/۶۸**	۱۰/۰۴*		
خطا	۱۸	۱/۵۵	۲/۷۲	۱۳/۴۵	۱۶۸۲/۹۰	۳/۱۱	۵/۵۶	۷۰۹۱/۸۶	۵/۶۲	۲/۹۱		
ضریب تغییرات (%)	-	۸/۵۸	۷/۸۶	۴/۷۱	۶/۹۱	۴/۱۱	۳/۱۹	۹/۵۱	۴/۸۹	۱۰/۱۶		

^{ns}، * و **: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمارهای آزمایشی و برهمکنش آن‌ها بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در برگ‌های سویا در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). در اثر تنش سرب فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) افزایش یافت. با این وجود کاربرد کلسیم میزان فعالیت این آنزیم‌ها را تحت تنش سرب باز هم بیش‌تر کرد. در اثر اعمال غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک فعالیت آنزیم SOD در مقایسه با تیمار شاهد به ترتیب معادل ۲۲ و ۴۰ درصد افزایش یافت. این افزایش فعالیت در مورد آنزیم CAT به ترتیب معادل ۲۱ و ۵۸ درصد بود. معنی‌دار بودن برهمکنش سرب و کلسیم بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نشان می‌دهد که در شرایط نرمال، کاربرد کلسیم اثر معنی‌داری بر فعالیت این آنزیم‌ها نداشت اما با تشدید تنش سرب، کاربرد کلسیم از طریق افزایش فعالیت این آنزیم‌ها موجب پاکسازی گونه‌های اکسیژن فعال و بهبود تحمل گیاه به تنش سرب شد (جدول ۳). ROS مانند سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال‌های هیدروکسیل ($OH^{\cdot-}$) و اکسیژن نوزاد (1O_2) طی متابولیسم عادی در سلول تولید می‌شوند. در شرایط نرمال، ROS به میزان کمی تولید شده و هم‌چنین بین تولید و پاکسازی آن تعادلی وجود دارد.

جدول ۳: نتایج مقایسه میانگین صفات مورد بررسی برهمکنش سرب و کلسیم (میلی گرم بر کیلوگرم خاک)

تیمار	سرب	کلسیم	میزان سرب ریشه (mgr/kg)	مالون دی آلدئید (µm/gr)	سوپراکسید دیسموتاز (mgr/min)	کاتالاز (mgr/min)	شاخص سبزی‌نگی (SN)	محتوی آب نسبی (%)	سطح برگ تک بوته (cm ²)	زیست توده تک بوته (gr)
	صفر	صفر	۰/۴۶ ^f	۱۳/۲۸ ^g	۵۸/۶۱ ^d	۱۲۲/۱۱ ^d	۳۷/۴۸ ^b	۸۶/۶۹ ^b	۶۴۸/۹۱ ^b	۴۹/۵۲ ^d
	صفر	۲۰۰	۰/۳۸ ^f	۱۲/۹۲ ^g	۶۰/۲۸ ^d	۱۲۴/۹۹ ^d	۳۸/۵۶ ^b	۸۸/۹۳ ^{ab}	۸۰۵/۷۵ ^a	۵۸/۴۴ ^b
		۴۰۰	۰/۳۲ ^f	۱۲/۷۴ ^g	۶۳/۶۷ ^d	۱۲۶/۵۳ ^d	۴۰/۲۳ ^a	۹۰/۹۷ ^a	۸۵۲/۶۶ ^a	۶۵/۹۳ ^a
	صفر	صفر	۴/۴ ^d	۱۸/۶۹ ^d	۷۱/۶۸ ^c	۱۴۷/۷۲ ^c	۳۳/۳۶ ^d	۷۰/۵۶ ^d	۵۳۳/۸۳ ^c	۴۰/۴۷ ^e
	۱۰۰	۲۰۰	۳/۲۶ ^{de}	۱۷/۰۴ ^e	۸۳/۲۸ ^b	۱۶۰/۳۳ ^c	۳۴/۰۵ ^d	۷۳/۳۰ ^{cd}	۵۶۰/۵۸ ^{bc}	۵۳/۴۶ ^{cd}
		۴۰۰	۲/۲۱ ^e	۱۵/۶۸ ^f	۸۷/۹۷ ^b	۱۸۱/۳۶ ^b	۳۶/۱۳ ^c	۷۵/۵۳ ^c	۶۲۸/۹۱ ^b	۵۷/۳۲ ^{bc}
	صفر	صفر	۲۲/۸۴ ^a	۲۵/۴۷ ^a	۸۲/۱۰ ^b	۱۹۳/۶۵ ^b	۲۸/۷۱ ^f	۵۷/۴۳ ^e	۴۵۰/۳۳ ^d	۳۰/۵۷ ^f
	۲۰۰	۲۰۰	۲۰/۴۹ ^b	۲۳/۳۹ ^b	۹۵/۶۹ ^a	۲۱۵/۷۳ ^a	۲۹/۶۴ ^f	۵۹/۳۶ ^e	۵۳۲/۲۵ ^c	۳۵/۸۳ ^e
		۴۰۰	۱۵/۷۰ ^c	۲۰/۱۴ ^c	۱۰۱/۴۱ ^a	۲۳۲/۱۳ ^a	۳۱/۷۷ ^e	۶۳/۳۸ ^{de}	۵۹۴/۰۸ ^{bc}	۳۹/۵۷ ^e

در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند از نظر آماری و براساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

این تعادل در اثر بروز تنش‌های محیطی از جمله فلزات سنگین به هم می‌خورد. ROS در سطوح پایین به‌عنوان مولکول‌های پیام‌رسان در فعال‌سازی مسیرهای واکنش به تنش‌های محیطی عمل می‌کند اما در سطوح بالا، ROS می‌تواند با ایجاد خسارت اکسیداتیو موجب تخریب چربی‌ها، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و در نهایت مرگ سلول شود. این امر در اثر سمیت فلزات سنگین مانند سرب به خوبی اثبات شده است (Liu et al., 2008; Singh et al., 2010). برای مقابله با افزایش تولید ROS و اجتناب از خسارت اکسیداتیو، گیاهان یک سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی دارند (Singh et al., 2010; Gupta et al., 2010). مسمومیت فلزی ممکن است فعالیت این آنزیم‌ها را کاهش یا افزایش دهد. این تغییرات بستگی به نوع فلز، شکل اختصاصی فلز، گونه گیاهی و مدت و شدت تیمار دارند (Pourrut et al., 2011; Singh et al., 2010). آزمایش حاضر نشان داد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند SOD و CAT در اثر تنش سرب افزایش یافت. تحقیقات مشابه دیگری نیز افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در اثر تنش سرب را تایید می‌کنند (Singh et al., 2010; Verma and Dubey, 2003). SOD به‌عنوان خط اول دفاع سلول در برابر تنش اکسیداتیو، یون‌های سوپر اکسید را به اکسیژن و H_2O_2 تبدیل می‌کند. هم‌چنین آنزیم CAT می‌تواند H_2O_2 را به آب و اکسیژن تبدیل نماید (Pourrut et al., 2011). در این مطالعه، اگرچه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان با تیمار سرب افزایش یافت اما این افزایش نتوانست میزان MDA (شاخص تنش اکسیداتیو) بوته‌های در معرض سرب را کاهش دهد. با این وجود، کاربرد کلسیم، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را در ترکیب با سرب بالاتر برد. کلسیم نه تنها فعالیت این آنزیم‌ها را افزایش داد بلکه میزان MDA را نیز در گیاهان تحت تنش سرب کاهش داد. نقش مثبت کلسیم در بهبود تحمل به تنش فلزات سنگین از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان توسط سایر محققان نیز گزارش شده است (Nazar et al., 2012; Ahmad et al., 2015; Siddiqui et al., 2012).

شاخص سبزینگی

اثر تنش سرب و هم‌چنین کاربرد کلسیم بر شاخص سبزینگی برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود اما برهمکنش این دو تیمار بر شاخص سبزینگی معنی‌دار نبود (جدول ۲). به عبارت دیگر اثر مثبت کاربرد کلسیم بر این صفت، در تمام سطوح مصرف و عدم مصرف سرب دارای روند مشابهی بود. با افزایش غلظت سرب، از شاخص سبزینگی برگ کاسته شد به‌طوری‌که در غلظت‌های سرب ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک، شاخص سبزینگی برگ به ترتیب معادل ۱۱ و ۲۳ درصد در مقایسه با تیمار شاهد کاهش یافت. از سوی دیگر کاربرد کلسیم به‌ویژه به میزان ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک در هر سه سطح مصرف و عدم مصرف سرب موجب افزایش معنی‌دار شاخص سبزینگی شد (جدول ۳). سرب از طریق اختلال در جذب عناصری هم‌چون منیزیم و آهن که در ترکیب کلروفیل نقش دارند، ممانعت از فعالیت

آنزیم آمینولولینیک‌اسید دهیدراتاز و همچنین افزایش فعالیت آنزیم کلروفیل‌از، تولید کلروفیل را محدود می‌کند (Chatterjee *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2008). نتایج سایر تحقیقات نیز بیانگر کاهش میزان کلروفیل در اثر مسمومیت حاصل از سرب در گیاهان مختلف است (Bharwana *et al.*, 2014; Sadeghipour, 2016; Wang *et al.*, 2013). در آزمایش حاضر نشان داده شد که کاربرد کلسیم تحت تنش سرب موجب بهبود شاخص سبزیگی بوته‌های سویا شد. نقش مثبت کلسیم در بهبود جذب عناصر غذایی دخیل در ساختمان کلروفیل یکی از دلایل افزایش محتوی کلروفیل تحت تیمار کلسیم است (Ahmad *et al.*, 2015). افزایش محتوی کلروفیل گونه‌های مختلف گیاهی در اثر کاربرد کلسیم در شرایط مختلف، توسط سایر محققان تایید شده است (Jiang and Huang, 2001; Tavallali *et al.*, 2008; Ibrahim *et al.*, 2016; Naeem and Khan, 2006).

محتوی آب نسبی (RWC)

اثر اصلی کاربرد سرب و کلسیم بر محتوی آب نسبی برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود در حالی‌که برهمکنش این دو تیمار بر محتوی آب نسبی برگ معنی‌دار نشد (جدول ۲). مفهوم آن این است که کاربرد کلسیم در تمام سطوح مصرف و عدم مصرف سرب با روند مشابهی، محتوی آب نسبی برگ‌های سویا را افزایش داد. محتوی آب نسبی برگ، با افزایش شدت تنش سرب به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در غلظت‌های سرب ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک، محتوی آب نسبی برگ‌های سویا به ترتیب معادل ۱۹ و ۳۴ درصد در مقایسه با عدم مصرف سرب کاهش یافت. این در حالی است که با کاربرد کلسیم، به‌ویژه با میزان ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک آن، از اثر سوء تنش سرب بر این صفت به‌طور معنی‌داری کاسته شد (جدول ۳). محتوی نسبی آب برگ یکی از مهم‌ترین شاخص‌های وضعیت آبی در گیاه است که با جذب آب از طریق ریشه‌ها و تلفات آب از طریق برگ‌ها مرتبط است. کاهش RWC در نتیجه مسمومیت سرب به عدم تعادل بین جذب و دفع آب نسبت داده می‌شود. سرب از یک طرف رشد ریشه را کاهش داده که موجب کاهش جذب آب می‌شود و از طرف دیگر با کاهش سطح ترکیباتی که آماس سلولی را کنترل می‌کنند، انعطاف‌پذیری دیواره سلول و آماس سلولی را کاهش می‌دهند. این عوامل در نهایت باعث برهم خوردن وضعیت آبی گیاه می‌شوند (Wang *et al.*, 2011; Sharma and Dubey, 2005; Pourrut *et al.*, 2013). هم‌راستا با نتایج پژوهش حاضر، گزارش‌های دیگری نیز وجود دارند که کاهش RWC در اثر تیمار سرب را نشان می‌دهند (Sadeghipour, 2016). در آزمایش حاضر همچنین ثابت شد که تحت تنش سرب، کاربرد کلسیم موجب بهبود محتوی آب نسبی برگ‌های سویا گردید. این اثر مثبت کلسیم می‌تواند ناشی از بهبود یکپارچگی غشاهای زیستی و کاهش خسارت اکسیداتیو تحت تنش سرب باشد. در سایر تحقیقات نیز نقش مثبت کلسیم در بهبود وضعیت آبی گیاه به تجمع محلول‌های آلی سازگار هم‌چون پرولین و گلیسین بتائین

نسبت داده شده است (Tavallali et al., 2008; Ibrahim et al., 2016). مشابه با نتایج پژوهش حاضر، کاربرد خارجی کلسیم باعث افزایش محتوی آب نسبی برگ علف‌های چمنی تحت تنش گرما (Jiang and Huang, 2001) و آفتابگردان (Ibrahim et al., 2016) و شیرین بیان (Li et al., 2003) در شرایط تنش خشکی شد.

سطح برگ

اعمال تنش سرب و هم‌چنین کاربرد کلسیم اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر سطح برگ بوته‌های سویا داشتند اما برهمکنش این دو تیمار بر این صفت معنی‌دار تشخیص داده نشد (جدول ۲). به عبارت دیگر کاربرد کلسیم در تمام سطوح عدم تنش و تنش سرب دارای اثرات مثبتی با روند یکسان بود. سطح برگ بوته‌های سویا با تشدید تنش سرب به‌طور معنی‌داری کاهش یافت به‌طوری‌که در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک سطح برگ تک بوته در مقایسه با تیمار عدم مصرف سرب به ترتیب معادل ۱۸ و ۳۰ درصد کاهش یافت. با این وجود کاربرد کلسیم در تمام سطوح سرب، سطح برگ بوته‌ها را در مقایسه با عدم کاربرد آن به‌طور معنی‌داری افزایش داد (جدول ۳). تحت شرایط تنش سرب، گیاهان علائم ظاهری محدود شدن رشد از قبیل برگ‌های کم‌تر، کوچک‌تر و شکننده را نشان می‌دهند (Pourrut et al., 2011). هم‌چنین مشابه با نتایج حاضر، مسمومیت سرب موجب کاهش سطح برگ بوته‌های لوبیا چشم بلبلی گردید (Sadeghipour, 2017). از سوی دیگر در پژوهش حاضر مشخص شد که اثر منفی سمیت سرب بر سطح برگ بوته‌های سویا با کاربرد کلسیم کاهش یافت. اثر مثبت کلسیم بر فراهمی و جذب عناصر غذایی می‌تواند تعداد و سطح برگ بوته را افزایش داده که این امر منجر به دریافت بیشتر نور برای فتوسنتز می‌شود. این اثر مثبت کلسیم در افزایش سطح برگ به نقش این عنصر غذایی در تقسیم و توسعه سلولی نسبت داده شده است (Hepler and Wayne, 1985). نقش مثبت کاربرد کلسیم در افزایش سطح برگ بوته‌های سنا (*Senna alexandrina*) (Naeem and Khan, 2006) و توت فرنگی (Khayyat et al., 2009) در شرایط تنش شوری نیز گزارش شده است.

زیست توده

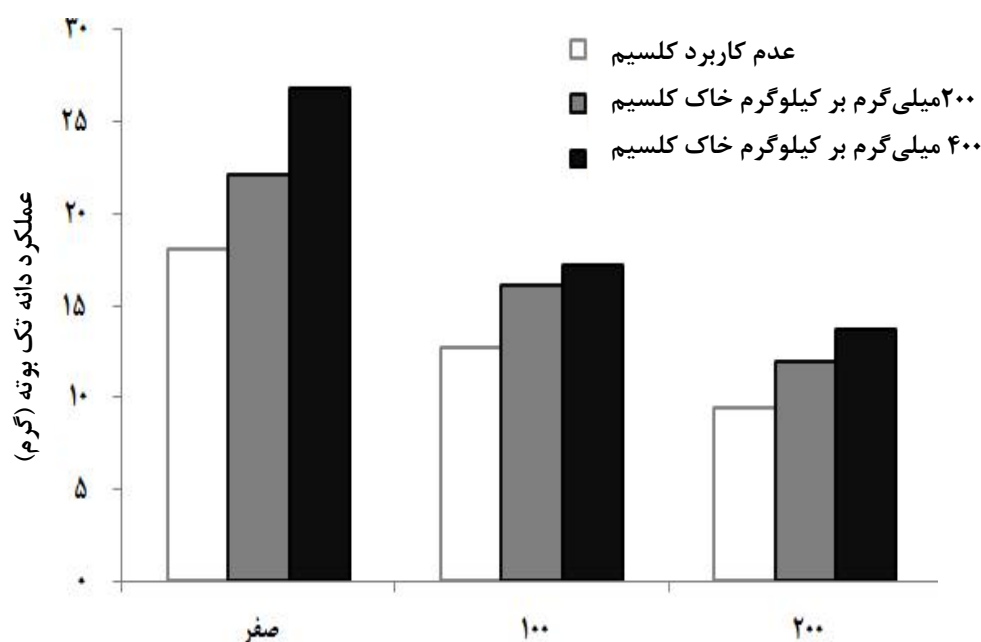
جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر اصلی و برهمکنش سرب و کلسیم بر زیست توده سویا در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). به عبارت دیگر، کاربرد کلسیم در بهبود زیست توده تولیدی سویا در سطوح مختلف سرب دارای روند یکسانی نبود. تنش سرب موجب کاهش زیست توده سویا شد، به‌طوری‌که در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک، در مقایسه با عدم مصرف سرب، زیست توده سویا به ترتیب معادل ۱۸ و ۳۸ درصد کاهش یافت. با این حال، کاربرد کلسیم، موجب افزایش زیست توده تولیدی در تمام سطوح سرب شد (جدول ۳). اثر بازدارندگی سرب بر رشد

و زیست توده گیاهی، به اختلال در فعالیت‌های متابولیکی گیاه از قبیل اختلالات تغذیه‌ای و فتوسنتزی و نیز تشدید اکسیداسیون اکسین نسبت داده شده است (Nagajyoti *et al.*, 2010). نتایج سایر تحقیقات نیز نشان داده که تولید زیست توده گیاهی در اثر غلظت‌های بالای سرب محدود می‌شود (Bharwana *et al.*, 2014; Verma and Dubey, 2003). عوامل مهم داخلی زیادی تولید زیست توده گیاهی را کنترل می‌کنند. وجود کلسیم برای انجام فرایندهای مختلف فیزیولوژیکی و متابولیکی ضروری است. به‌طور کلی، عناصر معدنی در رشد و نمو گیاه اهمیت زیادی دارند. برای مثال: کلسیم انتقال مواد فتوسنتزی در گیاه را تسهیل می‌کند. به‌علاوه، این عنصر غذایی، بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیکی مانند تقسیم، توسعه و تمایز سلولی، پایداری و یکپارچگی غشاء و دیواره سلولی و فعالیت برخی آنزیم‌ها را تنظیم می‌کند که تمامی این موارد در نهایت موجب بهبود رشد می‌شوند (Naeem and Khan, 2006). گزارش‌های زیادی وجود دارد که نتایج تحقیق حاضر را تایید می‌کنند مبنی بر اینکه در گیاهان مختلف، کاربرد کلسیم در شرایط تنش فلزات سنگین، موجب افزایش زیست توده تولیدی گیاه شده است (Ahmad *et al.*, 2015; Siddiqui *et al.*, 2012).

عملکرد دانه

نتایج نشان داد که اثر اصلی کاربرد سرب و کلسیم بر عملکرد دانه سویا در سطح احتمال یک درصد و برهمکنش این دو تیمار بر این صفت در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). تنش سرب به‌طور معنی‌داری موجب کاهش عملکرد دانه سویا شد، به‌طوری که در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک، عملکرد دانه تک بوته سویا در مقایسه با عدم تنش سرب به ترتیب معادل ۳۰ و ۴۸ درصد کاهش یافت. از سوی دیگر با کاربرد کلسیم میزان عملکرد دانه در مقایسه با عدم کاربرد آن در تمام سطوح مصرف و عدم مصرف سرب افزایش یافت اگرچه روند این افزایش در شرایط عدم تنش سرب بیش‌تر بود (شکل ۱). تحت تیمارهای صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک، کاربرد ۴۰۰ میلی‌گرم کلسیم بر کیلوگرم خاک در مقایسه با عدم کاربرد آن عملکرد دانه تک بوته سویا را به ترتیب معادل ۴۹، ۳۶ و ۴۶ درصد افزایش داد. از جمله شاخص سبزی‌نگی، محتوی آب نسبی، سطح برگ و زیست توده کاهش نشان دادند که در نهایت موجب کاهش شدید عملکرد گردید. مشابه یافته‌های آزمایش حاضر، مسمومیت سرب موجب کاهش عملکرد دانه ماش (Hussain *et al.*, 2006)، برنج (Chatterjee *et al.*, 2004) و لوبیا چشم بلبلی (Sadeghipour, 2017) شده است. کلسیم نقش مهمی در سازگاری گیاهان به تنش‌های محیطی ایفا می‌کند. مشخص شده که این عنصر غذایی، در شرایط نامطلوب محیطی، با پایداری ساختار غشای سلولی موجب ممانعت از خسارت به غشا و نشت مواد از سلول می‌شود. کلسیم هم‌چنین یک پیام‌رسان ثانویه در مسیر انتقال پیام بوده که فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی تنظیم می‌کند. اهمیت نقش پیام‌های کلسیم در هدایت تغییرات محیطی به واکنش گیاه

در بسیاری از محرک‌های خارجی ثابت شده است (Li et al., 2003). در این مطالعه، به خوبی مشخص شد که تحت تنش سرب، کاربرد کلسیم از طریق کاهش جذب سرب، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، شاخص سبزی‌نگی، محتوی آب نسبی، سطح برگ و زیست توده تولیدی موجب بهبود تحمل به سرب و در نهایت افزایش عملکرد دانه سویا شد. نتایج سایر تحقیقات نیز نقش مثبت کلسیم در بهبود عملکرد آفتابگردان تحت تنش آبی (Ibrahim et al., 2016) و توت فرنگی تحت تنش شوری (Khayyat et al., 2009; Kaya et al., 2002) را تایید کرده است.



شکل ۱: اثر کاربرد کلسیم در سطوح مختلف سرب (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم خاک) بر عملکرد دانه سویا

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که تنش سرب میزان سرب ریشه، پراکسیداسیون چربی‌ها و فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را در سویا افزایش داد. تیمار سرب هم‌چنین موجب کاهش شاخص سبزی‌نگی، محتوی آب نسبی، سطح برگ، زیست توده و عملکرد دانه شد. از سوی دیگر تحت شرایط تنش سرب، کاربرد کلسیم به-ویژه ۴۰۰ میلی گرم کلرید کلسیم بر کیلوگرم خاک موجب کاهش جذب سرب و پراکسیداسیون چربی‌ها و فعالیت بیش‌تر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شد. این درحالی است که کاربرد کلسیم باعث بهبود صفات مرتبط با رشد از جمله شاخص سبزی‌نگی، محتوی آب نسبی، سطح برگ، زیست توده و عملکرد دانه سویا شد. این نتایج نشان داد که کلسیم می‌تواند از طریق کاهش جذب سرب، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، بهبود وضعیت آبی گیاه و محتوی کلروفیل به‌عنوان ابزار

مفیدی در تحمل به تنش سرب در سویا مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

- بی‌نام، ۱۳۹۶. وبگاه رسمی سازمان هواشناسی کشور. WWW.IRIMO.IR
- Aebi, H. 1984.** Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
- Ahmad, P., Sarwat, M., Bhat, N. A., Wani, M.R., Kazi, A. G. and Tran, L. S. 2015.** Alleviation of cadmium toxicity in *Brassica juncea* L. by calcium application involves various physiological and biochemical strategies. *Plos One* 10 (1): 1-17.
- Beyer, W. F. and Fridovich, I. 1987.** Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry* 161 (2): 559-566.
- Bharwana, S. A., Ali, S., Farooq, M. A., Iqbal, N., Hameed, A., Abbas, F. and Ahmad, M. S. A. 2014.** Glycine betaine-induced lead toxicity tolerance related to elevated photosynthesis, antioxidant enzymes suppressed lead uptake and oxidative stress in cotton. *Turkish Journal of Botany* 38: 281-292.
- Chatterjee, C., Dube, B. K., Sinha, P. and Srivastava, P. 2004.** Detrimental effects of lead phytotoxicity on growth, yield and metabolism of rice. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 35: 255-265.
- Gupta, D., Huang, H., Yang, X., Razafindrabe, B. and Inouhe, M. 2010.** The detoxification of lead in *Sedum alfredii* is not related to phytochelatins but the glutathione. *Journal of Hazardous Materials* 177 (1-3): 437-444.
- Heath, R.L. and Packer, L. 1968.** Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125 (1): 189-198.
- Hepler, P.K. and Wayne, R. O. 1985.** Calcium and plant development. *Annual Review of Plant Physiology* 36: 397-439.
- Hussain, M., Ahmad, M. S. A. and Kausar, A. 2006.** Effect of lead and chromium on growth, photosynthetic pigments and yield components in mash bean [*Vigna mungo* (L.) Hepper]. *Pakistan Journal of Botany* 38: 1389-1396.
- Ibrahim, M. F. M., Faisal, A. and Shehata, S. A. 2016.** Calcium chloride alleviates water stress in sunflower plants through modifying some physio-biochemical parameters. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 16 (4): 677-693.
- Jiang, Y. and Huang, B. 2001.** Effect of calcium on antioxidant activities and water relations associated with heat tolerance in two cool season grasses. *Journal of Experimental Botany* 52 (355): 341-349.

Kaya, C., Kirnak, H., Higgs, D. and Saltali, K. 2002. Supplementary calcium enhances plant growth and fruit yield in strawberry cultivars grown at high (NaCl) salinity. *Scientia Horticulturae* 93: 65-74.

Khayyat, M., Tehranifar, A., Akbarian, A., Shayesteh Nia, S. and Khabari, S. 2009. Effects of calcium forms on electrolyte leakage, total nitrogen, yield and biomass production by strawberry plants under NaCl salinity. *Journal of Central European Agriculture* 10 (3): 297-302.

Kumari, A., Sheokand, S. and Swaraj, K. 2010. Nitric oxide induced alleviation of toxic effects of short term and long term Cd stress on growth, oxidative metabolism and Cd accumulation in chickpea. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 22: 271-284.

Kurtyka, R., Małkowski, E., Kita, A. and Karcz, W. 2008. Effect of calcium and cadmium on growth and accumulation of cadmium, calcium, potassium and sodium in maize seedlings. *Polish Journal of Environmental Studies* 17 (1): 51-56.

Li, M., Wang, G. and Lin, J. 2003. Application of external calcium in improving the PEG-induced water stress tolerance in liquorice cells. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 44: 275-284.

Liu, D., Li, T., Jin, X., Yang, X., Islam, E. and Mahmood, Q. 2008. Lead induced changes in the growth and antioxidant metabolism of the lead accumulating and non-accumulating ecotypes of *Sedum alfredii*. *Journal of Integrative Plant Biology* 50 (2): 129-140.

Naeem, M. and Khan, M. M. A. 2006. Influence of calcium on crop yield and biochemical attributes, anthraquinone and sennoside contents of *Cassia tora* L. Roxb.- A medicinal legume. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 12 (4): 61-73.

Nagajyoti, P. C., Lee, K.D. and Sreekanth, T. V. M. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A Review. *Environmental Chemistry Letters* 8: 199-216.

Nazar, R., Iqbal, N., Masood, A., Khan, M. I. R., Syeed, S. and Khan, N.A. 2012. Cadmium toxicity in plants and role of mineral nutrients in its alleviation. *American Journal of Plant Sciences* 3: 1476-1489.

Paudel, P., Singh, R. S., Pandey, I. B. and Prasad, S.S. 2017. Effect of different weed management practices on weed dynamic, yield and economics of soybean production. *Azarian Journal of Agriculture* 4 (2): 54-59.

Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P. and Pinelli, E. 2011. Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 213: 113-136.

Sadeghipour, O. 2016. Pretreatment with nitric oxide reduces lead toxicity in cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). *Archives of Biological Sciences, Belgrade* 68 (1): 165-175.

Sadeghipour, O. 2017. Nitric oxide increases pb tolerance by lowering pb uptake and translocation as well as phytohormonal changes in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Sains Malaysiana 46 (2): 189-195.

Sharma, P. and Dubey, R.S. 2005. Lead toxicity in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology 17: 35-52.

Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H., Sakran, A. M., Basalah, M. O. and 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.

Singh, R., Tripathi, R. D., Dwivedi, S., Kumar, A., Trivedi, P. K. and Chakrabarty, D. 2010. Lead bioaccumulation potential of an aquatic macrophyte *Najas indica* are related to antioxidant system. Bioresource Technology 101: 3025-3032.

Suzuki, N. 2005. Alleviation by calcium of cadmium-induced root growth inhibition in *Arabidopsis* seedlings. Plant Biotechnology 22 (1): 19-25.

Tavallali, V., Rahemi, M. and Panahi, B. 2008. Calcium induces salinity tolerance in pistachio rootstocks. Fruits 63: 285-296.

Verma, S. and Dubey, R. S. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant Science 164: 645-655.