تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد یازدهم، شماره سوم، پائیز ۱۳۹۷
۷۰۵-۶۹۱
http://dx.doi.org/ 10.22077/escs.2018.730.1140

نقش تیمارهای اسید سالیسیلیک و پرولین بر القاء فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پاسخ‌های تحمل به تنش شوری در سویا (*Glycine max* L.)

حمیده غفاری[۱]، محمودرضا تدین[۲]*، جمشید رزمجو[۳]

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
۲. دانشیار گروه زراعت دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
۳. استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۲/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۶/۲۶

چکیده

شوری آب یا خاک یکی از مهم‌ترین تنش‌ها در مناطق خشک و نیمه‌خشک است که به‌شدت رشد گیاهان را از طریق تأثیر بر فرآیندهای فیزیولوژیک محدود می‌کند. آزمایش حاضر با هدف بررسی بهبود تحمل به شوری سویا با محلول‌پاشی پرولین و اسیدسالیسیلیک در سال ۱۳۹۵ در فضای باز گلخانه‌های دانشگاه شهرکرد در جعبه‌های کاشت با چهار تکرار به‌صورت اسپیلیت پلات در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. عامل اصلی شامل شوری در سه سطح (۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) و عامل فرعی محلول‌پاشی پرولین ۱۰ میلی‌مولار، اسید سالیسیلیک ۳ میلی‌مولار، ترکیب اسید سالیسیلیک ۳ میلی‌مولار با پرولین ۱۰ میلی‌مولار، و شاهد (محلول‌پاشی با آب) بود. صفات پرولین، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، مالون‌دآلدئید، پراکسید هیدروژن، ارتفاع و وزن خشک اندام هوایی اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد اثرات محلول‌پاشی پرولین و اسید سالیسیلیک به‌طور چشمگیری محتوای پرولین، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، ارتفاع و وزن خشک اندام هوایی را در سویا تحت تنش شوری افزایش داد. به‌علاوه، تحت شوری ۱۰۰ میلی‌مولار، محلول‌پاشی پرولین و اسید سالیسیلیک باعث کاهش مالون‌دآلدئید و پراکسیدهیدروژن به ترتیب ۲۳ و ۲۵ درصد در مقایسه با تیمار محلول‌پاشی با آب شدند. همچنین ارتفاع و وزن خشک اندام هوایی در سطح شوری ۱۰۰ میلی‌مولار با کاربرد پرولین و اسیدسالیسیلیک به میزان ۳۲ و ۳۸ درصد نسبت به محلول‌پاشی با آب افزایش یافتند. بنابراین نتایج این مطالعه نشان می‌دهد کاربرد پرولین و اسیدسالیسیلیک همراه باهم، تحمل به تنش شوری در سویا را از طریق فعال کردن سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا بهبود می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: **سویا، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، مالون‌دآلدئید، وزن خشک اندام هوایی.**

مقدمه

مشکل شوری منابع آب‌وخاک در همه جای دنیا وجود دارد و باعث کاهش کارایی فعالیت‌های کشاورزی می‌شود (Läuchli and Luttge, 2002). کنترل شور شدن خاک و آب و افزایش تحمل شوری گیاهان زراعی دو روش کلیدی برای افزایش نیاز روزافزون جمعیت رو به رشد کره‌ی زمین به غذا است (Läuchli and Luttge, 2002). تنش اسمزی و یونی حاصل از شوری سبب وقوع تنش اکسیداتیو در سلول‌های گیاهی می‌شود که ناشی از افزایش تولید انواع اکسیژن فعال در طی اجرای فرآیندهای حیاتی سلول است. اثر زیان‌بار شوری بر روی رشد گیاه به پتانسیل اسمزی پایین خاک، تغذیه غیر متعادل، اثرهای یونی خاص و یا ترکیبی از این عوامل بستگی دارد. سلول‌های گیاهی جهت مقابله با اثرات مخرب انواع اکسیژن فعال از مکانیسم‌های تحمل نظیر چرخه مهلر، چرخه گلوتاتیون- آسکوربات و چرخه گزانتوفیل بهره می‌برند (Ashraf and Harris, 2004). اجزای چرخه‌های یادشده با جذب انواع اکسیژن

* نگارنده پاسخگو: محمودرضا تدین. پست الکترونیک: Mrtadayon@yahoo.com

فعال و یا ممانعت از تولید آن‌ها به پایداری سلول کمک می‌کنند. این چرخه‌ها از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و آنتی-اکسیدان‌ها تشکیل‌شده‌اند. کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز ازجمله آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی در سلول‌های گیاهی به شمار می‌روند (Ashraf and Harris, 2004). افزایش فعالیت آنزیم‌های جذب‌کننده انواع اکسیژن فعال یکی از متداول‌ترین مکانیسم‌های تحمل به شوری است (Shokrpour and Esfandiari, 2014). در محیط شور، علاوه بر اختلال در جذب آب، جذب مواد معدنی محلول در آب هم توسط گیاه کاهش می‌یابد. رشد و نمو گیاه به‌شدت تحت تأثیر چنین تغییراتی است. علاوه بر این، علت کاهش بیوماس در شرایط شوری را کم شدن سطح برگ به‌عنوان یک منبع تأمین‌کننده آسیمیلات‌ها عنوان می‌کنند که به دنبال آن میزان فتوسنتز خالص و تولید ماده خشک کم می‌شود (Hasanuzzaman et al., 2013).

سویا (*Glycine max* L.) گیاهی دولپه، یک‌ساله از خانواده لگومینوز و یک گیاه زراعی بسیار مهم در سطح جهان است. دانه سویا ازنظر روغن (تقریباً ۲۰ درصد) و پروتئین (تقریباً ۴۰ درصد) غنی است. بین گیاهان روغنی، سویا دارای بیشترین میزان پروتئین و بیشترین درآمد ناخالص است. کل تولید جهانی سویا در سال ۲۰۱۳ حدود ۲۶۱ میلیون تن بود، که آمریکا با ۳۲ درصد، برزیل با ۲۹ درصد، آرژانتین ۱۹ درصد، چین ۵ درصد، هند ۴ درصد بیشترین تولیدکننده‌های جهان بوده‌اند. در ایران، سطح زیرکشت سویا در سال‌های اخیر ۶۰ تا ۸۰ هزار هکتار بود که حدود ۸۵ درصد آن آبی و ۱۵ درصد دیم بوده است (Faraji et al., 2015). سویا گیاه زراعی است که در برابر شوری مقاومت چندانی ندارد، لذا آب‌های شور به‌ویژه در نقاطی که زهکشی محدود است سبب کاهش عملکرد آن می‌شود (Pashaee et al., 2014). با توجه به اینکه تولید بخش قابل‌توجهی از محصولات کشاورزی با مشکل آب یا خاک شور مواجه است، اتخاذ روش‌هایی که امکان رشد و حصول عملکرد مطلوب تحت چنین شرایطی را برای گیاهان فراهم کند، بسیار حائز اهمیت است.

اسید سالیسیلیک (SA) از ترکیبات فنلی است که در تعداد زیادی از گیاهان وجود دارد. این ترکیب امروزه به-عنوان ماده‌ای شبه هورمون محسوب می‌گردد که نقش مهمی در رشد و نمو گیاهان ایفا می‌کند (Kang, 2003). این ماده می‌تواند نقش محوری در مقاومت نسبت به بیماری در گیاهان به‌ویژه طی مقاومت سیستمیک کسب‌شده داشته باشد (Ramezannezhad et al., 2013). همچنین اسید سالیسیلیک نقش محوری در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف در خلال رشد و نمو گیاه مثل جذب یون، فتوسنتز و جوانه‌زنی بسته به غلظت بکار رفته، گونه‌ی گیاهی، دوره‌ی رشدی و شرایط محیطی ایفا می‌کند. این ماده همچنین به‌عنوان یک سیگنال مولکولی مهم در نوسانات گیاهی در پاسخ به تنش‌های محیطی شناخته شده است (Ramezannezhad et al., 2013). اسید سالیسیلیک می‌تواند مقاومت به تنش شوری را افزایش داده و سبب کاهش اثر تنش اکسیداتیو شود (Shahbazizade et al., 2014).

هنگامی‌که گیاهان در شرایط تنش‌زا قرار می‌گیرند، گیاهان یک سری از متابولیت‌ها به‌ویژه آمینواسیدها را تجمع می‌کنند. آمینواسیدها به‌عنوان پیش ماده و ماده متشکله پروتئین‌ها شناخته‌شده‌اند و یک نقش مهم در متابولیسم و توسعه گیاه دارند (Munns, 2005). مطالعات نشان می‌دهد همبستگی مثبتی بین تجمع پرولین و تنش گیاه وجود دارد. پرولین، یک آمینواسید است. یک نقش مهم و سودمندی در گیاهانی که در معرض شرایط تنش‌زا قرار می‌گیرند دارد و به‌عنوان یک اسمولیت عالی عمل می-کند (Hayat et al., 2012). شوری منجر به کاهش یوبی-کوئینون و جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و پراکسیداز می‌شود که با محلول‌پاشی پرولین به‌طور چشمگیری بر این کاهش غلبه می‌شود (Munns, 2005). در مطالعات انجام‌شده توسط حیات و همکاران (Hayat et al., 2012) محلول‌پاشی پرولین، اثرات آسیب شوری و پراکسیداسیون لیپیدهای غشا در باقلا را کاهش داد و همچنین کاربرد پرولین باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز) می‌شود. در ایران شوری یک مسئله فراگیر و محدودکننده تولید پایدار کشاورزی است. ازاین‌رو به نظر می‌رسد شناخت عملیات مدیریتی و استفاده از ترکیباتی که باعث آلودگی محیط‌زیست نمی‌شوند و به کنترل شوری و اصلاح خاک کمک کند ضروری است. با توجه به روند افزایش تجمع نمک‌ها در زمین‌های زراعی و بروز تنش شوری در اغلب مناطق و همچنین تولید سویا به‌عنوان یک گیاه پروتئینی و روغنی باارزش در زراعت لازم به ارزیابی کاهش این گیاه

تحت تنش شوری است. هدف از این مطالعه بررسی نقش اسیدسالیسیلیک به‌عنوان ترکیبی با خواص آنتی‌اکسیدانی و پرولین به‌عنوان اسمولیت سازگار و تنظیم اسمزی در مواجه با تنش شوری و در جهت القای فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی و بهبود رشد سویا تحت تنش شوری بوده است.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک و پرولین روی گیاه سویا (رقم سامان با گروه رسیدگی زودرس) تحت تنش شوری آزمایشی به‌صورت اسپیلیت پلات در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در جعبه‌های کاشت و در محیط آزاد طراحی و اجرا شد. برای خاک جعبه‌های کاشت از ترکیب خاک مزرعه و خاک‌برگ با نسبت ۱:۳ استفاده شد. در هر جعبه ۸ عدد بذر کاشته شد و پس از استقرار گیاهچه‌ها و در مرحله ۳ برگی بوته‌های اضافی تنک شدند و در هر جعبه تنها ۴ گیاه نگه‌داشته شد. نیاز کودی خاک مورداستفاده برای جعبه‌های کاشت برحسب نتایج آزمون خاک (جدول ۱) صورت گرفت. تا قبل از شروع اعمال تیمارها، آبیاری با آب شهری انجام گرفت. عامل اصلی شامل آبیاری با آب‌شور با کلرید سدیم: صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار و عامل فرعی شامل محلول‌پاشی: پرولین ۱۰ میلی‌مولار، اسید سالیسیلیک ۳ میلی‌مولار، ترکیب اسید سالیسیلیک ۳ میلی‌مولار با پرولین ۱۰ میلی‌مولار و شاهد (محلول‌پاشی با آب) (Shahbazizade et al., 2014; Jasim et al., 2012) بود. محلول‌پاشی روی گیاه در مرحله ۴ برگی به میزانی انجام گرفت که برگ‌ها کامل خیس شده و قطرات محلول از برگ بریزد. پس از طی دوره استقرار بوته‌ها و زمانی که گیاهان به مرحله ۴ برگی رسیدند، محلول‌پاشی در دو مرحله و با فاصله زمانی ۷ روز صورت گرفت. گیاهان شاهد تنها به‌وسیله آب خالص محلول‌پاشی شدند. ۷ روز بعد از محلول‌پاشی دوم با افزودن تدریجی کلرید سدیم به آب آبیاری، اعمال شوری انجام شد. آبیاری با آب‌شور به فاصله زمانی هر سه روز یک‌بار صورت گرفت پس از هر بار آبیاری زه‌آب ۵ جعبه از هر تیمار به‌طور تصادفی برداشت و میزان قابلیت هدایت الکتریکی آن‌ها با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری قابلیت هدایت الکتریکی (مدل Cyberscan Singapore) اندازه‌گیری شد و در مواردی که میزان قابلیت هدایت الکتریکی محلول ورودی بیشتر بود آبشویی با آب مقطر انجام گرفت. در طی روز زه آب‌های خارج‌شده به خاک هر جعبه برگشت داده شد تا غلظت نمک در خاک بر اساس مقادیر تیمارها ثابت باقی بماند. رطوبت خاک در محدوده ظرفیت زراعی مزرعه نگه‌داشته شد. مقدار آب موردنیاز هر جعبه با وزن کردن جعبه و اختلاف وزن آن در شرایط آبیاری شده و خشک به دست آمد.

جدول ۱. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک

Table 1. Soil physical and chemical characteristics.

بافت خاک Texture	عمق Depth (cm)	رس Clay	سیلت Silt	شن Sand	پتاسیم $K_{ava.}$	فسفر $P_{ava.}$	نیتروژن N	ماده آلی OC	هدایت الکتریکی EC	pH
		(%)			(mg/kg)		(٪)		(dS m^{-1})	
Loam- Clay	0-30	39	34	26	458	17.1	0.12	1.11	0.41	7.7

در مرحله گلدهی صفات زیر اندازه‌گیری شدند:

پرولین

برای اندازه‌گیری پرولین محتوای بافت برگ از روش بیس و همکاران (Bates et al., 1973) استفاده شد. ۰/۵ گرم از بافت برگ در هاون چینی کاملاً کوبیده شد تا به حالت خمیری درآید. سپس ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد به آن اضافه شد و محتوی هاون از کاغذ صافی عبور داده شد. به ۲ میلی‌لیتر محلول، ۲ میلی‌لیتر اسید نایِن هیدرین (۱۲۵ میلی‌گرم نایِن‌هیدرین +۲ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۶ مولار + ۳ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال + ۲ میلی‌لیتر اسیداستیک) اضافه شد. محتوی حاصل مخلوط شد و در حمام آب جوش در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت گذاشته شد و سپس لوله‌های محتوی محلول حاصل در یخ قرار داده، پس از یکی شدن دمای آن با دمای محیط به آن ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه گردید و به

مدت ۲۰-۱۵ ثانیه به هم زده شدند. استانداردهای پرولین را در مقادیر صفر، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۳ و ۰/۰۴ میکرومول بر میلی‌لیتر تهیه شد، نمونه‌های حاصل و استانداردها در طول‌موج ۵۲۰ نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

تهیه عصاره آنزیمی

برای تهیه عصاره آنزیمی یک گرم بافت تر برگ در یک هاون چینی محتوی سه میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با ۷/۲pH که شامل اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) ۱ میلی‌مولار، فنیل متان سولفونیل فلورید (PMSF)۱ میلی‌مولار و پلی وینیل پیرولیدون (PVP) ۱ درصد بود، سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفوژ یخچال‌دار با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. از محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)(EC 1.11.1.6)

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از محاسبه کاهش جذب H_2O_2 در ۲۴۰ نانومتر و با روش ایبی (Aebi, 1984) انجام گرفت. میزان H_2O_2 موجود در مخلوط واکنش پس از ۱ دقیقه با استفاده از ضریب خاموشی (ε=۰/۰۳۹۴ $mMol^{-1}cm^{-1}$) و فرمول A= εbc محاسبه شد که نشان‌دهنده میزان فعالیت آنزیم کاتالاز است.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)(EC1.11.1.1)

در این سنجش با شروع واکنش آنزیمی و اکسید شدن آسکوربات، کاهش جذب در ۲۹۰ نانومتر، دو دقیقه پس از شروع واکنش نسبت به زمان شروع واکنش محاسبه شد. با استفاده از تغییرات جذب در طول‌موج ۲۹۰ نانومتر، ضریب خاموشی آسکوربات (ε= ۲/۸ $mMol^{-1}cm^{-1}$) و فرمول A= εbc، میزان آسکوربات برجای‌مانده پس از ۲ دقیقه انجام واکنش آنزیمی محاسبه شد (Nakano and Asada, 1981).

فعالیت آنزیم پراکسیداز (GPOD) (EC 1.11.1.7)

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از گایاکل و اندازه‌گیری میزان جذب تتراگایاکل تشکیل‌شده از گایاکل درنتیجه فعالیت پراکسیداز، در ۴۷۰ نانومتر انجام گرفت. میزان جذب تتراگایاکول (حاصل از اکسید شدن گایاکول) در ۴۷۰ نانومتر در لحظه شروع واکنش پس از اضافه نمودن عصاره آنزیمی و پس از یک دقیقه خوانده شد. با استفاده از تغییرات جذب در یک دقیقه در ۴۷۰ نانومتر، ضریب خاموشی تتراگایاکل (ε=۲۵/۵ $mMol^{-1}cm^{-1}$) و فرمول A= εbc، مقدار تتراگایاکول تشکیل‌شده محاسبه شد (Plewa et al., 1991).

تعیین پراکسیداسیون لیپیدهای غشا

بر اساس روش هس و پاکر (Heath and Packer, 1968) و با استفاده از اندازه‌گیری مالون دی آلدئید به‌عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدی غشا انجام گرفت. میزان مالون دی آلدئید با اندازه‌گیری جذب در طول‌موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر محاسبه شد.

سنجش پراکسید هیدروژن (H_2O_2)

سنجش پراکسید هیدروژن با استفاده از روش ولیکوا و همکاران (Velikova et al., 2000) انجام گرفت. بافت برگ گیاه در حمام یخ با تری کلرواستیک ۰/۱ درصد سائیده مشد. عصاره در سانتریفوژ یخچال دار با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول بالایی به ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (pH=7) و ۱ میلی‌لیتر یدور پتاسیم ۱ مولار اضافه شد و جذب در طول‌موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد.

ارتفاع گیاه

ارتفاع گیاهان از سطح زمین تا بلندترین ساقه اصلی اندازه-گیری شد.

وزن خشک اندام هوایی

پس از برداشت گیاهان، اندام هوایی در آون در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت و وزن شد.

تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. نمودارها و منحنی‌های همبستگی با نرم‌افزار Excel انجام شدند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد صفات موردبررسی شامل پرولین، فعالیت آنزیم‌های CAT، POX، APX، MDA، H_2O_2، ارتفاع و وزن خشک گیاه تحت تأثیر شوری قرار گرفتند. همچنین تفاوت بین تیمارهای محلول‌پاشی و اثر

متقابل سطوح شوری و تیمارهای محلول‌پاشی مورداستفاده در کلیه صفات موردمطالعه معنی‌دار بود (جدول ۲). بر این اساس، مقایسه میانگین‌ها فقط بر اساس اثرات متقابل ارائه گردید.

تأثیر شوری و سطوح محلول‌پاشی بر محتوای پرولین در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۲). مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح شوری و تیمارهای محلول‌پاشی برای محتوای پرولین نشان داد که همه تیمارها نسبت به تیمار شاهد و محلول‌پاشی با آب افزایش یافتند. در سطح عدم تنش بین سطوح محلول‌پاشی اختلاف کمتری مشاهده شد، اما با افزایش سطح شوری تا سطح ۵۰ میلی‌مولار اختلاف بین تیمارها بیشتر شد و محتوای پرولین در این سطح نسبت به دو سطح دیگر بیشتر بود، در سطح ۱۰۰ میلی‌مولار محتوای پرولین نسبت به سطح ۵۰ میلی‌مولار کمتر شد (شکل ۱). بیشترین افزایش محتوای پرولین در تیمار ۵۰ میلی‌مولار شوری و محلول-پاشی ترکیب پرولین و اسید سالیسیلیک و کمترین افزایش در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار شوری و محلول‌پاشی با آب به دست آمد که به ترتیب افزایش ۱۴۳ و ۱۲ درصدی نسبت به تیمار شاهد نشان دادند (شکل ۱).

جدول ۲. تجزیه واریانس اثرات محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک و پرولین بر پرولین، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی برگ، مالون‌دآلدئید، محتوای پراکسیدهیدروژن، ارتفاع و وزن خشک اندام هوایی گیاه سویا تحت تنش شوری.

Table 2. Analysis of variance for the effects of salt stress, proline and salicylic acid (SA) applications on antioxidant enzymes activities, malondialdehyde, peroxide hydrogen, plant height and dry matter of soybean under salinity stress.

		Mean square							میانگین مربعات
منابع تغییرات Source of variations	درجه آزادی df	پرولین Proline	کاتالاز CAT	پراکسیداز POX	آسکوربات پراکسیداز APX	مالون دآلدئید MDA	پراکسید هیدروژن H_2O_2	ارتفاع Height	ماده خشک اندام هوایی Dry matter
شوری Salinity	2	5.081**	0.53***	0.85***	0.006***	2571.2***	7.88***	272.7***	140.12***
خطای اصلی Error a	9	0.034	0.001	0.008	0.00004	7.004	0.028	10.78	0.49
محلول‌پاشی Foliar	3	1.89**	0.40***	1.55***	0.0099***	88.79**	0.40***	151.44***	10.25***
شوری × محلول‌پاشی Salinity ×Foliar	6	0.131*	0.02**	0.054**	0.0005***	55.38**	0.23***	25.77*	3.03**
خطای فرعی Error b	27	0.039	0.002	0.01	0.00004	8.51	0.021	8.19	0.369
ضریب تغییرات (درصد) CV. (%)		*6.31*	*7.12*	*8.09*	*7.52*	*6.85*	*7.43*	*5.59*	*6.58*

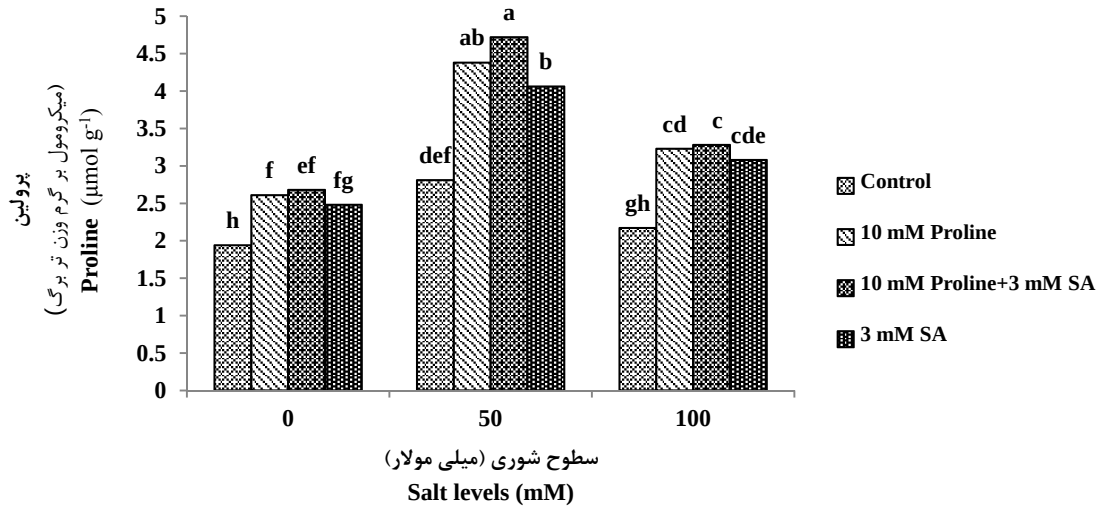
ns^، *، ** و *** به ترتیب بیانگر معنی‌دار نبودن، معنی‌دار بودن در سطوح ۵ درصد، ۱ درصد و ۰/۱ درصد.

ns, *, ** and *** show non-significance and significance at 5, 1 and 0.001% level, respectively.

نقش حفاظتی پرولین به‌غیراز تنظیم اسمزی مربوط به توانایی این ماده در حفظ پایداری غشاهای سلولی و پروتئین‌ها، مهار کردن گونه‌های فعال اکسیژن و بافر کردن پتانسیل احیایی سلول، تحت شرایط تنش است (Matysik et al., 2002). در این راستا باکری و همکاران (Bakry et al., 2014) گزارش کردند محتوای پرولین در گیاه بزرک تحت محلول‌پاشی پرولین نسبت به محلول‌پاشی با آب افزایش یافت و این باعث ایجاد مقاومت گیاه تحت شرایط تنش شد. علی و همکاران (Ali et al., 1999) در مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که پرولین به‌عنوان یک مولکول تنظیم‌کننده و سیگنال‌دهنده در گیاه عمل می‌کند و مقاومت به شوری را بهبود می‌دهد.

تجمع پرولین در بافت‌های گیاه یکی از متداول‌ترین تغییرات القاشده ناشی از تنش شوری در گیاه است. تجمع پرولین ممکن است به خاطر کاهش اکسیداسیون پرولین یا تحریک سنتز آن از گلوتامات و یا افزایش فعالیت آنزیم پروتئاز باشد (Nasir Khan et al., 2007). همچنین اسکندری زنجانی و همکاران (Eskandari Zanjani et al.,

2012) در این راستا نشان دادند محتوای پرولین برگ با کاربرد اسیدسالیسیلیک در گیاه دارویی درمنه تحت شرایط شوری افزایش یافت و اسید سالیسیلیک باعث افزایش مقاومت گیاه شد. اسید سالیسیلیک به‌عنوان افزایش‌دهنده محتوای پرولین درون‌سلولی شناخته شده است (Hayat et al., 2010).

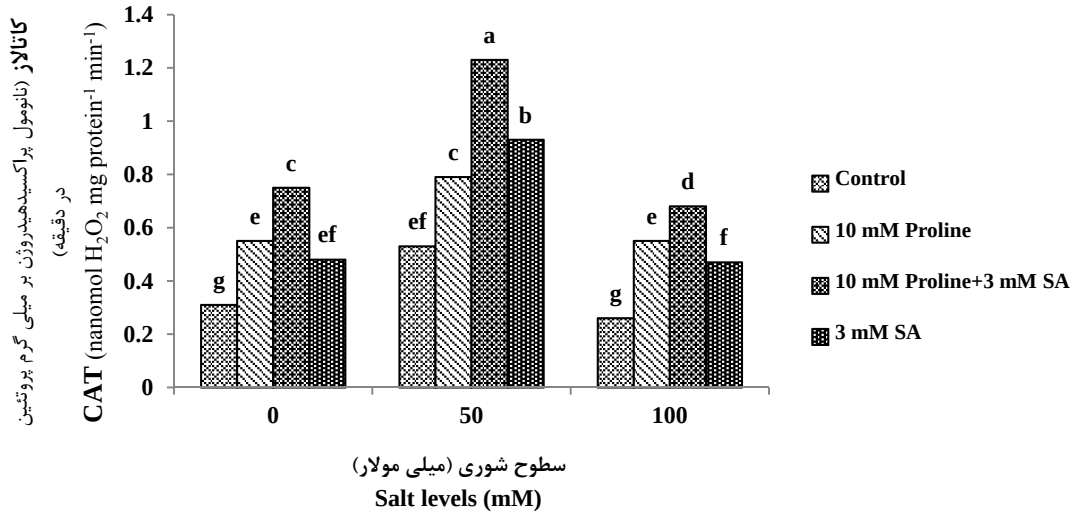


شکل ۱. تأثیر برهمکنش سطوح شوری و محلول‌پاشی برای محتوای پرولین.

Fig. 1. Interaction effects of salt levels and foliar treatments on proline content.

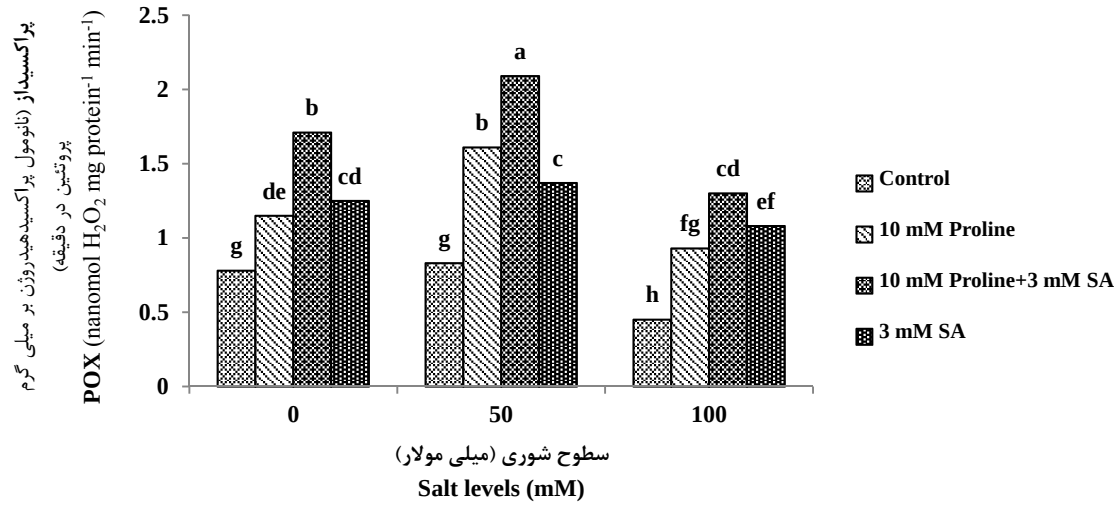
بیشترین میزان فعالیت برای هر سه آنزیم کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در تیمار ترکیب پرولین و اسید سالیسیلیک تحت تنش ۵۰ میلی‌مولار به دست آمد که به ترتیب افزایش ۲۹۷، ۲۸۷ و ۱۶۸ درصد نسبت به تیمار شاهد داشتند (شکل‌های ۲، ۳ و ۴). بعد از تیمار ترکیبی، برای هر سه آنزیم محلول‌پاشی پرولین و اسید سالیسیلیک بین سطوح مختلف تنش متفاوت بود؛ اما در همه سطوح تنش، تیمار محلول‌پاشی با آب در بین سطوح محلول‌پاشی کمترین میزان داشت (شکل‌های ۲، ۳ و ۴). در مطالعه فایز و بازید (Fayez and Bazaid, 2014) در گیاه گندم و برزویی و همکاران (Borzouei et al., 2012) شوری منجر به افزایش غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه جو شد درحالی‌که در مطالعه راو (Rao, 2013) فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در اثر شوری در گیاه گندم کاهش یافت. تنش‌های زنده و غیرزنده با تأثیر مستقیم و غیرمستقیم بر وضعیت آب گیاه باعث مختل شدن عمل فتوسنتز و نهایتاً القای تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شوند. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی عمومی‌ترین واکنش گیاهان در مقابله با صدمات ناشی از تنش اکسیداتیو است. تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌طور گسترده در بسیاری از گیاهان تحت تنش گزارش شده است (Halliwell, 1999). قدر و همکاران (Khedre et al., 2003) گزارش کردند شوری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز را کاهش می‌دهد ولی فعالیت این آنزیم‌ها در حضور پرولین به‌شدت بالاتر از عدم پرولین بود. ایشان معتقدند پرولین قادر است رادیکال‌های آزاد اکسیژن را مهار کند و اثرات تنش شوری بر گیاه را کاهش دهد؛ بنابراین هم‌زمان با افزایش تولید و وجود پرولین گیاه، شدت تنش اکسیداتیو کاهش می‌یابد (Kohler et al., 2009). هنگامی‌که اسید سالیسیلیک در غلظت و زمان مناسب به کار برده می‌شود موجب بروز تنش اکسیداتیو موقت و گذرا در سلول‌های گیاهی شده که به‌عنوان یک فرآیند مقاوم‌سازی عمل می‌نماید و موجب افزایش ظرفیت آنتی-اکسیدانی سلول می‌گردد (Daneshmand et al., 2012). اسید سالیسیلیک با تغییر فعالیت آنزیم‌هایی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز (آنزیم‌های دخیل در تولید یا تجزیه H_2O_2) موجب افزایش موقت و جزئی در مقدار H_2O_2 گردیده که منجر به القای

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول و سایر پاسخ‌های کاهش‌دهنده اثرات منفی تنش می‌گردد (Daneshmand et al., 2012). هوکو و همکاران (Hoque et al., 2007) گزارش کردند که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POX) و سوپراکسیددسموتاز (SOD) با کاربرد پرولین بر گیاه تحت تنش شوری به‌طور معنی‌داری افزایش یافت.



شکل ۲. تأثیر برهمکنش سطوح شوری و محلول‌پاشی برای فعالیت آنزیم کاتالاز.

Fig. 2. Interaction effects of salt levels and foliar treatments on Catalase activity.

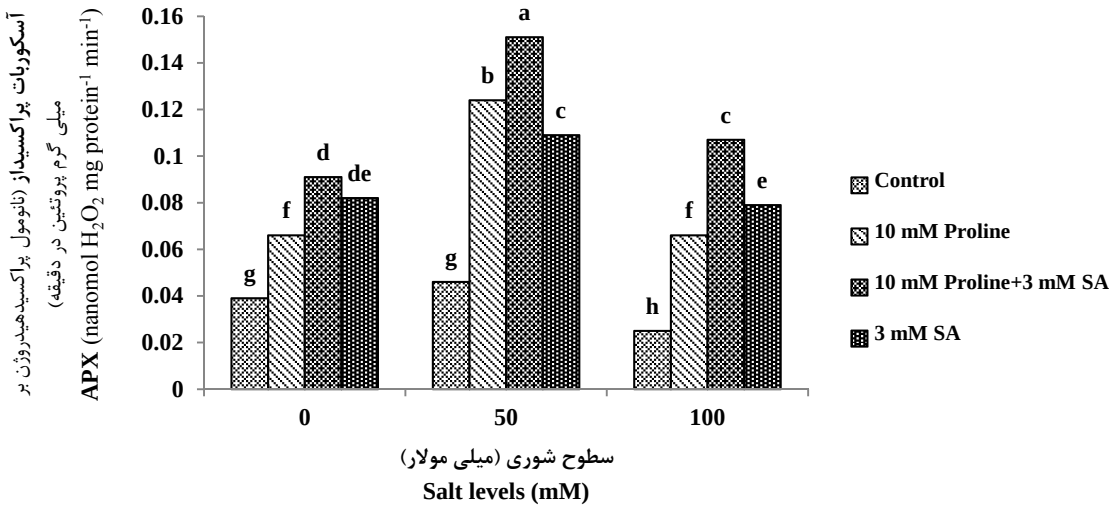


شکل ۳. تأثیر برهمکنش سطوح شوری و محلول‌پاشی برای فعالیت آنزیم پراکسیداز.

Fig. 3. Interaction effects of salt levels and foliar treatments on peroxidase activity.

تأثیر شوری بر غلظت مالون دآلدئید به‌عنوان شاخص شدت پراکسیداسیون غشاء لیپیدها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). اثر متقابل شوری و تیمارهای محلول‌پاشی نشان داد بیشترین غلظت مالون-دآلدئید در تیمار شوری ۱۰۰ میلی‌مولار و محلول‌پاشی با آب بود که افزایش ۱۶۱ درصدی نسبت به تیمار شاهد داشت (شکل ۵). در سطوح تنش ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار محلول‌پاشی تیمار ترکیبی پرولین و اسید سالیسیلیک

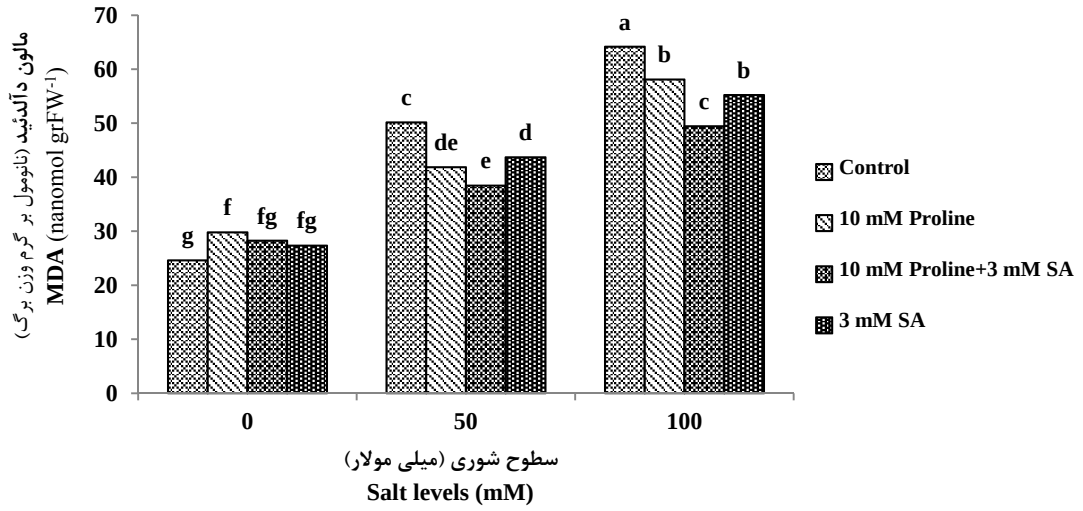
نسبت به سایر تیمارهای محلول‌پاشی باعث کاهش غلظت مالون‌دآلدئید شد، این کاهش در سطح ۵۰ و ۱۰۰ میلی-مولار ۲۳ درصد نسبت به شاهد هر سطح شد (شکل ۵). یکی از آسیب‌های جدی تنش شوری خسارت به غشاهای سلولی و رهاسازی یون‌ها از سلول به فضای بین سلولی است. این پدیده نتیجه تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن است که منجر به پراکسیداسیون لیپید و درنتیجه افزایش غلظت مالون‌دآلدئید، نفوذپذیری غشا و خسارت به سلول می‌شود (Azari et al., 2012). هر نوع رادیکال آزاد که قادر به برداشتن هیدروژن متصل به گروه فعال متیل موجود در زنجیره اسید چرب غیراشباع باشد، می‌تواند باعث پراکسیداسیون لیپیدها شود (Halliwell, 1999). اهمیت کاربرد پرولین به‌عنوان یک آنزیم حفاظتی در طول شرایط تنش غیرزیستی شناخته شده است (Okuma et al., 2000). این اثر به‌علاوه توسط نتایج کاربرد پرولین خارجی تحت تنش شوری از طریق تنظیم پروتئین‌های حفاظتی تنش در *Pancratium maritinmum* و کاهش اکسیداسیون لیپید غشا تائید می‌شود. همچنین دیف (Deef, 2007) هم در گندم گزارش کرد که کاربرد سالیسلیک اسید رشد را در گندم افزایش داد، اثرات شوری را مهار کرد و در بین دو غلظت مختلف، غلظت پایین‌تر آن (۱ میلی‌مولار) تأثیر بیشتری داشت.



شکل ۴. تأثیر برهمکنش سطوح شوری و محلول‌پاشی برای فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز.

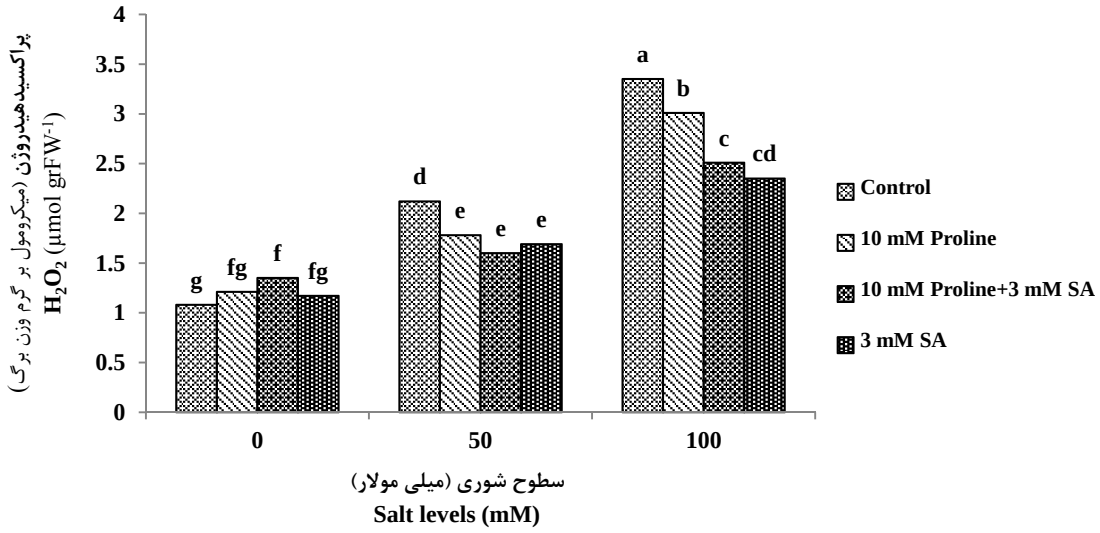
Fig. 4. Interaction effects of salt levels and foliar treatments on ascorbate peroxidase activity.

مقایسات میانگین اثر متقابل شوری و تیمارهای محلول-پاشی نشان داد به‌طورکلی با افزایش سطوح شوری محتوای پراکسید هیدروژن افزایش یافت، این افزایش در سطح ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار شوری مربوط به تیمار محلول‌پاشی با آب بود که به ترتیب افزایش ۹۶ و ۲۱۰ درصدی نسبت به شرایط عدم تنش و محلول‌پاشی با آب بود (شکل ۱). درحالی‌که با افزایش سطوح تنش تا سطح ۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، بین تیمارهای محلول‌پاشی پرولین، اسید سالیسیلیک و تیمار ترکیبی پرولین و اسید سالیسیلیک اختلاف معنی‌داری با یکدیگر وجود نداشت، اما اختلاف معنی‌داری با محلول‌پاشی با آب داشتند، کمترین محتوای پراکسید هیدروژن در سطح ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم مربوط به تیمار محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک بود که اختلاف معنی‌داری با تیمار ترکیبی پرولین و اسید سالیسیلیک نداشت که به ترتیب کاهش ۳۰ و ۲۵ درصدی نسبت به تیمار تنش ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و محلول‌پاشی با آب داشتند (شکل ۶).



شکل ۵. تأثیر برهمکنش سطوح شوری و محلول‌پاشی برای محتوای مالون‌دآلدئید.

Fig. 5. Interaction effects of salt levels and foliar treatments on malondialdehyde content.



شکل ۶. تأثیر برهمکنش سطوح شوری و محلول‌پاشی بر محتوای پراکسید هیدروژن.

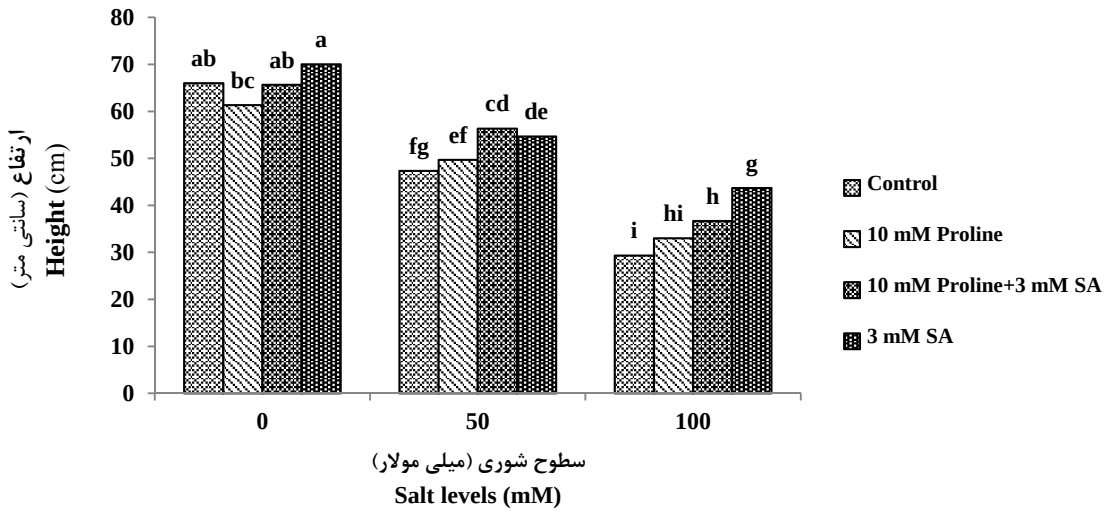
Fig. 6. Interaction effects of salt levels and foliar treatments on hydrogen peroxide.

به‌طورکلی تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROSها) در اثر تنش شوری افزایش می‌یابد. طبیعتاً با افزایش سطح تولید گونه‌های فعال اکسیژن در گیاه جهت تعادل فیزیولوژیک، سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل آنتی-اکسیدان‌های آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز فعال می‌شوند (Fayez and Bazaid, 2014; Borzouei et al., 2012). بولر و همکاران (Bowler et al., 1992) بیان کردند افزایش غلظت پراکسیدهیدروژن به‌عنوان سیگنالی برای افزایش بیان ژن آنزیم کاتالاز عمل کرده و درنتیجه فراوانی و فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه در شرایط تنش‌زا افزایش پیدا می‌کند. نقش حفاظتی پرولین به‌غیراز تنظیم اسمزی مربوط به توانایی این ماده در حفظ پایداری غشاهای سلولی و پروتئین‌ها، مهار کردن ROSها و بافر کردن پتانسیل ردوکس سلول، تحت شرایط تنش است. مکانیسم مولکولی مهار ROSها توسط پرولین مربوط به ویژگی‌های بیوشیمیایی پیرولیدین است که پرولین را به‌طور مؤثری قادر می‌سازد با اکسیژن تکی و گروه هیدروکسیل واکنش دهد و اثرات مخرب ROSها بر مولکول‌های مهمی نظیر DNA و آنزیم‌ها را خنثی کند (Matysik et al., 2002). علاوه بر

این طبق گزارش اسکوپلیتیس و همکاران (Skopelitis et al., 2006) ROSهای تولیدشده طی تنش‌های غیرزیستی می‌توانند سیگنالی برای بیان گلوتامات دهیدروژناز آنیونی که تشکیل گلوتامات (پیش ساز پرولین) را کاتالیز می‌کند باشند. کائول و همکاران (Kaul et al., 2008) در مطالعه خود نشان دادند که کاربرد خارجی L- پرولین یک پاک‌کننده قوی رادیکال‌های آزاد (به‌ویژه ROS) شناخته شده است. هونگ و همکاران (Hong et al., 2000) نتیجه گرفتند که نقش پرولین به‌عنوان یک پاک‌کننده رادیکال‌های آزاد در کاهش تنش نسبت به نقش آن به‌عنوان اسمولیت ساده مهم‌تر است. در این راستا ایسلام و همکاران (Islam et al., 2009) گزارش کردند کاربرد پرولین تحمل گیاه به شوری را بهبود می‌دهد و با کاهش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانع مرگ سلول می‌شود؛ که این مطالعات با یافته‌های این مطالعه (شکل‌های ۲، ۳، ۴ و ۶) مطابقت داشت. سطح اسید سالیسیلیک درونی و فعالیت آنزیم سنتز کننده SA یعنی بنزوئیک اسید ۳ هیدروکسی‌لاز توسط شوری در گیاهچه برنج تحریک می‌شود. این‌چنین نتایجی نشان می‌دهد که SA در پاسخ به شوری نقش دارد، پیش تیمار با SA در غلظت‌های بین ۰/۱ تا ۰/۵ میلی‌مولار موجب کاهش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (Harfouche et al., 2008).

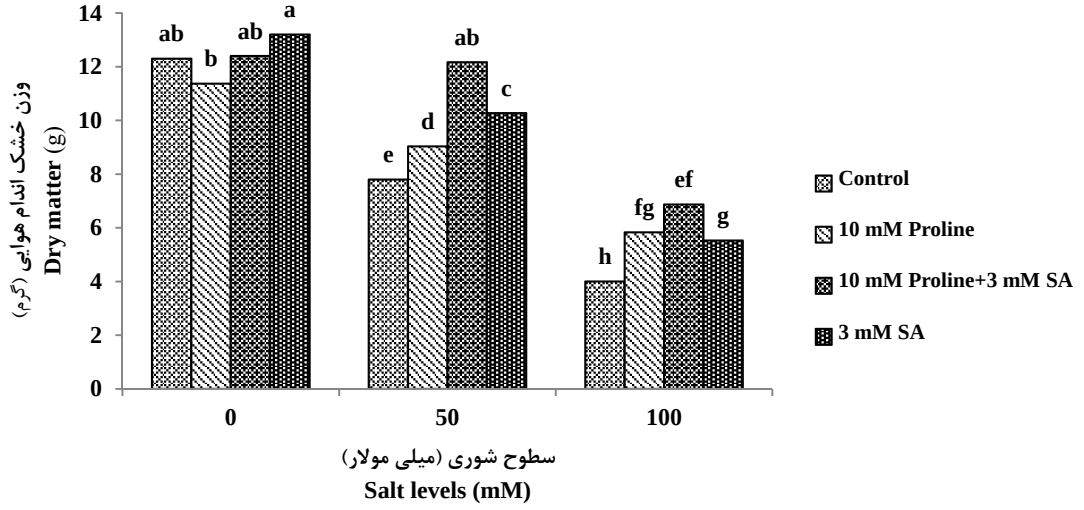
با افزایش سطوح شوری ارتفاع بوته و ماده خشک اندام هوایی گیاه کاهش یافت. احسان‌زاده و همکاران (Ehsanzadeh et al., 2009) گزارش کردند شوری منجر به کاهش وزن خشک بخش هوایی در گندم شد. ایشان اظهار داشتند کاهش سرعت رشد برگ‌ها و پیری زودهنگام و مرگ برگ‌ها منجر به کاهش جذب کربن و نتیجتاً کاهش رشد در شرایط شور می‌شود. شوری از طریق کاهش تکثیر سلول‌ها و کاهش مدت تجمع ماده خشک باعث کوتاه شدن میانگره‌ها، ارتفاع بوته و وزن خشک بخش هوایی می‌شود. همچنین محیط‌های شور دارای مقادیر زیادی یون‌هایی نظیر کلر و سدیم هستند که یا خود سمیت ایجاد می‌کنند و یا از طریق ایجاد اختلال در متابولیسم سایر عناصر منجر به بروز عدم تعادل در سیستم تغذیه گیاه می‌شوند. درنتیجه گیاه بخشی از انرژی خود را جهت مقابله با تنش از دست می‌دهد و نهایتاً رشد گیاه کاهش می‌یابد. در مطالعه احسان‌زاده و همکاران (Ehsanzadeh et al., 2009) نیز شوری منجر به کاهش وزن خشک برگ و به‌طورکلی بخش هوایی گندم شد.

مقایسات میانگین اثر متقابل شوری و تیمارهای محلول‌پاشی بر ارتفاع گیاه نشان می‌دهد در تیمار شاهد (عدم تنش) بین تیمارهای محلول‌پاشی تفاوت معنی‌داری ازلحاظ آماری وجود نداشت، درحالی‌که کمترین ارتفاع در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار مربوط به محلول‌پاشی با آب و بیشترین ارتفاع تحت محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک ۳ میلی‌مولار با ۴۳/۶۷ سانتی‌متر بود (شکل ۷). احتمال داده می‌شود اسید سالیسیلیک سبب بهبود جذب عناصر غذایی در شرایط تنش شوری می‌شود که این خود می‌تواند افزایش رشد را به همراه داشته باشد که افزایش ارتفاع گیاه یکی از این موارد است (Eraslan et al., 2007). اسکندری‌زنجانی و همکاران (Eskandari Zanjani et al., 2013) گزارش کردند تنش شوری باعث کاهش ارتفاع گیاه شد، درحالی‌که کاربرد اسید سالیسیلیک هم در شرایط شاهد (بدون تنش) و هم شرایط تنش شوری تأثیر مثبتی بر ارتفاع گیاه داشت. اثرات متقابل شوری و تیمارهای محلول‌پاشی بر وزن خشک اندام هوایی نشان داد در تیمار شاهد (عدم تنش)، محلول‌پاشی با اسید سالیسیلیک بیشترین میزان وزن خشک را داشت، بااین‌حال، با سایر تیمارهای محلول‌پاشی تفاوت چشمگیری نداشت (شکل ۷). درحالی‌که در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار شوری بیشترین وزن خشک مربوط به تیمار ترکیبی اسید سالیسیلیک و پرولین و کمترین میزان مربوط به تیمار محلول‌پاشی با آب بود (شکل ۸). با توجه به این‌که شرایط تنش سبب کاهش فعالیت آنزیم روبیسکو می‌شود، به نظر می‌رسد اسیدسالیسیلیک با افزایش فعالیت آنزیم روبیسکو و درنتیجه بهبود فتوسنتز سبب افزایش سطح برگ و درنتیجه افزایش وزن خشک اندام هوایی می‌شود. از طرفی افزایش بیوماس در اثر استفاده از اسید سالیسیلیک به خاطر فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ماده در غشا سلولی باشد. تیمار با اسید سالیسیلیک باعث افزایش مقادیر لیگنین در ساختار دیواره سلولی می‌شود (Vafabakhsh *et al*., 2008)؛ که این خود می‌تواند عاملی در افزایش وزن بیوماس گیاهان در معرض تنش شوری باشد. همچنین کایا و همکاران (Kaya et al., 2007) گزارش کردند محلول‌پاشی پرولین باعث افزایش وزن خشک اندام هوایی هندوانه تحت تنش شوری شد. این نتایج با مشاهدات ما مطابقت دارد.



شکل ۷. تأثیر برهمکنش سطوح شوری و محلول‌پاشی بر ارتفاع گیاه.

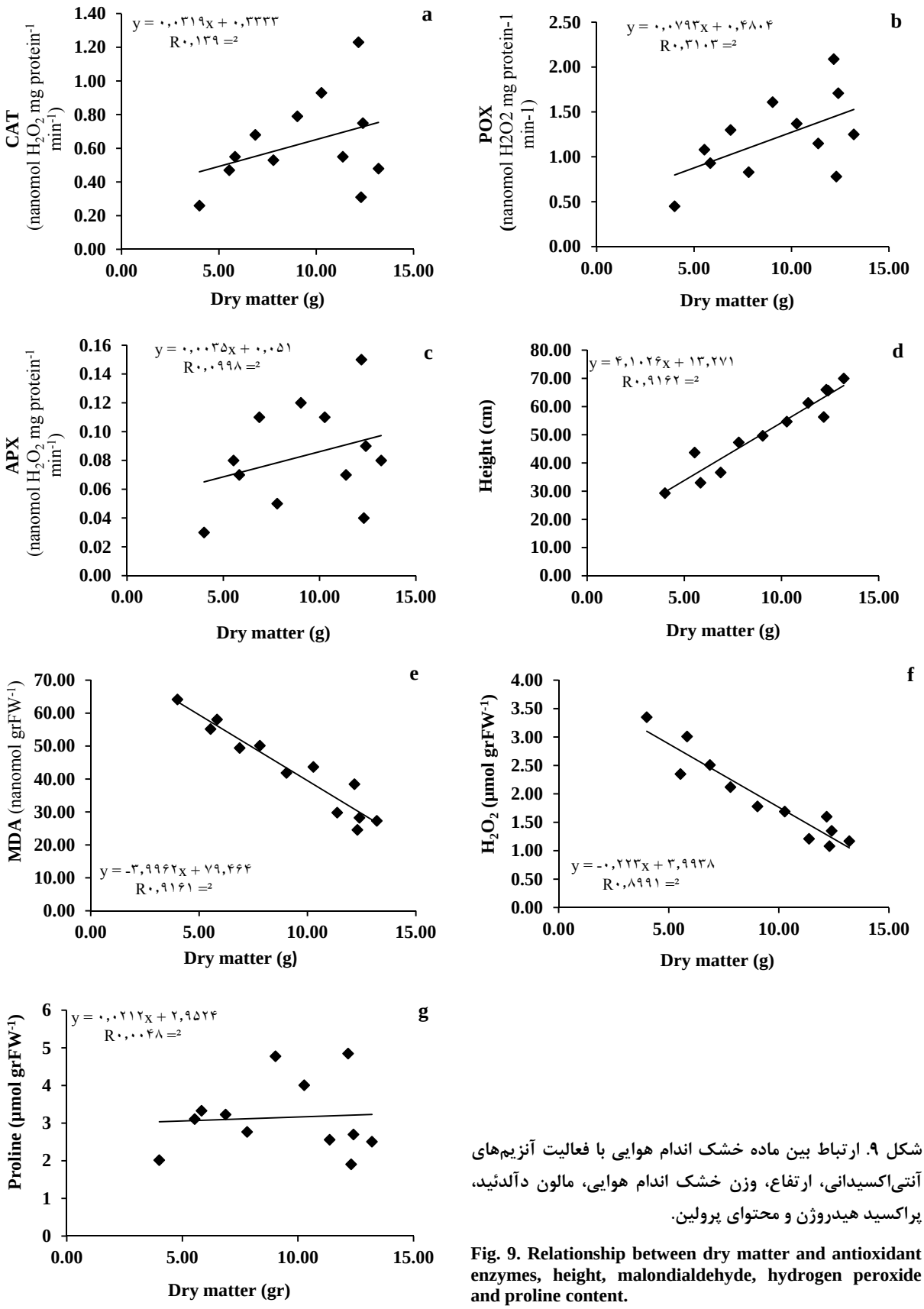
Fig. 7. Interaction effects of salt levels and foliar treatments on plant height.



شکل ۸. تأثیر برهمکنش سطوح شوری و محلول‌پاشی بر وزن خشک اندام هوایی گیاه.

Fig. 8. Interaction effects of salt levels and foliar treatments on plant dry matter.

بررسی ضرایب همبستگی بین صفات موردبررسی و وزن خشک اندام هوایی نشان داد بیشترین همبستگی مثبت بین وزن خشک اندام هوایی و ارتفاع (R^2= 92) بود و همبستگی منفی بین وزن خشک اندام هوایی و میزان مالون‌دآلدئید (R^2=-92) و پراکسیدهیدروژن (R^2=-90) داشت (شکل ۹). این نتایج نشان می‌دهد میزان مالون‌دآلدئید و پراکسیدهیدروژن با افزایش سطوح شوری افزایش می‌یابند، درحالی‌که میزان ماده خشک اندام هوایی کاهش می‌یابد. درنتیجه به‌منظور دستیابی به وزن خشک اندام هوایی بیشتر باید میزان مالون‌دآلدئید و پراکسیدهیدروژن را کاهش داد.



شکل ۹. ارتباط بین ماده خشک اندام هوایی با فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، ارتفاع، وزن خشک اندام هوایی، مالون دآلدئید، پراکسید هیدروژن و محتوای پرولین.

Fig. 9. Relationship between dry matter and antioxidant enzymes, height, malondialdehyde, hydrogen peroxide and proline content.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر محلول‌پاشی با پرولین و اسید سالیسیلیک با افزایش محتوای پرولین و بهبود قدرت سیستم دفاع آنتی-اکسیدانی و کاهش گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا موجب کاهش تنش اکسیداتیو در گیاه سویا گردید که نتیجه آن بهبود رشد و افزایش زیست‌توده گیاه است. درمجموع نتایج این مطالعه نشان داد با استفاده از غلظت‌های مناسب اسید سالیسیلیک و پرولین به‌صورت محلول‌پاشی، می‌توان اثرات منفی تنش شوری بر گیاه سویا را کاهش داد و به‌علاوه موجب بهبود رشد در شرایط تنش شوری در گیاه سویا گردید.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند صمیمانه تشکر می‌نمایم.

منابع

Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. Methods in Enzymology. 105, 121-126.

Ali, G., Srivastava, P. S., Iqbal, M., 1999. Proline accumulation, protein pattern and photosynthesis in regenereants grown under NaCl stress. Biology of Plants. 42, 89-95.

Ashraf, M., Harris, P.J., 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. Plant Science. 166, 3-16.

Azari, A., Modares Sanavi, S.A.M., Askari, H., Ghanati, F., Naji, A.M., Alizadeh, B., 2012. Effect of salt stress on morphological and physiological traits of two species of rapeseed (*Brassica napus* and *B. rapa*). Journal Field Crop Science. 14(2), 121-135. [In Persian with English Summary].

Bakry, B.A., Taha, M.H., Abdelgawad, Z.A., Abdallah, M.M.S., 2014. The Role of humic acid and proline on growth, chemical constituents and yield quantity and quality of three Flax cultivars grown under saline soil conditions. Agricultural Sciences. 5, 1566-1575.

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

Borzouei, A., Kafi, M., Akbari-Ghogdi, E., Mousavi-Shalmani, M.A., 2012. Long term salinity stress in relation to lipid peroxidation super oxide dismutase activity and proline content of salt sensitive and salt-tolerant wheat cultivars. Chili Journal of Agriculture Research. 72(4), 476-482.

Bowler, C., Van Montagu, M., Inze´, D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 43, 83-116.

Daneshmand, F., Arvin M.J., Keramat, B., Momeni, N., 2012. Interactive effects of salt stress and salicylic acid on germination and plant growth parameters of maize (*Zea mays* L.) under field conditions. Journal of Plant Process and Function. 1(1), 56-70. [In Persian with English Summary].

Deef, H.E., 2007. Influence of salicylic acid on stress tolerance during seed germination of *Triticum aestivum* and *Hordeum vulgare*. Advances in Biological Research.1, 40-48.

Ehsanzadeh, P., Sabagh Nekoonam, M., Nouri, J., Pourhadian, H., Shaydaee, S., 2009. Growth, chlorophyll and cation concentration of tetraploid genotypes. Journal of Plant Nutrition. 23(1), 58-70.

Eraslan, F., Inal, A., Gunes, A., Alpaslan, M. 2007. Impact of exogenous salicylic acid on growth, antioxidant activity and physiology of carrot plants subjected to combined salinity and boron toxicity. Scientia Horticulturae. 113, 120–128.

Eskandari Zanjani, K., Shirani Rad, A.H., Moradi Agdam, A., TaherKhani, T., 2013. Effect of Salicylic Acid Application under Salinity Conditions on Physiologic and Morphologic Characteristics of Artemisia (*Artemisia annua* L.). Journal of Crop Ecophysiology. 6(4), 415-428. [In Persian with English Summary].

Faraji, A., Reisi, S., Kiani, A.R., Yones Abadi, M., Sadeghnejad, H.R., Kia, Sh., Bagheri, M., Kazemi Talachi, M., Hezarjiribi, E., Mosa Khani, A., Sokht Sarai, N. 2015. Technical instruction of soybean production in Guilan state. Agricultural and Natural Resources Research Center of Guilan Province. Pp.30. [In Persian].

increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. Journal of Plant Physiology. 166, 1587- 97.

Jasim, A.H., Abu Al- Timmen, W.M., Al-Alwani, B.A., 2012. Effect of salt stress, application of salicylic acid and proline on enzymes activity of sweet pepper (*Capsicum annum* L.). Protection of environment and water quality, the basis for agricultural production. Food Security sustainable development. 285- 297.

Kang, G. 2003. Salicylic acid changes activities of H_2o_2 metabolizing enzymes and increases the chilling tolerance of banana seedlings. Environmental and Experimental Botany. 50, 9-15

Kaya, C., Tuna, A.L., Ashraf, M., Altunlu, H., 2007. Improved salt tolerance of melon (*Cucumis melo* L.) by the addition of proline and potassium nitrate. Environmental and Experimental Botany. 60(3), 397-403.

Kaul. S., Sharma, V., Mehta, V., 2008. Free radical scavenging potential of L-proline, evidence from in vitro assays. Amino Acids. 34, 315-20.

Khedr, A.H.A., Abbas, M.A., Wahid, A.A.A., Quick, W.P., Abogadallah, G.M., 2003. Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancratium maritimum* L. to salt-stress. Journal of Experimental Botany. 54, 2553–2562.

Kohler, J., Antonio Hernández, J., Caravaca, F., Roldán, A., 2009. Induction of antioxidant enzymes is involved in the greater effectiveness of a PGPR versus AM fungi with respect to increasing the tolerance of lettuce to severe salt stress. Environmental and Experimental Botany. 65, 245–252.

Läuchli, A., Luttge, U., 2002. Salinity, Environment-Plants-Molecules. The Netherlands, Kluwer Academic Publishers.

Matysik, J., Alia, B., and Mohanty, P., 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. Current Science. 82(5), 525-532.

Munns, R., 2005. Genes and salt tolerance, bringing them together. New Phytologist. 167, 645-63.

Fayez, K.A., Bazaid, S.A., 2014. Improving drought and salinity tolerance in barley by application of salicylic acid and potassium nitrate. Journal of the Saudi Society of Agricultural Science. 13, 45–55.

Halliwell, B. 1999. Antioxidant defense mechanism from the beginning to the end. Free Radical Research. 31, 261-272.

Harfouche, A.L., Rugini, E., Mencarelli, F., Botondi, R., Muleo, R., 2008. Salicylic acid induces H_2O_2 production and endochitinase gene expression but not ethylene biosynthesis in *Castanea sativa* in vitro model system. Journal of Plant Physiology. 165, 734-744.

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., and Fujita, M., 2013. Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-Induced damages in ecophysiology and responses of plants under salt stress. Springer New York. Pp. 25-87.

Hayat, Sh., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. Sh., Pichtel, J., Ahmad, A., 2012. Role of proline under changing environments. A review. Plant Signaling Behavior. 7(11), 1456-1466.

Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M., Ahmad, A., 2010. Effect of exogenous Salicylic acid under changing environment, A review. Environmental and Experimental Botany. 68, 14-25.

Heath, R.L., Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics. 125, 189–198.

Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., Verma, D. P., 2000. Removal of feedback inhibition of delta (1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. Plant Physiology. 122, 1129-36.

Hoque, M.A., Banu, M.N., Okuma, E., Amako, K., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., 2007. Exogenous proline and glycinebetaine increase NaCl-induced ascorbate- glutathione cycle enzyme activities, and proline improves salt tolerance more than glycinebetaine in tobacco Bright Yellow-2 suspension-cultured cells. Journal of Plant Physiology. 164, 1457-68.

Islam, M.M., Hoque, M.A., Okuma, E., Banu, V., Shimoishi, Y., Nakamura, Y., 2009. Exogenous proline and glycinebetaine

Rao, A., Ahmad, S.D., Sabir, S.M., Awan, S.I., Hussain Shah, A., Abbas, S.R., Shafique, S., Khan, F., Chaudhary, A., 2013. Potential antioxidant activities improve salt tolerance in ten varieties of Wheat (*Triticum aestivum* L.). American Journal of Plant Sciences. 4, 69-76.

Shahbazizadeh, E., Movahhedi Dehnavi, M., Balouchi, H.R., 2015. Effects of foliar application of salicylic and ascorbic acids on some physiological characteristics of soybean (cv. Williams) under salt stress. Journal of Plant Process and Function. 4 (11), 13-22. [In Persian with English Summary].

Shokrpour, M., Esfandiari, E., 2014. Grouping Different Wheat Varieties for Salt Tolerance using Some Biochemical and Physiological Indices. Journal of Crop Breeding. 6(14), 54-66.

Skopelitis, D.S., Paranychianakis, N.V., Paschalidis, K.A., Pliakonis, E.D., Delis, I. D., Yakoumakis, D.I., 2006. Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. The Plant Cell. 18(10), 2767-2781.

Vafabakhsh, J., Nasiri Mahalati, M., Kochaki, A., 2008. Impact of water stress on yield and radiation use efficiency of canola (*Berasica napus*). Journal of Field Crops Research. 6, 193-208. [In Persian with English Summary].

Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A., 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants, protective role of exogenous polyamines. Plant Science. 151, 59-66.

Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology. 22, 867-880.

Nasir Khan, M., Siddiqui, M.H., Mohammad, F., Masroor, M., Khan, A., Naeem, M., 2007. Salinity induced change in growth, enzyme activities, photosynthesis, proline accumulation and yield in linseed genotypes. Journal of Agriculture and Science. 3, 685-689.

Okuma, E., Soeda, K., Tada, M., Murata, Y., 2000. Exogenous proline mitigates the inhibition of growth of *Nicotiana tabacum* cultured cells under saline conditions. Soil Science and Plant Nutrition. 46, 257-63.

Plewa, M.J., Smith, S.R., Wagne, E.D., 1991. Diethyl dithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. Mutation Res/Fund Molecular Mechanisms Mutagenesis. 247, 57-64.

Ramezannezhad, R., Lahouti, N., Ganjali, A., 2013. Effect of salicylic acid on physiological and biochemical parameters on resistant and sensitive chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes under drought stress. Journal of plant Ecophysiology. 5(12), 24-36. [In Persian with English Summary].

Pashaee, Kh., Raiesi, S., Masoumi, A., Mostafavi, E., Shahkoomahalli, A., 2014. Effect of different level of salinity stress on some morphological and yield of different varieties of soybean. Journal of Oilseed Crops. 3, 75-88.