**نقش تیمارهای اسید سالیسیلیک و پرولین بر القاء فعالیت آنزیم­های آنتی­اکسیدانی و**

**پاسخ­های تحمل به تنش شوری در سویا (*Glycine max* L.)**

**1حمیده غفاری، 1محمودرضا تدین\* و جمشید رزمجو2**

**1گروه زراعت دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد**

**2گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان**

**\* نویسنده مسئول:** **mrtadayon@yahoo.com**

**چکیده**

شوری آب یا خاک یکی از مهم­ترین تنش­ها در مناطق خشک و نیمه خشک می­باشد که به شدت رشد گیاهان را از طریق تاثیر بر فرآیندهای فیزیولوژیک محدود می­کند. آزمایش حاضر با هدف بررسی بهبود تحمل به شوری سویا با محلول­پاشی پرولین و اسیدسالیسیلیک در سال 1395 در فضای باز گلخانه­های دانشگاه شهرکرد در جعبه­های کاشت با چهار تکرار به صورت اسپیلیت پلات در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا شد. عامل اصلی شامل شوری در سه سطح (0، 50 و 100 میلی­مولار) و عامل فرعی محلول­پاشی پرولین 10 میلی­مولار، اسید سالیسیلیک 3 میلی مولار، ترکیب اسید سالیسیلیک 3 میلی­مولار با پرولین 10 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 به طور چشمگیری محتوای پرولین، فعالیت آنزیم­های آنتی­اکسیدانی، ارتفاع و وزن خشک اندام هوایی را در سویا تحت تنش شوری افزایش داد. به­علاوه، تحت شوری 100 میلی­مولار، محلول­پاشی پرولین و اسید سالیسیلیک باعث کاهش مالون­دآلدئید و پراکسیدهیدروژن به ترتیب 23 و 25 درصد در مقایسه با تیمار محلول­پاشی با آب شدند. همچنین ارتفاع و وزن خشک اندام هوایی در سطح شوری 100 میلی­مولار با کاربرد پرولین و اسیدسالیسیلیک به میزان 32 و 38 درصد نسبت به محلول­پاشی با آب افزایش یافتند. بنابراین نتایج این مطالعه نشان می­دهد کاربرد پرولین و اسیدسالیسیلیک همراه با هم، تحمل به تنش شوری در سویا را از طریق فعال کردن سیستم دفاعی آنتی­اکسیدانی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا بهبود می­دهد.

کلمات کلیدی: سویا، فعالیت آنزیم­های آنتی­اکسیدانی، مالون­دآلدئید و وزن خشک اندام هوایی.

**مقدمه**

مشکل شوری منابع آب و خاک 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 روز افزون 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 انوع اکسیژن فعال از مکانیسم­های تحمل نظیر چرخه مهلر، چرخه گلوتاتیون- آسکوربات و چرخه گزانتوفیل بهره می­برند (Ashraf and Harris, 2004). اجزای چرخه­های یاد شده با جذب انواع اکسیژن فعال و یا ممانعت از تولید آنها به پایداری سلول کمک می­کنند. این چرخه­ها از آنزیم­های آنتی­اکسیدانی و آنتی­اکسیدان­ها تشکیل شده­اند. کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و سوپر اکسید دسموتاز از جمله آنزیم­های آنتی­اکسیدانی در سلول­های گیاهی به شمار می­روند (Ashraf and Harris, 2004). افزایش فعالیت آنزیم­های جذب کننده 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 به شدت تحت تأثیر چنین تغییراتی است. علاوه بر این، علت کاهش بیوماس در شرایط شوری را کم شدن سطح برگ به عنوان یک منبع تأمین کننده 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، یک ساله از خانواده لگومینوز و یک گیاه زراعی بسیار مهم در سطح جهان است. دانه سویا از نظر روغن (تقریبا 20 درصد) و پروتئین (تقربا 40 درصد) غنی است. بین گیاهان روغنی، سویا دارای بیشترین میزان پروتئین و بیشترین درآمد ناخالص است. کل تولید جهانی سویا در سال 2013 حدود 261 میلیون تن بود، که آمریکا با 32 درصد، برزیل با 29 درصد، آرژنتین 19 درصد، چین 5 درصد، هند 4 درصد بیشترین تولیدکننده­های جهان بوده­اند. در ایران، سطح زیر کشت سویا در سال­های اخیر 60 تا 80 هزار هکتار بود که حدود 85 درصد آن آبی و 15 درصد دیم بوده است (Faraji *et al*., 2015). سویا گیاه زراعی است که در برابر شوری مقاومت چندانی ندارد، لذا آب­های شور به ویژه در نقاطی که زهکشی محدود است سبب کاهش عملکرد آن می­شود (Pashaee *et al*., 2014). با توجه به اینکه تولید بخش قابل توجهی 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 به­عنوان 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 به ویژه طی مقاومت سیستمیک کسب شده 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 به عنوان 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 به ویژه آمینواسیدها را تجمع می­کنند. آمینواسیدها به عنوان پیش ماده و ماده متشکله پروتئین­ها شناخته شده­اند 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 به عنوان یک اسمولیت عالی عمل می­کند (Hayat *et al*., 2012). شوری منجر به کاهش یوبی­کوئینون و جلوگیری از فعالیت آنزیم­های آنتی­اکسیدانی کاتالاز و پراکسیداز می­شود، که با محلول­پاشی پرولین به طور چشمگیری بر این کاهش غلبه می­شود (Munns, 2005). در مطالعات انجام شده توسط Hayat و همکاران (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 دسموتاز) می­شود. در ایران شوری یک مسأله فراگیر و محدود کننده تولید پایدار کشاورزی است. از این رو به نظر می­رسد شناخت عملیات مدیریتی و استفاده از ترکیباتی که باعث آلودگی محیط زیست 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 به عنوان یک گیاه پروتئینی و روغنی با ارزش در زراعت لازم به ارزیابی کاهش این گیاه تحت تنش شوری می­باشد. هدف از این مطالعه بررسی نقش اسیدسالیسیلیک به عنوان ترکیبی با خواص آنتی­اکسیدانی و پرولین به عنوان اسمولیت سازگار و تنظیم اسمزی در مواجه با تنش شوری و در جهت القای فعالیت آنزیم­های آنتی­اکسیدانی و بهبود رشد سویا تحت تنش شوری بوده است.

**مواد و روش­ها**

به منظور بررسی محلول­پاشی اسید سالیسیلیک و پرولین روی گیاه سویا (رقم سامان با گروه رسیدگی زودرس) تحت تنش شوری آزمایشی به صورت 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 1:3 استفاده شد. در هر جعبه 8 عدد بذر کاشته شد و پس از استقرار گیاهچه­ها و در مرحله 3 برگی بوته­های اضافی تنک شدند و در هر جعبه تنها 4 گیاه نگه­داشته شد. نیاز کودی خاک مورد استفاده برای جعبه­های کاشت بر حسب نتایج آزمون خاک (جدول 1) صورت گرفت. تا قبل از شروع اعمال تیمار­ها، آبیاری با آب شهری انجام گرفت. عامل اصلی شامل آبیاری با آب شور با کلریدسدیم: صفر، 50 و 100 میلی­مولار و عامل فرعی شامل محلول­پاشی: پرولین 10 میلی­مولار، اسید سالیسیلیک 3 میلی مولار، ترکیب اسید سالیسیلیک 3 میلی­مولار با پرولین 10 میلی­مولار، و شاهد (محلول­پاشی با آب) (Shahbazizade *et al*., 2014 و Jasim *et al*., 2012) بود. محلول­پاشی روی گیاه در مرحله 4 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 4 برگی رسیدند، محلول­پاشی در دو مرحله و با فاصله زمانی 7 روز صورت گرفت. گیاهان شاهد تنها بوسیله آب خالص محلول­پاشی شدند. 7 روز بعد از محلول­پاشی دوم با افزودن تدریجی کلریدسدیم به آب آبیاری، اعمال شوری انجام شد. آبیاری با آب شور به فاصله زمانی هر سه روز یکبار صورت گرفت پس از هر بار آبیاری زه­آب 5 جعبه از هر تیمار بطور 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 خارج شده به خاک هر جعبه برگشت داده شد تا غلظت نمک در خاک براساس مقادیر تیمارها ثابت باقی بماند. رطوبت خاک در محدوده ظرفیت زراعی مزرعه نگه داشته شد. مقدار آب مورد نیاز هر جعبه با وزن کردن جعبه و اختلاف وزن آن در شرایط آبیاری شده و خشک بدست آمد.

جدول 1- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک

Table 1- Soil physical and chemical characteristics.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| pH | EC | OC | N | P ava. | K ava. | Sandy | Silt | Clay | Depth(cm) | Texture |
|  (dS m-1) | (%) | (mg/kg) | (%) |
| 7.7 | 0.41 | 1.11 | 0.12 | 17.1 | 458 | 26 | 34 | 39 | 0-30 | Loam- Clay |

در مرحله گلدهی صفات زیر اندازه­گیری شدند.

- پرولین: برای اندازه گیری پرولین محتوای بافت برگ از روش Bates و همکاران (1973) استفاده شد. 5/0 گرم از بافت برگ در هاون چيني کاملا كوبيده شد تا به حالت خميري در آید. سپس 10 ميلي ليتر سولفوسالیسيليك اسيد 3 درصد به آن اضافه شد و محتوي هاون از كاغذ صافي عبور داده شد. به 2 ميلي ليتر محلول، 2 ميلي ليتر اسيد ناين هيدرين (125 ميلي گرم ناين­هيدرين+ 2 ميلي ليتر اسيد فسفريك 6 مولار + 3 ميلي ليتر اسيد استيك گلاسيال + 2 ميلي ليتر اسيداستيك) اضافه شد. محتوي حاصل مخلوط شد و در حمام آب جوش در دماي 100درجه سانتيگراد به مدت 1 ساعت گذاشته شد و سپس لوله­هاي محتوي محلول حاصل در يخ قرار داده، پس از يكي شدن دماي آن با دماي محيط به آن 4 ميلي ليتر تولوئن اضافه گردید و به مدت 20-15 ثانيه بهم زده شدند. استانداردهاي پرولين را در مقادير0 ، 01/0 ، 02/0 ، 03/0 و 04/0 ميكرومول بر ميلي ليتر تهيه شد، نمونه هاي حاصل و استانداردها در طول موج 520 نانومتر با كمك دستگاه اسپكتروفتومتر قرائت شد.

- تهيه عصاره آنزیمی: برای تهیه عصاره آنزیمی يك گرم بافت تر برگ در يك ‌ها‌ون چيني محتوي سه ميلي‌ليتر بافر فسفات 50 ميلي مولار با pH 2/7 که شامل اتيلن دي آمين تترا استيك اسيد (EDTA) 1 ميلي مولار، فنيل متان سولفونيل فلوريد (PMSF) 1 ميلي مولار و پلي وينيل پيروليدون (PVP) 1 درصد بود، سائيده شد. عصاره حاصل به مدت 15 دقيقه در سانتريفوژ يخچال‌دار با 14000 دور در دقیقه قرار گرفت. از محلول رویي براي سنجش فعاليت آنزيم‌ها استفاده شد .

- فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)(EC 1.11.1.6): سنجش فعاليت آنزيم كاتالاز با استفاده از محاسبه‌ کاهش جذب H2O2 در 240 نانومتر و با روش Aebi(1984) انجام گرفت. ميزان H2O2 موجود در مخلوط واکنش پس از 1 دقيقه با استفاده از ضريب خاموشي (mMol-1cm-1 0394/0ε=) و فرمول A= εbc محاسبه شد که نشان‌دهنده ميزان فعاليت آنزيم کاتالاز مي‌باشد.

- فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسيداز (APX)(EC1.11.1.1): در این سنجش با شروع واکنش آنزيمي و اکسيد شدن آسکوربات، کاهش جذب در 290 نانومتر، دو دقيقه پس از شروع واکنش نسبت به زمان شروع واکنش محاسبه شد. با استفاده از تغييرات جذب در طول موج 290 نانومتر، ضريب خاموشي آسکوربات (mMol-1cm-1 8/2 =ε) و فرمول A= εbc، ميزان آسکوربات برجاي مانده پس از 2 دقيقه انجام واکنش آنزيمي محاسبه شد (Nakano and Asada, 1981).

- فعالیت آنزیم پراکسیداز (GPOD)(EC 1.11.1.7): سنجش فعاليت آنزيم پراکسيداز با استفاده از گاياکل و اندازه‌گيري ميزان جذب تتراگاياکل تشکيل شده از گاياکل در نتيجه فعاليت پراکسيداز، در 470 نانومترانجام گرفت. ميزان جذب تتراگاياکول (حاصل از اکسيد شدن گاياکول) در 470 نانومتر در لحظه شروع واکنش پس از اضافه نمودن عصاره آنزيمي و پس از يک دقيقه خوانده شد. با استفاده از تغييرات جذب در يک دقيقه در 470 نانومتر، ضريب خاموشي تتراگاياکل (mMol-1cm-1 5/25ε=) و فرمول A= εbc، مقدار تتراگاياکول تشکيل شده محاسبه شد (Plewa *et al*., 1991).

- تعیین پراکسیداسیون لیپیدهای غشا: بر اساس روش Heath and Packer (1968) و با استفاده از اندازه گیری مالون دی آلدئید به عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدی غشا انجام گرفت. میزان مالون دی آلدئید با اندازه گیری جذب در طول موج های 532 و 600 نانومتر محاسبه شد.

- سنجش پراکسيد هيدروژن (H2O2) : سنجش پراکسيد هيدروژن با استفاده از روش Velikova و همکاران (2000) انجام گرفت. بافت برگ گياه در حمام يخ با تری کلرواستيک 1/0 درصد سائيده مشد. عصاره در سانتريفوژ يخچال دار با 10000 دور در دقیقه برای 15 دقيقه در4 درجه سانتي­گراد سانتريفيوژ شد. سپس 5/0 ميلی ليتر از محلول بالایی به 5/0 ميلی ليتر بافر فسفات پتاسيم 10 ميلی مولار (pH=7) و 1 ميلی ليتر يدور پتاسیم 1 مولار اضافه شد و جذب در طول موج 390 نانومتر خوانده شد.

* ارتفاع گیاه: ارتفاع گیاهان از سطح زمین تا بلندترین ساقه اصلی اندازه­گیری شد.

- وزن خشک اندام هوایی: پس از برداشت گیاهان، اندام هوایی در آون در دمای 80 درجه سانتی­گراد به مدت 48 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 مورد بررسی شامل پرولین، فعالیت آنزیم­های CAT، POX، APX، MDA، H2O2، ارتفاع و وزن خشک گیاه تحت تاثیر شوری قرار گرفتند. همچنین تفاوت بین تیمارهای محلول­پاشی و اثر متقابل سطوح شوری و تیمارهای محلول­پاشی مورد استفاده در کلیه صفات مورد مطالعه معنی­دار بود (جدول 2). بر این اساس، مقایسه میانگین­ها فقط بر اساس اثرات متقابل ارائه گردید.

جدول 2- 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 enzymes activities, malondialdehyde, peroxide hydrogen, height and dry matter of soybean under salt stress.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| میانگین مربعاتMean square |  | منابع تغییراتSource of variation |
| ماده خشک اندام هواییDry matter | ارتفاعHeight | H2O2 | MDA | APX | POX | CAT | پرولینProline | درجه آزادیdf |
| 140.12\*\*\* | 272.7\*\*\* | 7.88\*\*\* | 2571.2\*\*\* | 0.006\*\*\* | 0.85\*\*\* | 0.53\*\*\* | 5.081\*\* | 2 | شوریSalt  |
| 0.49 | 10.78 | 0.028 | 7.004 | 0.00004 | 0.008 | 0.001 | 0.034 | 9 | خطای اصلیError a |
| 10.25\*\*\* | 151.44\*\*\* | 0.40\*\*\* | 88.79\*\* | 0.0099\*\*\* | 1.55\*\*\* | 0.40\*\*\* | 1.89\*\* | 3 | محلول­پاشیFoliar |
| 3.03\*\* | 25.77\* | 0.23\*\*\* | 55.38\*\* | 0.0005\*\*\* | 0.054\*\* | 0.02\*\* | 0.131\* | 6 | شوری × محلول­پاشیSalt ×Foliar |
| 0.369 | 8.19 | 0.021 | 8.51 | 0.00004 | 0.01 | 0.002 | 0.039 | 27 | خطای فرعیError b |
| 6.58 | 5.59 | 7.43 | 6.85 | 7.52 | 8.09 | 7.12 | 6.31 |  | ضریب تغییرات (درصد)CV. (%) |

^ns ،\*،\*\*و \*\*\*به ترتيب بيانگر معني‌دار نبودن، معني‌دار بودن در سطوح 5 درصد، 1 درصد و 1/0 درصد.

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

تاثیر شوری و سطوح محلول­پاشی بر محتوای پرولین در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی­داری مشاهده شد (جدول 2). 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 50 میلی­مولار اختلاف بین تیمارها بیشتر شد و محتوای پرولین در این سطح نسبت به دو سطح دیگر بیشتر بود، در سطح 100 میلی­مولار محتوای پرولین نسبت به سطح 50 میلی­مولار کمتر شد (شکل 1). بیشترین افزایش محتوای پرولین در تیمار 50 میلی­مولار شوری و محلول­پاشی ترکیب پرولین و اسید سالیسیلیک و کمترین افزایش در تیمار 100 میلی­مولار شوری و محلول­پاشی با آب بدست آمد که به ترتیب افزایش 143 و 12 درصدی نسبت به تیمار شاهد نشان دادند (شکل 1). نقش حفاظتی پرولین به­غیر از 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 Bakry و همکاران (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. Ali و همکاران (1999) در مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که پرولین به عنوان 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 القا شده ناشی از تنش شوری در گیاه می­باشد. تجمع پرولین ممکن است به­خاطر کاهش اکسیداسیون پرولین یا تحریک سنتز آن از گلوتامات و یا افزایش فعالیت آنزیم پروتئاز باشد (Nasir Khan *et al*., 2007). همچنین Eskandari Zanjani و همکاران (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 به عنوان افزایش­دهنده محتوای پرولین درون سلولی شناخته شده است (Hayat *et al*., 2010).

شکل 1. تاثیر برهمکنش سطوح شوری و محلول­پاشی برای محتوای پرولین.

Figure 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 50 میلی­مولار به دست آمد که به ترتیب افزایش 297، 287 و 168 درصد نسبت به تیمار شاهد داشتند (شکل­های 2، 3 و 4). 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 2، 3 و 4). در مطالعه Fayez and Bazaid (2014) در گیاه گندم و Borzouei و همکاران (2012) شوری منجر به افزایش غلظت آنزیم­های آنتی­اکسیدانی در گیاه جو شد در حالی­که در مطالعه Rao (2013) فعالیت آنزیم­های آنتی­اکسیدانی در اثر شوری در گیاه گندم کاهش یافت. تنش­های زنده و غیرزنده با تأثیر مستقیم و غیر مستقیم بر وضعیت آب گیاه باعث مختل شدن عمل فتوسنتز و نهایتاً القای تنش اکسیداتیو در گیاهان می­شوند. افزایش فعالیت آنزیم­های آنتی اکسیدانی عمومی­ترین واکنش گیاهان در مقابله با صدمات ناشی از تنش اکسیداتیو می­باشد. تغییر در فعالیت آنزیم­های آنتی اکسیدانی به طور 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). هنگامی که اسید سالیسیلیک در غلظت و زمان مناسب به کار برده می­شود موجب بروز تنش اکسیداتیو موقت و گذرا در سلول­های گیاهی شده که به عنوان یک فرآیند مقاوم سازی عمل می­نماید و موجب افزایش ظرفیت آنتی­اکسیدانی سلول می­گردد (Daneshmand *et al*., 2012). اسید سالیسیلیک با تغییر فعالیت آنزیم­هایی نظیر سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز (آنزیم­های دخیل در تولید یا تجزیه H2O2) موجب افزایش موقت و جزئی در مقدار H2O2 گردیده که منجر به القای ظرفیت آنتی­اکسیدانی سلول و سایر پاسخ­های کاهش دهنده 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 به طور معنی­داری افزایش یافت.

شکل 2. تاثیر برهمکنش سطوح شوری و محلول­پاشی برای فعالیت آنزیم کاتالاز.

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

شکل 3. تاثیر برهمکنش سطوح شوری و محلول­پاشی برای فعالیت آنزیم پراکسیداز.

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

شکل 4. تاثیر برهمکنش سطوح شوری و محلول­پاشی برای فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز.

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

تاثير شوري بر غلظت مالون دآلدئید به عنوان شاخص شدت پراکسیداسیون غشاء لیپیدها در سطح احتمال يك درصد معني­دار بود (جدول2). اثر متقابل شوری و تیمارهای محلول­پاشی نشان داد بیشترین غلظت مالون­دآلدئید در تیمار شوری 100 میلی­مولار و محلول­پاشی با آب بود، که افزایش 161 درصدی نسبت به تیمار شاهد داشت (شکل 5). در سطوح تنش 50 و 100 میلی­مولار محلول­پاشی تیمار ترکیبی پرولین و اسید سالیسیلیک نسبت به سایر تیمارهای محلول­پاشی باعث کاهش غلظت مالون­دآلدئید شد، این کاهش در سطح 50 و 100 میلی­مولار 23 درصد نسبت به شاهد هر سطح شد (شکل 5). 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 در نتیجه 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 غیر اشباع باشد، می­تواند باعث پراکسیداسیون لیپیدها شود (Halliwell, 1999). اهمیت کاربرد پرولین به عنوان یک آنزیم حفاظتی در طول شرایط تنش غیرزیستی شناخته شده است (Okuma *et al*., 2000). این اثر به علاوه توسط نتایج کاربرد پرولین خارجی تحت تنش شوری از طریق تنظیم پروتئین­های حفاظتی تنش در *Pancratium maritinmum* و کاهش اکسیداسیون لیپید غشا تایید می­شود. همچنین Deef (2007) هم در گندم گزارش کرد که کاربرد سالیسلیک اسید رشد را درگندم افزایش داد، اثرات شوری را مهار کرد و دربین دو غلظت مختلف، غلظت پایین تر آن (1 میلی مولار) تأثیر بیشتری داشت.

شکل 5. تاثیر برهمکنش سطوح شوری و محلول­پاشی برای محتوای مالون­دآلدئید.

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

مقایسات میانگین اثر متقابل شوری و تیمارهای محلول­پاشی نشان داد به طور کلی با افزایش سطوح شوری محتوای پراکسید هیدروژن افزایش یافت، این افزایش در سطح 50 و 100 میلی­مولار شوری مربوط به تیمار محلول­پاشی با آب بود، که به ترتیب افزایش 96 و 210 درصدی نسبت به شرایط عدم تنش و محلول­پاشی با آب بود (شکل 1). در حالی­که با افزایش سطوح تنش تا سطح 50 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 100 میلی­مولار کلریدسدیم مربوط به تیمار محلول­پاشی اسید سالیسیلیک بود که اختلاف معنی­داری با تیمار ترکیبی پرولین و اسید سالیسیلیک نداشت که به ترتیب کاهش 30 و 25 درصدی نسبت به تیمار تنش 100 میلی­مولار کلریدسدیم و محلول­پاشی با آب داشتند (شکل 6). به­طورکلی تولید گونه­های فعال اکسیژن (ROS ها) در اثر تنش شوری افزایش می­یابد. طبیعتا با افزایش سطح تولید گونه­های فعال اکسیژن در گیاه جهت تعادل فیزیولوژیک، سیستم­های آنتی­اکسیدانی شامل آنتی­اکسیدان­های آنزیمی شامل سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز فعال می­شوند (Fayez and Bazaid, 2014 و Borzouei *et al*., 2012). بولر و همکاران (Bowler *et al*., 1992) بیان کردند افزایش غلظت پراکسیدهیدروژن به عنوان سیگنالی برای افزایش بیان ژن آنزیم کاتالاز عمل کرده و در نتیجه فراوانی و فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه در شرایط تنش­زا افزایش پیدا می­کند. نقش حفاظتی پرولین به­غیر از تنظیم اسمزی مربوط به توانایی این ماده در حفظ پایداری غشاهای سلولی و پروتئین­ها، مهار کردنROS ها و بافر کردن پتانسیل ردوکس سلول، تحت شرایط تنش است. مکانیسم مولکولی مهارROS ها توسط پرولین مربوط به ویژگی­های بیوشیمیایی پیرولیدین است، که پرولین را بطور موثری قادر می­سازد با اکسیژن تکی و گروه هیدروکسیل واکنش دهد و اثرات مخربROS ها بر مولکول­های مهمی نظیر DNA و آنزیم­ها را خنثی کند (Matysik *et* *al*., 2002). علاوه بر این طبق گزارش Skopelitis و همکاران (2006) ROS های تولید شده طی تنش­های غیر زیستی 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 (بویژه ROS) شناخته شده است. هونگ و همکاران (Hong *et al*., 2000) نتیجه گرفتند که نقش پرولین به عنوان یک پاک­کننده رادیکال­های آزاد در کاهش تنش نسبت به نقش آن به عنوان اسمولیت ساده مهم­تر است. در این راستا Islam و همکاران (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 2، 3، 4 و 6) مطابقت داشت. سطح اسید سالیسیلیک درونی و فعالیت آنزیم سنتز کننده SA یعنی بنزوئیک اسید 3 هیدروکسی­لاز توسط شوری در گیاهچه برنج تحریک می­شود. این چنین نتایجی نشان می­دهد که SA در پاسخ به شوری نقش دارد، پیش تیمار با SA در غلظت­های بین 1/0 تا 5/0 میلی­مولار موجب کاهش تجمع گونه­های فعال اکسیژن می­شود (Harfouche *et al*., 2008).

شکل 6. تاثیر برهمکنش سطوح شوری و محلول­پاشی بر محتوای پراکسیدهیدروژن.

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

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 نتیجتا 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. در نتیجه گیاه بخشی از انرژی خود را جهت مقابله با تنش از دست می­دهد و نهایتا رشد گیاه کاهش می­یابد. در مطالعه Ehsanzadeh و همکاران (2009) نیز شوری منجر به کاهش وزن خشک برگ و بطور کلی 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 از لحاظ آماری وجود نداشت، در حالی­که کمترین ارتفاع در تیمار 100 میلی­مولار مربوط به محلول­پاشی با آب و بیشترین ارتفاع تحت محلول­پاشی اسید سالیسیلیک 3 میلی­مولار با 67/43 سانتی­متر بود (شکل 7). 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 می­باشد (Eraslan *et al*., 2007). اسکندری­زنجانی و همکاران (Eskandari Zanjani *et al*., 2013) گزارش کردند تنش شوری باعث کاهش ارتفاع گیاه شد، در حالی­که کاربرد اسید سالیسیلیک هم در شرایط شاهد (بدون تنش) و هم شرایط تنش شوری تاثیر 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، با این حال، با سایر تیمارهای محلول­پاشی تفاوت چشمگیری نداشت (شکل 7). در حالی­که، در تیمار 100 میلی­مولار شوری بیشترین وزن خشک مربوط به تیمار ترکیبی اسید سالیسیلیک و پرولین و کمترین میزان مربوط به تیمار محلول­پاشی با آب بود (شکل 8). با توجه به این­که شرایط تنش سبب کاهش فعالیت آنزیم روبیسکو می­شود، به­نظر می­رسد اسیدسالیسیلیک با افزایش فعالیت آنزیم روبیسکو و در نتیجه بهبود فتوسنتز سبب افزایش سطح برگ و در نتیجه افزایش وزن خشک اندام هوایی می­شود. از طرفی افزایش بیوماس در اثر استفاده از اسید سالیسیلیک به­خاطر 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 Kaya و همکاران (2007) گزارش کردند محلول­پاشی پرولین باعث افزایش وزن خشک اندام­هوایی هندوانه تحت تنش شوری شد. این نتایج با مشاهدات ما مطابقت دارد.

شکل 7. تاثیر برهمکنش سطوح شوری و محلول­پاشی بر ارتفاع گیاه.

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

شکل 8. تاثیر برهمکنش سطوح شوری و محلول­پاشی بر وزن خشک اندام هوایی گیاه.

Figure 8. Interaction effects of salt levels and foliar treatments on Dry matter.

بررسی ضرایب همبستگی بین صفات مورد بررسی و وزن خشک اندام هوایی نشان داد بیشترین همبستگی مثبت بین وزن خشک اندام هوایی و ارتفاع (R2= 92) بود و همبستگی منفی بین وزن خشک اندام هوایی و میزان مالون­دآلدئید (R2=-92) و پراکسیدهیدروژن (R2=-90) داشت (شکل 9). این نتایج نشان می­دهد میزان مالون­دآلدئید و پراکسیدهیدروژن با افزایش سطوح شوری افزایش می­یابند، درحالی­که میزان ماده خشک اندام هوایی کاهش می­یابد. در نتیجه به منظور دستیابی به وزن خشک اندام هوایی بیشتر باید میزان مالون­دآلدئید و پراکسیدهیدروژن را کاهش داد.

شکل 9. ارتباط بین ماده خشک اندام هوایی با صفات مورد بررسی.

Figure 9. (a-g) Relationship between dry matter and measured traits.

**نتیجه­گیری**

در مطالعه حاضر محلول­پاشی با پرولین و اسید سالیسیلیک با افزایش محتوای پرولین و بهبود قدرت سیستم دفاع آنتی­اکسیدانی 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 زیست توده گیاه است. در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد با استفاده از غلظت­های مناسب اسید سالیسیلیک و پرولین به صورت محلول­پاشی، می­توان اثرات منفی تنش شوری بر گیاه سویا را کاهش داد و به علاوه 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 enzymol. 105: 121-126.

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

Ashraf, M., and 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., and 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., and 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., and 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., and 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., and Inze´, D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. Annual review of plant physiology and plant molecular biology. 43: 83-116.

Daneshmand, F., Arvin M. J., Keramat, B., and 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 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., and Shaydaee, S., 2009. Growth, chlorophyll and cation concentration of tetraploid genotypes. Journal Plant Nutrition. 23 (1): 58-70.

Eraslan, F., Inal, A., Gunes, A., and 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., and TaherKhani, T., 2013. Effect of Salicylic Acid Application under Salinity Conditions on Physiologic and Morphologic Characteristics of Artemisia (*Artemisia annua* L.). Journal 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., and Sokht Sarai, N. 2015. Technical instruction of soybean production in Guilan state. Agricultural and Natural Resources Research Center of Guilan Province. Pp.30

Fayez, K. A., and 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., and Muleo, R., 2008. Salicylic acid induces H2O2 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 mitigatl salt-induced damages In Ecophysiology and responses of plants under salt stress. Springer New York. p. 25-87.

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

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

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: 189–198.

Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., and 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., and 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., and Nakamura, Y., 2009. Exogenous proline and glycinebetaine 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., and 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 H2o2 metabolizing enzymes and increases the chilling tolerance of banana seedlings. Environmental and Experimental Botany. 50:9-15

Kaya, C., Tuna, A. L., Ashraf, M., and 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., and 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., and 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., and 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. and 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 Phytol. 167:645-63.

Nakano, Y., and 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., and 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., and 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., and Wagne, E. D., 1991. Diethyldithiocarbamate 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., and 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., and 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.

Rao, A., Ahmad, S. D., Sabir, S. M., Awan, S. I., Hussain Shah, A., Abbas, S. R.., Shafique, S., Khan, F., and 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., and 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., and Esfandiari, E., 2014. Grouping Different Wheat Varieties for Salt Tolerance using Some Biochemical and Physiological Indices. Journal Crop Breeding. 6(14): 54-66.

Skopelitis, D. S., Paranychianakis, N. V., Paschalidis, K. A., Pliakonis, E. D., Delis, I. D., and 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. Plant Cell. 18(10): 2767-2781.

Vafabakhsh, J., Nasiri Mahalati, M., and 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., and 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.

**Role of salicylic acid and proline treatment on induction of antioxidant enzyme activities and salt tolerance responses of soybean**

 **(*Glycine max* L.)**

**1Hamideh Ghafari , 1Mahmoudreza Tadayon\* and Jamshid Razmjoo2**

**1Department of Agronomy, College of Agriculture, Shahrekord University.**

**2Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Isfahan University of Technology.**

**\*corresponding author: mrtadayon@yahoo.com**

**Abstract**

Soil and water salinity is a major constraint in arid and semi-arid regions, lowering plant growth and productivity due to negative effects on plant physiological processes. The present experiment was aimed to investigate the improvement of salt tolerance in soybean by exogenous application of proline and salicylic acid as split plot arrangement in a randomized completely design in box with four replication in College of Agriculture, Shahrekord University in 2016. Main plot included three levels irrigation by saline water; 0 (control), 50 and 100 mM NaCl) and sub plot in four level of foliar applied (10 mM proline, in combination with 10 mM proline + 3 mM salicylic acid, 3 mM salicylic acid and sprayed with water (control)). Proline, enzyme activity, MDA, H2O2, height and dry matter were measured. The results revealed that effects exogenous application of proline and salicylic acid were significant increase in proline, activities of antioxidant enzymes, height and dry matter of soybean under salt stress. Furthermore, 100 mM NaCl with proline and salicylic acid application decreased malondialdehyde and peroxide hydrogen 23 and 25% compared to water, respectively. So, interaction effects showed height and dry matter increased by proline and salicylic acid application 32 and 38% under 100 mM NaCl compared to water, respectively. The present study, therefore, suggests that exogenous proline and salicylic acid improved tolerance to salt stress in soybean by increasing antioxidant defense system and decreasing membrane lipid peroxide.

Keywords: Soybean, activities of antioxidant enzymes, malondialdehyde and dry matter.