

The effect of salinity stress and salicylic acid on some physiological and biochemical traits of Black cumin (*Nigella sativa* L.)

Arash Fazeli^{*}, Batool Zarei, Zahra Tahmasebi

Department of agronomy and plant breeding, Faculty of agriculture, Ilam university, Ilam, Iran

Abstract

Black Cumin (*Nigella sativa* L.) is an annual plant from the buttercup family that has been used in food industry and cosmetic products in addition to its medicinal value. In this research, the effect of salinity stress and salicylic acid on some physiological and biochemical parameters including Relative Water Content (RWC), ion leakage, malondialdehyde, anthocyanin content, proline, catalase activity and ascorbate peroxides in black cumin (*Nigella sativa* L.) were investigated. Experimental treatments consisted of three levels (0 as control, 25 and 75 mM NaCl) and (0 as control, 0.75 and 1.5 mM) for salinity and salicylic acid, respectively. Three to four-leaf seedlings incubated for three weeks under salt stress, during the same period twice sprayed with salicylic acid. The results showed that salinity stress significantly reduced the RWC and anthocyanin, and significantly increased ion leakage malondialdehyde, proline, catalase activity and ascorbate peroxidase activity. While in salt stress condition, salicylic acid treatment increased the RWC, malondialdehyde, anthocyanin, proline, catalase activity and ascorbate peroxidase activity, but ion leakage was decreased. Black Cumin is sensitive to salinity stress, so by applying salicylic acid may increase the antioxidant capacity that can help to the possibility of plant to growth and survival under stress conditions.

Keywords: Ascorbate peroxidase, Anthocyanin, proline, Black cumin, Catalase

* Corresponding Author: a.fazeli@ilam.ac.ir

تأثیر تنش شوری و سالیسیلیک اسید بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.)

آرش فاضلی^{*}، بتول زارعی، زهرا طهماسبی

گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

چکیده

سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.) از خانواده آلاله و گیاهی یک‌ساله است که علاوه بر ارزش دارویی، در صنایع غذایی و فرآورده‌های آرایشی - بهداشتی کاربرد دارد. در پژوهش حاضر، اثر تنش شوری و سالیسیلیک اسید بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه سیاه‌دانه شامل محتوای نسبی آب برگ، آنتوسیانین، پرولین و مالون‌دی‌آلدهید، نشست یونی، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز بررسی شد. تیمارهای آزمایش شامل تنش شوری سدیم کلرید در سه غلظت صفر (شاهد بدون شوری)، ۲۵ و ۷۵ میلی‌مولار و سالیسیلیک اسید در سه غلظت صفر، ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی‌مولار بودند. گیاهچه‌های سه تا چهاربرگی به مدت سه هفته در شرایط تنش شوری و دوبر محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید با فاصله زمانی یک هفته قرار گرفتند. نتایج نشان دادند تنش شوری کاهش معنی‌دار محتوای نسبی آب برگ و آنتوسیانین و افزایش معنی‌دار نشست یونی، مالون‌دی‌آلدهید، پرولین، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز را باعث شد؛ در حالی که در تنش شوری، تیمار سالیسیلیک اسید افزایش محتوای نسبی آب برگ، مالون‌دی‌آلدهید، آنتوسیانین، پرولین، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز را موجب شد؛ اما نشست یونی کاهش یافت. از آنجا که سیاه‌دانه گیاهی حساس به شوری است، با کاربرد سالیسیلیک اسید و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، امکان رشد و بقای گیاه در شرایط تنش فراهم می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آسکوربات پراکسیداز، آنتوسیانین، پرولین، سیاه‌دانه، کاتالاز

* نگارنده مسئول: نشانی پست الکترونیک: a.fazeli@ilam.ac.ir، شماره تماس: ۰۹۱۸۸۴۳۷۳۰۲

مقدمه

سیاهدانه (*Nigella sativa* L.) گیاهی یک‌ساله و دیپلوئید ($2n=2x=12$) است و به راسته گل‌ساعتی‌ها (*Passiflorales*) و خانواده آلاله (*Ranunculaceae*) تعلق و اهمیت دارویی دارد (Antuono *et al.*, 2002). دانه آن سرشار از اسیدهای چرب لینولئیک اسید، اولئیک اسید و پالمیتیک اسید است. برای این گیاه خواص مختلف دارویی از جمله ضدسرطانی (Gurung *et al.*, 2010)، ضد میکروبی (Salem, 2005) و ضد دیابت‌بودن (Bassim, 2003) گزارش شده است. این خواص، بیشتر به دلیل وجود ترکیبات کینونی مانند تیموکینون و دی تیموکینون در دانه هستند. از اسانس سیاهدانه ماده‌ای به نام نیژلون استخراج می‌شود که کرم‌کش، مسهل و زیادکننده ترشحات شیر است (Antuono *et al.*, 2002).

شوری یکی از تنش‌های اصلی محیط به حضور غلظت زیاد نمک‌های محلول در خاک اطراف ریشه مربوط می‌شود. غلظت‌های زیاد نمک‌های محلول با افزایش فشار اسمزی، سمیت یونی و محدود کردن جذب آب از ریشه بر رشد گیاهان و در نتیجه تولید کشاورزی اثر می‌گذارند. بخش اصلی بازدارندگی رشد، با تجمع سدیم اضافی در خاک ایجاد می‌شود (Jouyban, 2012). مقدار کاهش رشد گیاه در شرایط شوری به ترکیب و غلظت نمک، مرحله فیزیولوژیک گیاه و گونه گیاهی بستگی دارد (Jaleel *et al.*, 2013). یکی از تغییرات بیوشیمیایی که در تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری رخ می‌دهد، تولید انواع اکسیژن فعال است که تخریب عمده غشا، چربی‌ها، پروتئین‌ها و

نوکلئیک اسیدها را باعث می‌شود (Garratt *et al.*, 2002). تنش شوری؛ کاهش سطح برگ (کاهش سطح نورساختی)، کاهش دسترسی به کربن دی‌اکسید به علت بسته شدن روزنه‌ها، کاهش هدایت میان برگ (یا مزوفیلی (به علت کاهش نفوذپذیری غشا به کربن دی‌اکسید بر اثر دهیدراته شدن غشاهای یاخته‌ای)، سمیت نمک، افزایش القای پیری و آسیب اکسایشی (اکسیداتیو) را باعث می‌شود (Orcutt and Nilsen, 2000). Hajar و همکاران (۱۹۹۶) با بررسی اثر تیمارهای مختلف شوری بر جوانه‌زنی و شاخص‌های رشد *N. sativa* مشاهده کردند با افزایش شوری؛ وزن ساقه، وزن ریشه، و سطح برگ کاهش یافتند. تأثیر تنش شوری بر صفات فیزیولوژیک مانند کاهش مقدار آنتوسیانین، کلروفیل، محتوای نسبی آب برگ در بایونته آلمانی (Salimi *et al.*, 2012) و کلزا (Chaparzadeh and Zarandi, 2011) و افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز در گیاه دارویی پریوش (Askary *et al.*, 2016) و زیره سبز (Ghorbanli *et al.*, 2012) نیز گزارش شده است.

برای افزایش مقاومت گیاهان به تنش، روش‌های مختلف از جمله به‌نژادی و استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد به کار گرفته می‌شوند. در مقایسه با روش‌های به‌نژادی که اغلب بلندمدت و پرهزینه هستند، استفاده از مواد شیمیایی مانند سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید آسان‌تر و ارزان‌تر است. سالیسیلیک اسید نقش مهمی در مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایفا می‌کند و بر رشد گیاه، جوانه‌زنی دانه، ساختار غشاء، جذب

از حدود ۱۲ روز جوانه زدند و گیاهچه‌ها در شرایط گلخانه با دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند؛ سپس در مرحله سه تا چهار برگگی تنک شدند؛ به طوری که در هر گلدان ۱۰ بوته نگه داشته شد. گیاهچه‌های حاصل به مدت سه هفته در تنش شوری با نمک سدیم کلرید در غلظت‌های صفر (شاهد یا بدون شوری)، ۲۵ و ۷۵ میلی‌مولار براساس پژوهش‌های قبلی (Ghorbanli *et al.*, 2012) و دو بار محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید براساس مطالعات Elyasi و همکاران (۲۰۱۶) با فاصله زمانی یک هفته در غلظت‌های صفر (شاهد)، ۰/۷۵، ۱/۵ میلی‌مولار قرار گرفتند. اعمال تیمار تنش براساس روش Ghorbanli و همکاران (۲۰۱۲) انجام شد. در نهایت، نمونه‌برداری از برگ گیاه انجام شد و نمونه‌ها پس از انجماد با نیتروژن مایع، به فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. صفات فیزیولوژیک ارزیابی شده در پژوهش حاضر شامل محتوای نسبی آب برگ، نسبت یونی، مالون‌دی‌آلدهید، آنتوسیانین، پرولین، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز بودند.

اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ: برای تعیین محتوای نسبی آب برگ‌ها، ابتدا تعداد مساوی برگ جوان از هر تیمار انتخاب و جدا شد. پس از جدا شدن برگ‌ها از گیاهچه‌ها بلافاصله در آزمایشگاه با ترازو (با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم) وزن شدند (FW)؛ سپس به مدت ۴ تا ۵ ساعت در آب مقطر (برای آب‌گیری کامل) در محیط آزمایشگاهی با دمای تقریبی ۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از این مدت، آب سطحی با

و انتقال یون، سرعت فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای، مقدار کلروفیل و گل‌دهی در شرایط تنش تأثیر می‌گذارد (Belkhadi *et al.*, 2010). سالیسیلیک اسید در کاهش آثار ناشی از تنش‌ها نقش دارد؛ برای نمونه، کاهش تأثیر تنش شوری بر صفاتی مانند مقدار آنتوسیانین، رنگیزه‌های فتوسنتزی و نش‌یونی بر اثر تیمار سالیسیلیک اسید در گیاهان دارویی مریم‌گلی (Gholami *et al.*, 2013) و شیرین‌بیان (Behnamnia and Shenavai Zare, 2013) گزارش شده است. اثر مثبت سالیسیلیک اسید بر رشد را به علت تأثیر آن بر سایر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نیز می‌دانند؛ برای نمونه در گیاه گندم سالیسیلیک اسید تغییر در تعادل تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی اکسین، سیتوکینین و آبسزیک اسید را موجب شد که نتیجه آن افزایش رشد در شرایط غیرتنش، بهبود رشد و افزایش مقاومت در تنش شوری بود (Shakirova *et al.*, 2003).

هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر تنش شوری بر برخی از شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه سیاه‌دانه و کاربرد سالیسیلیک اسید برای کاهش خسارت گیاه در برابر تنش شوری و در نتیجه بررسی امکان رشد گیاه در مناطق شور بود.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه سیاه‌دانه از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه و با بنومیل به نسبت دو در هزار ضدعفونی شدند؛ سپس در گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ۲۰ سانتی‌متر حاوی ماسه، رس و هوموس به نسبت ۱:۱:۱ کاشته شدند. بذرهای پس

میلی‌لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد محتوی ۰/۵ درصد تیوباریتوریک اسید اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حمام آب گرم قرار داده شد؛ سپس بلافاصله در حمام یخ سرد شد و دوباره مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. شدت جذب این محلول با اسپکتروفتومتر (مدل Spectrod، شرکت Jena AG، آلمان) در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. جذب سایر رنگیزه‌های غیراختصاصی در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کسر شد. برای محاسبه غلظت مالون‌دی‌آلدهید از ضریب خاموشی $10^{-5} \times 10^5$ بر مول بر سانتی‌متر استفاده شد و نتایج حاصل از اندازه‌گیری، برحسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه شدند (Heath and Packer 1969).

مقدار آنتوسیانین: برای اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین برگ از روش Wagner (۱۹۷۹) استفاده شد. ۰/۱ گرم بافت تازه گیاه در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و کلریدریک اسید خالص با نسبت ۱:۹۹) به‌طور کامل ساییده و عصاره حاصل سانتریفیوژ شد. روش‌ناور حاصل به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت؛ سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ و جذب محلول رویی در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. غلظت با رابطه ۳ و با در نظر گرفتن ضریب خاموشی (ε) ۳۳۰۰۰ بر مول بر سانتی‌متر محاسبه شد. A، جذب؛ b، عرض کوت و c، غلظت محلول مدنظر است.

$$A = \epsilon bc$$

رابطه ۳

کاغذ صافی خشک شد و نمونه‌ها دوباره وزن شدند (TW). پس از آن، برای اندازه‌گیری وزن خشک (DW)، برگ‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار داده شدند. محتوای نسبی آب برگ از رابطه ۱ محاسبه شد (Wagner, 1979).

$$\text{رابطه ۱} \quad \text{RWC} = \frac{(FW - DW)}{(TW - DW)} \times 100$$

اندازه‌گیری نشت یونی: برای سنجش میزان

آسیب به غشا، میزان نشت یونی اندازه‌گیری شد. ۰/۲ گرم از بافت سالم و تازه اندام هوایی گیاه پس از شستشو با آب مقطر درون لوله آزمایش قرار داده و ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. لوله آزمایش به مدت ۲ ساعت درون حمام آب گرم با دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و میزان هدایت الکتریکی نمونه‌ها (EC1)، با EC متر (مدل 4510، شرکت Jenway، انگلستان) اندازه‌گیری شد؛ سپس لوله آزمایش در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد و پس از خنک شدن لوله‌ها تا دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، میزان هدایت الکتریکی نمونه‌ها (EC2) دوباره اندازه‌گیری و درصد نشت یونی با رابطه ۲ محاسبه شد (Hamed *et al.*, 2007).

$$\text{رابطه ۲} \quad \text{درصد نشت یونی} = \frac{EC1}{EC2} \times 100$$

سنجش غلظت مالون‌دی‌آلدهید: ابتدا ۰/۲

گرم از بافت تازه برگ در هاون چینی حاوی ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۱ درصد ساییده شد. عصاره حاصل با دستگاه سانتریفیوژ (مدل Z300، شرکت Hermle، آلمان) به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. به ۱ میلی‌لیتر از روش‌ناور حاصل از سانتریفیوژ، ۵

EDTA، ۱ میلی مولار ساییده شد. همگن‌های حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ و روشناور حاصل یا عصاره برای سنجش‌های آنزیمی استفاده شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز: سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با محاسبه کاهش جذب هیدروژن پراکسید (کاهش مقدار هیدروژن پراکسید) در ۲۴۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۲۸۰۰ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات ۱۰ میلی مولار (pH=۷) و ۳۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید ۳۳ میلی مولار بود. با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به مخلوط یادشده، واکنش شروع می‌شود. میزان هیدروژن پراکسید موجود در مخلوط واکنش پس از ۱ دقیقه با ضریب خاموشی ۴۰ بر مول بر سانتی‌متر برای هیدروژن پراکسید و رابطه ۴ محاسبه شد که نشان‌دهنده میزان فعالیت آنزیم کاتالاز است. A، معادل جذب نوری خوانده شده؛ ε، ضریب خاموشی؛ c، غلظت هیدروژن پراکسید و b، عرض کوت (برحسب سانتی‌متر) است. فعالیت آنزیمی به صورت واحد آنزیمی در مقدار پروتئین کل (میلی گرم) موجود در ۱۰۰ میکرولیتر عصاره در ۱ دقیقه محاسبه شد (Velikova et al., 2000).

$$A = \varepsilon bc \quad \text{رابطه ۴}$$

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=۷)، ۳۰۰ میکرولیتر آسکوربات ۰/۵ میلی مولار، ۳۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید ۰/۱۵ میلی مولار، ۳۰ میکرولیتر EDTA ۱۰ میلی مولار و ۱۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. با تغییرات جذب در طول موج ۲۹۰

اندازه‌گیری مقدار پرولین: ابتدا ۰/۲ گرم بافت تازه برگ در هاون چینی حاوی ۵ میلی لیتر محلول سولفوسالسیلیک اسید ۳ درصد ساییده و مخلوط یکنواختی تهیه شد. عصاره حاصل به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی برای اندازه‌گیری مقدار پرولین استفاده شد. ۲ میلی لیتر از مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ عصاره با ۲ میلی لیتر معرف نین هیدرین و دو میلی لیتر استیک اسید گلاسیال مخلوط شد و ۱ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حمام آب گرم قرار گرفت. پس از این مدت برای قطع انجام همه واکنش‌ها، لوله‌های محتوی مخلوط در حمام آب سرد قرار داده و سپس ۴ میلی لیتر تولوئن به مخلوط اضافه شد و لوله‌ها به خوبی ورتکس شدند. با ثابت نگه داشتن لوله‌ها به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه، دو لایه مجزا تشکیل شدند. از فاز رنگی بالایی که حاوی تولوئن و پرولین بود، برای اندازه‌گیری غلظت پرولین استفاده شد (Bates, 1973). جذب این ماده رنگی در طول موج ۵۲۰ نانومتر تعیین و مقدار پرولین در هر نمونه با نمودار استاندارد محاسبه شد. نتایج برحسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه شدند.

برای رسم نمودار استاندارد پرولین، غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومول بر لیتر پرولین تهیه شدند و نمودار جذب برحسب غلظت رسم و از رابطه خطی آن برای محاسبه غلظت پرولین استفاده شد.

استخراج عصاره آنزیمی و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها: ۰/۵ گرم از برگ منجمد شده در ۱/۵ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=۷) محتوی پلی وینیل پیرولیدون ۱ درصد و

SAS نسخه ۹/۱ بررسی شد و میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد غلظت‌های متفاوت شوری، سالیسیلیک اسید و برهم‌کنش آنها در سطح ۱ درصد اثر معنی‌داری بر محتوای نسبی آب برگ، نشت یونی، مالون‌دی‌آلدهید، پرولین و فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه سیاه‌دانه داشتند. اثر غلظت‌های متفاوت شوری و سالیسیلیک اسید نیز در سطح ۱ درصد و برهم‌کنش آنها در سطح ۵ درصد بر محتوای آنتوسیانین و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز معنی‌دار بود.

نانومتر، ضریب خاموشی آسکوربات پراکسیداز (۲/۸ بر مول بر سانتی‌متر) و رابطه ۳، میزان آسکوربات به‌جامانده پس از دو دقیقه انجام واکنش آنزیمی محاسبه شد. یک واحد آنزیمی آسکوربات پراکسیداز مقدار آنزیمی است که ۱ میلی‌مول آسکوربات پراکسیداز را در ۱ دقیقه اکسید می‌کند (Nakano and Asado, 1981). فعالیت آنزیمی به‌صورت واحد آنزیمی در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در ۵۰ میکرولیتر عصاره در ۱ دقیقه محاسبه شد.

تحلیل آماری: آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار انجام شدند. تحلیل واریانس داده‌ها با نرم‌افزار آماری

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات بررسی‌شده در گیاه دارویی سیاه‌دانه

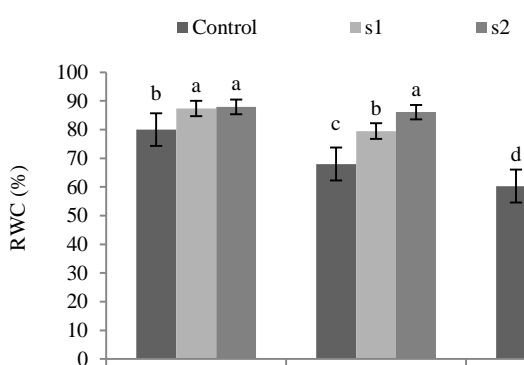
منابع تغییرات	درجه آزادی	نشت یونی	محتوای نسبی آب	آنتوسیانین	مالون‌دی‌آلدهید	پرولین	آنزیم کاتالاز	آنزیم آسکوربات پراکسیداز
سالیسیلیک اسید	۲	۹۳۳/۷**	۵۵۸/۴۹**	۵/۳۳**	۰/۰۱۷**	۸/۹**	۰/۳۵۳**	۵/۰۱**
شوری	۲	۱۸۵۵/۱**	۳۳۷/۶**	۳/۸۶**	۰/۰۱۸**	۲/۱**	۰/۰۰۶**	۱/۸۸**
سالیسیلیک اسید- شوری	۴	۲۸۴/۵**	۴۴/۱**	۰/۱۵*	۰/۰۰۸**	۰/۷**	۰/۰۰۲۲۴**	۰/۲۷۸*
خطا	۱۸	۱۰/۲۸	۴/۳۶	۰/۰۴۸	۰/۰۰۰۲	۰/۰۲	۰/۰۰۰۰۷	۰/۱۲

* و ** به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد هستند.

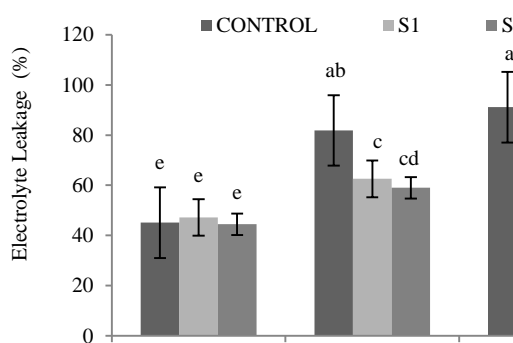
کاهش معنی‌داری نشان داد. کاربرد سالیسیلیک اسید افزایش درصد آب بافت برگ را در همه شرایط بررسی‌شده و غیرتنش سبب شد (شکل ۱). در شرایط بدون شوری تفاوت معنی‌داری بین گیاهان

محتوای نسبی آب برگ (RWC): اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ یکی از شاخص‌هایی است که مقاومت گیاه را به تنش شوری تخمین می‌زند. محتوای نسبی آب برگ سیاه‌دانه در تنش شوری

درصد تغییرات مالون‌دی‌آلدهید در تیمار ۲۵ و ۷۵ میلی‌مولار شوری نسبت به شاهد (بدون شوری) به ترتیب در رایت بدون کاربرد سالیسیلیک اسید، ۵۰ و ۵۵/۵ درصد افزایش، در تیمار ۰/۷۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، ۳/۶ و ۱۷/۱۱ درصد افزایش و در ۱/۵ سالیسیلیک اسید، ۱۹/۲ و ۵/۲ درصد افزایش نشان داد (شکل ۳).



شکل ۱- اثر سالیسیلیک اسید بر محتوای نسبی آب برگ در گیاه سیاه‌دانه در شرایط شوری (NaCl) و بدون شوری: S1 (۰/۷۵) و S2 (۱/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید)- مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ هستند.



شکل ۲- اثر سالیسیلیک اسید بر مقدار نشت یونی در گیاه سیاه‌دانه در شرایط شوری (NaCl) و بدون شوری: S1 (۰/۷۵) و S2 (۱/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید)- مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ هستند.

تیمار شده با سالیسیلیک اسید و تیمار نشده با آن مشاهده شد. میانگین درصد تغییرات محتوای نسبی آب برگ در تیمار ۲۵ و ۷۵ میلی‌مولار شوری نسبت به شاهد (بدون شوری) به ترتیب در نبود سالیسیلیک اسید، ۱۷/۶ و ۳۲/۶ درصد کاهش، در ۰/۷۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید ۹/۹ و ۱۰/۴ درصد کاهش و در ۱/۵ میلی‌مولار به ترتیب ۲ و ۱۰/۵ درصد کاهش به دست آمد (شکل ۱).

نشت یونی: نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان دادند

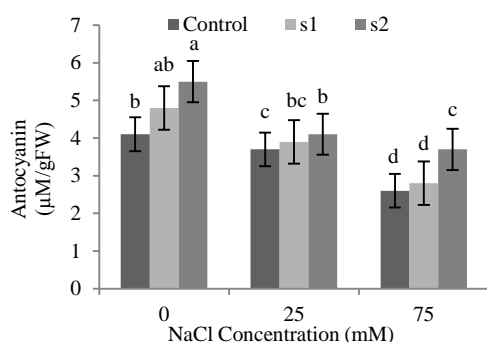
تنش شوری افزایش نشت یونی را به فضای خارج سلولی باعث می‌شود و تیمار گیاهان با سالیسیلیک اسید مقدار نشت یونی را کاهش داد (شکل ۲). در شرایط بدون شوری (غلظت صفر سدیم کلرید) تیمار با سالیسیلیک اسید اثری بر مقدار نشت یونی در برگ گیاه سیاه‌دانه نداشت.

میانگین درصد تغییرات نشت یونی در تیمار ۲۵ و ۷۵ میلی‌مولار شوری نسبت به شاهد (بدون شوری) در شرایط بدون سالیسیلیک اسید به ترتیب ۴۵ و ۵۰/۶ درصد افزایش و در تیمار ۰/۷۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، ۷/۶ و ۳۴/۲۴ درصد افزایش و در ۱/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، ۲۴/۶ و ۴/۷ درصد افزایش یافت (شکل ۲).

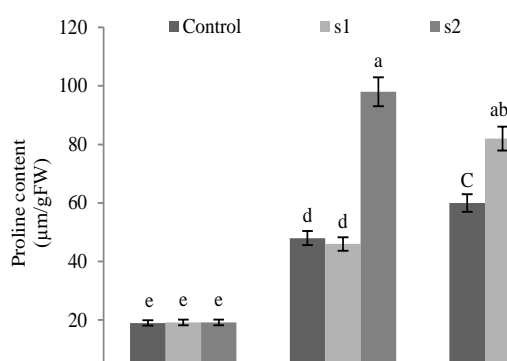
مالون‌دی‌آلدهید: در پژوهش حاضر مقدار

مالون‌دی‌آلدهید، شاخص پراکسیداسیون لیپید، اندازه‌گیری شد. مقایسه میانگین‌ها نشان داد تنش شوری افزایش معنی‌دار میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء را از نظر آماری سبب می‌شود. تیمار با سالیسیلیک اسید در شرایط بدون تنش شوری اثری بر مقدار مالون‌دی‌آلدهید نداشت (شکل ۳)؛ اما در تنش شوری مالون‌دی‌آلدهید را کاهش داد. میانگین

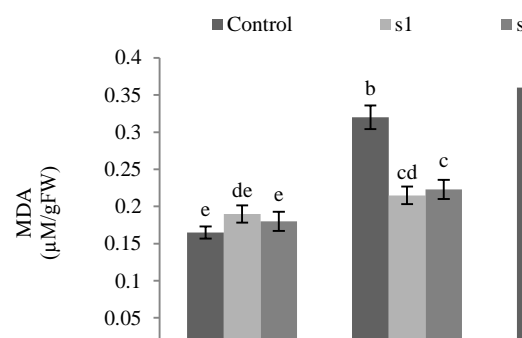
تیمار نشده بودند. میانگین پرولین در تیمار ۲۵ و ۷۵ میلی‌مولار شوری نسبت به شاهد (بدون تیمار شوری) در نبود سالیسیلیک اسید به ترتیب، ۶۰/۴ و ۶۸/۳ درصد افزایش؛ در ۰/۷۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، ۵۸/۲ و ۷۶/۵ درصد افزایش و در ۱/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید به ترتیب ۸۰/۴ و ۸۰/۴ درصد افزایش به دست آمد (شکل ۵).



شکل ۴- اثر سالیسیلیک اسید بر مقدار آنتوسیانین در گیاه سیاه‌دانه در شرایط شوری (NaCl) و بدون شوری: S1 (۰/۷۵) و S2 (۱/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید)- مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ هستند.



شکل ۵- اثر سالیسیلیک اسید بر مقدار پرولین در گیاه سیاه‌دانه در شرایط شوری (NaCl) و بدون شوری: S1 (۰/۷۵) و S2 (۱/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید)- مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ هستند.



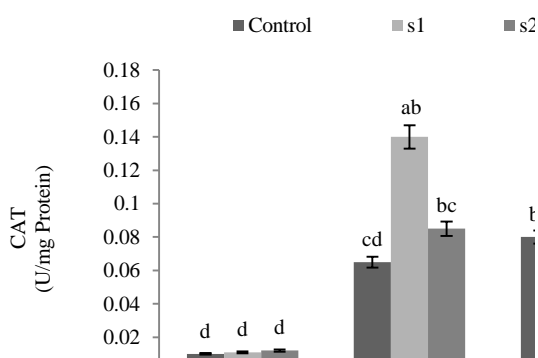
شکل ۳- اثر سالیسیلیک اسید بر مقدار مالون‌دی‌آلدئید (MDA) در گیاه سیاه‌دانه در شرایط شوری (NaCl) و بدون شوری: S1 (۰/۷۵) و S2 (۱/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید)- مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ هستند.

آنتوسیانین: نتایج نشان دادند تنش شوری

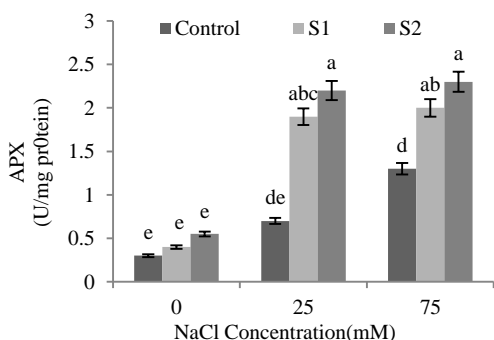
کاهش مقدار آنتوسیانین را در گیاه سیاه‌دانه باعث شد. استفاده از سالیسیلیک اسید مقدار آنتوسیانین را در شرایط تنش و غیر تنش (بدون کاربرد نمک) افزایش داد (شکل ۴). میانگین درصد تغییرات آنتوسیانین در تیمار ۲۵ و ۷۵ میلی‌مولار شوری نسبت به شاهد (بدون شوری) به ترتیب در حالت بدون سالیسیلیک اسید، ۱۰/۸ و ۵۷/۶ درصد کاهش؛ در تیمار ۰/۷۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، ۲۳ و ۷۱/۴ درصد کاهش و در ۱/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، ۳۴/۱ و ۴۸/۶ درصد کاهش یافت (شکل ۴).

پرولین: مقایسه میانگین حاصل از اندازه‌گیری

پرولین در شکل ۵ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، تنش شوری مقدار پرولین را در برگ‌های سیاه‌دانه به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد. تیمار سالیسیلیک اسید در شرایط بدون تنش شوری اثری بر مقدار پرولین برگ نداشت؛ ولی در شرایط تنش شوری، غلظت ۱/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید افزایش مقدار پرولین را در مقایسه با گیاهانی باعث شد که با سالیسیلیک اسید



شکل ۶- اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه سیاه‌دانه در شرایط شوری (NaCl) و بدون شوری: S1 (۰/۷۵) و S2 (۱/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید)- مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ هستند.



شکل ۷- اثر سالیسیلیک اسید بر آسکوربات پراکسیداز در گیاه سیاه‌دانه در شرایط شوری (NaCl) و بدون شوری: S1 (۰/۷۵) و S2 (۱/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید)- مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ هستند.

بحث

نتایج حاصل از پژوهش حاضر بیان‌کننده رابطه مستقیم بین افزایش غلظت شوری و کاهش شاخص‌های فیزیولوژیک در گیاه سیاه‌دانه است. یکی از تغییرات بیوشیمیایی که در تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری رخ می‌دهد، تولید انواع ROS است (Garratt et al., 2002). گیاهان

فعالیت آنزیم کاتالاز: مقایسه میانگین فعالیت

آنزیم کاتالاز بیان‌کننده افزایش فعالیت این آنزیم در شرایط تنش شوری بود (شکل ۶). در همه غلظت‌های شوری، غلظت سالیسیلیک اسید فعالیت این آنزیم را افزایش داد؛ هرچند این افزایش، بین غلظت‌های بررسی‌شده سالیسیلیک اسید در همه غلظت‌های شوری معنی‌دار نبود؛ اما میانگین درصد تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار ۲۵ و ۷۵ میلی‌مولار شوری نسبت به شاهد (بدون شوری) در شرایط بدون سالیسیلیک اسید به ترتیب ۸۴/۶ و ۸۷/۵ درصد افزایش، در تیمار ۰/۷۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، ۹۲/۸ و ۹۳/۷ درصد افزایش و در ۱/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، ۸۵/۸ و ۹۲/۳ درصد افزایش نشان داد (شکل ۶).

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: براساس

نتایج، غلظت‌های ۲۵ و ۷۵ میلی‌مولار شوری افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را باعث شد (شکل ۷). به کار بردن سالیسیلیک اسید، فعالیت این آنزیم را در تنش شوری افزایش داد و بین غلظت‌های متفاوت سالیسیلیک اسید در شاهد (بدون شوری) اختلاف معنی‌داری وجود نداشت؛ اما در سایر غلظت‌های شوری اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. میانگین درصد تغییرات فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تیمار ۲۵ و ۷۵ میلی‌مولار شوری نسبت به شاهد در شرایط کاربرد سالیسیلیک اسید، ۵۷/۱ و ۷۶/۹ درصد افزایش، در تیمار ۰/۷۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، ۷۸/۹ و ۸۰ درصد افزایش و در ۱/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، ۷۵ و ۷۶ درصد افزایش یافت (شکل ۷).

محتوای نسبی آب برگ در گیاه گلرنگ، بر اثر تیمار سالیسیلیک اسید در شرایط تنش شوری افزایش یافت که با نتایج ما مطابقت دارد. تیمار سالیسیلیک اسید به تولید اسمولیت‌ها برای حفظ فشار اسمزی گیاه در تنش شوری کمک می‌کند. تولید اسمولیت‌ها فشار اسمزی داخل سلول را کاهش می‌دهد که هم به حفظ آب داخل سلول کمک می‌کند و مانع از خشکی سلول می‌شود و هم با کمک به جذب آب از محلول خاک افزایش فشار آماس و میزان محتوای نسبی آب برگ را باعث می‌شود (Levent Tuna *et al.*, 2007).

غشای سلولی یکی از هدف‌های اولیه در بسیاری از تنش‌های محیطی از جمله شوری به شمار می‌رود و ثبات غشا در شرایط تنش، یکی از نشانه‌های تحمل است؛ بنابراین اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید تولیدشده در پراکسیداسیون لیپیدها و اندازه‌گیری میزان نشت یونی، شاخص‌های خوبی برای اندازه‌گیری میزان آسیب اکسیداتیو واردشده به غشا هستند (Bandeoglu *et al.*, 2004). بر اثر آسیب‌پذیری غشای سیتوپلاسمی، محتویات سلول به بیرون تراوش می‌کند که مقدار این خسارت با اندازه‌گیری نشت یونی تعیین می‌شود (Jouyban, 2012). گزارش شده است تنش شوری یا خشکی افزایش مقدار پراکسیداسیون لیپیدها و نشت یونی را در گیاهان حساس به این تنش‌ها موجب می‌شوند (Juan *et al.*, 2005)؛ بنابراین به نظر می‌رسد افزایش پراکسیداسیون لیپیدها یا نشت یونی در گیاه بررسی شده در شرایط تنش، از افزایش تولید انواع

برای مقاومت در برابر تنش اکسیداتیو ایجادشده باید از سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی یا غیر آنزیمی استفاده کنند. گزارش‌های متعدد نشان می‌دهند تنش شوری کاهش شاخص‌های فیزیولوژیک مانند محتوای نسبی آب برگ و آنتوسیانین و افزایش معنی‌دار نشت یونی و فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز را موجب شده است (Momeni *et al.*, 2013; Jaleel *et al.*, 2013).

باتوجه به نتایج پژوهش حاضر، محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید اثر جبران‌کننده‌ای بر شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه سیاهدانه در شرایط تنش شوری داشت. محتوای نسبی آب برگ، شاخصی برای سنجش میزان تنش گزارش شده است (Gholami *et al.*, 2013). کاهش میزان محتوای نسبی آب برگ مربوط به کاهش جذب آب به گیاه است؛ زیرا پتانسیل اسمزی بسیار منفی محلول‌های شور خاک مانع از جذب آب به گیاه می‌شود و در نتیجه به پدیده‌ای به نام خشکی فیزیولوژیک منجر می‌شود. نمک کاهش پتانسیل آب خاک را باعث می‌شود و گیاه به کم‌آبی دچار می‌شود که بسته‌شدن روزنه‌ها را سبب می‌شود (Salimi *et al.*, 2012). کاربرد سالیسیلیک اسید در گیاه سیاهدانه در تنش شوری، افزایش محتوای رطوبت نسبی برگ را باعث می‌شود و به نظر می‌رسد دلیل احتمالی آن افزایش محلول‌های سازگار و در نتیجه کاهش پتانسیل اسمزی گیاهان باشد که افزایش جذب آب را در محیط‌های نامساعد سبب می‌شود (Levent Tuna *et al.*, 2007). همچنین Daneshmand و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند

کلات کردن یون‌های فلزی یا قرار گرفتن به صورت سوبسترای آنزیم‌های پراکسیداز نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا می‌کنند (Chu *et al.*, 2000). کاربرد سالیسیلیک اسید افزایش ترکیبات فنلی و کاتچین و در نتیجه افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را در کالوس‌های در معرض تنش گیاه *Lepidium meyenii* موجب شده است (Wagner, 1979). علاوه بر این، گزارش شده است تیمار سالیسیلیک اسید مقدار آنتوسیانین را در هویج (Eraslan *et al.*, 2007) و اسفناج (Eraslan *et al.*, 2008) در شرایط تنش شوری افزایش داده است. افزایش ترکیبات مختلف فنلی مانند آنتوسیانین و آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی کاهش‌دهنده آثار تنش است (Syvacy and Sokmen, 2004).

یکی از راه‌های مقابله با تنش‌های محیطی مانند شوری و خشکی، سنتز ترکیبات اسموتیک و محافظ اسمزی است که پرولین یکی از این ترکیبات است. افزایش پرولین در گیاهان هنگام تنش، نوعی سازوکار دفاعی است. پرولین با چندین سازوکار مانند تنظیم اسمزی و جلوگیری از تخریب آنزیم، تحمل گیاه را در برابر تنش‌ها افزایش می‌دهد. کاربرد سالیسیلیک اسید در مقابل تنش می‌تواند افزایش میزان پرولین را باعث شود. گزارش شده است پرولین در گیاه *Salvia officinalis* و توتون (Celik and Atak, 2012) در تنش شوری به‌طور معنی‌داری افزایش یافت که نشان‌دهنده به کار افتادن سامانه مقاومتی گیاه و تولید اسمولیت در برابر آسیب‌های ناشی از تنش شوری در گیاه است. گیاه *Salvia officinalis* با

در شرایط تنش اکسیداتیو ناشی شود که حذف یا خاموش کردن آنها خارج از توان گیاه بوده است و نشان‌دهنده این است که سازوکارهای دفاعی ایجاد شده در گیاه در مقابل تنش اکسیداتیو کافی نبوده‌اند (Jouyban, 2012). همچنین Daneshmand و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند نشأت یونی در گیاه گلرنگ، در شرایط تنش شوری افزایش یافته است که با نتایج ما مطابقت دارد.

تنش شوری، تنش اکسیداتیو را سبب می‌شود. گیاهان برای مقابله با این اکسیدان‌ها، سازوکارهای حفاظتی دارند که شامل مولکول‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان هستند. آنتی‌اکسیدان‌ها به سه گروه تقسیم‌بندی می‌شوند که عبارتند از: ۱- ترکیبات غشایی و محلول در چربی مانند کارتنوئیدها؛ ۲- ترکیبات محلول در آب مانند فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها و ۳- آنزیم‌هایی مانند کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز. آنزیم‌ها در افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی نقش دارند (Agarwal and Pandey, 2004). نتایج ما نشان دادند تنش شوری کاهش مقدار آنتوسیانین را در گیاه سیاه‌دانه باعث شد. استفاده از سالیسیلیک اسید مقدار آنتوسیانین را در شرایط تنش و غیرتنش (عدم کاربرد نمک) افزایش داد. فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌های سنتز شونده از مسیر فنیل پروپانوئید با عملکرد آنتی‌اکسیدانی خود، خاموش‌کننده یا جاروب‌کننده انواع ROS در گیاهان هستند (Syvacy and Sokmen, 2004). این ترکیبات با سازوکارهای متعددی مانند قطع کردن واکنش‌های زنجیره‌وار اکسیداسیون، اهدای هیدروژن،

(2013)، گزارش شده است. سالیسیلیک اسید با فعال کردن سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان آنزیمی، افزایش مقاومت گیاه سیاه‌دانه را به تنش اکسیداتیو ناشی از تنش شوری موجب می‌شود.

جمع‌بندی

تنش شوری در گیاه سیاه‌دانه کاهش محتوای نسبی آب برگ و محتوای آنتوسیانین و نیز افزایش نشی یونی، مالون‌دی‌آلدهید، پرولین، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز را موجب شد.

تیمار سالیسیلیک اسید ویژگی‌های بررسی شده را بهبود می‌دهد و با افزایش سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی (کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز) و غیر آنزیمی (آنتوسیانین) تنش اکسیداتیو را کاهش می‌دهد که افزایش مقاومت گیاه را به تنش موجب می‌شود. باتوجه‌به وجود زمین‌های شور در بیشتر مناطق ایران، توجه بیشتر به کاربرد هورمون گیاهی سالیسیلیک اسید در مناطق شور پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

نگارندگان از همه اساتید ارجمند و آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه ایلام برای همکاری در انجام مراحل گوناگون پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌کنند.

References

Abdul Jaleel, C., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Ines, J., Al-Juburi, H. J., Chang-Xing, Z., Hong-Bo, S. and Panneerselvam, R. (2009) Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constrains. *Acta Physiologiae Plantarum* 31: 427-436.

تیمار سالیسیلیک اسید، میزان پرولین را افزایش داد (Khosravi *et al.*, 2011). پرولین علاوه‌براینکه ماده‌ای اسمززا و محافظ اسمزی است، در حفظ تعادل آب، حفظ ثبات پروتئین‌ها، حفظ ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها، تثبیت کردن غشاها و دستگاه سنتز پروتئین، کاهش خطرهای ناشی از تولید ROS، جاروب کردن رادیکال‌های هیدروکسیل و تنظیم pH سلولی نقش دارد (Verbruggen and Hermans 2008). گزارش شده است پرولین با جاروب کردن یا کاهش تولید اکسیژن یکتایی در کاهش آسیب نوری غشای تیلاکوئیدها مؤثر بوده است (Chaitanya *et al.*, 2009).

در شرایط تنش، میزان تولید انواع ROS بیشتر می‌شود و در نتیجه تنش اکسیداتیو رخ می‌دهد. آنزیم‌هایی مانند آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز از آنزیم‌های مهم سیستم آنتی‌اکسیدانی در گیاهان هستند (Abdul Jaleel *et al.*, 2009). با افزایش فعالیت آسکوربات پراکسیداز و در نتیجه فعال شدن چرخه آسکوربات - گلوکاتیون و افزایش فعالیت جاروب کننده‌های هیدروژن پراکسید مانند کاتالاز و سایر پراکسیدازها، با تنش اکسیداتیو مقابله می‌شود. افزایش فعالیت این آنزیم‌ها با کاهش مقدار پراکسیداسیون لیپید، هیدروژن پراکسید و نشی یونی (He and Zhu, 2008) همراه است.

افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بر اثر تیمار سالیسیلیک اسید در تنش شوری در سایر گیاهان از جمله اسفناج (Eraslan *et al.*, 2008)، گندم (Momeni *et al.*, 2009)، ذرت (Momeni *et al.*, 2009)، و درمنه (Eskandari Zanjani, *et al.*, 2013)

- stress in *Cassia angustifolia*. Iranian Journal of Plant Biology 48(4): 555-560.
- Antuono, D. L. F., Moretti, A. and Lovato, A. F. S. (2002) Seed yield, yield components, oil content and essential oil content and composition of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascena*. Industrial Crops and Products 15: 59-69.
- Askary, M., Amini, F. and Hosseinpour, L. (2016) Study of variability in growth, antioxidant defense system and protein content by zinc element application in periwinkle (*Catharanthus roseus* L.) under salinity stress. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 32: 35-46 (in Persian).
- Bandeoglu, E., Egidogan, F., Yucel, M. and Avni Oktem, H. (2004) Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl salinity stress. Plant Growth Regulation 42: 69-77.
- Bassim Atta, M. (2003) Some characteristic of *Nigella* (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile. Food Chemistry 83(1): 63-68.
- Bates, L. S. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil. 39: 205-207.
- Behnamnia, M. and Shenavai Zare, A. (2013) The effects of salicylic acid on licorice seedlings *Glycyrrhiza glabra* L.) under salt stress. Journal of Plant Process and Function 3: 73-83 (in Persian).
- Belkhadi, A., Hediji, H., Abbes, Z., Nouairi, I., Barhoumi, Z., Zarrouk, M., Chaibi, W. and Djebali, W. (2010) Effects of exogenous salicylic acid pre-treatment on cadmium toxicity and leaf lipid content in *Linum usitatissimum* L.. Ecotoxicology and Environmental Safety uk 73(5): 1004-1011.
- Celik, O. and Atak, C. (2012) The effect of salt stress on antioxidative enzymes and proline content of two Turkish tobacco varieties. Turkish Journal of Biology 36: 339-356.
- Chaitanya, K. V., Rasineni, G. K. and Agarwal, S. and Pandey, V. (2004) Antioxidant enzyme responses to NaCl
- Reddy, A. R. (2009) Biochemical responses to drought stress in mulberry (*Morus alba* L.): evaluation of proline, glycine betaine and abscisic acid accumulation in five cultivars. Acta Physiologiae Plantarum 31: 437-447.
- Chaparzadeh, N. and Zarandi, L. (2011) The effects of salinity on pigments content and growth of two canola (*Brassica napus*) cultivars. Iranian Journal of Plant Biology 3(9): 13-26 (in Persian).
- Chu, Y. H., Chang, C. L. and Hsu, H. F. (2000) Flavonoid content of several vegetable and their antioxidant activity. Journal of the Science of Food and Agriculture. 80: 561-566.
- Daneshmand, F., Arvin, M. J. and Keramat, B. (2014) Salicylic acid induced changes in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) under salinity stress. Iranian Journal of Plant Biology 27 (2): 204-215 (in Persian).
- Elyasi, R., Majdi, M., Bahramnejad, B. and Mirzaghaderi, Gh. (2016) Spatial modulation and abiotic elicitors responses of the biosynthesis related genes of mono/triterpenes in black cummin (*Nigella sativa*). Industrial Crops and Products 79: 240-247.
- Eraslan, F., Inal, A., Gunes, A. and Alpaslan, M. (2007) Impact of exogenous salicylic acid on the growth, antioxidant activity and physiology of carrot plants subjected to combined salinity and boron toxicity. Scientia Horticulturae 113: 120-128.
- Eraslan, F., Inal, A., Pilbeam, D. J. and Gunes, A. (2008) Interactive effects of salicylic acid and silicon on oxidative damage and antioxidant activity in spinach (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador) grown under boron toxicity and salinity. Plant Growth Regulation 55: 207-219.
- Eskandari Zanjani, K., Shirani Rad, A. H., Moradi Aghdam, A. and Taherkhani, T.

- (2013) Effect of salicylic acid application under salinity conditions on physiological and morphological characteristics of *Artemisia* (*Artemisia annua* L.). *Journal of Crop Ecophysiology* 6(4): 415-428 (in Persian).
- Garratt, L. C., Janagoudr, B. S., Lowe, K. C., Anthony, P., Power, J. B. and Davey, M. R. (2002) Salinity tolerance and antioxidant status in cotton cultures. *Free Radical Biology and Medicine* 33: 511-502.
- Gholami, R., Kashefi, B. and Saeidi Sar, S. (2013) Effect salicylic acid on alleviation of salt stress on growth traits of *Salvia limbata* L.. *Journal of Plant Ecophysiology* 15: 63-73 (in Persian).
- Ghorbanli, M., Ahmadi, F., Monfared, A. and Bakhshi Khaniki, Gh. (2012) Effect of salt stress and its interaction with ascorbate on catalase, ascorbate peroxidase activity, proline and malondialdehyde in *Cuminum cyminum* L. four weeks after germination. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 28(1): 14-27 (in Persian).
- Gurung, R. L., Lim, S. N., Khaw, A. K., Soon, J. F., Shenoy, K., Ali, S. M., Jayapal, M., Sethu, S., Baskar, R. and Hande, M. P. (2010) Thymoquinone induces telomere shortening, DNA damage and apoptosis in human glioblastoma cells. *Plos One* 5(8): e12124
- Hajar, A. S., Zidan, M. A. and Al-zahrani, H. S. (1996) Effect of salinity stress on the germination, growth and physiological activities of *Nigella sativa* L.. *The Arab Gulf Journal of Science Research* 14(2): 445-454.
- Hamed, K. B., Castagna, A., Salem, E., Ranieri, A. and Abdelly, C. (2007) Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) under salinity conditions: a comparison of leaf and root antioxidant responses. *Plant Growth Regulation* 53(3): 185-194.
- He, Y. and Zhu, Z. Y. (2008) Exogenous salicylic acid alleviates NaCl toxicity and increases antioxidative enzyme activity in *Lycopersicon esculentum*. *Biological Plantarum* 52: 792-795.
- Heath, R. L. and Packer, L. (1969) Photoperoxidation in isolated chloroplast kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Jaleel, C. A., Sankar, B., Sridharan, R. and Panneerselvam, R. (2013) Soil salinity alters growth, chlorophyll content and secondary metabolite accumulation in *Catharanthus roseus*. *Turkish Journal of Biology* 32: 79-83.
- Jouyban, Z. (2012) The effect of salt stress on plant growth. *Technical Journal of Engineering and Applied Science* 2(1): 7-10.
- Juan, M., Rivero, R. M., Romero, L. and Ruiz, J. M. (2005) Evaluation of some nutritional and biochemical indicators in selecting salt-resistant tomato cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 54(3): 193-201.
- Khosravi, S., Baghizadeh, A. and Nezami, M. T. (2011) The salicylic acid effect on the *Salvia officinalis* L. under salinity (NaCl) stress. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry* 7(4): 80-87.
- Levent Tuna, A., Kaya, C., Dikilitas, M., Yokas, I. B., Burun, B. and Altunlu, H. (2007) Comparative effects of various salicylic acid derivatives on key growth parameters and some enzyme activities in salinity stressed maize (*Zea mays* L.) plants. *Pakistan Journal of Botany* 39(3): 787-798.
- Momeni, N., Arvin, M., Khagoei negad, Gh., Keramat, B. and Daneshmand, F. (2013) Effects of sodium chloride and salicylic acid on some photosynthetic parameters and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) plants. *Plant Biology* 5(15): 15-30 (in Persian).
- Multu, S., Alici, O. and Nalbantoglu, B. (2009) Effects of salicylic acid and salinity on apoplatic antioxidant

- enzymes in two wheat cultivars differing in salt tolerance. *Biologia Plantarum* 53: 344-338.
- Nakano, Y. and Asado, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22: 867-880.
- Orcutt, D. M. and Nilsen, E. T. (2000) The physiology of plants under stress, soil and biotic factors. John Wiley and Sons, New York.
- Salem, M. L. (2005) Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seeds. *International Immunopharmacology* 5: 1749-1770.
- Salimi, F., Shekari, F., Azimi, M. R. and Zangani, E. (2012) Role of methyl jasmonate on improving salt resistance through some physiological characters in German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Iranian Journal of Plant Biology* 27: 700-711 (in Persian).
- Shakirova, F. M., Sakhabutdinova, A. R., Bozrutkova, M. V., Fatkhutdinova, R. A. and Fatkhutdinova, D. R. (2003) Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Science* 164: 317-322.
- Syvacy, A. and Sokmen, M. (2004) Seasonal changes in antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin constituent of the stems of two *Morus* species (*Morus alba* L. and *Morus nigra* L.). *Plant Growth Regulation* 44: 251-256.
- Verbruggen, N. and Hermans, C. (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino acids* 35: 753-759.
- Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. *Plant Science* 151: 59-66.
- Wagner, G. J. (1979) Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids and anthocyanin in protoplasts. *Plant physiology* 64: 88-93.