# دور حامض السالسيلك في فعالية الإنزيمات المضادة للأكسدة لكالس العنب (*Vitis vinifera* L.) صنف حلواني تحت الإجهاد الملحي

**باقر سجاد محمود شاكر**

**مدرس مساعد**

**قسم البستنة وهندسة الحدائق / كلية الزراعة / جامعة الكوفة.**

**البريد الالكتروني: baqir.almashhadi@uokufa.edu.iq**

**المستخلص:**

هدفت التجربة إلى دراسة تأثير إضافة حامض السالسليك في الإجهاد الملحي (NaCl) لكالس العنب *Vitis vinifera* L. صنف حلواني على فعالية بعض الأنزيمات المضادة للأكسدة ، نفذت التجربة في مختبرات زراعة الأنسجة التابعة لقسم البستنة وهندسة الحدائق في كلية الزراعة جامعة الكوفة للفترة من أذار إلى كانون الثاني. أذ زرع 250 ملغم من كالس العنب ونمي تحت تأثير الإجهاد الملحي في الوسط الغذائي MS والمزود بالتراكيز (0، 75 و 150) ملي مولر من كلوريد الصوديوم على التوالي وبالتداخل مع التراكيز ( 0، 0.5 و 1) ملي مولر حامض السالسليك لمدة 8 أسبوع. أظهرت النتائج وجود تأثير معنوي لإضافة حامض السالسليك الى الاوساط الغذائية في خفض فعالية الإنزيمات المضادة للأكسدة بوجود 1 ملي مولر من حامض السالسليك فسجلت اقل فعالية للأنزيمات dismutase (SOD) ، Catalase (CAT) و Peroxidase (POD). بلغت 47.69 وحدة. ملغم بروتين$^{-1}$، 4.62 مايكرو مول. دقيقة . ملغم بروتين$^{-1}$ و 22 مايكرومول. ملغم بروتين$^{-1}$. دقيقة$^{-1}$ على التتالي. واعلى معدل فعالية للأنزيماتSOD، CAT، Ascorbat peroxidase (APX) وPOD عند التركيز 1 ملي مولر NaCl المضاف للوسط الغذائي سجلت معدل فعالية 427.50، 31.58 ، 0.0261 و 111 على التتالي. وكان لتداخل حامض السالسليك مع ملح NaCl اثر في تباين فعالية الأنزيمات فأعطت اقل معدل فعالية لأنزيمي SOD و CAT عند التداخل1 ملي مولر حامض السالسليك و 75 ملي مولر NaCl بلغ 49.30 و 10.31، وسجل اقل معدل فعالية انزيمية عند التداخل 0.5 و 75 ملي مولر للحامض والملح للأنزيمين APX و POD بلغت0.024 وحدة. مايكرو مول حامض الاسكوربك$^{-1}$. دقيقة$^{-1}$ و 49.3 مايكرومول. ملغم بروتين$^{-1}$. دقيقة$^{-1}$.

# Effect of Salicylic acid on the antioxidant enzymes activity for callus of grape *Vitis vinifera* L. Halawini under in vitro salt stress

**Baqer S. M. AL- Khayat**
**Assistant Lecturer**
**Department of Horticulture and Landscape/ college of Agriculture/ University of Kufa.**
**E-mail address:** baqir.almashhadi@uokufa.edu.iq

**Abstract:**

The experiment aimed to study the effect of adding Salicylic acid in salinity stress on callus of grape *Vitis vinifera* L. Halawini.

It was achieved in the laboratories of plant tissue culture belong to Horticulture and leaned scabe faculty of agriculture, University of kufa. during a period from October 2017 to December 2017. 250 mg of grape callus Halawini cultured under the effect of salicity stress in culture medium MS with sodium chloride (NaCl) (0, 75 and 150 mM) respectively with the adding salicylic acid(SA) on contractions (0, 0.5 and 1 mM). The culturing period was 8 weeks. The results revealed a significant effect for salicylic acid adding in lowering oxidative stress enzymes namely superoxide dis-mutase (SOD), catalase (CAT), Ascorbate peroxidas (APX) and peroxidase (POD).

**المقدمة:**

يعدُّ العنب الأوربي *Vitis vinifera* L. احد أشجار فاكهة المناطق المعتدلة التي تعود إلى العائلة العنبية Vitaceae (22). وهو مهم اقتصادياً لمردوده الكبير واستمراره في الإثمار لعشرات السنين والقيمة الغذائية العالية للعنب إذ تحتوي الثمار على السكريات والفيتامينات والأحماض العضوية والأملاح المعدنية والبروتينات والدهون وغيرها، فضلا عن أهميته في الاستعمالات الطبية في علاج الكثير من الأمراض إذ إن الأعناب الطازجة تحتوي على مركب Resveratrol المثبط لنمو خلايا سرطان البروستات (18).

ان المخاطر الناجمة عن تغير المناخ وقلة الموارد المائية والتكاليف العالية لمشاريع استصلاح التربة جعل الباحثين والمتخصصين التوجه إلى الوسائل الأخرى في التعايش مع ظاهرة الملوحة و إجراء اختبارات ودراسات فسلجية حول تأثير الملوحة، وقد أشارت بعض الدراسات الى موت جميع الزروعات لنبات العنب عند التركيز 200 وانخفاض كبير في نسبة بقاء زروعات ثلاث أصناف من العنب عند التركيز 175 ملي مول المزروعة خارج الجسم الحي (2)، ومن تأثيرات الملوحة، هو زيادة انتاج الجذور الحرة (ROS) super oxide radicals – جزيئه الأوكسجين الحرة superoxide ($O_2^{\cdot -}$)، بيرو كسيد الهيدروجين peroxide hydrogen ($H_2O_2$) وجذر الهيدروكسيل hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$) الناتجة عن الاختزال غير التام للأوكسجين الجوي $O_2$ (4 و 27)، قلة امتصاص الماء، زيادة سمية الايونات وعدم توازن مغذيات النبات (37 و11). وان هذه التغيرات قد تؤدي الى حصول استجابات تكيفية adaptive responses عبر ميكانيكيات متعددة مثل تجميع الأملاح الذائبة في العصير الخلوي او توزيعها داخل النبات، وتحفيز إنتاج بعض البروتينات وانتاج الذائبات

وتفعيل النظام الدفاعي الإنزيمي وغير الإنزيمي (43). ومن أهم الإنزيمات التي تقلل من الأجهاد الملحي هي سوبر اوكسيديز ديمسيموتيز superoxide dismutase (SOD) و الكتليز catalase (CAT) و الاسكوربت بيروكسيديز Ascorbate peroxidas (APX) و البيروكسيديز peroxidase (POD) المعروف دور الحد في تقليل الإجهاد الملحي على النبات وبالتالي الحد من التأثيرات السلبية للملوحة (6). أذ أن $O_2$ في اللأكسدة الضوئية في الظروف الطبيعية للخلية يتحول إلى $H_2O$، ولكن في ظروف الإجهاد يزداد إنتاج الجذور الحرة (ROS)،وبذلك النظام الدفاعي بالعمل (5). اذ يسرع SOD بتحويل جريئتين أوكسجين حرة ($O2^{\cdot-}$) إلى فوق اوكسيد الهايدروجين ($H_2O_2$) وجريئة أوكسجين($O_2$) وان فوق أوكسيد الهيدروجين يزال بوساطة إنزيمات CAT و POX (5،38 ، 25 و 16).

صنف المركب الفينولي SA من ضمن الهرمونات النباتية ذات التأثيرات الفسلجية الشبيه بالهرمونات النباتية (28) و هو مركب حيوي يمكن تنقله بحرية داخل وخارج الخلايا والأنسجة والأعضاء (23) كما يلعب دوراً مهماً في الاستجابات الدفاعية ضد مختلف الضغوط الحيوية و غير الحيوية (7) اذ يقوم بإنتاج مركبات ايضية ثانوية تساعد في تحمل النبات، إنتاج مغذيات معدنية وتحفيز هرمونات النبات ونتيجة ذلك تزداد فعالية أزالة السموم وتقليل الاجهادات على الخلايا النباتية (37 و 42 و7).

**المواد وطرائق العمل :**

نفذت التجربة في مختبرات زراعة الأنسجة التابع لقسم البستنة وهندسة الحدائق في كلية الزراعة جامعة الكوفة للفترة من أذار لعام 2017 م لغاية كانون الأول لنفس لعام. تم أستحثاث الكالس من كرمات بعمر 10 سنوات، واحضرت الافرع بطول 30 سم تقريباً الى المختبر وأزيل جميع الأوراق عنها وغسلت بالماء الجاري لعدة مرات ثم قطعت إلى قطع بطول (2 – 2.5) سم لتصبح كل قطعة حاوية على عقدة واحدة ( single node segment) وبرعماً واحداً (برعماً جانبياً)، ثم غُسلت بالماء والصابون السائل (الزاهي) لمرات عديدة لمدة 30 دقيقة لإزالة الأتربة والأوساخ العالقة بها، ومن ثم تم وضعها في محلول مانع للأكسدة مؤلف من 100ملغم . لتر$^{-1}$ حامض الاسكوربيك Ascorbic acid + 150 ملغم . لتر$^{-1}$ حامض ألستريك acid Citric للتقليل من الإفرازات الفينولية للأفرع المستعملة في الزراعة، بعدها نقلت إلى كابينة الهواء الطبقي ( Laminar Air Flow Cabinet) لإجراء عملية التعقيم السطحي ، إذ عقمت بتغطيسها بالكحول الاثيلي 70% لمدة 10 ثواني ثم غمرت في محلول هيبوكلورات الصوديوم (NaOCl) بتركيز 1.05% ( القاصر التجاري Clorax المحتوي على 5.25% من هايبوكلورات الصوديوم بعد تخفيفه بالماء المقطر مرتين ليكون تركيز Clorax 20% حجم. حجم$^{-1}$ للحصول على تركيز1.05% هايبوكلورات الصوديوم ) لمدة 15 دقيقة مع التحريك المستمر لإزالة الفقاعات الهوائية المتكونة على الأجزاء النباتية وبعدها تم غسل الأجزاء النباتية ثلاث مرات بماء مقطر ومعقم ولمدة 5 دقائق في كل مرة ،لإزالة التأثير الضار للمادة المعقمة وللمحافظة على حيوية الأجزاء النباتية وبعد

الانتهاء من عملية التعقيم نقلت الأجزاء النباتية الى أطباق بتري معقمة وقطعت أطرافها ليصبح طولها بحدود 1 سم تقريبا وذلك باستعمال الملاقط والشفرات الجراحية، وبذلك اصبحت الأجزاء النباتية صالحة للزراعة (3).

لغرض تحضير واحد لتر من الوسط الغذائي المستعمل في زراعة الاجزاء النباتية المستخدمة بالدراسة فقد تم وضع قدح مدرج( بيكر Baker ) سعة 1000 مل على الخلاط المغناطيسي magnetic stirrer وأضيف له 200 مل ماء مقطر تقريباً و4.41 غم الوسط الغذائي MS (Murashige and Skoog,1962) الجاهز ( المنتج من قبل شركة Himedia ) و 30 غم. لتر$^{-1}$ السكروز و 100 ملغم.لتر$^{-1}$ Myo – instol و1 ملغم.لتر$^{-1}$ بنزل أدنين بيورين benzyl amino purine (BAP) و 2 ملغم.لتر$^{-1}$ نفثالين اسيتك اسد Napthalene acetic acid (NAA)، وأكمل الحجم بالماء المقطر إلى 950 مل تقريباً ثم عدلت درجة التفاعل (pH) إلى 5.7 ± 0.1 بمحلول حامض الهيدروكلوريك (HCl) بتركيز 0.1 عياري او محلول هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) 0.1 مولار ثم أضيف الآكار (Agar–Agar) بمقدار 7 غم.لتر$^{-1}$ وتم أكمال الحجم الى 1 لتر ثم رفعت درجة الحرارة الى 90 – 94 ° م لمدة10 دقائق، بعدها وزعت على أنابيب الزراعة سعة (10020 x ملم) المعقمة مسبقاً وبواقع 10 مل لكل أنبوبة. ونقلت إلى جهاز التعقيم بالبخار (المعقام Autoclave) وعُقِمَتْ على درجة حرارة 121°م وضغط مقداره 1.04 كغم. سم$^{-2}$ لمدة 20 دقيقة. بعد نهاية التعقيم أخرجت وحفظت في مكان نظيف وبدرجة حرارة الغرفة لحين الزراعة .

حضنت الأنابيب المزروعة بدرجة حرارة 25 ± 2°م وشدة إضاءة 1000 لوكس لمدة 16 ساعة ضوء و 8 ساعة ظلام في غرفة النقل لمدة ثمانية اسابيع، بعد ذلك تم أعادة زراعة الكالس المتكون على الاجزاء النباتية على نفس الوسط الغذائي المستخدم لإستحثاث الكالس لحين الحصول على الكتلة المطلوبة لأجراء الدراسة.**تأثير الإجهاد الملحي وحامض السالسليك في فعالية الإنزيمات المضادة للأكسدة**

تم زراعة 250 ملغم من الكالس في أنبوبة سعة 40 مل وضع فيها 10 مل من نفس مكونات الوسط المستخدم في التنشئة والمزود بالتراكيز(0 ، 0.5 و1 ) ملي مولر على التتالي من حامض السالسيلك وبالتداخل مع التراكيز ( 0، 75 و 150) ملي مولر كلوريد الصوديوم NaCl وكررت كل معاملة ثلاث مرات، قد تم أضافة تراكيز حامض السالسليك من خلال تحضير محلول مسبق stock solution أذ تم تحضير 10 ملي مولر من حامض السالسليك وذلك بأذابة 138.12 ملغم مِنهُ بقطرات معدودة من NaOH ورجها بشكل سريع وقوي حتى أذابتها بشكل كامل ثم اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر. وتم أضافة الحجم المطلوب لكل معاملة حسب التركيز المطلوب وحجم الوسط.

وتم حضن الكالس في غرفة الحضن بنفس ظروف غرفة الحضن في التنشئة ولمدة 8 أسبوع. وبعد انتهاء المدة تم أخراج الكالس من الوسط الغذائي وتم قياس فعالية الإنزيمات التالية (SOD، CAT، APX و POD). حيث قدرة فعالية إنزيم Super oxide dismutase (SOD) حسب طريقة المتبعة من قبل (30) ، وقدرت

فعالية أنزيم Catalase (CAT) بطريقة (1)، وقدرت فعالية انزيم Ascorbate peroxidase (APX) بالطريقة المستخدمة من قبل (35)، وقدرت فعالية أنزيم peroxidase (POD) وبالطريقة المتبعة من (24).

نفذت التجربة كتجربة عامليه باستعمال التصميم العشوائي الكامل وبعاملين( تراكيز حامض السالسليك × تراكيز ملح NaCl ) (4) وبواقع ثلاث مكررات لكل معاملة، وتم استعمال البرنامج الإحصائي الجاهز (GenStat 12 th Edition) تحت نظام تشغيل الحاسوب الآلي Windows لأجراء التحليلات الإحصائية. وتمت مقارنة المتوسطات باختبار دانكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 0.05 لاختبار الفروق المعنوية بين متوسطات المعاملات.

**النتائج والمناقشة:**

**أولا– فعالية انزيم Superoxide dismutase ( SOD)**

من ملاحظة الجدول (1) يتضح ان زيادة تراكيز حامض السالسليك في الأوساط الغذائية قد اثر بشكل كبير في معدل انخفاض فعالية انزيم SOD في كالس العنب حلواني، فسجلت اعلى معدل فعالية للأنزيم في كالس العنب حلوني المزروع بالوسط الخالي من حامض السالسليك (التركيز 0 ملي مولر) بلغت 280.20 وحدة. ملغم بروتين$^{-1}$ والتي تفوقت معنوياً على فعاليته قي كل من المعاملتين ( 0.5 و1 ) ملي مولر. إذ اقل معدل لفعالية الأنزيم SOD في كالس العنب حلواني عند المعاملة 1 ملي مولر حامض السالسيلك 64.66 وحدة.ملغم بروتين$^{-1}$. وقد يعزى سبب انخفاض فعالية أنزيم SOD بأزدياد تركيز حامض السالسليك بالوسط الغذائي الى الدور الايجابي الذي يلعبه حامض السالسليك في الاستجابات الدفاعية ضد مختلف الضغوط (37) زيادة الضغط الأسموزي وزيادة إختيارية إمتصاص الأيونات المفيدة ويمنع التراكم الزائد للأيونات السامة وبذلك يساعد في تحمل الإجهاد الملحي، وتحفيز هرمونات النبات وكنتيجة لذلك تزداد فعالية أزالة السموم وتقليل الاجهادات على الخلايا النباتية (37) وقد اتفقت هذه النتائج مع ما توصل اليه (21 و 34 )

تظهر البيانات في الجدول (1) هنالك زيادة معنوية في فعالية انزيم SOD بزيادة تراكيز NaCl المضافة للوسط الغذائي MS إذ أعطت أعلى فعالية عند المعاملة 150 ملي مولر (216.753 وحدة. ملغم بروتين$^{-1}$) وتفوقت على معاملة المقارنة التي أعطت أقل فعالية 69.12 وحدة. ملغم بروتين$^{-1}$، والتي اختلفت معنوياً عن المعاملة 75 ملي مولر أذا عطت معدل فعالية لأنزيم SOD 209.67 وحدة. ملغم بروتين$^{-1}$. وقد يكون سبب زيادة فعالية SOD بارتفاع تركيز NaCl في الوسط الغذائي إلى الدور السلبي إلى ايونات NaCl بالتراكيز المرتفعة في الخلايا من خلال تأثيرها على الجهد الأزموزي، أو قد يعزى السبب إلى زيادة مستويات جذور الأوكسجين الفعالة ROS وأن زيادة فعالية الـ SOD تشير إلى كفاءة تقليل سمية جذور الأوكسجين الحر (23) إذ أشارت العديد من الدراسات العلمية بان SOD تزداد فعاليته تحت ظروف الإجهاد الملحي كونها أحد الوسائل لمقاومة ظروف الإجهاد الملحي التي تؤدي إلى إستحداث الجهد التأكسدي المتمثل بزيادة جذور الأوكسجين الفعالة (ROS) الضارة للنبات، فتقوم الخلايا بزيادة إنتاج الأنزيمات المضادة للأكسدة لما لها من

أهميه في التخلص منها حيث تعمل كمواد كانسة scavenegers للجذور الحرة (32)، اذ يتمثل عمل هذا الإنزيم المرحلة الأولى من النظام الدفاعي الإنزيمي في الخلايا و الأنسجة النباتية بالتخلص من الأوكسجين الحر والتي يتمخض عنها إنتاج فوق أوكسيد الهيدروجين الذي تتخلص منه الخلية بفعل زيادة فعالية الـ CAT (27).

وتتفق هذه النتائج مع ما حصل عاليه (16) و ( 21) في دراستها على كالس أصل الخوخ Garnem المزود بتراكيز ( 150، 30 ، 60 و 150 ملي مولر) من ملح NaCl أذ حصلت على أعلى فعالية SOD عند المعاملة 120 ملي مول. وتتوافق نتائجنا مع نتائج كل من (3، 15، 13، 40 و 2).

**جدول1:تأثير حامض السالسليك و ملح كلوريد الصوديوم وتداخلاتهما المضافة إلى الوسط الغذائي MS في فعالية إنزيم SOD (وحدة.ملغم بروتين$^{-1}$) في كالس العنب حلواني بعد ثمانية أسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي.**

| تركيز كلوريد الصوديوم NaCl ملي مولر | تركيز حامض السالسليك ملي مولر | | | معدل تأثير كلوريد الصوديوم NaCl |
|---|---|---|---|---|
| | **0** | **0.5** | **1** | |
| **0** | 78.19 e | 83.28 e | 47.69 f | **69.72 c** |
| **75** | 334.90 b | 244.80 c | 49.30 f | **209.67 b** |
| **150** | 427.50 a | 125.77 d | 96.99 e | **216.75 a** |
| معدل تأثير حامض السالسليك | **280.20 a** | **151.28 b** | **64.66 c** | |

**المتوسطات التي يظهر معها حرف أبجدي مشترك لا تختلف فيما بينها اختلافاً معنوياً حسب اختبار دنكن عند مستوى معنوَّية 5%**

اما عن تأثير التداخل بين تراكيز حامض السالسليك وملح NaCl فيشير الجدول رقم (1) إلى وجود فروق معنوية بين التداخلات فكان أعلى معدل لفعالية انزيم SOD بلغت 427.50 وحدة.ملغم بروتين$^{-1}$ عند معاملة التداخل 0 ملي مول حامض السالسليك و 150 ملي مولر NaCl التي تفوقت معنوياً على جميع التداخلات، ولوحظ اقل فعالية لإنزيم SOD في كالس الحلواني كانت 47.69 وحدة.ملغم بروتين$^{-1}$ عند معاملة التداخل 1 ملي مولر حامض السالسليك و 0 ملي مولر كلوريد الصوديوم والتي لم تختلف معنوياً عن معاملة 1 ملي مولر حامض السالسليك و 75 ملي مولر كلوريد الصوديوم التي سجلت معدل فعالية بلغ 49.30 وحدة.ملغم بروتين$^{-1}$. وهذا يدل على الدور الايجابي لحامض السالسليك بتركيز 1 ملي مولر الذي يلعبه في الخلايا النباتية سواء كان بوجود كلوريد الصوديوم بتركيز 75 ملي مولر او بعدم وجوده حيث إن فعالية إنزيم SOD قد انخفضت فيهما معنوياً حتى على معاملة المقارنة ( 0 و 0 ) ملي مولر لكل من حامض السالسليك و كلوريد الصوديوم التي أَعطت معدل فعالية 78.19 وحدة.ملغم بروتين$^{-1}$، وقد يكون سبب ارتفاع معدل فعالية إنزيم SOD في نسيج الكالس الخالي من إضافة حامض السالسليك إلى أن الخلايا قد تكون معرضة لإجهاد غير حيوي بسبب وجود تراكيز من NaCl في الأوساط، وتراكم عنصر الصوديوم فى الفجوات العصارية يسبب سمية كبيرة للخلايا كما أنه

يتعارض مع البوتاسيوم فى العديد من التفاعلات، اما الكلوريد فإن تراكمة يسبب سمية أكثر من الصوديوم ويسبب نقص شديد فى كفاءة العمليات الحيوية. نرى معدل الفعالية SOD تنخفض وبشكل معنوي كلما زاد تركيز حامض السالسليك قد يكون لما له دور مهماً في الاستجابات الدفاعية ضد مختلف الضغوط (14 و 9) و زيادة نشاط حامض السالسليك يقلل إجهاد الأكسدة ويزيد الضغط الأسموزي وزيادة إختيارية في إمتصاص الأيونات المفيدة ويمنع التراكم للأيونات الزائدة السامة وبذلك يساعد في تحمل الإجهاد الملحي (37 و 32 و42). وتتفق هذه النتائج مع (21 )، اذ حصلا على اعلى معدل فعالية لأنزيم SOD في كالس اصل الخوخ Garnem بعد 21 يوم من الزراعة عند التداخل 30 ملي مول (التعبير الصحيح ملي مولر حسب رأي أهل الكيمياء الاختصاص) ملح كلوريد الصوديوم و 0.1 ملي مول حامض السالسليك بلغ 8.49 وحدة. ملغم$^{-1}$ بروتين، و أقل معدل فعالية 1.89 عند معاملة 0 ملي مول كلوريد الصوديوم وحامض السالسليك.

**ثانياً: فعالية انزيم الكتليز (CAT) Catalase**

يوضح الجدول (2) أن معدل فعالية أنزيم الكتليز Catalase في كالس العنب حلواني قد انخفضت معنوياً بازدياد تركيز حامض السالسليك في الوسط الغذائي MS فكانت اعلي معدل فعالية لأنزيم CAT عند المعاملة 0 ملي مولر حامض السالسليك أعطت معدل فعالية بلغ 20.73 مايكرو مول. دقيقة. ملغم بروتين$^{-1}$ وتفوقت معنوياً على معدل الفعالية 15.78 و 9.73 مايكرو مول. دقيقة . ملغم بروتين$^{-1}$ عند التركيزين 0.5 ملي مولر و 1 ملي مولر على الترتيب. وقد تفوقت معاملة التركيز 0.5 ملي مولر حامض السالسليك معنوياً على معاملة التركيز 1 ملي مولر . ان إنتاج الجذور الحرة و المتمثل بـ فوق أوكسيد الهيدروجين hydrogen peroxide و جذر الهيدروكسيل hydroxyl radicals وذرة الأوكسجين الأحادية superoxide تحت الظروف الطبيعية التي ينمو بها النبات تكون عند مستويات واطئة لا تؤذي الخلية، فنلاحظ انخفاض فعالية CAT عند زيادة تراكيز حامض السالسليك بالوسط الغذائي، لما له دور إيجابي في تقليل أضرار الملوحة وتقليل الإجهاد على الخلايا (37) وقد أثبتت دراسات عديدة أن الإضافة الخارجية لحامض السالسليك يمكنه تخفيف أعراض السمية الناتجة من إجهادات الملوحة في العديد من أنواع النباتات (6 و 10).من خلال تنظيم عمليات النقل الأيوني، وزيادة أختيارية للأيونات المفيدة ويمنع التراكم الزائد للأيونات السامة، وزيادة النشاط الهرموني للخلايا وتأثيره المعنوي في تقليل أنتاج فوق أوكسيد الهيدروجين أثناء الإجهاد الملحي (20 و 28 )وتتفق هذه النتائج مع ما وجداه (21 و19). في انخفاض معدل فعالية CAT في الخلايا النباتية بزياد تراكيز حامض السالسليك بالوسط الغذائي.

**جدول 2: تأثير حامض السالسليك وملح كلوريد الصوديوم وتداخلاتهما المضافة إلى الوسط الغذائي MS في فعالية إنزيم CAT (مايكرو مول. دقيقة . ملغم بروتين$^{-1}$) في كالس العنب حلواني بعد ثمانية أسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي.**

| تركيز كلوريد الصوديوم NaCl ملي مولر | تركيز حامض السالسليك ملي مولر | | | معدل تأثير كلوريد الصوديوم NaCl |
|---|---|---|---|---|
| | **0** | **0.5** | **1** | |
| **0** | 6.45 f | 5.78 f | 4.62 f | 5.62 c |
| **75** | 24.16 b | 18.92 c | 10.25 e | 17.78 b |
| **150** | 31.58 a | 22.65 b | 14.31 d | 22.85 a |
| معدل تأثير حامض السالسليك | 20.73 a | 15.78 b | 9.73 c | |

**المتوسطات التي يظهر معها حرف أبجدي مشترك لا تختلف فيما بينها اختلافاً معنوياً حسب اختبار دنكن عند مستوى معنوّية 5%**

ويظهر الجدول (2) ان زيادة تركيز ملح NaCl في الوسط الغذائي قد زادت من فعالية انزيم CAT في كالس العنب حلواني فبلغت معدل الفعالية لأنزيم 22.85 مايكرو مول. دقيقة . ملغم بروتين$^{-1}$عند المعاملة 150 ملي مولر NaCl التي تفوقت معنوياً على معدل الفعالية لانزيم CAT عند المعاملتين 75 ملي مولر و 150 ملي مولر ، وان معدل فعالية CAT 17.78 مايكرو مول. دقيقة . ملغم بروتين$^{-1}$ عند التركيز 75 ملي مولرNaCl تفوق معنوياً على 5.62 مايكرو مول. دقيقة . ملغم بروتين$^{-1}$عند التركيز 0 ملي مولر. من الممكن إن تكون زيادة تراكيز NaCl هي مسؤولة عن تضرر الخلية تحت الإجهاد الملحي وان هذا الإجهاد يقود إلى إنتاج كميات عالية من الجذور الحرة تعمل على الاضرار بالأغشية الخلوية (32). وقد يكون هذا سبب زيادة انزيم CAT عند أرتفاع تركيز NaCl بالوسط الغذائي. ومضادات الأكسدة هذه تعمل كمواد كانسة Scavengers للجذيرات الحرة Free radicals الناجمة عن الاجهاد الملحي (28) وتتفق النتائج مع ما توصل اليه (3) بزراعة ثلاثة أصناف من العنب الأوربي عديم البذور ( Crimson seedless وPrincess و Summer Royal) بخمس تراكيز NaCl ( 0 ، 50 ، 100، 150 و 200 ) ملي مولر وحصل على أعلى فعالية CAT بتركيز 150 ملي مولر. وتتماشى مع نتائج (21، 40 و13).

ومن الجدول (2) أظهر تداخل مستويات حامض السالسليك و ملح NaCl تأثيراً معنوياً في فعالية أنزيم CAT فقد تفوقت معاملة 0 ملي مولر حامض السالسليك و 150 ملي مولر ملح NaCl فأعطت أعلى معدل لفعالية CAT بلغت 31.58 مايكرو مول. دقيقة . ملغم بروتين$^{-1}$ على جميع التداخلات، وأقل فعالية 4.62 مايكرو مول. دقيقة . ملغم بروتين$^{-1}$ عند التداخل 1 ملي مولر حامض السالسيلك و 0 ملي مولر NaCl والذي لم يختلف عن تداخلات 0 ملي مولرNaCl مع التركيزيين (0 و 0.5 ) ملي مولر حامض السالسليك والذين أعطيا معدل فعالية 6.45 مايكرو مول. دقيقة . ملغم بروتين$^{-1}$ و 5.78 مايكرو مول. دقيقة . ملغم بروتين$^{-1}$ على الترتيب. ولم تختلف معنوياً معاملتا التداخل (0 ملي مولر حامض السالسليك مع 75 ملي مولر

NaCl ) و (150 ملي مولر NaCl و0.5 ملي مولر وحامض السالسليك ) فيما بينهما وقد تفوقا معنوياً على جميع التداخلات باستثناء معدل تداخل ( 0 ملي مولر حامض السالسليك و150 ملي مولر NaCl . إن فوق اوكسيد الهايدروجين $H_2O_2$ يزال بواسطة أنزيم CAT بتحويله إلى ماء وجزيئة $O_2$( 34 و 23 و 26).

**ثالثاً: فعالية انزيم اسكوربت بيروكسيديز peroxidas (APX)**

يشير الجدول (3) إلى أن إضافة حامض السالسليك بالتراكيز (0.5 ملي مولر و ملي مولر) إلى الأوساط الغذائية قد أثر في انخفاض معدل فعالية إنزيم APX فكانت أعلى فعالية 0.0174 وحدة.مايكرومول حامض الاسكوربك$^{-1}$. دقيقة$^{-1}$ عند التركيز 0 ملي مولر حامض السالسليك والتي تفوقت معنويا على أقل معدل لفعاليته 0.0120 وحدة.مايكرومول حامض الاسكوربك$^{-1}$. دقيقة$^{-1}$ عند التركيز 0.5 ملي مولر التي لم تختلف معنوياً عن معدل معاملة التركيز 1 ملي مولر التي أعطت فعالية 0.0120 وحدة.مايكرومول حامض الاسكوربك$^{-1}$. دقيقة$^{-1}$. حامض السالسليك يلعب دورا مهماً في تنظيم النمو بالخلايا وبالتالي النبات، والاستجابات الدفاعية للتغيرات البيئية (7) من خلال تقليل وطأت الإجهاد على الخلايا، فقد يكون سبب تقليل الإجهاد هو زيادة ايون البوتاسيوم دخل الخلايا ومنع التسرب منها عن طريق تصحيح طريق البوتاسيوم النشط وإزالة الاستقطاب الخارجي له وتكوين القناة KOR بدل ROS الغير مرغوب بزيادتها داخل الخلية (18 ، 8، 12 و20 ).

كما يلاحظ من الجدول نفسه هناك زيادة تراكيز NaCl في الوسط الغذائي سببت زيادة فعالية APX في كالس العنب حلواني فسجلت معدل فعالية 0.0190 وحدة. مايكرومول حامض الاسكوربك$^{-1}$. دقيقة$^{-1}$ عند 150 ملي مولر NaCl المتفوقة معنوياً على كل من المعاملتين 0 ملي مولر و 75 ملي مولر NaCl، ويلاحظ تفوق معدل فعالية APX 0.0159 وحدة.مايكرومول حامض الاسكوربك$^{-1}$. دقيقة$^{-1}$ عند معاملة 75 ملي مولر معنوياً على المعاملة الخالية من NaCl.اذ ان ملح كلوريد الصوديوم في الوسط الغذائي يزيد من كمية فوق أوكسيد الهيدروجين في نسيج الكالس وبوجود الأوكسجين الحر يتكون عن تفاعلهما جذر الهيدروكسيل الذي يسبب الاضرار التأكسدية للخلايا وفي مثل هذه الحالات فان النبات يقوم بتفعيل جهازه الدفاعي الانزيمي من خلال ميكانيكيات معينة للتقليل والتخلص من هذه الجذور الحرة لغرض استمرار بقاءه (29)، ما يعمله انزيم APX هو تقليل الجذور الحرة عبر تفاعل الاسكوربيك مع فوق اوكسيد الهايدروجين وانتاج الماء (39). وتتفق نتائج الدراسة مع ما وجده كل من (23 ) في مزارع كالس البطيخ و (41) في كالس التفاح و (7) في المزارع النسيجية للعنب و (21) في كالس أصل الخوخ .

وعن تأثير التداخل فقد شارت نتائج الجدول ذاتها الى وجود تفوق معنوي لمعاملة التداخل بين 150 ملي مولر NaCl و 0 ملي مولر حامض السالسليك البالغة 0.0261 وحدة.مايكرومول حامض الاسكوربك$^{-1}$. دقيقة$^{-1}$ على جميع المعاملات، ولوحظت أقل فعالية عند معاملة التداخل 0.5 ملي مولر حامض السالسليك مع 0 ملي مولر NaCl (0.0051 وحدة.مايكرومول حامض الاسكوربك$^{-1}$. دقيقة$^{-1}$) والتي لم تختلف معنوياً عن معدل فعالية انزيم APX في الوسط الخالي من إضافة حامض السالسليك و NaCl.

**جدول 3 : تأثير حامض السالسليك و ملح كلوريد الصوديوم وتداخلاتهما المضافة إلى الوسط الغذائي MS في فعالية إنزيم APX (وحدة.مايكرومول حامض الاسكوربك$^{-1}$. دقيقة$^{-1}$) في كالس العنب حلواني بعد ثمانية أسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي.**

| تركيز كلوريد الصوديوم NaCl ملي مولر | تركيز حامض السالسليك ملي مولر | | | معدل تأثير كلوريد الصوديوم NaCl |
|---|---|---|---|---|
| | **0** | **0.5** | **1** | |
| **0** | 0.0062 d | 0.0051 d | 0.0145 c | 0.0086 c |
| **75** | 0.0198 b | 0.0124 c | 0.0154 b | 0.0159 b |
| **150** | 0.0261 a | 0.0185 b | 0.0125 c | 0.0190 a |
| معدل تأثير حامض السالسليك | 0.0174 a | 0.0120 b | 0.0141 b | |

**المتوسطات التي يظهر معها حرف أبجدي مشترك لا تختلف فيما بينها اختلافاً معنوياً حسب اختبار دنكن عند مستوى معنوّية 5 %**

**رابعاً: فعالية إنزيم البروكسيديز (Peroxidase (POD**

يبين الجدول رقم (4) انخفاض معدل فعالية أنزيم POD بكالس العنب حلواني بارتفاع تركيز حامض السالسليك في الوسط الغذائي المزروع فيه الكالس، فسجلت أعلى معدل فعالية لأنزيم POD 74.00 مايكرومول. ملغم بروتين$^{-1}$. دقيقة$^{-1}$ عند المعاملة 0 ملي مولر حامض السالسليك، التي تفوقت معنوياً على أقل معدل فعالية لأنزيمPOD 45.67 مايكرومول. ملغم بروتين$^{-1}$. دقيقة$^{-1}$عند أعلى تركيز لحامض السالسليك 1 ملي مولر والتي لم تختلف معنوياً عن معاملة 0.5 ملي مولر التي أعطت معدل فعالية بلغ 51.77. مايكرومول. ملغم بروتين$^{-1}$. دقيقة$^{-1}$. وقد يعزى ذلك الى دور حامض السالسليك في الاستجابات الدفاعية ضد مختلف الإجهادات (8) و قيامه بإنتاج مركبات ايضية ثانوية تساعد في مقاومة الخلايا لإجهادات الملوحة، و إنتاج مغذيات معدنية وتحفيزه لبعض هرمونات النبات و زيادة فعالية إزالة السموم من الخلايا خفف من الاجهاد على الكالس ( 37 و 20 و 42).

ويوضح الجدول (4) إلى إن أعلى معدل فعالية لأنزيم POD سجل عند زيادة تركيز NaCl بالوسط الغذائي MS، فَسُجلت فعالية مقدارها 82.00 مايكرومول. ملغم بروتين$^{-1}$. دقيقة $^{-1}$ عند التركيز 150 ملي مولر NaCl والتي تفوقت معنوياً على معاملة المقارنة (0) ملي مولر ومعاملة 75 ملي مولر حيث سجلتا 27.67 و61.77 مايكرومول. ملغم بروتين$^{-1}$. دقيقة$^{-1}$ على التوالي. وقد يكون سبب زيادة إنزيم POD في الخلايا هو إحدى الوسائل لمقاومة ظروف الجفاف التي تؤدي إلى استحداث الجهد ألتأكسدي المتمثل بزيادة جذور الأوكسجين الفعالة (ROS) الضارة للنبات، لما له من دور في التخلص منها ، والمتمثل بأزالة فوق أوكسيد الهيدروجين $H_2O_2$ (16) وتنسجم هذت النتائج مع (2) فقد حصل على أعلى زيادة لفعالية انزيم POD عند المستوى 150 ملي مولر في فروع المتضاعفة النامية في الوسط MS والمزود بالتراكيز الملحية (0، 75 ، 100، 125، 150

و 200) ملي مولر ونتائج (13) و (36) عند تعريض بادرات وكالس نبات *Trigonella* لملح NaCl قد سبب زيادة في فعالية الأنزيمات المضادة للأكسدة مثل Peroxidase والـ Catalase .

ويشير الجدول(4) الى وجود فروق معنوية في انخفاض فعالية أنزيم POD عند تداخلات حامض السالسليك مع التراكيز الملحية (NaCl)، فسجلت أعلى فعالية عند تداخل المعاملة 0 ملي مولر حامض السالسليك مع 150 ملي مولر NaCl بلغت 111 مايكرومول. ملغم بروتين$^{-1}$. دقيقة $^{-1}$ والتي تفوقت معنوياً على جميع التدخلات، ولوحظت أقل معدل لفعالية 22 مايكرومول. ملغم بروتين$^{-1}$. دقيقة $^{-1}$عند التداخل 0 ملي مولر NaCl و 1 ملي مولر حامض السالسليك التي انخفضت معنوياً عن جميع التداخلات.

**جدول 4 : تأثير حامض السالسليك و ملح كلوريد الصوديوم وتداخلاتهما المضافة إلى الوسط الغذائي MS في فعالية إنزيم POD (مايكرومول. ملغم بروتين$^{-1}$. دقيقة $^{-1}$) في كالس العنب حلواني بعد ثمانية أسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي.**

| معدل تأثير كلوريد الصوديوم | تركيز حامض السالسليك ملي مول.لتر$^{-1}$ | | | تركيز كلوريد الصوديوم |
|---|---|---|---|---|
| NaCl ملي مولر | **1** | **0.5** | **0** | NaCl ملي مولر |
| 27.67 c | 22 e | 33 d | 28 d | **0** |
| 61.77 b | 53 c | 49.3 c | 83 b | **75** |
| 82.00 a | 62 bc | 73 b | 111 a | **150** |
| | 45.67 b | 51.77 b | 74.00 a | معدل تأثير حامض السالسليك |

**المتوسطات التي يظهر معها حرف أبجدي مشترك لا تختلف فيما بينها اختلافاً معنوياً حسب اختبار دنكن عند مستوى معنوَّية 5 %**

**References:**


1. **Aebi, H .(1984**) Catalase in vitro. *Methods in enzymology. Academic press*. Orlando. 105-121).
2. **AL-Deheimawi, A. J. M.(2009)** *In vitro* evaluation of three grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars for NaCl tolerance. thesis**.** Department of Horticulture and Landscape, Agriculture at the University of Kufa. Iraq.
3. **Al-Mamoori, A. H. H. (2015)** Effect of NaCl on Growth and Some Biochemical Characteristics of In vitro Plantlets of Three Grape *Vitis vinifera* L. Cultivars. Thesis . Department of Horticulture and Landscape, Agriculture at the University of Kufa. Iraq.
4. **Al-Rawi, K. M. and KhalafAlah, A. M. (2000)** Design and analysis of agricultural experiments. Dar Al Kuttab for Printing and Publishing. University of Al Mosul. Iraq.
5. **Apel, K. and Hirt H.(2004)** Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biology*. 2004;55:373–399.

6. **Ashraf, M.(2009)** Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotech Advance*, 27 : 84-93.
7. **Baneh, H.D.; Attari, H. ; Hassani, A. and Abdollahi. R. (2013)** Salinity effects on the physiological parameters and oxidative enzymatic activities of four Iranian grapevines (*Vitis vinifera* L.)cultivar. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*.5-9/1022-1027.
8. **Bassil, E.; Tajima, H.; Liang, Y. C.; Ohto, M. A.; Ushijima, K.; Nakano, R.; Esumi, T.;Coku, A.; Belmonte, M.and Blumwald, E.(2011**) The Arabidopsis Na?/H? antiporters NHX1 and NHX2 control vacuolar pH and K? homeostasis to regulate growth, flower development, and reproduction. *Plant Cell*, 23:3482–3497.
9. **Bastam, N.; Baninasab, B.and Ghobadi, C. (2013)** Improving salt tolerance by exogenous application of salicylic acid in seedlings of pistachio. *Plant Growth Regulation*, 69:275–284
10. **Belkadhia, A; Harob, A. D.; Soengasc, P.; Obregonb, S.; Carteac, M. E.; Chaibia, W. and Wahbi Djebali, W.(2014)** Salicylic acid increases tolerance to oxidative stress induced by hydrogen peroxide accumulation in leaves of cadmium-exposed flax (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Plant Interactions*, 9(1): 647–654
11. **Bohnert, H. J.; Nelson, D.E. and Jensen, R.G. (1995**) Adaptation to environmental stresses . *Plant Cell* , 7 : 1099 – 1111.
12. **Davies, P. J. (2004)** Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, Action. Kluwer, Dordrecht.
13. **Esa, M.B.(2015)** Effect of methyl jasmonate and ascorbic acid on physiological and biochemical changes in Citrus rootstock ( Troyer strange) under salt in vitro. thesis. Department of Horticulture and Landscape, Agriculture at the University of Kufa. Iraq.
14. **Fahad S, Hussain S, Bano A, Saud S, Hassan S, Shan D, Khan FA,Khan F, Chen Y, Wu C, Tabassum MA, Chun MX, Afzal M, Jan A, Jan MT, Huang J (2014)** Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment. *Environ Science Pollution Research* ISSN: 0944-1344.
15. **Fu-nan, S; Chuan-ping, Y.; Xue-mei, L. and Gong-bin, L.(2006)** Effect of salt stress on activity of superoxide dismutase (SOD) in *Ulmus pumila* L. *Journal of Forestry Research*, 17(1): 13–16.
16. **Gara, L.D.; Pinto, M.C. and Tommasi, F. (2003)** The antioxidant systems vis-a-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Journal Plant Physiology and Biochemistry*, 41:863-870.
17. **Garg,G.(2010)** In vitro screening of *catharanthus roseus* L. cultivars for salt tolerance using physiological. *International Journal of Environmental Science and Development*, Vol. 1, ( 1) ISSN:2010-0264.

18. **Hudson, T. S. ; D. K. Hartle ; S. D. Hursting ; N. P. Nunez ; T. T.Y. Wang ; H. A. Young ; P. Arany and Green J. E. (2007)** Inhibition of Prostate Cancer Growth by Muscadine Grape Skin Extract and Resveratrol through Distinct Mechanisms. *Cancer Res.*, 67 (17) 8396- 8405.
19. **Iqbal, N.; Umar, S.; Khan, N. A. and Khan M.I.R. (2014)** A new perspective of phytohormones in salinity tolerance: regulation of proline metabolism. *Environ Exp Boanyt*, 100:34–42
20. **Jayakumar, O.; Rengel, Z. and Bose, J.(2015)** Salicylic acid in plant salinity stress signalling and tolerance. *Plant Growth Regulation*.DOI: 10.1007/ s10725-015-0028-z
21. **Joudi, Z. J. and Abbas, M. C.(2016)** Effect of salicylic acid on the antioxidant enzymes activity for callus of garnem peach rootstock under in vitro salt stress. Kufa Journal for Agricultural Science.8 (4) :22-36.
22. **Jules, J. and Moore J. N. (1996)** *Fruit Breeding* .volume II: Vine and small fruit crops. John Wiley and Sons. Inc.
23. **Kawano T, Furuichi T, Muto S (2004)** Controlled salicylic acid levels and corresponding signaling mechanisms in plants. *Plant biotechnology*, 21: 319-335
24. **Kim, Y. ; Chung, T. and Choi, W.(1988)** Increased regeneration from NaCl tolerant callus in rice. Euphytica, 39 : 207 – 212.
25. **Kono, Y. and Fridovic, I. (1983)** Inhibition and reactivation of Mn-Catalase and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato. *Journal of Biological Chemistry*, 258: 13646-13468.
26. **Kusvuran, S.; Ellialtioglu, S.; Yaser, F. and Abak, K. (2012)** Autioxidative enzyme activites in the leaves and callus tissues of salt-tolerant and salt-susceptible melon varieties under salinity. *African Journal of Biotechnology*, 11(3):635-641.
27. **Lokhande, V.H.; T.D., Nikam; V.Y., Patade. M. L., Ahire. and Suprasanna, P. ( 2011)** Effects of optimal and supra-optimal salinity stress on antioxidative defence, osmolytes and in vitro growth responses in *Sesuvium portulacastrum* L. *Plant Cell Tissue Organ Culture*,104:41–49.
28. **Maheswari.J.; Bose. J.; Babourina,O.; Rengel, Z. and Shabala, S.(2015)** Salicylic acid in plant salinity stress signalling and tolerance**.** *Plant Growth Regulation*, https://www.researchgate.net/publication/271706150
29. **Mallik, S. ; Nayak, M. ; Sahu, B.B. ; Panigrahi, A.K. and Shaw, B.P.( 2011)** Response of antioxidant enzymes to high NaCl concentration in different salt-tolerant plants. *Biology Plant*, 55:191–195.
30. **Marklund, S. and Marklund, G.( 1974)** Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *Eur. Journal Biochem*istry., 47:469-474

31. **Mittal, S. ; Kumari, N. ana Sharma, V.( 2012)** Differential response of salt stress on Brassica juncea: photosynthetic performance, pigment, proline, D1 and antioxidant enzymes. *Plant Physiology Biochem*istry,54:17–26.
32. **Mittler R.( 2002)** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Science*.;7:405–410.
33. **Murashige, T. and Skoog, F. (1962)** A revised medium for rapid growth and bi-oassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, 15: 473-497.
34. **Mutlu, S.; O., Atici; and Nalbantoglu, B.( 2009).** Effect of salicylic acid and salinity on apoplastic antioxidant enzymes in two wheat cultivars differing in salt tolerance. *Biologia Plantarum*, 53: 334-338.
35. **Nakana, Y. and Asada, K. (1981)** Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant Cell Physiology*, 22: 867-880.
36. **Niknam, V. ; Razavi, N.; Ebrahimzadeh, N. and Sharifizadeh, B. (2006 )** Effect of NaCl on biomass, protein and proline contents, and antioxidant enzymes in seedlings and calli of two *Trigonella* species. *Biologia Plantarum*, 50 (4): 591-596
37. **Rajeshwari, V and Bhuvaneshwari, V.(2017)** Salicylic acid induced salt stress tolerance in plants. *International Journal of Plant Biology and Research*, *5(3): 1067*
38. **Scandalios, J.G. (1993)** Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiology*, 101: 712-726.
39. **Sergio, L. ; Paola, A.D.; Cantore, V. ; Pieralice, M.; Cascarano, N.A.; Bianco,V.V. and Venere, D.D. (2012)** Effect of salt stress on growth parameters, enzymatic antioxidant system, and lipid peroxidation in wild chicory (*Cichorium intybus* L.). *Acta Physiology Plant*, doi:10.1007/s11738-012-1038-3
40. **Tahir, H. I.(2015)** Study of biochemical changes in in vitro salt stress callus of three grape(*Vitis vinifera* L.) Cultivars. thesis. Department of Horticulture and Landscape Agriculture at the University of Kufa. Iraq.
41. **Wang, K.; Zhang, L.; Gao, M.; Lv, L.; Zhao, Y.; Zhan, L.; LI, B.; Han, N. M. and Alva, K.(2013)** Influence of salt stress on growth and antioxidant responses of two Malus species at callus and plantlet Stages. *Pakistin Journal Botany*, 45(2): 375-381.
42. **Yusuf, M. ; Hayat, S. and Alyemeni, M. (2013)** Salicylic acid plant growth and development.chapter:2.springer .
43. **Zhu, J.K.( 2001)** Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, 6 : 66–71.