نشریه دانش آب و خاک / جلد ۲۶ شماره ۳/۲ صفحه‌های ۹۳ تا ۱۰۴/ سال ۱۳۹۵

تأثیر پیش‌تیمار بذر با باکتری‌های محرک رشد بر رشد رویشی، صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گیاه بامیه (*Abelmoschus esculentus* L.) تحت تنش دمای پایین

سمیه بهادری[۱]، بهروز اسماعیل‌پور*[۲]، علی اشرف سلطانی طولارود[۳]، مختار حیدری[۴]، سرور خرم دل[۵]، پیمان عباس‌زاده دهجی[۶]، پریسا شیخ‌زاده مصدق[۷]

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۸/۰۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۴/۱۲

۱- کارشناس ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
۲- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
۳- استادیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
۴- استادیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رامین، خوزستان
۵- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
۶- استادیار گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان
۷- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: behsmaiel@yahoo.com

چکیده

در این بررسی آزمایشی در دانشگاه محقق اردبیلی به‌صورت طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۳ اجرا گردید. تیمارهای آزمایشی شامل پیش‌تیمار بذر با سویه‌های۱، ۱۰، ۱۹ و ۱۵۰ باکتری *سودوموناس پوتیدا*، سویه‌های ٦٩ و ۱۵۹ باکتری *سودوموناس فلورسنس*، تیمار تلفیقی باکتری *سودوموناس پوتیدا* سویه ۱۹ و باکتری *سودوموناس فلورسنس* سویه ۱۵۹ و تیمار شاهد (بدون تلقیح) بود. گیاهان تا مرحله شش‌برگی در گلخانه نگهداری شدند، سپس روزانه به‌مدت ۲۷۰ دقیقه در معرض تنش دمای پایین (دمای هشت درجه سلسیوس) قرار گرفتند و سرمادهی روزانه به‌مدت پنج روز ادامه یافت. پس از اعمال تنش سرما، طول و وزن خشک گیاهچه، رنگیزه‌های فتوسنتزی، کربوهیدرات کل، پرولین، ثبات غشا، مقدار پروتئین، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پلی‌فنل‌اکسیداز و پراکسیداز اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که پیش‌تیمار با باکتری‌های محرک رشد باعث افزایش طول و وزن خشک گیاهچه، صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی شد. سویه‌های باکتری *سودوموناس پوتیدا و سودوموناس فلورسنس* از طریق افزایش پرولین، میزان کربوهیدرات محلول، و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باعث حفظ یکپارچگی غشای سلول گردیده و در نتیجه خسارت به غشا کاهش یافت. بیشترین بهبود پیش‌تیمار جهت کاهش اثرات تنش دمای پایین از تلقیح بذور با سویه ۱۵۰ باکتری *سودوموناس پوتیدا* و سویه ٦٩ باکتری *سودوموناس فلورسنس*حاصل شد.

واژه‌های کلیدی: *آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پرولین، سودوموناس پوتیدا، سودوموناس فلورسنس*

Effects of Seed Priming with Plant Growth Promoting Bacteria on Some Physiological and Biochemical Characteristics of Okra (*Abelmoschus esculentus* L.) Seedlings under Low Temperature Stress

S Bahadoori[1], B Esmaielpour[2]*, AA Soltani Toolarood[3], M Heidari[4], S Khorramdel[5], P Abasszadeh Dahaji[6], P Shiekhzadeh[7]

Received: 24 January 2015 Accepted: 21 June 2016

1-M.Sc. of Hortic. Sci., Faculty of Agri. and Natural Res., Mohaghegh Ardabili Univ., Ardabil, Iran
2-Assoc. Prof. of Hortic. Sci., Faculty of Agri. and Natural Res., Mohaghegh Ardabili Univ., Ardabil, Iran
3- Assist. Prof. of Soil Sci., Faculty of Agri. and Natural Res., Mohaghegh Ardabili Univ., Ardabil, Iran
4- Assist. Prof. of Hortic. Sci., Faculty of Agri. Sci., Ramin Univ., Khouzestan, Iran
5- Assist. Prof. of Agro., Faculty of Agri. Sci., Ferdowsi Univ. of Mashhad, Mashhad, Iran
6- Assist. Prof. of Soil Sci., Faculty of Agri. Sci., Vali-e-Aser Univ., Rafsanjan, Iran
7- Assist. Prof. of Agro., Faculty of Agri. and Natural Res., Mohaghegh Ardabili Univ., Ardabil, Iran
*Corresponding Author, Email: behsmaiel@yahoo.com

Abstract

In this study an experiment was conducted based on completely randomized design in research greenhouse of Mohaghegh Ardabili University in 2014. Treatments consisted of inoculated seeds by *Pseudomonas putida* strains 1, 10, 19 and 150, *Pseudomonas fluorescence* strains 69 and 159, combination of strain 19 from *Pseudomonas putida* and strain 69 from *Pseudomonas fluorescence* and control (without inoculation). Plants were kept in greenhouse until six-leaf stage then exposed to low temperature stress (8 ºC temperature for 270 minutes during five consecutive days). After exposing plants to low temperature stress, traits such as seedling height and dry weight, photosynthetetic pigments, total carbohydrates, proline, membrane integrity, protein amount, catalase, peroxidase and poly phenol oxidase enzymes were measured. Results indicated that priming of okra seeds with plant growth promoting bacteria increased seedling height and dry weight, physiological and biochemical characteristics. *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescence* increased cell membrane integrity via increase in leaf proline content, total soluble carbohydrates and antioxidant enzymes. The greatest promotion of seedling growth under low temperature was obtained by priming of seeds with *Pseudomonas putida* strain 150 and of *Pseudomonas fluorescence* strain 69.

Keywords: *Antioxidant enzymes, Proline, Pseudomonas fluorescence, Pseudomonas putida*

مقدمه

توسعه غذاهایی با پروتئین بالا با منشا گیاهی در کشورهای در حال توسعه ضروری است، زیرا قیمت بالای پروتئین حیوانی را کاهش می‌دهد. مصرف محصولاتی مانند بامیه نقش مهمی را در مبارزه با سوءتغذیه، که یک مشکل جدی در این کشورها می‌باشد، ایفا می‌کند (آمینیگو و آکین‌گبالا ۲۰۰٤). بامیه منبع مهمی از ویتامین‌های A، B و C و عناصر معدنی مانند کلسیم، پتاسیم بوده و هم‌چنین غنی از پروتئین می‌باشد (دانشور ۱۳۸۷). بامیه از سبزی‌های فصل گرم است که گیاهچه آن در دمای ۱۰ درجه سلسیوس دچار آسیب سرمازدگی می‌شود (مارش ۱۹۹۲).

گیاهان برای رشد بهینه به محدوده دمایی خاصی احتیاج دارند و دماهای خارج از این محدوده به‌عنوان یک

تنش محسوب می‌شود. گزارش شده است که وقتی گیاه در معرض دماهای بین صفر تا ۱۵ درجه سلسیوس قرار گیرد تغییرات فیزیولوژیکی در آن به‌وجود می‌آید (سپانن ۲۰۰۰). نتیجه این تغییرات فیزیولوژیکی ممکن است به‌صورت آسیب‌های قابل برگشت و یا غیرقابل برگشت بروز نماید. ضایعات اولیه اختلالاتی هستند که در واکنش‌های متابولیسمی به‌صورت موقتی ایجاد می‌شوند و معمولا در صورت رفع عامل تنش‌زا قابل برگشت می‌باشند و آسیب‌های ثانویه اختلالات متابولیسمی هستند که معمولا پس از رفع تنش به‌حالت اولیه برنمی‌گردند (آلن و اورت ۲۰۰۱). تحقیقات نشان داده است که با تغییر خصوصیات غشاء در حین تنش سرما، تعادل متابولیسمی به‌هم خورده و باافزایش متابولیت‌های سمی، آسیب‌های ثانوی در گیاه ایجاد می‌شود (سپانن ۲۰۰۰). یکی از مهمترین تغییرات بیوشیمیایی در گیاهان که تحت تنش‌های سرما و یخبندان ایجاد می‌شود تولید گونه‌های فعال اکسیژن در کلروپلاست و میتوکندری‌ها است (باکالووا و همکاران ۲۰۰٤، رحیم‌زاده و همکاران ۲۰۰۷). گونه‌های فعال اکسیژن شکل‌های فعالی از اکسیژن هستند که در مراحل حیاتی مانند تنفس نوری، فتوسنتز و تنفس تولید می‌شوند. رادیکال سوپراکسید در طی فتوسنتز در صورت اختلال در تجزیه آب در واکنش هیل و عدم انتقال الکترون به فتوسیستم II تشکیل می‌شود (بات چارژ ۲۰۰۵). گونه‌های فعال اکسیژن شدیدا با مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک واکنش داده و پراکسیداسیون لیپید، واسرشته شدن شدن پروتئین و جهش در DNA را سبب می‌شوند که این امر به مختل شدن متابولیسم طبیعی گیاه و در نهایت مرگ سلول‌ها منجر می‌شود (پننی کووک و همکاران ۲۰۰٤، اسفندیاری و همکاران ۲۰۰۷). گیاهان مکانیزم‌های حفاظتی مختلفی را برای دفع یا کاهش رادیکال‌های فعال اکسیژن دارند که در سطوح مختلف تنش مؤثر است. سیستم‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدان یکی از این مکانیزم‌های حفاظتی است. گیاهانی که از سطوح بالاتری از آنتی‌اکسیدان‌ها برخوردار هستند، مقاومت بیشتری به آسیب‌های اکسیداتیو نشان می‌دهند. دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز از مهمترین آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشند که باعث شکسته شدن پراکسیدهیدروژن به آب و اکسیژن می‌گردند (قربانلی و همکاران ۱۳۸۲، جاندا و همکاران۲۰۰۵، یانگ و همکاران ۲۰۰۸). گیاهان در مقابل تنش‌های محیطی، از قبیل سرما و یخبندان در مرحله سازگاری، با ذخیره مواد تنظیم‌کننده اسمزی، مقاومت خویش به دمای پایین را افزایش می‌دهند. مواد تنظیم‌کننده فشار اسمزی بیشتر شامل اسیدهای آمینه، کربوهیدرات، برخی یون‌های معدنی و پروتئین‌ها هستند و پرولین یکی از اسیدآمینه‌های فعال در پدیده تنظیم اسمزی است (جعفری و همکاران ۱۳۸۵). امروزه فناوری‌های مختلفی در جهت ارتقای کیفیت بذر با هدف افزایش جوانه‌زنی و استقرار بهتر گیاهچه تحت شرایط نامساعد محیطی توسط محققین مورد ارزیابی قرار گرفته است. یکی از این فناوری‌ها، تیمار پیش از کاشت یا پرایمینگ بذر می‌باشد (اشرف و فولاد ۲۰۰۵). پیش‌تیمار سبب تغییرات بیوشیمیایی، زیستی و فیزیولوژیکی زیادی در بذور و همچنین گیاه حاصل از آن می‌شود، به‌طوری‌که نتیجه آن جوانه‌زنی و استقرار مناسب گیاهچه است (اشرف و فولاد ۲۰۰۵). در حال حاضر، تقویت زیستی بذر با به‌کارگیری باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه[1] از جمله کارآمدترین روش‌های پیش‌تیمار بذر می‌باشد (اشرف و فولاد ۲۰۰۵). این باکتری‌ها گروه نامتجانسی از باکتری‌های ریزوسفری می‌باشند که به‌طور مستقیم با سنتز یک‌سری از مواد (مانند هورمون‌ها، سیدروفور، آنزیم ACC- دِآمیناز و...) و تسهیل جذب عناصر غذایی و غیر مستقیم از طریق خنثی یا تعدیل نمودن اثرات مضر عوامل بیماری‌زا با تولید متابولیت‌هایی از قبیل آنتی‌بیوتیک‌ها، سیانید هیدروژن یا افزایش مقاومت گیاه

[1] Plant growth promoting rhizobacteria

میزبان نسبت به عوامل بیماری‌زا موجب بهبود شاخص‌های رشد و نمو گیاه می‌گردند (کلوپر و همکاران ۱۹۸۹، گلیک ۱۹۹۵). یکی از مکانیسم‌های مهم باکتری‌های محرک رشد که در دهه‌های اخیر مورد توجه محققین قرار گرفته است توانایی تولید آنزیم ACC – دآمینازمی‌باشد. گزارشات حاکی از آن است که هر باکتری که دارای فعالیت آنزیم ACC – دآمیناز بیش از ۲۰ نانومول α-کتوبوتیرات بر میلی گرم در ساعت باشد، باکتری محرک رشد گیاه بوده و می‌تواند شاخص‌های رشد گیاه را افزایش دهد (کلوپر و همکاران ۱۹۸۹). مایه‌زنی گیاه با باکتری‌های PGPR دارای توانایی تولید این آنزیم می‌تواند در کاهش سطح اتیلن تنشی در گیاه و در نتیجه کاهش اثرات منفی آن مؤثر باشند. باکتری‌های محرک رشد با چنین توانایی می توانند گیاهان را در برابر اثرات مضرّ تنش‌های محیطی چون فلزات سنگین، شرایط غرقابی، پاتوژنهای گیاهی، خشکی و شوری محافظت کنند. باکتری‌های جنس *سودوموناس* یکی از انواع مهم باکتری های محرک رشد گیاهی تولید کننده آنزیم ACC – دآمیناز بوده که با خنثی یا تعدیل نمودن عوامل ایجاد کننده تنش باعث افزایش عملکرد محصول می‌گردند (ناناداکومار و همکاران ۲۰۰۱). در ایران علی رغم تحقیقات گسترده انجام شده در خصوص نقش باکتری‌های محرک رشد گیاهی در افزایش رشد و عملکرد محصولات زراعی، پژوهش‌های صورت گرفته در زمینه نقش باکتری‌های محرک رشد تولید کننده آنزیم ACC – دآمیناز در کاهش اثرات مضر عوامل تنش‌زای گیاهی خیلی محدود می‌باشد. لذا این تحقیق با هدف بررسی تأثیر گونه‌های مختلف سودوموناس‌های فلورسنت دارای فعالیت آنزیم ACC دآمیناز و توانایی تولید اکسین، بر شاخص‌های مرفولوژیکی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه بامیه تحت تنش دمای پایین انجام شد.

مواد و روش‌ها

نحوه اعمال تیمارها و کشت گیاه در گلدان‌ها

این آزمایش در سال ۱۳۹۳ در گروه باغبانی دانشگاه محقق اردبیلی (شهر اردبیل) انجام شد. بذرهای بامیه رقم بسنطی که در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت، از شرکت سپاهان رویش اصفهان تهیه گردید. آزمایش به‌صورت طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل تلقیح بذور گیاه بامیه با مایه تلقیح سویه‌های۱، ۱۰، ۱۹ و ۱۵۰ باکتری *سودوموناس پوتیدا* ، سویه‌های ٦٩ و ۱۵۹ باکتری‌های *سودوموناس فلورسنس*، تیمار تلفیقی باکتری *سودوموناس پوتیدا* سویه ۱۹ و باکتری *سودوموناس فلورسنس*سویه ۱۵۹ و یک تیمار بدون تلقیح بود. باکتری‌های محرک رشد از آزمایشگاه بیولوژی دانشکده کشاورزی پردیس کرج تهیه شد و در یخچال در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آماده‌سازی مایه تلقیح

برای آماده سازی مایه تلقیح ابتدا هشت ارلن مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث[2] تهیه گردید. برای تهیه مایه تلقیح، یک کلنی خالص از هر باکتری برداشته شد و تحت شرایط استریل به ارلن مایر محتوی محیط نوترینت براث اضافه گردید. ارلن مایرهای تلقیح شده با هفت سویه باکتری همراه با یک ارلن مایر تلقیح نشده به عنوان شاهد، روی شیکر با سرعت ۱۲۰rpm و دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شدند. مایه تلقیح سویه‌های مورد مطالعه پس از ٤٨ ساعت با جمعیت 7×10^{7} عدد باکتری در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون آماده مصرف بودند.

بذرهای بامیه قبل از انجام آزمایش با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به‌مدت پنج دقیقه ضدعفونی و سپس سه مرتبه با آب مقطر شستشو شدند. تعداد ۵۰ عدد بذر انتخاب و به ارلن محتوی باکتری انتقال داده شدند. سپس

[2] Nutrient Broth

به هر ارلن سوسپانسیون یک نوع از باکتری‌ها اضافه شد و به‌مدت ٤٥ دقیقه بذرها در محلول باکتری غوطه‌ور شدند تا عمل تلقیح به‌طور کامل انجام گیرد. بذرهای تیمار شاهد در محیط کشت مایع بدون حضور باکتری قرار داده شدند. بعد از عمل تلقیح بذور روی ورقه آلومینیمی استریل تا حدودی خشک شدند، سپس پتری دیش‌های محتوی بذور به ژرمیناتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و مدت روشنایی ۱۲ ساعت منتقل شدند. بذور پس از خروج ریشه‌چه به‌اندازه دو میلی‌متر به گلدان‌هایی پلاستیکی یک‌بار مصرف، حاوی پیت‌ماس و پرلیت با نسبت‌های چهار به یک منتقل شدند. و گلدان‌ها برای رشد در داخل گلخانه با دمای ۲± ۲۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند و آبیاری گلدان‌ها هر دو روز یک‌بار بدون محلول غذایی صورت گرفت. در مرحله دو یا سه برگی، گیاهچه در گلدان‌های بزرگتر حاوی خاک، ماسه و کود دامی به نسبت ۱:۱:۲ کاشته شده و پس از اینکه گیاهان به مرحله شش‌برگی رسیدند، جهت جلوگیری از شوک سرمایی به‌مدت دو روز در شرایط دمایی ۱۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سرما در اتاقک رشد ۸ درجه سلسیوس، روزانه به‌مدت ۲۷۰ دقیقه اعمال و سرمادهی روزانه به‌مدت ۵ روز ادامه یافت. پس از تیمار گیاهچه‌ها، گلدان‌های حاوی گیاهچه به گلخانه با طول دوره روشنایی ١٦ ساعت و با دمای متوسط ۲۵ درجه سلسیوس منتقل شدند. یک روز بعد از پایان تیمار سرما، بوته‌ها از محل طوقه برداشت و برخی شاخص‌های رشد مورد بررسی قرار گرفت.

اندازه‌گیری طول و وزن خشک گیاهچه

طول گیاهچه با استفاده از خط‌کش در سه تکرار بر اساس سانتی‌متر اندازه‌گیری گردید. وزن خشک گیاهچه با استفاده از ترازو با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی

اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل و کارتنوئیدها) بر اساس روش پیشنهادی آرنون (١٩٤٩) انجام شد. در این روش رنگیزه‌ها با استفاده از استون ۸۰ درصد استخراج شدند و غلظت آنها براساس روابط زیر محاسبه گردید. نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه و ارائه می‌گردد.

Chla = (١٢/٢٥) (A٦٦٣/٢) – (٢/٧٩٨) (A٦٤٦/٨)

Chlb = (٢١/٢١) (A٦٤٦/٨) – (٥/١) (A٦٦٣/٢)

ChlT = Chla + Chlb

Cartenoide = (١٠٠٠A٤٧٠- ١/٨Chla-٨٥/٠٢ Chlb)/١٩٨

A: جذب طول موج

Chla: کلروفیل a Chlb: کلروفیل b

ChlT: کلروفیل کل Cartenoide: کارتنوئید

اندازه‌گیری مقدار پرولین

اندازه‌گیری مقدار پرولین با استفاده از معرف ناین هیدرین بر اساس روش پیشنهادی بیتس (١٩٧٣) انجام گرفت. در این روش از معرف ناین هیدرین و اسید استیک گلاسیال برای اندازه‌گیری پرولین استفاده شد و نتایج بر حسب میکرومول بر گرم وزن تازه گزارش گردید.

اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول

اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول با استفاده از روش ایریگوئن و همکاران (١٩٩٢) انجام شد. ابتدا عصاره الکلی از برگ‌ها تهیه شد. بدین صورت که، ابتدا ۰/۵ گرم از بافت نگهداری شده در یخچال ۷۰- برداشته و در هاون چینی کاملاً هموژن گردید. سپس ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ به آن اضافه و به لوله آزمایش درب‌دار منتقل شده و به‌مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد. مایع رویی جدا و به لوله دیگر منتقل شده و سپس دو بار و در هر بار ۵ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ به بخش جامد باقی مانده اضافه و کاملاً شستشو گردید و بخش مایع رویی به لوله آزمایش منتقل شده و در نهایت ۱۵ میلی‌لیتر از عصاره به‌دست آمد (کلیه موارد فوق در حمام یخ و نور کم انجام شد). عصاره‌ی حاصل، به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه

سانترفیوژ شد. بعد از جداسازی روشناور، ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره الکلی انتخاب و داخل لوله‌های آزمایشی ریخته شد. سپس سه میلی‌لیتر آنترون تازه (۱۵۰میلی‌گرم آنترون در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۷۲٪) تهیه شده به آن اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. پس از خنک شدن نمونه‌ها در محیط آزمایشگاه، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ٦٢٥ نانومتر، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد.

اندازه‌گیری ثبات غشا (نشت مواد یونی)

اندازه‌گیری ثبات غشا (نشت مواد یونی)بر اساس روش پیشنهادی ردمن و همکاران (١٩٨٦) انجام گرفت. از برگ کاملاً توسعه یافته دیسک‌هایی به قطر یک سانتی‌متر تهیه شد. نمونه‌ها در ظرف سربسته حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه قرار گرفت و به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و توسط دستگاه شیکر تکان داده شد. پس از پایان زمان مورد نظر، قرائت در طول موج ۲۸۰ نانومتر انجام شود (L_t). نمونه به محلول برگردانیده شد، سپس نمونه و محلول در اتوکلاو قرار داده شد و سپس قرائت در طول موج ۲۸۰ نانومتر انجام شود (L_0).

$$\text{نشت مواد محلول ٪} = (L_t / L_0) \times ١٠٠$$

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پلی-فنل‌اکسیداز و پراکسیداز از روش کارا و میشرا (١٩٧٦) استفاده شد:

آنزیم کاتالاز: ٦٠ میکرولیتر از عصاره پروتئینی را در ۲/۵ میلی‌لیتر بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷ و ۰/۳ میلی‌لیتر آب اکسیژنه پنج میلی‌مولار در حمام یخ اضافه نموده و منحنی تغییرات جذب در طول موج ٢٤٠ نانومتر رسم شد. فعالیت آنزیم برحسب میکروگرم بر میلی‌گرم پروتئین بافت تازه گیاهی محاسبه گردید.

آنزیم پلی‌فنل اکسیداز: ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی را در ۱/۵ میلی‌لیتر تریس ۰/۲ مولار و ۰/۳ میلی‌لیتر پیروگالل ۰/۰۲ مولار حل نموده و میزان جذب در طول موج ٤٢٠ نانومتر یادداشت شد.

آنزیم پراکسیداز: ۵۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی را در ۲/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج که شامل بافر تریس ۱۰۰ میلی‌مولار و آب اکسیژنه پنج میلی‌مولار و پیروگالل ۱۰ میلی‌مولار بود، منحنی تغییرات جذب در طول موج ٤٢٥ نانومتر رسم شد.

تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم افزار 9.1 SAS انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها نیز با آزمون چند دامنه ای دانکن صورت گرفت.

نتایج و بحث

طول و وزن خشک گیاهچه

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که اثر پیش‌تیمار بذر با باکتری‌های محرک رشد گیاهی بر طول گیاهچه و وزن خشک گیاهچه بامیه رقم بسنطی در شرایط تنش دمای پایین در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد. طبق جدول ۲، بیشترین طول گیاهچه (۳۵/۱ سانتی‌متر) در پیش‌تیمار بذر بامیه با سویه ۱۹ باکتری *سودوموناس پوتیدا* حاصل شد که نسبت به شاهد، سویه ۱۵۰ *سودوموناس پوتیدا* و سویه ٦٩ باکتری *سودوموناس فلورسنس*اختلاف معنی‌دار نشان داد و کمترین طول گیاهچه (۲۲/۰ سانتی‌متر) مربوط به شاهد بود.

آلن و اورت (۲۰۰۱) گزارش دادند که گیاه گوجه-فرنگی تحت تنش سرما با کاهش رشد همراه بود. پال و سارما (۲۰۰٦) اثر تلقیح پنج سویه *سودوموناس فلورسنس* دارای توانایی تولید هورمون‌های محرک‌رشد از قبیل اکسین و جیبرلین را بر فلفل سیاه مورد بررسی قرار دادند. این بررسی نشان داد که کاربرد باکتری به-طور معنی‌داری وزن خشک ریشه، طول ریشه، سطح ریشه و تعداد ریشه را افزایش می‌دهد. بهبود رشد گیاه در اثر آغشته کردن بذر با کودهای بیولوژیک می‌تواند

ناشی از تأثیر این میکروارگانسیم‌ها روی فعالیت‌های فیزیولوژیک و متابولیک گیاه و نیز تثبیت نیتروژن باشد و بخشی دیگری از این اثرات افزایشی نیز می‌تواند حاصل، بهبود کارآیی گیاه در اثر ترشح هورمون‌هایی نظیر سیتوکینین و اکسین باشد که جذب آب و مواد غذایی را تحریک می‌کند. از سوی دیگر باکتری با تولید جیبرلین سبب افزایش تارهای کشنده می‌شوند، لذا جذب عناصر غذایی از خاک بهتر صورت گرفته و رشد گیاه بهبود می‌یابد (زهیر و همکاران ۲۰۰٤). گراول و همکاران (۲۰۰۷) افزایش طول ریشه، وزن تر ریشه و اندام هوایی گیاه گوجه فرنگی را در اثر تلقیح با باکتری‌های *سودوموناس* که دارای توانایی تولید اکسین بود را گزارش کردند. همچنین باکتری‌های دارای آنزیم ACC دی‌آمیناز می‌توانند از طریق کاهش سطح اتیلن موجب افزایش طول ریشه و رشد گیاه شوند (احمد و همکاران ۲۰۰۸). نتایج صفات محرک رشدی سویه‌های به کار رفته در تحقیق عباس‌زاده و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد سودوموناس‌های فلورسنت از مهمترین باکتری‌های تولید کننده اکسین و آنزیم ACC- دآمیناز می‌باشند.

رنگیزه‌های فتوسنتزی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد تأثیر پیش‌تیمار بذر با ترکیبات مختلف بر میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل به‌ترتیب در سطح احتمال۱ درصد معنی‌دار است و بر مقدار کارتنوئید در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). مقایسه میانگین میزان کلروفیل a نشان داد که تمام تیمارها باعث افزایش معنی-دار صفت ذکر شده گردیدند، به‌طوری‌که بیشترین مقدار کلروفیل a (۱٤/٦ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) از پیش‌تیمار بذر با سویه ۱۵۰ *سودوموناس پوتیدا* حاصل شد که با سویه ۱۹ *سودوموناس پوتیدا*، تیمار تلفیقی سویه ۱۹ *سودوموناس پوتیدا* + سویه ۱۵۹ *فلورسنس* و شاهد اختلاف معنی‌دار داشت (جدول ۲). باتوجه به جدول ۲، نتایج مقایسه میانگین نشان می‌دهد تمام سویه‌ها (به-استثناء سویه ٦۹ *سودوموناس فلورسنس*) باعث افزایش معنی‌دار میزان کلروفیل b نسبت به شاهد شدند و بیشترین مقدار (۹/۰٦ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مربوط به سویه ۱۹ *سودوموناس پوتیدا* می‌باشد، که با شاهد، سویه ۱۰ *سودوموناس پوتیدا* و سویه ٦۹ *سودوموناس فلورسنس* اختلاف معنی‌دار داشت و کمترین مقدار (٤/۲۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در تیمار شاهد مشاهده شد.

جدول۲ نتایج مقایسه میانگین مقدارکلروفیل نشان می‌دهد، بیشترین و کمترین مقدار کلروفیل کل به‌ترتیب ۲۱/۱، ۹/٦٤ میلی‌گرم بر گرم وزن تر از سویه ۱۵۰ *سودوموناس پوتیدا* و تیمار شاهد حاصل شد و مقدار کلروفیل در تیمار سویه ۱۵۰ *سودوموناس پوتیدا* با تیمار سویه‌های ۱ و ۱۰ *سودوموناس پوتیدا* اختلاف معنی‌دار نداشت.

درجه حرارت پایین ممکن است اندام کلیدی فتوسنتز شامل کلروپلاست و غشای تیلاکوئید را تخریب کند و باعث تورم پلاستید و تیغه تیلاکوئید، تجمع قطرات چربی و سرانجام باعث به‌هم ریختگی کل پلاستید شود. در این میان فتوسیستم II اولین هدف آسیب درجه حرارت پایین می‌باشد (آلن و اورت ۲۰۰۱). علاوه بر این دمای پایین، فعالیت آنزیم‌های جذب کربن مانند آنزیم چرخه کالوین، ATP سنتاز را کاهش می‌دهد و بازسازی روبیسکو و فسفریلاسیون را محدود می‌کند (آلن و اورت ۲۰۰۱) و کاهش انتقال کربن از برگ که منجر به تجمع کربوهیدرات محلول می‌شود (حسنزمان و همکاران ۲۰۱۳). علت اصلی تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن در دمای پایین، عدم تعادل بین دریافت نور و فتوسنتز می-باشد (آلن و اورت ۲۰۰۱). در گیاهان مقاوم به تنش سرما تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن کنترل شده و تعدیل می‌گردد. همچنین کاهش دما در حضور نور خطر اکسیداسیون نوری را به علت عدم توازن استفاده از نور، افزایش می‌دهد (آلن و اورت ۲۰۰۱). تنش منجر به افزایش غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد مانند اسید آبسیزیک و اتیلن می‌شود که تحریک کننده آنزیم کلروفیلاز شده و به این ترتیب کلروفیل‌ها تحت تاثیر این آنزیم تجزیه می‌شود (اوربای و همکاران ۲۰۱۰). باکتری‌های ریزوسفری می-توانند از افزایش غلظت اتیلن درگیاهان در هنگام بروز تنش جلوگیری نموده و سبب کاهش اثرات منفی این هورمون در رشد و توسعه اندام‌های گیاه از طریق تولید

آنزیم ACC-دآمیناز شوند. این آنزیم به صورت غیر مستقیم و عمدتاً از طریق کاهش سطح اتیلن تنشی در گیاه باعث تداوم رشد گیاه می‌گردد (گریکو و گلیک ۲۰۰۱).

یلدیریم و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که باکتری‌های محرک رشد می‌تواند باعث القا سیگنال اسید سالیسیلیک و جاسمونات شوند که مهم‌ترین سیگنال‌ها برای پاسخ گیاه به تنش‌های محیطی می‌باشد. .اسید سالیسیلیک معمولا با اثر بر هورمون‌های اسید آبسیزیک و اتیلن بسیاری از روندهای فیزیولوژیک و رشد گیاه را تنظیم می‌کند، از جمله با اثر بر روی هورمون اسید آبسیزیک و تجمع این هورمون در گیاه باعث خوگیری گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی می‌شود (زهو ۲۰۰۱).

صفات بیوشیمیایی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر تیمارها بر تولید پرولین، کربوهیدرت محلول، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

پرولین

با توجه به نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده ها، تمام تیمارها باعث افزایش معنی‌دار مقدار پرولین برگ بامیه نسبت به شاهد شدند و بیشترین میزان پرولین آزاد برگ از تلقیح بذر با سویه‌های ۱، ۱۰ ، ۱۹ *سودوموناس پوتیدا*، سویه ٦٩ *سودوموناس فلورسنس* و تیمار تلفیقی حاصل شد (جدول ۲). گیاهان در مقابل تنش‌های مختلف مکانسیم‌های دفاعی مختلفی دارند که تحت تنش سرما باعث تجمع بالای ترکیبات محلول سازگار می‌شوند که این ترکیبات بدون تغییر در pH فیزیولوژیکی و غیرسمی در غلظت بالا هستند که باعث حفظ فشار اسمزی همچنین باعث تثبیت ساختار پروتئین و غشا تحت استرس می-شوند که نقش مهمی در سازگاری سلول به استرس‌های مختلف دارند. پرولین یکی از مهم‌ترین این نوع ترکیبات می‌باشد که از دو مسیر گلوتامات و اورنیتین سنتز می-شود که تحت تنش سرما به مقدار زیادی سنتز آن افزایش می‌یابد و باعث کاهش رادیکال‌های آزاد تولید شده در شرایط تنش می‌شود (اشرف و فولاد ۲۰۰۷). عموآقایی و همکاران (۱۳۸٤) گزارش کردند که در شرایط تنش رطوبتی، گیاهچه ذرت تلقیح شده با باکتری *آزوسپیریلوم* به طور قابل توجهی غلظت پرولین بالاتری نسبت به تیمار شاهد دارد. چنین به‌نظر می‌رسد که باتوجه به نقش پرولین به‌عنوان مخزن ذخیره‌ای نیتروژن و استفاده از باکتری‌ها به‌عنوان تثبیت کننده نیتروژن، احتمالا پرولین، گیاه را در تحمل به تنش یاری می‌کند (طاهرخانچی و همکاران ۱۳۹۲).

کربوهیدرات‌های محلول

از نظر محتوی کربوهیدرات تمام تیمارها با شاهد اختلاف معنی‌دار نشان دادند و بیشترین مقدار کربوهیدرات محلول (۱/۱۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) از سویه ۱ *سودوموناس پوتیدا* حاصل شد (جدول ۲). گوستا و همکاران (۲۰۰۵) در گزارشی عنوان داشته‌اند که گیاهان در مرحله سازگاری به تنش دمای پایین با تجمع اسید آبسیزیک در برگ‌های خود موجب فعالیت برخی از ژن‌ها و تغییراتی در کربوهیدرات درون سلول می‌شوند که در نتیجه تنظیم فشار اسمزی و تحمل پذیری گیاهان نسبت به تنش دمای پایین افزایش می‌یابد. گزارش شده است که نقش قندها در ایجاد تحمل نسبت به دماهای پایین می‌تواند بیشتر از سایر محافظت‌کننده‌های سرمایی باشد. ساکارز یک ترکیب ضروری است که می‌تواند باعث افزایش تحمل گیاه نسبت به تنش‌های محیطی نظیر تنش دمای پایین شود. گلوکز دارای کنترلی مستقیم و گسترده بر بیوسنتز هورمون اسید آبسیزیک می‌باشد به‌طوری‌که غلظت بالای گلوکز در سلول منجر به سطوح بالای اسید آبسیزیک درون سلولی می‌گردد، زیرا نسخه برداری ژن‌های بیوسنتز کننده اسید آبسیزیک را افزایش می‌دهد. ساکارز نیز همانند گلوکز یکی از ترکیبات اساسی برای بیوسنتز اسید آبسیزیک می‌باشد (یادگاری و همکاران ۲۰۰۸). عموآقایی و همکاران (۱۳۸٤) در تحقیقی اثر *آزوسپیریلوم* در شرایط شور بر عملکرد گندم را بررسی و نشان دادند که کاربرد این سویه باعث تجمع بیشتر مواد تنظیم‌کننده اسمتیک و تحمل به شوری در گیاهان شد.

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس اثر پیش‌تیمار بر پارامترهای رویشی، رنگیزه‌های فتوسنتزی، صفات بیوشیمیایی و ثبات غشا بامیه تحت تنش دمای پایین.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات											
		طول گیاه	وزن خشک گیاه	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتنوئید	پرولین	کربوهیدرات محلول	ثبات غشا	فعالیت آنزیم کاتالاز	فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز	فعالیت آنزیم پراکسیداز
تیمار	۷	۶۳/۰*	۰/۱۰۷*	۲۷/۰**	۲/۳۰**	۳۶/۳**	۱/۴۸*	۰/۷۰۱**	۰/۲۰۵**	۸۶۲**	۵۵۸**	۱۳۰۰**	۸۳۵۲**
خطا	۱۶	۱۶/۰	۰/۰۵۰	۳/۹۰	۰/۳۳۰	۳/۳۰	۰/۵۹۰	۰/۰۲۰	۰/۰۱۰	۵۶/۵	۷/۳۰	۹۹/۰	۸۸۴
CV (٪)		۱۴/۰	۲۹/۰	۱۷/۵	۱۰/۳	۱۰/۸	۲۲/۴	۶/۰۰	۱۹/۸	۱۹/۴	۹/۴۰	۱۱/۰	۱۰/۲

*، ** و ns به ترتیب معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ درصد، ۱ درصد و عدم تفاوت معنی‌داری است.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر پیش‌تیمار بر پارامترهای رویشی، مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی، صفات بیوشیمیایی و ثبات غشای بامیه تحت تنش دمای پایین.

تیمار	طول گیاه	وزن خشک گیاه	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتنوئید	پرولین	کربوهیدرات محلول	ثبات غشا	فعالیت آنزیم کاتالاز	فعالیت آنزیم پلی‌فنل-اکسیداز	فعالیت آنزیم پراکسیداز
	cm	g pot^{-1}	(mg g^{-1} FW)						٪	(Unit mg^{-1} protein)		
شاهد	۲۲/۰^{c}	۰/۵۱۱^{b}	۵/۴۳^{d}	۴/۲۰^{d}	۹/۶۴^{d}	۲/۱۰^{b}	۱/۲۵^{c}	۰/۳۱۰^{e}	۵۴/۲^{ab}	۱/۴۰^{e}	۷۶/۰^{de}	۲۴۳^{b}
سویه ۱ *سودوموناس پوتیدا*	۲۹/۳^{abc}	۰/۷۴۰^{ab}	۱۳/۵^{ab}	۶/۰۰^{ab}	۱۹/۶^{ab}	۴/۲۵^{a}	۲/۶۰^{a}	۱/۱۵^{a}	۲۱/۰^{c}	۳۴/۷^{b}	۸۹/۰^{cd}	۳۳۹^{a}
سویه ۱۰ *سودوموناس پوتیدا*	۲۹/۰^{abc}	۰/۹۱۰^{ab}	۱۳/۶^{ab}	۵/۴۳^{bc}	۱۹/۱^{abc}	۳/۸۶^{a}	۲/۶۰^{a}	۰/۴۸۰^{de}	۴۰/۰^{b}	۴۶/۰^{a}	۱۰۸^{b}	۳۲۱^{a}
سویه ۱۹ *سودوموناس پوتیدا*	۳۵/۱^{a}	۱/۰۵^{a}	۹/۰۶^{c}	۶/۵۷^{a}	۱۵/۶^{c}	۲/۹۷^{ab}	۲/۴۳^{ab}	۰/۶۷۰^{bcd}	۶۵/۰^{a}	۱۷/۲^{d}	۶۵/۰^{e}	۲۵۹^{b}
سویه ۱۵۰ *سودوموناس پوتیدا*	۲۲/۹^{c}	۰/۵۶۰^{b}	۱۴/۶^{a}	۶/۵۳^{ab}	۲۱/۱^{a}	۳/۷۸^{a}	۲/۳۰^{b}	۰/۷۹۰^{bc}	۱۵/۳^{c}	۳۱/۷^{bc}	۱۰۰^{bc}	۳۶۰^{a}
سویه ۶۹ *سودوموناس فلورسنس*	۲۶/۴^{bc}	۰/۸۴۰^{ab}	۱۲/۱^{abc}	۴/۴۹^{cd}	۱۶/۶^{bc}	۳/۵۹^{a}	۲/۶۰^{a}	۰/۹۲۰^{ab}	۲۵/۰^{c}	۳۲/۰^{b}	۱۲۶^{a}	۳۲۶^{a}
سویه ۱۵۹ *سودوموناس فلورسنس*	۳۳/۰^{ab}	۰/۹۴۰^{ab}	۱۱/۹^{abc}	۵/۵۶^{ab}	۱۷/۴^{bc}	۳/۹۰^{a}	۲/۶۰^{a}	۰/۶۹۰^{bcd}	۴۳/۰^{b}	۳۴/۷^{b}	۷۵/۲^{de}	۲۱۹^{b}
سویه۱۹پوتیدا+سویه۱۵۹فلورسنس	۳۰/۹^{ab}	۰/۶۹۰^{ab}	۱۰/۲^{bc}	۶/۰۲^{ab}	۱۶/۲^{bc}	۲/۹۲^{ab}	۲/۴۰^{ab}	۰/۵۷۰^{cd}	۴۴/۰^{b}	۲۸/۱^{c}	۷۵/۳^{de}	۲۴۹^{b}

در هر ستون میانگین‌های با حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند.

ثبات غشا (نشت مواد محلول)

تلقیح بذور با سویه‌های ۱، ۱۰ و ۱۵۰ *سودوموناس پوتیدا* و سویه ۶۹ باکتری *سودوموناس فلورسنس* باعث کاهش نشت مواد محلول از غشا شدند و بیشترین ثبات غشا از سویه ۱۵۰ *سودوموناس پوتیدا* حاصل شد. کمترین مقدار ثبات غشا مربوط به سویه ۱۹ *سودوموناس پوتیدا* بود که با شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت. (جدول ۲). یکی از آثار منفی تنش دمای پایین آسیب به غشا سلول بوده که در توجیه این وضعیت می‌توان چنین گفت که رادیکال‌های آزاد در درون سلول باعث آسیب رساندن به لیپیدها و اسیدهای چرب غشایی شده و رادیکال‌های لیپید و پراکسی و هیدروپراکسی تولید می‌کنند. رادیکال‌های جدید تولید شده می‌توانند واکنش‌های اکسیداسیون لیپیدها (منجر به افزایش تولید مالون‌دی‌آلدئید) را تسریع کنند. تداوم این امر موجب تخریب بیشتر غشا سلول و خروج آب از درون سلول به فضای بین سلولی شده که نتیجه این وضعیت، بروز پدیده آب گزیدگی و افزایش نشت یونی است که در نهایت کاهش محتوای آب برگ را به دنبال خواهد داشت (ورسلوز و همکاران ۲۰۰۶). ترشح هورمون‌های گیاهی یکی از مهم‌ترین مکانسیم‌های باکتری‌های محرک رشد گیاه است (زهیر و همکاران ۲۰۰۴). یلدیریم و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که باکتری‌های محرک رشد می‌توانند باعث القا تجمع هورمون اسید سالیسیلیک شوند. اسید سالیسیلیک از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و جذب کلسیم، گیاه را از صدمات حاصل از واکنش‌های اکسیداتیو حفظ می‌کند. همچنین اسید سالیسیلیک میزان پلی‌آمین‌های پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین را در گیاه افزایش می‌دهد که می‌تواند به یکپارچگی و حفظ غشا تحت شرایط تنش شوری کمک

کند (نعمت و همکاران ۲۰۰۲). بیشترین ثبات غشا در سویه‌های دارای آنزیم ACC–دآمیناز مشاهده شد که این می‌تواند ناشی از کاهش تنش توسط این آنزیم باشد. تغییرات دما باعث نامتعادل شدن هورمون‌ها در گیاهان شده و رشد گیاهان را به طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار می‌دهد. مانند سایر فاکتورهای زیستی و غیرزیستی، سرما و گرما باعث تولید بیش از حد اتیلن در بافت‌های گیاهی می‌شود و این تولید بیش از حد اتیلن می‌تواند توسط باکتری‌های تولید کننده آنزیم ACC–دآمیناز تعدیل شود (سالم و همکاران ۲۰۰۷).

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

تمامی تیمارها باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به شاهد شدند و بیشترن مقدار (٤٦/٠) مربوط به سویه ۱ بود. سویه ۱۰ و۱۵۰ *سودوموناس پوتیدا* و سویه ٦٩ *سودوموناس فلورسنس* نیز در شرایط تنش دمای پایین میزان فعالیت آنزیم پلی–فنل اکسیداز را افزایش دادند که از لحاظ آماری نسبت به شاهد معنی‌دار بود (جدول ۳). در تنش دمای پایین گیاهچه‌های بامیه فعالیت آنزیم پراکسیداز به‌طور قابل توجه توسط تلقیح بذور با سویه‌ی ۱، ۱۰، ۱۵۰ *سودوموناس پوتیدا* و سویه ٦٩ *سودوموناس فلورسنس*افزایش یافت و بیشترین مقدار از پیش‌تیمار بذر بامیه با سویه ۱باکتری *سودوموناس پوتیدا* حاصل گردید (جدول ۲).

در شرایط تنش دمای پایین به‌علت تولید رادیکال–های آزاد اکسیژن در داخل سلول، احتمال وقوع تنش اکسیداتیو (به‌عنوان تنش ثانویه) وجود دارد که باعث اختلال در اعمال فیزیولوژیک سلول می‌شود (چن و همکاران ۲۰۰٦). تاسگین و همکاران (۲۰۰٦) نیز اعلام کردند که تیمار سرما موجب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه می‌شود. فعالیت آنزیم‌های آنتی–اکسیدانی در ارقام مقاوم به سرمای ذرت، برنج، یونجه، گوجه‌فرنگی و نخود بیشتر از ارقام حساس به سرما می–باشد (حسنوزمان و همکاران ۲۰۱۳). ماریوس و همکاران (۲۰۰۵) تأثیر تلقیح باکتریایی را روی چند شاخص بیوشیمیایی گیاه آفتابگردان بررسی کردند. نتایج نشان داد فعالیت آنزیم کاتالاز قبل و بعد از گل‌دهی در فرایند فتوسنتز و تولید انرژی و در نهایت، بهبود رشد آفتابگردان در تیمار کود زیستی نسبت به کنترل افزایش داشته است. هان و لی (۲۰۰۵) گزارش کردند با افزایش شدت تنش شوری نسبت به تیمار شاهد (بدون تنش)، باکتری‌های محرک رشد به‌طور معنی‌داری فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان را در برگ گیاه کاهو بالا بردند. در شرایط نبود تنش گیاهچه‌های تلقیح شده کاهو با باکتری *سودموناس* میزان فعالیت آنزیم کاتالاز کمتری را نسبت به تیمار شاهد (بدون باکتری) نشان داد (کوهلر و همکاران ۲۰۰۹). باکتری‌ها با تغییر در مکانیزم دفاعی گیاه سبب پاک‌سازی یا کاهش رادیکال‌های مخرب اکسیژن شده و از میزان خسارت ناشی از اثرات مضر تنش جلوگیری می‌کنند (پان و همکاران ۲۰۰٦).

نتیجه‌گیری کلی

تنش سرما باعث تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاهان می‌شود. یکی از این تغییرات، تجمع رادیکال‌های فعال اکسیژن در سلول می‌باشد که این رادیکال‌های فعال اکسیژن در متابولیسم گیاه اختلال ایجاد می‌کند. مطالعه حاضر نشان داد که باکتری‌های محرک رشد با افزایش مقدار پرولین، کربوهیدرات محلول، رنگیزه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنزیم‌های آنتی–اکسیدانی رشد گیاه بامیه تحت تنش دما را بهبود می‌دهند. همچنین نتایج بیانگر کارایی بالاتر سویه‌های دارای آنزیم ACC– دآمیناز در کاهش تنش سرما و افزایش پارامترهای رویشی، صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در گیاه بامیه می‌باشد. با توجه به نتایج این تحقیق می–توان نتیجه گرفت که کاربرد باکتری‌های محرک رشد به–خصوص باکتری‌های دارای توانایی مصرف ACC به–عنوان منبع نیتروژن می‌تواند نقش بسیار مؤثری در کاهش خسارات ناشی از تنش سرمایی در گیاهان داشته باشد.

منابع مورد استفاده

جعفری ر، منوچهری کلانتری خ و ترک‌زاده م، ۱۳۸۵. بررسی اثرات پاکلوبوترازول بر افزایش مقاومت به سرما در نهال‌های گوجه-فرنگی. مجله زیست شناسی ایران، جلد ۱۹، صفحه‌های ۲۹۰ تا ۲۹۸.

دانشور مح،. ۱۳۸۷ پرورش سبزی. انتشارات دانشگاه شهید چمران، اهواز.

طاهرخانچی آ، اکبری غع، مدرس ثانوی عم و قربانی جاوید م، ۱۳۹۲. ارزیابی تأثیرات کودهای زیستی بر عملکرد دانه و برخی خصوصیات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه سویا تحت تنش کم آبی. مجله به‌زراعی کشاورزی، جلد ۳، صفحه‌های ۱٤۱ تا ۱۵۳.

عموآقایی ر، مستاجران ا و امتیازی گ، ۱۳۸٤. اثر آزوسپیریلوم و اسیدیته قلیایی آب آبیاری بر عملکرد دانه و میزان پروتئین ارقام زراعی گندم. مجله زیست‌شناسی، جلد ۱۸، صفحه‌های ۲٤۸ تا ۲۵٦.

قربانلی خ، ساطعی م و مقیسه ا، ۱۳۸۲. اثر مقادیر متفاوت شوری بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و نیترات ردوکتاز در ریشه و برگهای ارقام کلزا. مجله پژوهش و سازندگی، جلد ٤۳، صفحه‌های ۱۵۳ تا ۱٦۰.

Abbaszadeh P, Saleh-Rastin N, Asadi-Rahmani H, Khavazi K, Soltani A, Shoary-Nejati AR and Miransari M, 2010. Plant growth-promoting activities of fluorescent pseudomonads, isolated from the Iranian soils. Acta Physiologiae Plantarum 32: 281–288

Ahmad F, Ahmad I and Khan M, 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth-promoting activities. Microbiology Research 163:173-181.

Allen DJ and Ort DR, 2001. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. Trends in Plant Science 6(1): 36-41.

Aminigo ER and Akingbala JO, 2004. Nutritive composition and sensory properties of ogi fortified with okra seed meal. Journal of Applied Science and Environment 8(2): 23-28.

Arnone DT, 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in *Beta vulgaris* L. Plant Physiology 24: 1-15.

Ashraf M and Foolad MR, 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving\plant abiotic stress resistance. Environ. Experimental Botany 59: 206-216.

Ashraf M and Foolad MR, 2005. Pre-sowing seed treatment-ashotgun approach to improve germination plant growth, and crop yield under saline and non-saline conditions. Advances in Agronomy 88: 223-271.

Bakalova S, Nikolova A and Nedeva D, 2004. Isoenzyme profiles of peroxidase, catalase and superoxide dismutase as affected by dehydration stress and ABA during germination of wheat seeds. Journal of Plant Physiology 30: 64-77.

Bates LS, 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.

Bhattacharjee S, 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: Role in stress, senescence and signal transduction in plants. Current Science 89: 1113-1121.

Chen Y, Zhang M, Chen T, Zhang Y and An L, 2006. The relationship between seasonal changes in anti-oxidative system and freezing tolerance in the leaves of evergreen woody plants of Sabina. South African Journal of Botany 72: 272-279.

Esfandiari E, Shekari F and Esfandiari M, 2007. The effect of salt stress on antioxidant enzymes' activity and lipid peroxidation on the wheat seedling. Journal of Notulae Botanica Horticulture Agribotanica 35: 48-56.

Glick BR, 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Canadian Journal of Microbiology 41: 109-117

Gravel V, Hani A and Tewddell RJ, 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). Soil Biology and Biochemistry 39: 1968-1977.

Grichko VP and Glick BR, 2001. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. Plant Physiology and Biochemistry 39: 11-17.

Gusta LV, Trischuk R and Weiser CJ, 2005. Plant cold acclimation: the role of abscisic acid. Journal of Plant Growth Regulation 24: 308-318.

Han HS and Lee KD, 2005. Plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis, mineral uptake and growth of Lettuce under soil salinity. Research Journal of Agriculture and Biological Science 1: 210-215.

Hsanuzzaman M, Nahar K and Fujita M, 2013. Extreme temperature responses, oxidative stress and antioxidant defense in plants. Pp 169-205. In: vahdati K and Leslie C (eds). Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture. InTech. Rijeka.

Irigoyen JJ, Emerich DW and sanchez-Diaz M, 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants. Plant Physiology 84: 55-60.

Janda T, Kosa EL, Szalai G and Paldi E, 2005. Investigatin of antioxidant activity of maize during low temperature stress. Journal of Plant Physiology 49: 53-54.

Kara M and Mishra E, 1976. Catalse, peroxidase and polyphenol oxidase activities rice leaf senescence. Plant Physiology 57(2): 315-319.

Kloepper JW, Lifshitz R, Zablotowicz RM, 1989 Free-living bacterial inocula for enhancing crop productity. Trends Biotechnology 7: 39–43.

Kohler J, Antonio Hernandes J, Caravaca F and Roldan 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.

Marius S, Octavita A, Eugen U, and Vlad A, 2005. Study of a microbial inoculation on several biochemical indices in sunflower (*Helianthus anuus* L.). Genetics and Molecular Biology 12(2): 11-17.

Marsh L, 1992. Emergence and seedling growth of okra genotypes at low temperatures. Hortscience 27(12): 1310-1312.

Nandakumar R, Babu S, Viswanathan R, Raguchander T and Samiyappan R, 2001. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by plant growth promoting rhizobacteria. Soil Biology and Biochemistry 33**:** 603–612.

Nemeth M, Janda T, Hovarth E, Paldi E, and Szali G, 2002. Exogenous salicylic acid increases polyamine content but may decrease drought tolerance in maize. Plant Science 162: 569-574.

Orabi SA, Salman SR and Shalaby, AF, 2010. Increasing resistance to oxidative damage in cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants by exogenous application of salicylic acid and paclobutrazol. World Journal of Agricultural Science 6: 252-259.

Pan Y, Wu LJ and Yu ZL, 2006. Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis fisch*). Plant Growth Regulation 49: 157-165.

Paul D and Sarma YR, 2006. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) mediated root proliferation in black pepper (*Piper nigrum* L.) as evidenced through GS root software. Archives of Phytopathology and Plant Protection 39: 1-4.

Pennycooke JC, Cox S and Stushnoff C, 2004. Relatioship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia (*Petinia hybrida*). Journal of Environmental and Experimental Botany 53: 225-232.

Rahimizadeh M, Habibi D, Madani H, Mohammadi H, Mehraban A and Sabet AM, 2007. The effect of micronutrients on antioxidant enzymes metabolism in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under drought stress. Journal Helia 47: 167-174.

Redmann RE, Haraldson J and Gusta LV, 1986. Leakage of UV-absorbing substances as a measure of salt injury in leaf tissue of woody species. Physiologia Plantarum 67: 87–91.

Saleem M, Arshad M, Hussain S and Bhatti AS, 2007. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 34: 635–648.

Seppanen MM, 2000. Characterize of freezing tolerance in *Solanum commersonii*(dun.) with special reference of the relationship between and oxidative stress. University of Helsinki Department of Production Section of Crop Husbandry 56: 4-44.

Tasgin E, Atici O, Nalbantoglu B and Petrova L, 2006. Effects of salicylic acid and cold treatment on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. Journal of Phytochemistry 67: 710-715.

Verslues PE, Agrawal M, Katiyar-Agrwal S, Zhu J and Zhu JK, 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. Plant Journal 45: 523-539.

Yadeghari LZ, Heidari R and Carapetian J, 2008. The influence of cold acclimation on proline, malondialdehyd (MDA), Total protein and pigments contents in soybean (*Glycine max*) seedlings Research Journal of Biological Sciences 3(1): 74-79.

Yilldirim E, Turan M, Donmez MF, 2008. Mitigation of salt stress in radish (*Raphanus Sativus* L.) by plant growth promoting rhizobacteria. Romanian Biotechnological Letters 13(5): 3933-3943.

Yong Z, Hao-Ru T and Ya L, 2008. Variation in antioxidant enzyme activities of two strawberry cultivars with short-term low temperature stress. Journal of Agricultural Sciences 4: 456-462.

Zahir ZA, Arshad M and Frankenberger WT, 2004. Plant growth promoting rhizobacteria: Application and perspectives in agriculture. Advances in Agronomy 81: 97-167.

Zhu JK, 2001. Cell signaling under salt, water and cold stresses. Plant Biology 4: 401-406.