

مطالعه اثرات باکتری محرک رشد و اسید سالیسیلیک در گیاه نعناع سبز (*Mentha spicata* L.) تحت شرایط تنش خشکی

Study the effects of Plant Growth Promoting Bacteria and salicylic acid in green mint (*Mentha spicata* L.) under drought stress conditions

کمال صالحی^{۱*}، محمود سلوکی^۲، محمود تنها^۳

۱- دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه هرمزگان، هرمزگان، ایران

۲- دانشیار، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه اصلاح گیاهان، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

Salehi K^{*1}, Solouki M², M Tanha³

1- PhD Student, Department of Biotechnology, College of Agriculture, University of Hormozgan, Hormozgan, Iran

2- Associate Professor, Department of Plant Breeding, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

3- Graduate MSc Student, Department of Plant Breeding, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: kamalsalehi88@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۲۸)

چکیده

به منظور بررسی اثر باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* 1732 و اسید سالیسیلیک بر صفات آنتی-اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی و همچنین بیان ژن لیمون هیدروکسیلاز در گیاه نعناع سبز تحت تنش خشکی آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی شامل سه سطح تنش خشکی، ۸۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد)، ۶۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی، به عنوان فاکتور A، کود زیستی (تلقیح و عدم تلقیح) فاکتور B و اسید سالیسیلیک (صفر و یک میلی مولار) به عنوان فاکتور C در سه تکرار انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده ها نشان داد که کاربرد باکتری و اسید سالیسیلیک سبب افزایش آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی فنل و فلاونوئید شد. همچنین میزان بیان ژن لیمون هیدروکسیلاز به عنوان ژن دخیل در سنتز منوترپن ها در شرایط تنش تحت تیمار باکتری و اسید سالیسیلیک افزایش یافت. کاربرد تیمار باکتری و اسید سالیسیلیک اثر معنی داری بر آنزیم های آنتی اکسیدانی نداشت در حالی تنش خشکی سبب افزایش بسیار معنی داری بر فعالیت های آنتی اکسیدانی شد. نتایج این آزمایش حاکی از آن است که باکتری و اسید سالیسیلیک با افزایش فنل کل و فلاونوئید و افزایش متابولیت های ثانویه به عنوان اولین سد دفاعی، اثرات مخرب تنش خشکی را کاهش داده است. در نتیجه گیاه تحمل بیشتری را از خود نشان داده و انرژی کمتری را صرف تولید آنزیم های آنتی اکسیدانی نموده است.

واژه های کلیدی

آنزیم های آنتی اکسیدانی
اسید سالیسیلیک
تنش خشکی
فلاونوئید
فنل کل
لیمون هیدروکسیلاز

مقدمه

گیاه نعناع سبز با نام علمی *Mentha spicata* L. یکی از گونه‌های موجود در جنس *Mentha* و متعلق به خانواده نعنائیان (Lamiaceae) است. این گیاه برای اولین بار در سال ۱۶۷۲ در منطقه‌ای از آمریکا کشت داده شد و دارای پراکنش وسیع در مناطق معتدل اروپا، آسیا، شمال آمریکا و به‌خصوص در نواحی مدیترانه است (Lewis 1998). ترپنوئیدها یک خانواده بزرگ از محصولات طبیعی هستند که به‌عنوان بهترین ترکیبات اسانس و رزین‌های دفاعی گیاه در گیاهان معطر شناخته می‌شوند. مونوترپن‌ها از اجزای اصلی اسانس گیاه نعناع سبز و یک گروه از ترپنوئیدها به‌شمار می‌آیند (McCartny et al. 2003). اکثر مونوترپن‌ها به واسطه‌ی تغییراتی که در ژرنال دی فسفات (GPP) در ابتدای مسیر سنتز ترپنوئیدها رخ می‌دهد حاصل می‌شوند و در طی این مسیر لیمونن توسط آنزیم ترپن سنتتاز تولید می‌شود. لیمونن ۳-هیدروکسیلاز به‌عنوان یک سیتوکروم P450 (یک کمپلکس آنزیمی) اکسیژناز وظیفه‌ی هیدروکسیله نمودن لیمونن (در کربن شماره ۳) را دارد که در تولید و انتقال سایر ایزوپروپانوئیدها نقش دارد. این فعالیت در ابتدای متابولیسم رخ می‌دهد و این مشخصه تولید و متابولیسم مونوترپن‌ها در گیاه نعناع است (Croteau and Gershenzon. 1994).

از میان تنش‌های محیطی، تنش خشکی مهم‌ترین عامل محدود کننده تولید محصولات در سیستم‌های کشاورزی در مناطق خشک و نیمه خشک به حساب می‌آید (Debaeke and Abdellah. 2004). تنش خشکی تقریباً تمامی جنبه‌های رشد گیاه و بیشتر فرآیندهای فیزیولوژیک آن را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Hung 2000). تنش‌های غیر زیستی از طریق ایجاد تغییراتی در مسیر متابولیسم کربوهیدرات‌ها بر افزایش یا کاهش سطح بیان ژن‌های مربوطه، اثر گذار می‌باشند (Gupta and Kaur. 2005). بنابراین باعث القای بیان و یا ممانعت از بیان برخی از ژن‌ها می‌شوند (Kasuga et al. 1999). در شناسایی ژن‌های درگیر در سنتز پروتئین‌ها به‌منظور القای تحمل نسبی به خشکی با افزایش راندمان فتوسنتز و تجمع پروتئین‌های محلول تحقیقاتی انجام شده‌است (Yangn et al. 2011). در این راستا گروه‌های مختلفی

از ژن‌های درگیر شامل ژن‌های سنتز آنزیمی، فاکتورهای کنترلی^۱، عوامل رونویسی^۲، هورمون‌ها و پروتئین‌های هموستاتیک شناسایی شده‌اند (Chen et al. 2010). باکتری‌های منطقه ریزوسفر از طریق مکانیسم‌های مختلف می‌توانند باعث افزایش رشد و عملکرد گیاه شده که اصطلاحاً ریزوباکتری‌های محرک رشد^۳ (PGPR) نامیده می‌شوند (Lynch 1990). مهم‌ترین سازوکارهای تاثیر این باکتری‌ها عبارتند از: افزایش فراهمی زیستی عناصر معدنی با تثبیت زیستی عناصر معدنی، تثبیت زیستی نیتروژن، محلول کردن فسفر و پتاسیم و مهار زیستی عوامل بیماری‌زا با تولید مواد تنظیم کننده رشد گیاه بویژه اکسین‌ها، جبرلین‌ها و سیتوکینین‌ها (Vessey 2003). تلقیح گیاه با باکتری محرک رشد *Paenibacillus polymyxa* باعث افزایش القای بیان ژن *ERD15* در گیاه آراییدوپسیس شده‌است و این ژن عامل تحمل به خشکی در این گیاه است (Timmusk and Wagner 1999).

اسید سالیسیلیک یا اسید ارتوئی ۳ دروکسی بنزوئیک و ترکیبات متعلق به آن از مشتقات فنل‌های گیاهی می‌باشند (Popova et al. 1997). سالیسیلیک اسید یکی از مولکول‌های سیگنالی را در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی در گیاه القا می‌کند (Arfan et al. 2007). علاوه بر این، سالیسیلیک اسید به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان در مقاومت اکتسابی سیستمیک شناخته می‌شود و باعث افزایش القای مقاومت گیاه به سایر تنش‌ها می‌شود (Raskin 1992). نقش حمایتی اسید سالیسیلیک مربوط به تنظیم رادیکال آزاد، آنتی اکسیدان‌ها، القا بیان ژن، جذب و پخش عناصر است (Meth welly et al. 2003). در مطالعه‌ای بیان ژن *H6H* و ایزوفرم‌های PMT تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک در ریشه‌های مویین و اندام‌های مختلف شاییزک افزایش یافت (Moradi et al. 2010).

گزارشات متعددی مبنی بر اهمیت نقش باکتری‌های محرک رشد و اسید سالیسیلیک بر کاهش اثرات ناشی از تنش‌ها از طریق افزایش بیان ژن‌های دفاعی و در نتیجه افزایش مقاومت گیاهان در برابر تنش‌ها وجود دارد. بر این اساس، با توجه به نقش کلیدی

¹ Regulatory Factor² Transcription Factor³ Plant growth promoting rhizobacteria

تعیین وزن خشک به آون با دمای ۱۰۳ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و به مدت ۴۸ ساعت در آن قرار گرفتند. درصد آب خاک در حالت ظرفیت زراعی از طریق معادله زیر تعیین شد:

$$100 \times (\text{وزن خشک خاک} / \text{وزن خشک خاک} - \text{وزن تر خاک}) = \text{درصد آب خاک (Nezami et al. 2012)}.$$

باکتری از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه شد. برای تهیه مایع تلقیح سویه باکتری از محیط کشت‌های نیترونت آگار (NA) و نیترونت براث (NB)، استفاده شد (۰/۸ گرم پودر استاندارد شرکت مرک المان در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر pH=7). به این ترتیب که یک حلقه از کشت ۴۸ ساعته باکتری در محیط NA به فالكونها انتقال یافته و به مدت ۳۶ ساعت روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس از این سوسپانسیون سری‌های رقت مختلف تهیه شد. به منظور تعیین مناسب‌ترین رقت جهت تولید کلنی‌های باکتری در سوسپانسیون‌های اصلی، به روش شمارش کلنی‌های ایجاد شده بر روی محیط کشت صورت گرفت. برای تیمار خاک ابتدا بر اساس حجم وضعیت رطوبتی گلدان‌ها، مقدار متناسب برای آن‌ها مشخص شد به نحوی که پس از افزودن این مقدار آب، از زیر گلدان بیش از چند قطره خارج نشود، سپس سوسپانسیون باکتری با جمعیت 10^9 سلول باکتری به خاک اضافه شد (Kim et al. 1997; Raupach and Kloepper 1998).

اسید سالیسیلیک با جرم مولکولی ۱۳۸/۱۲ گرم در دو غلظت در سطح یک میلی‌مولار (1 mM) و غلظت صفر (شاهد آب مقطر) بر اساس روش Sayyari et al. (2009) به دست آمد.

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی بر اساس روش Folin-Ciocalteu (Soland and Laima 1999) صورت گرفت. شدت جذب با دستگاه اسپکتوفتومتر با طول موج ۷۲۵ نانومتر و برای محاسبه غلظت ترکیب‌های فنلی از منحنی استاندارد گالیک اسید بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در گرم بافت تازه استفاده شد.

میزان فلاونوئید کل با روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شد (Toor and Savage 2005). شدت جذب در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. غلظت نمونه‌ها با استفاده از منحنی

باکتری محرک رشد و اسید سالیسیلیک در توسعه‌ی میکانیسم‌های دفاعی، پژوهش حاضر به منظور بررسی اثر دو تیمار فوق بر بیان ژن لیمونن هیدروکسیلاز به وسیله تکنیک Real Time PCR و برخی از صفات دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی در گیاه نعنای تحت تنش خشکی انجام شد.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثر باکتری‌های محرک رشد و محلول پاشی اسید سالیسیلیک بر برخی صفات فیزیولوژیک گیاه نعنای سبز تحت شرایط تنش خشکی آزمایشی در آبان ماه سال ۱۳۹۲ در گلخانه پژوهشگاه دانشگاه زابل به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. عوامل مورد بررسی شامل تنش خشکی به عنوان فاکتور A در سه سطح (۸۰ به عنوان شاهد، ۶۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی)، باکتری به عنوان فاکتور B در دو سطح (صفر یا شاهد و 10^9 CFU/mL) و اسید سالیسیلیک به عنوان فاکتور C به صورت محلول پاشی در دو غلظت صفر و یک میلی-مولار بود.

ریزوم‌های نعنای سبز از کلکسیون گیاهان پژوهشگاه دانشگاه زابل تهیه شد. ریزوم‌های جوان در گلدان‌های با ابعاد ۱۵×۲۰ کشت شدند. کشت ریزوم‌ها در عمق یک سانتی‌متری از سطح خاک صورت گرفت و در هر گلدان تعداد سه الی چهار ریزوم کشت داده شد. خاک گلدان‌ها نیز مخلوط مساوی از خاک برگ و هوموس بود. گلدان‌ها در شرایط یکسان در دمای روزانه ۲۵ تا ۳۰ و شبانه ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. به دلیل استقرار مناسب باکتری روی ریشه و امکان تکثیر بهتر، بعد از ۱۴ روز اعمال تنش خشکی به روش وزنی-حجمی صورت پذیرفت. پس از گذشت ۱۷ روز در شرایط تنش، محلول پاشی اسید سالیسیلیک اعمال شد. به منظور ایجاد شرایط یکسان از آب مقطر در محلول پاشی گیاه شاهد استفاده شد.

به منظور اعمال تنش خشکی ابتدا ۱۰ گلدان مشابه با گلدان‌های آزمایشی تا حد اشباع آبیاری و پس از گذشت ۴۸ ساعت گلدان‌ها هر دو ساعت یکبار توزین شدند. در زمان ثابت شدن وزن گلدان‌ها از هر گلدان یک نمونه خاک تهیه، توزین و سپس جهت

استاندارد کوئرستین بر اساس میزان معادل میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره به دست آمد.

میزان جذب آب اکسیژنه در عصاره آنزیمی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر در زمان یک دقیقه قرائت شد. تغییرات جذب به دست آمده در زمان یک دقیقه، به ضریب خاموشی مولی این واکنش که برابر $36 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ است تقسیم شد و فعالیت آنزیم کاتالاز بر حسب واحد در گرم وزن تر بیان شد (Beers and Sizer 1952).

میزان جذب آب اکسیژنه در عصاره آنزیمی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر در زمان یک دقیقه قرائت شد. تغییرات جذب به دست آمده در زمان یک دقیقه، به ضریب خاموشی مولی این واکنش که برابر $2676 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ است تقسیم شد و فعالیت آنزیم گایاکول پروکسیداز بر حسب واحد در گرم وزن تر بیان شد (Nakano and Asada 1981). جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به روش Sairam et al. (2002) جذب کمپلکس واکنشی در طول موج ۲۹۰ نانومتر یادداشت و با استفاده از ضریب خاموشی $\text{mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ میزان فعالیت آنزیم محاسبه شد.

برای استخراج RNA کل از برگ نعنای، از محلول RNX Plas (شرکت سینا ژن) همراه با کلروفرم، ایزوپروپانول، اتانول ۷۵ درصد و آب DEPC (دی اتیل پیروکربنات) طبق دستورالعمل استفاده شد. پس از استخراج RNA کل، کیفیت آن به وسیله الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. بعد از استخراج RNA سنتز DNA با استفاده از کیت 2-Steps RT-PCR kit ساخت شرکت Vivantis انجام شد. به منظور بررسی و کنترل بیان ژن *lim3h* با توجه به مطالعات Tahsili et al. (2010) از ژن توبولین (*Tub4*) (Accession number: DQ435662.1) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ژنهای *lim3h* و *Tubulin* با استفاده از نرم افزار Primer3web از طریق پایگاه داده NCBI^۱ انجام شد (جدول ۱).

تکثیر ژنهای *lim3h* و *Tubulin* برای اندازه گیری بیان ژن توسط واکنش Real Time PCR بر اساس روش استاندارد به صورت نسبی انجام گرفت. کمیت نسبی در Real Time PCR به وسیله

اندازه گیری افزایش تشعشع فلورسنس در نتیجه اتصال رنگ Eva Green با استفاده از دستگاه RG-3000 Corbett Research انجام گرفت. اجزای واکنش Real Time PCR شامل Master Mix (غلظت در حجم نهایی)، cDNA (10 ng) و هر آغازگر (μM) ۱/۰ - ۰/۱ بود. به منظور به دست آوردن دمای بهینه اتصال آغازگرها به توالی مورد نظر، واکنش زنجیره ای پلیمرز با شیب دمایی توسط دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت Eppendorf آلمان انجام گرفت. دمای مطلوب اتصال ژن *lim3h* و *Tubulin* ۶۰ درجه سانتی گراد تعیین شد. هم چنین برنامه حرارتی برای تکثیر هر دو ژن با استفاده از روش Real Time PCR یکسان و طبق جدول ۲ بود. پس از واکنش تکثیر به روش QReal Time PCR داده های خام به صورت Ct (Threshold cycle) از دستگاه استخراج شد. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد و از روش $\Delta\Delta\text{Ct}$ برای تجزیه داده ها استفاده شد.

همه آزمایش ها با سه تکرار و سه نمونه مستقل انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ و مقایسه میانگین ها بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام شد.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای طراحی شده

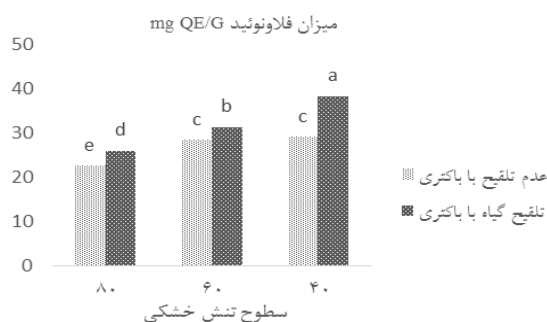
primer	Primer sequence (5'→3')	GC (%)
Forward <i>lim3h</i>	AGGATAGCGACGCTTACGTG	55.0
Reverse <i>lim3h</i>	TCAGCGAGTCCTTCACCAAC	50.0
Forward <i>Tub</i>	CTCCTTGAGCTAGTCGTCGC	60.0
Reverse <i>Tub</i>	AACAAGGCAAAAACATTCCG	58.0

جدول ۲- شرایط دمایی و زمانی واکنش Real time PCR

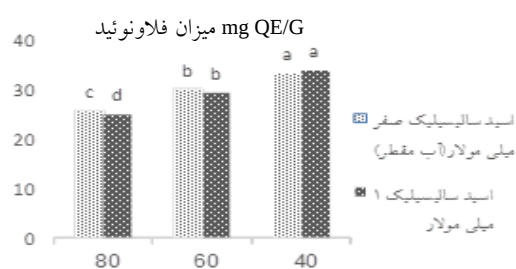
مرحله	دما و زمان مورد استفاده
فعال سازی ابتدای آنزیم	۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه
۴۰ چرخه شامل مراحل زیر	
واسرشت شدن	۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه
اتصال آغازگرها	۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه
بسط ترکیبی	۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه
منتحنی ذوب	افزایش دما از ۵۰ درجه تا ۹۹ درجه هر ۵ ثانیه ۱ درجه

¹ National Center for Biotechnology Information

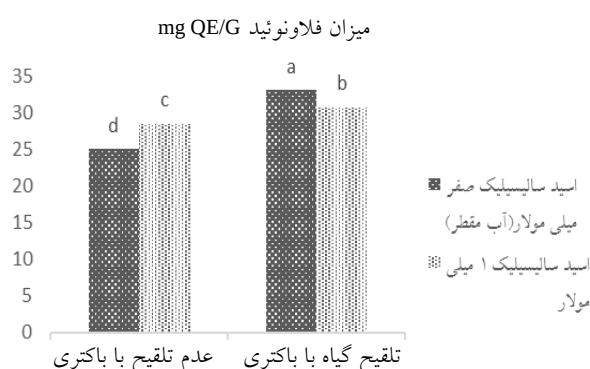
نتایج و بحث



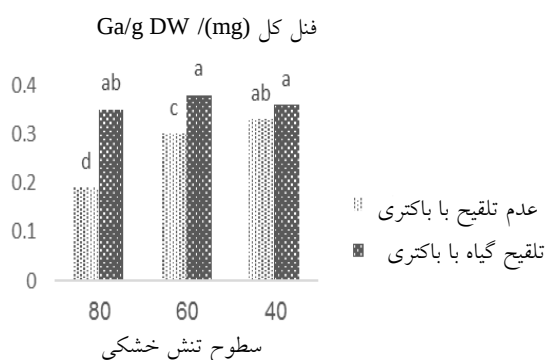
شکل ۱- اثر متقابل تنش خشکی و باکتری بر میزان فلاونوئید



شکل ۲- اثر متقابل تنش خشکی و اسید سالیسیلیک بر میزان فلاونوئید



شکل ۳- اثر متقابل باکتری و اسید سالیسیلیک بر میزان فلاونوئید



شکل ۴- اثر متقابل تنش خشکی و باکتری بر میزان فنل

با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۳) اثر متقابل دو گانه هر سه فاکتور بر میزان فلاونوئید در سطح یک درصد معنی‌دار شد. بیش‌ترین میزان فلاونوئید مربوط به اثر متقابل دو گانه تنش خشکی شدید (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) و باکتری به میزان ۳۸/۴۴ بود. کم‌ترین میزان فلاونوئید (۲۲/۶۸) در گیاه شاهد تحت تنش ملایم بود (شکل ۱). هم‌چنین در اثر متقابل دو گانه خشکی و اسید سالیسیلیک بیش‌ترین میزان مربوط به تیمار اسید سالیسیلیک یک میلی‌مولار و تنش خشکی در سطح ۴۰ درصد ظرفیت زراعی بود (شکل ۲). در بررسی اثر متقابل باکتری و اسید سالیسیلیک بیش‌ترین میزان مربوط به تلقیح گیاه توسط باکتری و اسید سالیسیلیک صفر میلی‌مولار بود (شکل ۳).

با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۳) برای میزان فنل کل اثر متقابل دو گانه تنش خشکی و باکتری، باکتری و اسید سالیسیلیک در سطح یک درصد و اسید سالیسیلیک و تنش خشکی در سطح پنج درصد معنی‌دار شد. بیش‌ترین میزان فنل (۰/۳۸۵) در ترکیب باکتری و اسید سالیسیلیک حاصل شد (شکل ۶) و کم‌ترین آن مربوط به تیمار شاهد به میزان ۰/۱۹ (شکل ۴) بود. هم‌چنین در بررسی ترکیب دو گانه تنش خشکی و اسید سالیسیلیک بیش‌ترین میزان فنل مربوط به تنش خشکی شدید (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) بدون اسید سالیسیلیک (آب-مقطر) بود (شکل ۵)، که بیانگر نقش بیشتر تنش خشکی در تولید فنل کل در گیاه است.

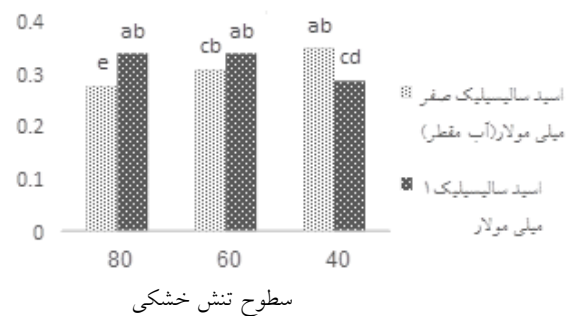
با توجه به نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۳) تنش خشکی اثر بسیار معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان آسکوربات پروکسیداز دارد. بیش‌ترین میزان فعالیت آن با میانگین ۰/۱۳۵ (واحد گرم بر وزن تر) مربوط به بالاترین سطح تنش (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) و کم‌ترین آن با میانگین ۰/۱۱۳ (واحد گرم بر وزن تر) در گیاه شاهد مشاهده شد (جدول ۴). اثرات اصلی باکتری و اسید سالیسیلیک و سایر اثرات متقابل بر روی این آنتی اکسیدان معنی‌دار نبود (جدول ۳).

(واحد گرم بر وزن تر) مربوط به بالاترین سطح تنش (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) و کمترین آن با میانگین ۰/۰۲۳ (واحد گرم بر وزن تر) در گیاه شاهد مشاهده شد (جدول ۴). اثرات اصلی باکتری و اسید سالیسیلیک و سایر اثرات متقابل بر روی این آنتی اکسیدان معنی دار نبود (جدول ۳).

تنش خشکی تاثیر معنی داری در سطح یک درصد بر میزان فعالیت آنزیم آنتی اکسیدان کاتالاز داشت (جدول ۳). بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در تنش شدید خشکی (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) با میانگین ۰/۲۷۴ (واحد گرم بر وزن تر) و کمترین میزان آن مربوط به گیاه شاهد در تنش ملایم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی) با میانگین ۰/۱۰۹ (واحد گرم بر وزن تر) بود. اثرات اصلی باکتری و اسید سالیسیلیک و سایر اثرات متقابل بر روی این آنزیم آنتی اکسیدان نیز معنی دار نبود (جدول ۳).

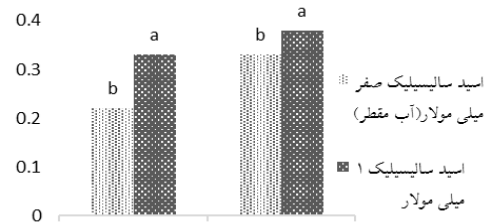
در میزان بیان ژن لیمونن ۳ هیدروکسیلاز اثر متقابل سه تیمار (تنش خشکی، باکتری و اسید سالیسیلیک) در سطح پنج درصد معنی دار بود (جدول ۳). بررسی میانگین اثرات اصلی (جدول ۴) بیانگر این است که با افزایش میزان تنش خشکی بیان ژن لیمونن ۳ هیدروکسیلاز افزایش می یابد. به صورتی که در تنش ۸۰، ۶۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی میزان بیان این آنزیم به ترتیب ۰/۹۴، ۲/۲۹ و ۳/۴۵ افزایش نشان داد.

فنل کل Ga/g DW /(mg)



شکل ۵- اثر متقابل تنش خشکی و اسید سالیسیلیک بر میزان فنل کل

فنل کل Ga/g DW /(mg)



شکل ۶- اثر متقابل باکتری و اسید سالیسیلیک بر میزان فنل کل

بر طبق جدول تجزیه واریانس (جدول شماره ۳) تنش خشکی اثر بسیار معنی داری بر میزان فعالیت آنزیم آنتی اکسیدان گایاکول پروکسیداز دارد. بیشترین میزان فعالیت آن با میانگین ۰/۰۴۰

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات اندازه گیری شده

منابع تغییرات	درجه آزادی	فلاونوئید	فنل کل	کاتالاز	گایاکول پروکسیداز	آسکوربات پروکسیداز	لیمونن هیدروکسیلاز
تنش خشکی	۲	۲۷۰/۵۰**	۰/۰۲۱**	۰/۰۸۵**	۰/۰۰۸۷**	۰/۰۰۱۶**	۱۸/۹۳۷**
باکتری	۱	۲۴۰/۵۰**	۰/۰۶۶**	۰/۰۰۰۴۲ ^{ns}	۰/۰۰۰۳۶ ^{ns}	۰/۰۰۰۵۶ ^{ns}	۵/۲۵۹**
سالیسیلیک اسید	۱	۳/۰۹*	۰/۰۰۸*	۰/۰۰۰۵۰ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۴۴ ^{ns}	۰/۰۰۰۶۴ ^{ns}	۰/۵۱۸*
خشکی*باکتری	۲	۳۸/۰۰۶**	۰/۰۱۱**	۰/۰۰۰۶۶ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۴۱ ^{ns}	۰/۰۰۰۵۹ ^{ns}	۰/۰۵۴۵**
خشکی*سالیسیلیک	۲	۴/۷۸**	۰/۰۰۵*	۰/۰۰۰۶۸ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۲۹ ^{ns}	۰/۰۰۰۶۲ ^{ns}	۰/۴۷۴**
باکتری*سالیسیلیک	۱	۷۶/۰۶**	۰/۰۵۱**	۰/۰۰۰۴۶ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۱۷ ^{ns}	۰/۰۰۰۵۹ ^{ns}	۳/۰۸۵**
خشکی*باکتری*سالیسیلیک	۲	۱/۹۵ ^{ns}	۰/۰۰۳ ^{ns}	۰/۰۰۰۶۳ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۱۲ ^{ns}	۰/۰۰۰۶۰ ^{ns}	۰/۳۵۴*
خطا		۲/۶۶	۰/۰۰۱۵	۰/۰۰۰۲۲	۰/۰۰۰۲۰	۰/۰۰۰۱۸	۰/۰۷۸
C.V%		۳/۴۱	۱۲/۲۴	۸/۲۹	۱۳/۹۷	۱۱/۰۵	۱۲/۶۱

ns، * و ** به ترتیب غیر معنی داری، معنی داری در سطح احتمال پنج و یک درصد

جدول ۴- میانگین‌های اثرات اصلی صفات اندازه‌گیری شده

فاکتور	فلاونوئید	فنل کل	کاتالاز	گایاکول پروکسیداز	آسکوربات پروکسیداز	لیمونن هیدروکسیلاز
a ₁	۲۴/۶۷ c	۰/۲۷۳ b	۰/۱۰۹ c	۰/۰۲۳ c	۰/۱۱۳ c	۰/۹۴ c
a ₂	۳۰/۰۸ b	۰/۳۳۸ a	۰/۱۶۰ b	۰/۰۳۲ b	۰/۱۱۷ b	۲/۲۹ b
a ₃	۳۳/۶۶ a	۰/۳۴۸ a	۰/۲۷۴ a	۰/۰۴۰ a	۰/۱۳۵ a	۳/۴۵ a
b ₁	۲۶/۹۴ b	۰/۲۸ b	۰/۱۸۴ a	۰/۰۳۳ a	۰/۱۲۶ a	۱/۸۴ b
b ₂	۳۲/۰۱ a	۰/۳۶۶ a	۰/۱۷۷ a	۰/۰۳۱ a	۰/۱۱۸ a	۲/۶ a
c ₁	۲۹/۱۱ b	۰/۳۰۷ b	۰/۱۸۵ a	۰/۰۳۲۱ a	۰/۱۲۶ a	۲/۱ b
c ₂	۲۹/۸۳ a	۰/۳۴۶ a	۰/۱۷۷ a	۰/۰۳۲۳ a	۰/۱۱۸ a	۲/۳۴ a

با توجه به جدول ۵ بیش‌ترین میزان (۴/۲۸) مربوط به اثر متقابل تنش شدید (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) و باکتری محرک رشد می‌باشد. کم‌ترین میزان (۰/۶۶) مربوط به گیاه شاهد در تنش ملایم (۸۰ درصد ظرفیت زراعی) بود. با توجه به مشاهدات این پژوهش با افزایش شدت تنش خشکی، میزان ترکیبات فنولی به عنوان متابولیت‌های ثانویه افزایش یافت، که به‌عنوان یک شاخص بالقوه برای دفاع آنتی اکسیدانی است (Cheruiyot et al. 2007). زمانی که گیاه در معرض تنش قرار می‌گیرد مقدار زیادی از گونه‌های فعال اکسیژن تولید می‌شود. در بسیاری از گیاهان، سیستم آنزیمی برای از بین بردن این رادیکال‌ها فعال می‌شوند (Jubany et al., 2010). پیش از آنکه سیستم آنزیمی وارد عمل شود، فلاونوئیدها دست به کار شده و به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی به‌طور مستقیم در پاک سازی گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌کند. خواص آنتی اکسیدانی فلاونوئیدها به اثر بازدارندگی آن‌ها در تنفس میتوکندریایی بر می‌شود (Sangtarash et al. 2009) و به‌طور غیر مستقیم به‌وسیله شلاته کردن آهن مانع تنش اکسیداتیو می‌شوند (Yang et al. 2003; Seyoum et al. 2001; al. 2006). در پژوهش حاضر افزایش میزان ترکیب‌های فنلی در تنش خشکی ارتباط مستقیم با ظرفیت آنتی اکسیدانی آن‌ها را نشان داد، که در گزارشات (Sangtarash et al. 2009) در گیاه شلغم (*Brassica rapa* L.) و گیاه *Cistus clusii* (2004) Hernandez et al. نیز نتایج مشابهی ارائه شده‌است. از آنجایی که ترکیبات فنولی (فنول کل و فلاونوئید) از طریق مسیر فنیل پروپانوئید ساخته می‌شود و آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز آنزیم

کلیدی این مسیر متابولیکی مهم است می‌توان تجمع این مواد را مربوط به القای این آنزیم توسط باکتری‌های محرک رشد (Maxwell et al. 1989; Petter and Verma 1990) و اسید سالیسیلیک (Solecka and Kacperska 2003; Sgarbi et al. 2003) دانست. تخمین زده شده که ۸۰ درصد باکتری‌های ایزوله شده از ریزوسفر قادر به تولید IAA هستند. مشخص شده‌است که بین فلاونوئید و هورمون اکسین برهمکنش‌هایی در جهت تشکیل گرهک وجود دارد، که می‌توان نتیجه گرفت باکتری محرک رشد منجر به افزایش فلاونوئیدها در گیاه می‌شوند (Maxwell et al. 1989; Petter and Verma 1990). Sang-Mo et al. (2014a) در تحقیق روی گیاه سویا (*Glycine max* L. تحت تیمار تنش خشکی و باکتری *Pseudomonas putida* دریافتند که کاربرد باکتری به واسطه تولید فیتوهورمون‌ها (IAA) می‌تواند باعث افزایش میزان فلاونوئید و افزایش مقاومت گیاه در شرایط تنش شود.

اسید سالیسیلیک به‌عنوان یک سیگنال دهنده ممکن است در تنظیم بیان ژن *PAL* (فنیل آلانین آمونیا لیاز) و بیوستز فنیل پروپانوئید نقش داشته باشد و سبب القاء این ژن شود، که موجب تجمع اسیدهای فنلی و فلاونوئید در گیاه می‌شود (Solecka and Kacperska 2003; Sgarbi et al. 2003). هم‌چنین افزایش ترکیبات فنولی و فلاونوئید تحت تیمار اسیدسالیسیلیک در گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) (Ding et al. 2002) و جعفری (*Petroselinum crispum* L.) (Thulke and Conrath 1998) گزارش شده‌است.

پراکسید هیدروژن به وسیله کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز سم زدایی می شود. کاتالاز آنتی اکسیدانی است که پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل می کند (Mittler et al. 2002).

طبق نتایج تحقیقات Kellos et al. (2008) بر روی ذرت (Zea mays) (Sairam et al. 1998) بر روی گندم (*Triticum aestivum*) (Manivannan et al. 2008) بر روی آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تنش خشکی به طرز معنی داری افزایش می یابد که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. آنچه که از نتایج این مطالعه مشخص است این نکته می باشد که باکتری و اسید سالیسیلیک تاثیر غیر معنی داری بر افزایش فعالیت های آنزیم های آنتی اکسیدانی داشته اند. کمتر بودن فعالیت آنزیم در تیمارهای حاوی باکتری نشان دهنده این است که باکتری گیاه را در شرایط مناسب تری قرار داده و آنزیم های آنتی-اکسیدانی کمتری تولید شده است که این نتایج با نتایج Sang-Mo al. (2014b) در گیاه خیار (*Cucumis sativus* L.) تحت تنش خشکی، و نتایج Heidari and Golpayegani (2012) در ریحان (*Ocimum basilicum* L.) تطابق کامل دارد. تاثیر سالیسیلیک اسید در تعدیل پاسخ گیاه و کاهش فعالیت آنزیم ها در محدوده وسیعی از تنش های اکسیداتیو گزارش شده است (Shirasu et al. 1997)؛ که با نتایج حاصل از این بررسی مطابقت دارد. کاهش فعالیت های آنتی اکسیدانی ممکن است نتیجه ای از غیر فعال شدن آنزیم، از طریق مولکولهای تاثیر گذار مرتبط با تنش باشد. از طرفی احتمال دارد که کاهش فعالیت این آنزیم ها به دلیل نیاز کمتر سلول ها برای متابولیسم آنتی اکسیداتیو پس از اعمال تیمار با اسید سالیسیلیک باشد. همچنین تغییرات القا شده در فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی به شدت و مدت تیمار و همچنین گونه و سن گیاه وابسته می باشد. ممکن است اسید سالیسیلیک به طور مستقیم در از بین بردن رادیکال های آزاد نقش داشته باشد و با پاک سازی این گونه های فعال، از افزایش فعالیت آنزیم جلوگیری کند. سالیسیلیک اسید در غلظت های یک میلی مولار و پایین تر به عنوان ترکیبات ضد تنشی باعث رفع اثرات ناشی از اکسیداتیو می شود (Mazaheri et al. 1387). همچنین با توجه به نتایج به دست آمده از صفات فیزیولوژیکی مبنی بر افزایش این صفات تحت تیمار باکتری و سالیسیلیک در تنش خشکی می توان نتیجه گرفت که

در شرایط تنش کمبود آب روزنه ها در گیاه بسته می شوند و متعاقب آن غلظت CO_2 در بافت مزوفیل کاهش می یابد و به دنبال این وضعیت واکنش های تاریکی فتوسنتز مختل شده و محصولات حاصل از واکنش های روشنایی، که شامل NADPH و ATP است، مصرف نمی شود. از این رو به علت عدم اکسید شدن مولکول NADPH، مصرف $NADP^+$ به منظور دریافت الکترون کاهش می یابد، بنابراین مولکول اکسیژن در مسیر زنجیره انتقال الکترون به عنوان پذیرنده جانشین الکترون عمل می کند و منجر به شکل گیری رادیکال سوپراکسید (O_2^-)، رادیکال پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و هیدروکسیل (OH^-) می شود. ROS به طور بالقوه دارای پتانسیلی است که با بسیاری از ترکیبات سلولی واکنش داده و سبب خسارت به غشا و سایر ماکرومولکول های ضروری می شود (Blokchina et al. 2002). آنزیم آسکوربات پروکسیداز نقش اساسی در متابولیسم کردن ترکیبات فعال اکسیژن و جلوگیری از خسارات ناشی از تنش اکسیداتیو را به عهده دارد. Hamrahi et al. (1387). فعالیت آنتی اکسیدانی آنزیم آسکوربات پروکسیداز با افزایش تنش اسمزی افزایش می یابد.

این نتایج توسط Sairam et al. (2002) در گیاه گندم (*Triticum aestivum* L.) و Blokchina et al. (2003) در گیاه بابونه (*Matricaria chamomilla* L.) گزارش شده است. آنزیم گایاکول پروکسیداز نیز تحت تنش، افزایش معنی داری را نشان داد. توزیع فضایی آنزیم هایی نظیر گایاکول سوپر اکسید در غشاها می تواند تا حدودی در برقراری مقاومت نسبت به خشکسالی مهم باشد (Bowler et al. 2002). آنزیم پراکسیداز در شکستن هیدروژن پراکسید نقش دارد و در دیواره سلولی، شبکه آندوپلاسمی، دستگاه گلژی و واکوئل یافت می شوند (Schloss et al. 1987). گایاکول به عنوان دهنده الکترون عمل می کند و از پراکسید هیدروژن برای اکسیداسیون انواع مختلف سوبستراهای آلی و غیر آلی استفاده می کند (Dinakar et al. 2009). افزایش فعالیت آنتی اکسیدان گایاکول پراکسیداز در اثر خشکی و یا درجه حرارت بالا توسط سایر محققین مانند Grace et al. (1998) در ماهونیا (*Mahonia repens* L.) و Jasinska et al. (2007) در نخود (*Cicer arietinum* L.) نیز گزارش شده است. همچنین با افزایش شدت تنش میزان آنزیم کاتالاز نیز افزایش می یابد. در موجودات زنده

صفات آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی توانسته‌اند به عنوان اولین سد دفاعی خسارات اکسیداتیو را کاهش و نیاز سلول را به منظور متابولیسم آنتی اکسیداتیوها کاهش دهد. کاهش میزان آنزیم‌های آنتی اکسیدانی به واسطه افزایش میزان فلاونوئید (Sangtarash et al. 2009) و پرولین (Trovato et al. 2008; Aktas et al. 2007) در گزارشات به اثبات رسیده است.

ژن لیمون ۳-هیدروکسیلاز، رمز کننده آنزیم لیمون هیدروکسیلاز بوده و وظیفه‌ی هیدروکسیله نمودن لیمون (قرار دادن OH در کربن شماره ۳) در مسیر تولید و سنتز مونوترپن‌ها در گیاه نعناع سبز (*Mentha spicata* L.) را بر عهده دارد که سبب تجزیه لیمون به طیف وسیعی از ساختارهای متابولیت ثانویه می‌شود (Croteau 1991 and Gershenzon 1994). تنش خشکی سبب افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاه می‌شود (Nowak et al. 2010). بر طبق فرضیه موازنه رشد-تمایز هر کمبودی که رشد را بیش از فتوسنتز محدود کند تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهد (Hermes and Mattson 1992). برخی از ژن‌ها در گیاه مسئول پاسخ به تنش خشکی می‌باشند، که سطح رونویسی آن‌ها در طی تنش خشکی افزایش یا کاهش می‌یابد، و محصولات این ژن‌ها در پاسخ به تنش خشکی درگیر هستند. این ژن‌ها به واسطه دریافت، انتقال سیگنال و فعال‌سازی فاکتورهای نسخه-برداری نقش ایفا می‌کنند و به این ترتیب محصول آن‌ها، پاسخ‌های دفاعی را در گیاه بر علیه تنش به دنبال خواهد داشت (Shinozaki 1999 and Yamaguchi-Shinozaki). بر طبق آزمایشات انجام شده در مورد اثر تنش خشکی بر بیان برخی ژن‌ها گزارش شده که تنش خشکی سبب افزایش میزان بیان ژن *LEA* (Late Embryogenesis Abundant)، در گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) شده که باعث افزایش مقاومت در برابر تنش خشکی شده- است (Ghareghani et al. 1390). افزایش متابولیت‌های ثانویه و اجزای اسانس در زمان تنش نشان دهنده نقش حفاظتی این ترکیبات به عنوان عوامل غیر آنتی اکسیدانی می‌باشد که در نتایج Charles et al. (1990) مبنی بر افزایش مقدار متون و کل سزکوئی ترپن‌ها در گیاه نعناع (*Mentha spicata* L.)، لینالول و کایکول در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*) (Simon et al. 1992) و میزان مونوترپن‌ها در گیاه جعفری (*Petroselinum crispum*)

(Mohamed et al. 2002) تحت تنش خشکی در یک راستا قرار دارد. اصطلاح مقاومت سیستمیک القایی^۱ برای باکتری‌های محرک رشد که باعث القا تغییرات فیزیکی و شیمیایی و افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های غیر زنده می‌شوند، پیشنهاد شده است (Yang et al. 2009). همان‌گونه که اشاره شد وجود IAA در یک باکتری بیانگر اثر بخشی مناسب جهت مقاومت در برابر تنش در گیاه می-باشد (Boiero et al. 2006). گزارشاتی مبنی بر افزایش میزان منتول در اسانس نعناع تحت تاثیر هورمون اکسین ارائه شده است (Singh and Mishra. 2001). همچنین مصرف IAA باعث افزایش لیمون در اسانس گیاه دارویی شوید (*Graveolens L.*) سالیسیلیک شد، نتایج این مطالعه همچنین نشان داد که اسید سالیسیلیک سبب افزایش رونویسی از ژن رمز کننده آنزیم لیمون هیدروکسیلاز می‌شود. در گزارش (Gao-Bin et al. 2009) مبنی بر بررسی اثر محلول پاشی اسید سالیسیلیک بر بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز آرتیمیسین در گیاه گندواش (*Artemisia annua* L.) مشخص شد که اسید سالیسیلیک به عنوان یک آنتی اکسیدان القاگر، میزان بیان ژن‌های *HMGR* و *ADS* را افزایش داده که در نتیجه غلظت آرتیمیسین و میزان متابولیت‌های ثانویه در گیاه افزایش یافته است.

باتوجه به مشاهدات این تحقیق باکتری و اسید سالیسیلیک با افزایش صفات غیر آنزیمی فنل کل و فلاونوئید و افزایش متابولیت‌های ثانویه به عنوان اولین سد دفاعی اثرات مخرب تنش خشکی را کاهش داده‌اند. در نتیجه گیاه مقاومت بهتری را از خود نشان داده است و انرژی کمتری را صرف تولیدهای آنزیم‌های آنتی اکسیدانی نموده است. مطالعات فراوانی بر روی باکتری‌ها خصوصاً سویه‌های 5033, FZB42, 5113 *Bacillus* *amyloliquefaciens* صورت گرفته است، همچنین پژوهش و تحقیق بر روی ریزجانداران و کاربرد آنان به خصوص باکتری‌ها در صنعت کشاورزی و اهمیت تجاری آن‌ها رو به افزایش است. در این تحقیق برای اولین بار سویه *Bacillus amyloliquefaciens* 1732 مورد مطالعه قرار گرفت و به عنوان عامل تاثیرگذار بر فرایند رشد گیاه در شرایط تنش گزارش شد. لذا پیشنهاد می‌شود از این سویه برای مطالعات بیشتر در سایر

¹ Induced systemic resistance

سویه‌های دیگر بر روی رشد گیاهان در محیط‌های کشت متفاوت مورد مطالعه و مقایسه قرار گیرد.

گیاهان و هم‌چنین دیگر تنش‌های محیطی استفاده شود. هم‌چنین پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی اثر این سویه‌ی باکتری با سایر

جدول ۵- اثرات متقابل تنش خشکی، باکتری و اسید سالیسیلیک بر میزان بیان ژن لیمونن هیدروکسیلاز

تلقیح باکتری b_2		عدم تلقیح باکتری b_1		سطوح خشکی
۱/۱۴e	c_1	۰/۶۶e	c_1	خشکی در سطح ۸۰ درصد ظرفیت زراعی
۱/۰۲e	c_2	۰/۹۳e	c_2	
۲/۹۲cd	c_1	۰/۹۶e	c_1	خشکی در سطح ۶۰ درصد ظرفیت زراعی
۲/۷۶d	c_2	۲/۵۱d	c_2	
۴/۲۸a	c_1	۲/۶۷d	c_1	خشکی در سطح ۴۰ درصد ظرفیت زراعی
۳/۵۲b	c_2	۳/۳۳cb	c_2	

تفاوت حروف در هر ستون به معنی وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد (b_1 تیمار گیاه عدم آلوده شده با باکتری، b_2 گیاه آلوده شده با باکتری، c_1 عدم محلول پاشی اسید سالیسیلیک، c_2 محلول پاشی اسید سالیسیلیک با غلظت یک میلی‌مولار).

منابع

- Aktas LY, B Turkyilmaz, H Akca and Parlak, S (2007). Role of abscisic acid and proline treatment on induction of antioxidant enzyme activities and drought tolerance responses of *Laurus nobilis* L. Grainlings. pp:14-27.
- Arfana M, Atharb HR, and Arfana M (2007). Does exogenous application of salicylic acid through the rooting medium modulate growth and photosynthetic capacity in two differently adapted spring wheat cultivars under salt stress. Journal of Plant Physiology, 164: 685-694.
- Beers R and Sizer T (1952). Spectrophotometric Method for Measuring the Breakdown of Hydrogenperoxide by Catalase. Journal of Biological Chemistry, 195: 133-138.
- Blokhina O, Virolainen E and Fagerstedt KV 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Annals of Botany, 91: 179-194.
- Blokhina O, Virolainen E, and Fagerstedt K 2002. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. Annual of Botany, 91: 179-194.
- Boiero L, Perrig D, Masciarelli O, Penna C, Cassan F and Luna V. (2006). Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum*, and possible physiological and technological implications. Applied Microbiology and Biotechnology, 74: 874- 880.
- Bowler C, Vanmotago M and Inze D (2002). Super oxide dismutase and stress tolerance, Annual Review of Plant physiology. 43: 83-116.
- Charles DJ, Joly RJ and Simon JE (1990). Effects of osmotic stress on the essential oil content and composition of peppermint. Phytochemistry, 29: 2837-2840.
- Chen L, Ren F, Zhong H, Jiang W, and Li X (2010). Identification and expression analysis of genes in

- response to high-salinity and drought stresses in *Brassica napus*. Biochimica Biophysica Acta 42: 154-164.
- Cheruiyot EK, Mumera LM, Ngetich WK, Hassanali A, Wachira F (2007). Polyphenols as potential indicators for osmotic tolerance in tea (*Camellia sinensis* L.). Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 71: 2190-2197.
- Croteau R 1991. Metabolism of monoterpenes in mint (*Mentha species* L.). Planta Physiology and Chemistry of Natural Products. 57: 10-14
- Croteau R, Gershenzon J (1994). Genetic control of monoterpene biosynthesis in mints (*Mentha amiaaceae* L.). Recent Advances in Phytochemistry. 28: 193-229.
- Debaeke P, and Abdellah A 2004. Adaptation of crop management to water limited environments. European Journal of Agronomy. 21: 433-446.
- Dinakar N, PC Nagajyothi, and S Suresh 2009. Cadmium induced changes on proline, antioxidant enzymes, nitrate and nitrite reductases in (*Arachis hypogaeae* L.). Journal of Environmental Biology, 30: 289-294.
- Ding CK, Wang CY, and Gross KC (2002). Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. Planta. 214: 895-901.
- Gao-Bin Pu, Dong-Ming Ma, Jian-Lin Chen, Lan-Qing Ma, Hong Wang, Guo-Feng Li, He-Chun Ye, Ben-Ye Liu 2009. Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. Plant Cell Reports, 28: 1127-1135.
- Grace SC, Logan BA and Adams WW (1998). Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a

- phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens*. Plant, Cell and Environment, 21: 513-521.
- Gupta A, and Kaur N (2005). Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. Journal Biotechnology Science. 30: 761-776.
- Hamrahi S, Habibi D, Madani H, Bojar M (2008). The effect of Cycocel on antioxidant enzymes micronutrients as indices of drought stress resistance in *Brassica napus* L. Journal of New Findings in Agriculture, 2:3.(In Farsi).
- Heidari M and Golpayegani A (2012). Effects of water stress and inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on antioxidant status and photosynthetic pigments in basil (*Ocimum basilicum* L.). Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 11: 57-61.
- Hermes DA and Mattson WJ (1992). The dilemma of plants: To grow or defend. The Quarterly Review of Biology, 67:283- 325.
- Hernandez I, Alegre L and Munné-Bosch S (2004). Drought-induced changes in flavonoids and other low molecular weight antioxidants in *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. Tree Physiology, 24: 1303-1311.
- Hung B (2000). Role of root morphological and physiological characteristics in drought resistance of plant. Plant Environmental Interaction.39-36.
- Jasinska pp and Anderson Jw (2007). Light-dependent reduction of hydrogen peroxide by ruptured pea chloroplasts. Plant Physiology.69:1407-1413.
- Jubany-Mari T, Munné-Bosch S, Alegre L (2010). Redox regulation of water stress responses in field-grown plants. Role of hydrogen peroxide and ascorbate. Plant Physiology and Biochemistry,48: 351-358.
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, and Shinozaki K (1999). Improving plant drought,salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. Nature Biotechnology 17: 287-291.
- Kim DS, Weller DM and Cook J (1997). Population Dynamics of *Bacillus* sp. L324-92R12 and *Pseudomonas fluorescens* 2-79RN10 in the Rhizosphere of Wheat. The American Phytopathological Society, 87: 559-564.
- Lewis, K. 1998. Peppermint and spearmint, theoxford review: 1-6.
- Liu F, Xing Sh, Ma H, Du Z, Ma B (2013). Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 9155-9164.
- Lynch JM (1990). Microbial metabolites. IN:Lynch JM. (Ed.), The Rhizosphere Wiley, Chichester, 177-206.
- Manivannan P, CA Jaleel, CX Zhao R Somasundaram M M Azooz and R. Panneerselvam. (2008). Variations in growth and pigment composition of sunflower varieties under early season drought stress. Global Journal of Molecular Sciences, 3: 50-56.
- Maxwell, CA Hartwig, UA Joseph, CM Phillips, DA (1989). Chalcone and two related flavonoids from alfalfa roots induce nog genes of *Rhizobium meliloti*. Plant Physiology, 91: 842-847.
- Mazaheri M, Kalantari KH, Hassibi N (2008). Study the interaction of ethylene and salicylic acid on induction of oxidative stress and mechanisms of resistance in canola plants (*Brassica napus* L.). Iranian journal of biology, 21:421-431. (In Farsi).
- McCartny HA, Foster SJ, Fraaije BA and Ward E (2003). Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. Pest Management Science, 59: 129- 142.
- Meth welly A Finkemeire I, Georgi M and Dietz KJ (2003). Salicylic acid alleviates the Cadmium toxicity in Barley seedlings. Plant physiology, 132:281-327.
- Mittler R 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science. 7:405-410.
- Mohamed A-HM, Harris PJ, Henderson C and Senatore, F. (2002). Effect of Drought Stress on the Yield and Composition of Volatile Oils of Drought-Tolerant and Non-Drought-Tolerant Clones of *Tagetes minuta*. *Planta Medica*, 68: 472- 474.
- Moradi A, Sharifi M, Mousavi A (2010). Study on gene expression of Hydroxylase (*H6H*) and putrescine N-methyl transferase (PMT) isozymes under different concentrations of salicylic acid in hairy roots and different organs of *Atropa belladonna* L. Journal of Biology 24:366-372. (In Farsi).
- Nakano Y and Asada K (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology, 22:867-880.
- Nezami S, Nemati H, Arayyio H, Bagheri A (2012). Reaction of Genous Mint to water deficiency stress under controlled conditions. Water and Soil Journal (Agricultural Science and Technology). 26: 1053-1061. (In Farsi).
- Nowak, A Martin Corina E. Tarnita and Edward O. Wilson. 2010. The evolution of eusociality. international weekly journal of science, 466:1057-1062.
- Petter NK Varma DPS (1990). Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interaction. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal, 3: 4-8.
- Popova, Pancheva T, Uzunova A (1997). Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiological role. Bulgarian Journal of Plant Physiology, 23: 85-93.
- Qareqanipour N, Khodambashi M, Shiran B, Mplaei A (1390). *LEA* gene expression in genotypes of beans (*Phaseolus vulgaris* L) under water deficiency stress on growth and productive phases. Modern Genetics. 7:223-240.
- Raskin I (1992). Role of salicylic acid in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 43: 463-739.
- Raupach GS, and Kloepper JW (1998). Mixtures of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Biological Control of Multiple Cucumber Pathogens. The American Phytopathological Society, 88: 1158-1164.
- Sairam RK, Rao KV and Srivastava GC, (2002). Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant

- activity and osmolyte concentration. *Plant Science*, 163: 1037-1046.
- Sairam RK, PS Deshmukh and DC Saxena (1998). Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biologia Plantarum*, 41: 387-394.
- Sang-Mo K, Ramalingam R, Abdul L Kh, Min-Ji Kim a, Jae-Man Park a, Bo-Ra Kim a, Dong-Hyun Shin a, In-Jung Lee. (2014). Gibberellin secreting rhizobacterium, *Pseudomonas putida* H-2-3 modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the plant growth under saline and drought conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 84:115-124.
- Sang-Mo K, Abdul L, Kh, MuhammadW, Young-Hyun Y, Jin-Ho, Jong-Guk K, Muhammad H and In-Jung Leea. (2014). Plant growth-promoting rhizobacteria reduce adverse effects of salinity and osmotic stress by regulating phytohormones and antioxidants in *Cucumis sativus*. *Journal of Plant Interactions*, 9: 673-682.
- Sangtarash MH, Qaderi MM, Chinnappa CC and Reid DM (2009). Carotenoid differential sensitivity of canola (*Brassica napus*) seedlings to ultraviolet-B radiation, water stress and abscisic acid. *Environmental and Experimental Botany*, 66: 212-219.
- Sayyaria M, Babalare M, Kalantar S, Serranoc M, Valerod D (2009). Effect of salicylic acid treatment on reducing chilling injury in stored pomegranates. *Postharvest Biology and Technology*, 53: 152-154.
- Schloss P, Walter C, and Mader M (1987). Basic peroxidases in isolated vacuoles of (*Nicotiana tabacum* L.). *Planta*, 170: 225-229.
- Seyoum A, Asres K and El-Fiky FK 2006. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67: 2058-2070.
- Sgarbi E, Fornasiero RB, Lins AP, Bonatti PM (2003). Phenol metabolism is differentially affected by ozone in two cell lines from grape (*Vitis vinifera* L.) leaf *Plant Science Journal*, 165: 951-957.
- Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K 1999. Molecular responses to cold, drought, heat, and salt stress in higher plant. *Landes Company*, 170 pp.
- Shirasu K, Nakajima H, Rajashekar K, Dixon RA and Lamb C (1997). Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signal in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell*, 9: 261-270.
- Simon JE, Bubenheim RD, Joly RJ and Chares DJ (1992). Water stress induced alteration in essential oil content and composition of sweet basil. *Journal of Essential Oil Research*, 4: 71- 75.
- Singh P, Mishra A (2001). Influence of gibberellins and ethereal on growth, chlorophyll content, protein, enzyme activities and essential monoterpene oil inefficient genotype *Menthaspicata* var. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, 22: 283-286.
- Soland SF, Laima SK (1999). Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. *Plant Agriculture* 1: 1-5
- Solecka D, Kacperska A (2003). Phenylpropanoid deficiency affects the course of plant acclimation to cold. *Physiol. Plantarum*, 119: 253-262.
- Tahsili J, Sharifi M, Behmanesh B, Pourbozorgi Rudsari N Ziaei M (2010). Gene expression of eugenol O- methyl transferase and components of essential oils in (*Ocimum basilicum* L.) at different stages of Growth. *Journal of Biology*, 23: 25-18.
- Thulke O, Conrath U (1998). Salicylic acid has a dual role in the activation of defence-related genes in parsley. *The Plant Journal*, 14: 35-42.
- Timmusk S and Wagner EGH (1999). The plant growthpromoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 12:951-959.
- Toor RK and Savage GP (2005). Antioxidant activity in different fractions of tomatoes. *Food Research International*, 38: 487-494.
- Trovato M, R Mattioli and P Costantino (2008). Multiple roles of praline in plant stress tolerance and development. *Rendiconti Lincei*, 19: 325-346.
- Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255: 571-586.
- Yang B, Kotani A, Aria K and Kusu F (2001). Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials. *Analytical Sciences*, 17: 599-604.
- Yang J, Kloepper JW and Ryu CM (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 14:1-4.
- Yang M, Yang Q, Fu T, and Zhou Y (2011). Overexpression of *Brassica napus* BnLAS gene in *Arabidopsis* affects plant development and increases drought tolerance. *Plant Cell Reports* 30: 373-388.