اثر سیتوکینین و براسینواستروییید بر برخی خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ارقام گندم تحت تنش خشکی در مرحله زایشی

محمدرضا سرافراز اردکانی*

استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران.

* نویسنده مسئول: sarafraz.ardakani@yazd.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۱۹

چکیده

به منظور بررسی و مقایسه اثر کاربرد خارجی تیمارهای هورمونی بر برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی و وزن هزار دانه در سه رقم گندم متفاوت از لحاظ درجه تحمل به دوره کم‌آبی شامل پیشتاز (متحمل)، سبلان (نیمه متحمل) و گاسپارد (حساس) تحت تنش خشکی طی شروع مرحله آبستنی، طرح گلدانی در قالب فاکتوریل با چهار تکرار در دانشگاه یزد در سال ۱۳۹۵ انجام گردید. تیمارها شامل فاکتور رقم در سه سطح، تنش خشکی در دو سطح (ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ یا کنترل و ۵۰٪ یا تنش خشکی) و کاربرد هورمون‌ها در چهار سطح بدون هورمون، کینتین (غلظت ۱۰۰ میکرومولار)، ۲۴- اپی‌براسینولید (۱ میکرومولار) و برهمکنش آن‌ها بود. تمام آنالیزها بر روی برگ پرچم انجام شد. بروز خشکی منجر به بیشترین کاهش معنی‌دار محتوای کلروفیل a، b، a+b، نسبت کلروفیل a/b، کاروتنوئید، پروتئین و وزن هزار دانه در رقم حساس (گاسپارد) گردید. بیشترین افزایش معنی‌دار سطح آبسیزیک اسید، قندهای محلول، پرولین و نسبت قندهای محلول به نشاسته در رقم متحمل مشاهده شد. در بین تیمارهای هورمونی، ۲۴- اپی‌براسینولید باعث بیشترین افزایش معنی‌دار سطح آبسیزیک اسید درونی و نسبت قندهای محلول به نشاسته داشت و برهمکنش کینتین و ۲۴- اپی‌براسینولید بیشترین افزایش در مقدار رنگیزه‌ها، پرولین و پروتئین و نیز وزن هزار دانه طی بروز خشکی به‌ویژه در رقم متحمل (پیشتاز) داشت. نتایج این تحقیق نشان داد که اثر تیمارهای هورمونی بر شاخص‌های بیوشیمیایی بیشتر از اثر آن‌ها بر وزن هزار دانه بوده است. در مجموع، تیمار برهمکنش کینتین و ۲۴- اپی‌براسینولید نسبت به تیمارهای انفرادی هورمون‌ها اثر بیشتری بر شاخص‌های بیوشیمیایی و وزن هزار دانه داشته است. رقم پیشتاز (متحمل) منفعت بیشتری از تیمارهای هورمونی در جهت تحمل بهتر دوره کم‌آبی برده است.

واژه‌های کلیدی: آبسیزیک اسید، ۲۴- اپی‌براسینولید، برگ پرچم و کینتین.

[Downloaded from cpj.ahvaz.iau.ir on 2024-12-29]

[DOR: 20.1001.1.20084403.1398.11.43.1.0]

مقدمه

گندم (*Triticum aestivum* L.) یکی از مهمترین منابع غذایی جهان است. با این حال این محصول مهم اقتصادی همواره تحت اثر تنش‌های محیطی نظیر خشکی قرار دارد، به خصوص اینکه این تنش به صورت انفرادی و برهمکنش با سایر تنش‌های محیطی نظیر شوری، گرما و سرما باعث افت شدید عملکرد می‌شود. افت شدید عملکرد ناشی از کاهش سنتز کربوهیدرات و خسارت به رنگیزه‌ها (به علت تولید تولید گونه‌های فعال اکسیژن، واسرشتگی پروتئین، تخریب ساختارهای غشایی و غیرفعال شدن آنزیم‌ها) است که باعث کاهش فتوسنتز می‌گردد (Zhao *et al*., 2017). بدیهی است که کمبود آب در مرحله زایشی یک گیاه (در غلات در مرحله سنبله رفتن) مهمترین تهدید برای ازدیاد محصول به حساب می‌آید (Farooq *et al*., 2014). کاربرد تیمارهای خارجی تنظیم کننده‌های رشد با تاثیری که بر همتاهای درونی خود در گیاه، سیستم آنتی‌اکسیدانی و روابط منبع و مخزن می‌گذارند، به عنوان یک راه حل برای کاهش آثار تنش‌های محیطی در سطوح مولکولی، سلولی، بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و محصول‌دهی تلقی می‌شوند. به خصوص هورمون‌های گیاهی با دخالت در مسیرهای ترارسانی علامت، عملکرد آنی از خود به جای می‌گذارند (Kaya *et al*., 2018). سیتوکینین‌ها بر روی جنبه‌های تکوینی گیاهان مانند بزرگ شدن و تقسیم سلول موثر هستند، با این حال این هورمون‌ها با به راه انداختن یک شبکه پیچیده سیگنالینگ در پاسخ به تنش‌های محیطی نیز موثر می باشند (Verma *et al*., 2016). بسته به شدت، مدت و نوع تنش و نیز نوع اندام و گونه‌های گیاهی، کاهش یا افزایش مقدار سیتوکینین‌های درونی در هنگام بروز تنش غیر زیستی از جمله تنش خشکی مشاهده می‌شود که این تغییر محتوای درونی در انواع ایزوفرم‌های این هورمون نیز متفاوت است. با این حال افزایش مقدار درونی این هورمون با استفاده از دست‌کاری‌های ژنتیکی و کاربرد خارجی این هورمون باعث افزایش تحمل گیاهان مختلف طی بروز تنش‌های محیطی شده است (Veselov *et al*., 2017). به طور نمونه افزایش نرخ فتوسنتز و عملکرد دانه از طریق تنظیم محتوای کلروفیل، افزایش تولید کربوهیدرات و تنظیم اسمزی در دو رقم گندم متحمل (پیشگام) و حساس (MV-17) طی کاربرد خارجی غلظت ۱۵۰ میکرومولار کینتین (اسپری کردن) در مرحله بروز خشکی در شرایط مزرعه طی مرحله پر شدن دانه مشاهده شده است (Sarafraz-Ardakani *et al*., 2014). در بررسی انجام گرفته، اسپری یک بار در هفته (به مدت سه هفته) ۶-بنزیل آمینو پورین (BAP) بر روی برگ‌های گیاه ذرت (*Zea mays* L.) باعث کاهش آثار تنش خشکی (به‌ویژه در ظرفیت زراعی ۵۰٪ نسبت به شرایط آبیاری کامل) به‌خصوص بهبود شاخص‌های رشد و محتوای کلروفیل در شرایط گلخانه شده است (Ali *et al*., 2011). براسینواستروییدها به عنوان آنالوگ ساختاری هورمون‌های استرولی جانوری در گیاهان مدنظر می‌باشند (Tang *et al*., 2016). این گروه از هورمون‌ها بسیاری از شبکه‌های متابولیسمی پیچیده در تکوین، رشد رویشی و تمایززدایی در گیاهان

[Downloaded from cpj.ahvaz.iau.ir on 2024-12-29]

[DOR: 20.1001.1.2008403.1398.11.43.1.0]

را کنترل می کنند. همچنین براسینواستروییدها برای حفاظت گیاهان در برابر تنش گرمایی، خشکی، شوری و اکسیداتیو از اهمیت بالایی برخوردار هستند (Pociecha *et al*., 2016). مطالعات اثر براسینواستروییدها بر روی غلات تحت تنش خشکی محدود بوده است (Anjume *et al*., 2011). به عنوان نمونه اثر کاربرد خارجی دو ایزوفرم ۲۴ـ اپی‌براسینولید و ۲۸ـ هموبراسینولید (با غلظت ۰/۰۱ میکرومولار) بر یک رقم برنج (*Oryza sativa* L.) تحت تنش خشکی در مرحله رویشی (ظرفیت زراعی ۵۰٪) در گلدان در هر دو حالت خیساندن بذرها[1] و اسپری (بر روی گیاهچه‌های ۵ برگی) باعث افزایش سنتز کربوهیدرات، بهبود پتانسیل آبی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد (Farooq *et al*., 2009). در مطالعه دیگری کاربرد خارجی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر براسینولید بر یک رقم ذرت تحت تنش خشکی در گلدان باعث بهبود کارایی مصرف آب، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ارتفاع گیاه و شاخص عملکرد دانه در مراحل رویشی و زایشی گردید (Anjume *et al*., 2011). همچنین در تحقیق دیگری بر روی غلات، اسپری ۲۴ـ اپی‌براسینولید با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر بر دانه‌رست‌های گندم در شرایط هیدروپونیک باعث افزایش بهبود مقدار کلروفیل، عملکرد آنزیم‌های روبیسکو و آنتی‌اکسیدان تحت تنش‌های انفرادی و توام خشکی (القا شده با پلی‌اتیلن گلیکول ۲۰۰۰، ۶ درصد وزنی/حجمی)[2] و گرما (دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد) شده است (Zhao *et al*., 2017). Talaat و همکاران (۲۰۱۵) افزایش تعداد دانه در واحد گیاه و عملکرد دانه در گیاه ذرت را طی کاربرد خارجی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر (اسپری هورمون) تحت تنش خشکی در شرایط مزرعه گزارش کردند. همچنین کاربرد خارجی این هورمون بر گیاهانی به غیر از غلات، نیز حاکی از بهبود آثار تحمل تنش در این گیاهان بوده است. صادقی‌پور و بنکدار هاشمی (۱۳۹۴) نشان دادند که کاربرد خارجی ۲۴ـ اپی‌براسینولید به‌ویژه به صورت اسپری (در مقابل خیساندن بذور) و در غلظت‌های پایین (۲ میکرومولار در مقایسه با ۴ میکرومولار) بر لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata* L. Walp) در شرایط مزرعه‌ای باعث افزایش ارتفاع بوته، محتوای آب نسبی و عملکرد در هر دو حالت بروز تنش خشکی و بدون تنش گردید. در بررسی دیگر، خیساندن بذرهای ترب (*Raphanus Sativus* L.) در محلول‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میکرومولار ۲۴ـ اپی براسینولید و ۲۸-هموبراسینولید باعث افزایش مقدار پرولین، پروتئین محلول کل و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و در نتیجه افزایش توان رویشی دانه‌رست‌های تحت اثر تنش خشکی اعمال شده به وسیله پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ (۱۵ درصد وزنی/حجمی)[3] گردید که در تیمار ۱ میکرومولار برای هر دو ایزوفرم مشهودتر بود (Mahesh *et al*., 2013). براسینواستروییدها و سیتوکینین‌ها برهمکنش نزدیکی با یکدیگر دارند. براسینواستروییدها با القای فعالیت آنزیم سیتوکینین گلوکوزیداز و کاهش بیان ژن سیتوکینین اکسیداز باعث افزایش سطح سیتوکینین درونی

1- Soaking

2- Polyethylene glycol (PEG) 6000 6% W/V

3- Polyethylene glycol (PEG) 6000 15% W/V

[Downloaded from cpj.ahvaz.iau.ir on 2024-12-29]

[DOR: 20.1001.1.2008403.1398.11.43.1.0]

می‌شوند. در این بین غلظت براسینواسترویید در این برهمکنش تعیین کننده است، زیرا برخی گزارشات نشان از اثر کمتر غلظت‌های بالای براسینواسترویدها در افزایش سطح درونی سیتوکینین‌ها و حتی عملکرد آن‌ها نظیر تحریک تقسیم سلولی داشته است (Tanveer *et al*., 2019). با این حال ارتباط چلیپایی این هورمون با سیتوکینین‌ها به‌ویژه در مواجهه با تنش‌ها به صورت یک مسئله مجهول باقی مانده است (Bajguz and Piotrowska-Niczyporuk, 2014). علی‌رغم افزایش براسینواستروییدها در مواجهه با تنش‌ها و اثر افزایشی این هورمون بر سطح آبسیزیک اسید درونی (Yuan *et al*., 2010)، سطح اغلب ایزوفرم‌های سیتوکینین کاهش می‌یابد که می‌تواند ناشی از تاثیر آبسیزیک اسید افزیش یافته در کاهش سطح سیتوکینین ها باشد (Sarafraz-Ardakani *et al*., 2014). با این‌حال نتایج Ogweno و همکاران (۲۰۱۰) نشان داده است که برهمکنش بین براسینواستروییدـ آبسیزیک اسید و سیتوکینین‌ها در تهیج دستگاه آنتی‌اکسیدانی و نرخ فتوسنتز در برگ‌های جدا شده گوجه فرنگی بسیار موثر بوده است. در بررسی اخیر انجام شده بر روی تاثیر انفرادی و برهمکنش تیمارهای سیتوکینین (کینتین ۱۰۰ میکرمولار) و ۲۴ـ اپی براسینولید (۱ میکرومولار)، بهبود پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی در ارقام مختلف گندم طی بروز خشکی در مرحله پر شدن دانه را در پی داشت (سرافراز اردکانی، ۱۳۹۸). بنابراین با توجه به برخی رفتارهای مشابه این دو هورمون به‌ویژه در مواجهه با تنش‌های غیر زیستی مانند خشکی علی‌رغم برخی کارکردهای مخالف یکدیگر، اثر تیمارهای خارجی انفرادی و برهمکنش این دو هورمون بر محتوای آبسیزیک اسید، رنگیزه‌ها، پروتئین، پرولین، مقدار قندهای محلول کل و نشاسته برگ پرچم در سه رقم گندم متحمل (پیشتاز)، نیمه متحمل (سبلان) و حساس (گاسپارد) بررسی و مقایسه شدند.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در قالب یک طرح پژوهشی در مهر ماه سال ۱۳۹۵ در گروه زیست‌شناسی دانشگاه یزد شروع شد و آنالیز نتایج تا اوایل فروردین ماه سال ۱۳۹۶ به طول انجامید. آزمایش در قالب فاکتوریل و بر پایه طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار در گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ۲۰ سانتیمتر و ارتفاع ۲۵ سانتیمتر، حاوی ۳ کیلوگرم خاک شامل ترکیبی از خاک مزرعه و خاک‌برگ با نسبت ۴ به ۱ انجام شد.

جدول ۱: مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در آزمایش

بافت خاک	رس (درصد)	سیلت (درصد)	شن (درصد)	نیتروژن (میلی‌گرم بر لیتر)	پتاسیم (میلی‌گرم بر لیتر)	فسفر (میلی‌گرم بر لیتر)	کربن آلی (درصد)	هدایت الکتریکی (دسی‌زیمنس بر متر)	اسیدیته
رس ـ شن	۲۹/۴	۴۱/۱	۱۹/۶	۳۵۲/۰۷	۴۶۳/۲۴	۱۷/۰۶	۱/۱۹	۱/۲۳	۷/۴۴

[Downloaded from cpj.ahvaz.iau.ir on 2024-12-29]

[DOR: 20.1001.1.2008403.1398.11.43.1.0]

تیمارهای اعمال شده شامل ظرفیت‌های زراعی ۱۰۰٪ و ۵۰٪ (تنش خشکی) بودند. برای اعمال تنش خشکی (ظرفیت زراعی ۵۰٪)، از روش وزن کردن گلدان‌ها استفاده گردید. ابتدا یکی از گلدان‌ها که از خاک مورد آزمایش پر شده بود، توزین شد. سپس گلدان از آب اشباع گردید که البته برای جلوگیری از تبخیر آب، سطح گلدان به‌وسیله فویل آلومینیومی به طور کامل پوشانده شد، با خروج آب ثقلی وزن گلدان کاهش یافت تا اینکه وزن آن ثابت گردید. تفاضل وزن خاک مرطوب و خشک نشان دهنده وزن آب موجود در گلدان در حد ظرفیت زراعی است، بنابراین قبل از آبیاری هر گلدان، گلدان مد نظر توزین شد و وضعیت آب موجود در خاک گلدان در مقایسه با ظرفیت زراعی تعیین گردید (رابطه ۱) و متناسب با تیمار مربوطه (۵۰٪ ظرفیت زراعی)، مقدار آب لازم به آن اضافه شد. برای اعمال تنش، گلدان‌ها روزانه وزن شدند و مقدار آب لازم برای رسیدن به ظرفیت زراعی مدنظر به آن‌ها اضافه گردید (عیسوند و شرفی، ۱۳۹۵):

رابطه ۱:

$$\text{وضعیت آب گلدان نسبت به ظرفیت زراعی} = \frac{\text{میزان آب موجود در گلدان قبل از آبیاری (گرم)} \times ۱۰۰}{\text{میزان آب موجود در گلدان در حد ظرفیت زراعی (گرم)}}$$

در مرحله کاشت گیاه، بذرهای ۳ رقم گندم شامل گاسپارد (رقم حساس)، سبلان (رقم نیمه‌متحمل) و پیشتاز (رقم متحمل) از موسسه پاکان بذر اصفهان تهیه و به تعداد ۸ الی ۱۰ عدد در هر گلدان کاشته و بلافاصله آبیاری گردیدند. قبل از مرحله تشکیل سنبله و به‌وسیله تنک کردن، تعداد گیاهان در هر گلدان به ۵ عدد تقلیل یافت. دو هفته بعد از شروع آبستنی (تشکیل سنبله) در حالی که رطوبت گلدان‌های تیمار شاهد در محدوده ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ نگه داشته شدند، تیمارهای خشکی شامل ۵۰ درصد ظرفیت زراعی برای برخی از گلدان‌ها اعمال شد. در این مدت هر روز گلدان ها توزین شدند و مقدار آب مورد نیاز به هر گلدان اضافه گردید. در هر دو گروه و از ابتدای هفته اول بعد از شروع آبستنی، اعمال تیمار سیتوکینین (خریداری شده از شرکت سیگما که از اتانول به عنوان حلال آن استفاده شد) و سپس (ابتدای هفته سوم بعد از شروع آبستنی) براسینواستروئید (خریداری شده از شرکت سیگما که از اتانول به عنوان حلال آن استفاده شد) به صورت اسپری محلول هورمونی (۱۰۰ میکرومولار کینتین و ۱ میکرومولار ۲۴ـ اپی‌براسینواستروئید) بر روی اندام هوایی انجام گرفت. در این آزمایش از توئین ۲۰ (۰/۰۵ درصد) به عنوان سورفکتانت استفاده شد. جهت اعمال تیمار شاهد (تیمار بدون هورمون) از آب مقطر دوبار تقطیر استفاده گردید. مدت اعمال تیمار ۴ هفته به طول انجامید. جهت نمونه‌برداری، برگ‌های پرچم در هر تکرار بریده و بلافاصله در فویل‌های آلومینیومی پیچیده شدند و به دمای ۸۰- درجه سانتیگراد منتقل گردیدند (سرافراز اردکانی، ۱۳۹۸).

[Downloaded from cpj.ahvaz.iau.ir on 2024-12-29]

[DOR: 20.1001.1.20084403.1398.11.43.1.0]

مقدار رنگیزه ها با استفاده از روش Lichtenthaler سنجیده شد. مقدار ۰/۵ گرم (W) از بافت برگ پرچم با ۵ میلی لیتر آب مقطر ساییده شد و سپس حجم عصاره به ۲۵ میلی لیتر (V) رسید. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره با ۴/۵ میلی-لیتر استون ۸۰ درصد مخلوط گردید و در ۱۰ دقیقه در g ×۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس محلول رویی جدا گردید و میزان جذب نوری (A) نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ جهت تعیین مقدار کلروفیل a، b و ۴۷۵ نانومتر جهت تعیین مقدار کاروتنویید اندازه‌گیری شد. مقادیر کلروفیل و کاروتنویید با استفاده از رابطه‌های ۲، ۳، ۴ و ۵ تعیین شدند (Lichtenthaler, 1987):

رابطه ۲: $$\text{Chlorophyll a} = (12.7A663 - 2.69A645)\ V/1000W$$

رابطه ۳: $$\text{Chlorophyll b} = (22.9A645 - 4.68A663)\ V/1000W$$

رابطه ۴: $$\text{Chlorophyll T} = \text{Chlorophyll a} + \text{Chlorophyll b}$$

رابطه ۵: $$\text{Carotenoids}_{X+c} = 1000\ (A470) - 1.8\ (\text{mg chl.a}) - 85.02\ (\text{mg chl.b})\ /198$$

کربوهیدرات‌های محلول کل و نشاسته با روش فنل ـ اسید سولفوریک سنجیده شدند (Dubois *et al*., 1956). استخراج قندهای محلول کل با استفاده از اضافه شدن ۱/۵ میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد به ۰/۰۳ گرم از نمونه‌های خشک شده و سانتریفوژ نمونه ها در g ×۳۰۰۰ انجام شد. سپس به ۲ میلی لیتر از روشناورها مقدار ۰/۵ میلی لیتر فنل ۵ درصد و ۲/۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد اضافه شد و مقدار جذب در طول موج ۴۸۵ نانومتر قرائت گردید. استخراج نشاسته با استفاده از پرکلریک اسید ۵۲ درصد صورت گرفت. جهت تعیین مقدار نشاسته به ۱ میلی لیتر از عصاره به‌دست آمده مجدداً ۰/۵ میلی لیتر فنل ۵ درصد و ۲/۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد اضافه گردید و جذب نمونه ها در ۴۸۵ نانومتر قرائت گردید. مقادیر قندهای محلول کل و نشاسته با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز برآورد شد.

برای اندازه گیری پرولین مقدار ۰/۰۳ گرم برگ پرچم در ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالسیلیک ۳ درصد ساییده شد و مخلوط حاصل توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۲ صاف گردید. ۲ میلی‌لیتر از عصاره با ۲ میلی‌لیتر معرف نین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال مخلوط شد و به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس نمونه ها به ظرف یخ منتقل شدند. پس از اضافه کردن ۴ میلی‌لیتر تولوئن به نمونه‌ها و مخلوط شدن آن‌ها و ظهور رنگ صورتی در قسمت فوقانی، جذب قسمت رویی عصاره در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد. مقدار پرولین با استفاده از منحنی استاندارد پرولین خالص برآورد شد (Bates *et al*., 1973). به منظور سنجش سطح درونی آبسیزیک اسید مقدار ۲ گرم از ماده گیاهی تازه برداشته، در هاون چینی خرد گردید و با اضافه کردن ۴۰ میلی‌لیتر محلول استخراج (۰/۲۵ گرم

[Downloaded from cpj.ahvaz.iau.ir on 2024-12-29]

[DOR: 20.1001.1.2008403.1398.11.43.1.0]

هیدروکسی تولوئن بوتیلن[1]) و ۰/۵ گرم سدیم آسکوربات (یا ۰/۴۴ گرم آسکوربیک اسید) در متانول ۹۰٪ با درجه HPLC حل گردید و به حجم یک لیتر رسانده شد. پس از قرارگیری نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در تاریکی و دمای ۱۶ درجه سانتیگراد، توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شدند و بافت‌های باقیمانده بر روی فیلتر سه بار توسط محلول استخراج شستشو گردید. متانول اضافی را توسط دستگاه تبخیر کننده گردان[2] در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد تبخیر کرده و سپس هم حجم محلول باقیمانده، بافر فسفات ۰/۵ مولار اضافه شد. سپس با اضافه کردن پتاس ۰/۲ نرمال اسیدیته محلول به ۸/۵ رسانیده شد. به منظور حذف ناخالصی‌ها به نمونه‌ها اتیل‌استات اضافه شد. سپس نمونه‌ها ورتکس شدند و فاز بالایی دور ریخته شده و باقیمانده اتیل‌استات توسط RFE در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد تبخیر شد. فاز آبی را توسط هیدروکلریک اسید ۰/۲ نرمال به حجم حدود ۲/۵ میلی لیتر رسانده و دوباره به میزان برابر اتیل‌استات اضافه گردید، با این تفاوت که این بار فاز اتیل‌استات نگه داشته شد. فاز اتیل‌استات اسیدی توسط دستگاه RFE در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد خشک گردید و باقیمانده در ۰/۵ میلی‌لیتر متانول حل شد. نمونه از فیلتر پلی تترافلوئورواتیلن ۰/۴۵ عبور داده شد و سپس به ستون HPLC تزریق گردید. اجزای محلول به‌دست آمده توسط دستگاه HPLC (مدل shambeck) با ستون C_{18} (UV detector، شدت جریان ml/min ۰/۷ و حلال استیک اسید ۰/۲ درصد و متانول ۱۰۰ درصد به نسبت ۵۰:۵۰ در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد جدا گردیدند. مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ نانومتر قرائت شد (Kelen *et al.*, 2004).

به منظور سنجش مقدار پروتئین، عصاره پروتئینی با استفاده از خرد شدن یک گرم بافت برگی در نیتروژن مایع و سائیده شدن بافت خرد شده در ۱۰۰ میلی‌گرم پلی وینیل پیرولیدون (PVP)، ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج شامل فسفات پتاسیم (pH= ۷، ۵۰ mM) و سدیم متابای‌سولفیت[3] (۱ mM) تهیه شد. مخلوط ساییده شده عصاره گیاهی در rpm ۱۵۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس فاز شفاف بالایی جدا شد. به ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه ۲/۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه شد و مقدار جذب نمونه در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. مقدار پروتئین محلول کل با استفاده از ترسیم منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی محاسبه شد (Bradford, 1979).

پس از جمع‌آوری داده‌ها، به منظور بررسی نرمال بودن و همگن بودن داده‌های کمی، به ترتیب از آزمون‌های کولموگروف ـ اسمیرنوف و لون استفاده شد. آنالیز آماری داده‌ها به‌وسیله آزمون تجزیه واریانس (ANOVA) و برای

1- Butylated hydroxytoluene

2- Rotary Flash Evaporation (RFE)

3- Sodium Metabisulfite

[Downloaded from cpj.ahvaz.iau.ir on 2024-12-29]

[DOR: 20.1001.1.2008403.1398.11.43.1.0]

مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan's Multiple Range) در سطح معنی داری ۵ درصد ($P\leq0.05$) استفاده شد.

نتایج و بحث

تغییرات سطح آبسیزیک اسید درونی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر انفرادی تنش خشکی، ژنوتیپ و هورمون (ظرفیت زراعی ۵۰ درصد) و نیز اثر متقابل دو به دو فاکتورها و برهمکنش هر سه فاکتور اثر معنی‌داری در سطح احتمال۱ درصد و ۵ درصد بر افزایش سطح درونی آبسیزیک اسید درونی (ABA) داشت (جدول ۲). طی بروز تنش در محیط، افزایش مقدار آبسیزیک اسید در رقم متحمل (۲/۰۹ برابر طی بروز خشکی نسبت به شرایط آبیاری کامل) نسبت به دو رقم دیگر بیشتر بود. تیمار ۲۴-اپی‌براسینولید تنها تیمار هورمونی بود که در هر سه رقم و به‌ویژه رقم متحمل (۲/۳۵ برابر)، باعث افزایش مقدار آبسیزیک اسید درونی در شرایط بدون تنش و بروز خشکی شد (شکل ۱). افزایش درونی آبسیزیک اسید درونی در تمام تنش‌های زیستی و غیرزیستی مانند خشکی (Kang *et al*., 2013) و به‌واسطه افزایش درونی یا کاربرد خارجی برخی تنظیم کننده‌های رشد نظیر ایزوفرم‌های براسینواسترویید (Yuan *et al*., 2010) مشاهده شده است.

جدول۲: نتایج تجزیه واریانس صفات مربوط به آبسیزیک اسید و رنگیزه‌ها

منابع تغییرات	درجه آزادی	آبسیزیک اسید	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل a+b	کلروفیل a/b	کاروتنویید
رقم	۲	٦٤/۰٦ **	۲۷٦/٦۲ **	٤٤۹/۲۱ **	۲٥۰/۱۷ **	۳/۲٤ *	۷۱/٦۱ **
تنش	۱	۳۷۳/۱۷ **	۸۳/۹۰ **	٤۲/٥۰ **	۷٦/٤٥ **	۳/۰٤ *	۸/۲۳ **
هورمون	۳	۱۰۲/۹۸ **	٥٦/۹٥ **	۱۷/۲۰ **	٥٤/۱۹ **	٤/۸٤ *	٦/۹٦ **
رقم × تنش	۲	۳۱/٤۲ **	۲۸/۱۳ **	۱/٦٦ **	۱٦/۰۹ **	۱/۹۱ *	۲/۰۲ *
رقم × هورمون	٦	۷/۷٤ **	۸/۱۱ **	۲/۷۱ **	۳/۹۷ **	۱/۱٥ ns	۱/۹٦ **
هورمون × تنش	۳	۱٤/۲۲ **	۲/۷٦ *	۱/۹۰ **	۲/۳۱ **	۲/۲۸ *	۱/۸٦ *
رقم × تنش × هورمون	٦	۸/۱۲ **	۳/۷٤ **	۲/٦۲ **	۲/۷۰ **	۲/۹۰ *	۲/۰٥ **
خطا	۷۲	۰/۲٦۲	۰/۰٥۱	۰/۰۱۷	۰/۰۱۱	۰/۸۲۲	۰/۹۰۳

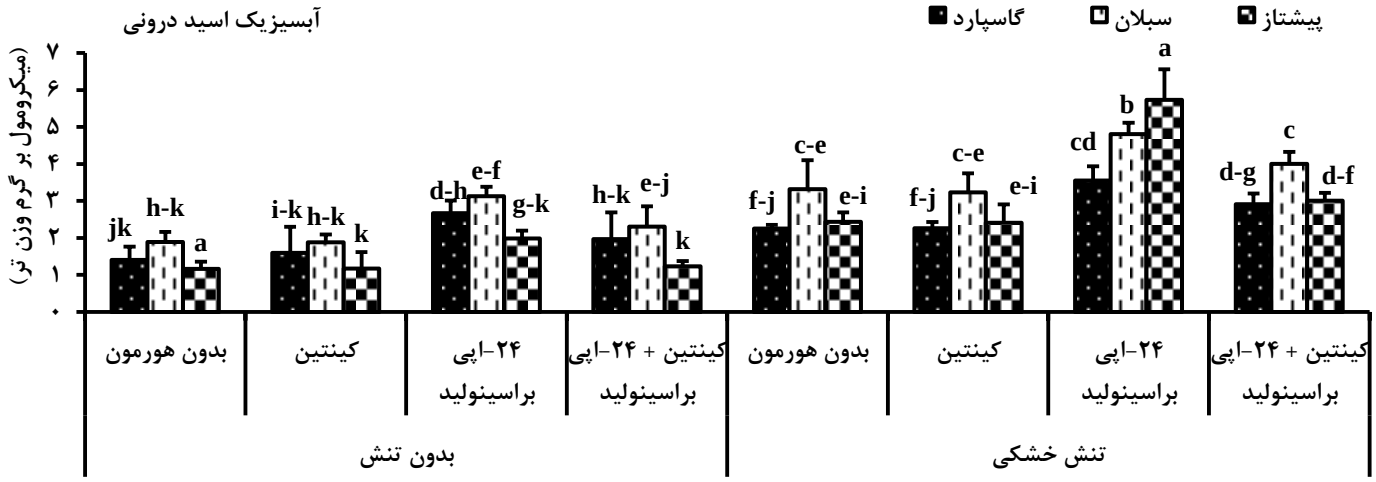
* و ** به ترتیب نشان دهنده معنی‌داری در سطح ۵٪ و ۱٪ هستند. ns بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.

در بررسی‌های انجام شده، کاربرد خارجی هورمون براسینواستروئید با افزایش سطح آبسیزیک اسید درونی باعث بهبود شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و فتوسنتزی در ارقام گیاهان گندم (Ogweno *et al*., 2008) گوجه فرنگی (Shahbaz *et al*., 2008) و خیار (Xia *et al*., 2009) شده است. افزایش معنی‌دار هورمون آبسیزیک اسید درونی در کارهای مشابه و

[Downloaded from cpj.ahvaz.iau.ir on 2024-12-29]

[DOR: 20.1001.1.2008403.1398.11.43.1.0]

بررسی انجام گرفته را می‌توان به فرا دست بودن براسینواستروییدها بر مسیرهای ساخت و عملکردی آبسیزیک اسید درونی نسبت داد (Yuan *et al*., 2010). علی‌رغم عدم تغییر معنی‌دار سطح آبسیزیک اسید درونی در تیمار کاربرد خارجی سیتوکینین در پژوهش انجام شده، اغلب مطالعات یک ارتباط خطی منفی بین تغییرات مقدار سیتوکینین‌ها و آبسیزیک اسید را نشان داده به خصوص اینکه افزایش آبسیزیک اسید درونی سبب کاهش میزان سیتوکینین‌ها به‌ویژه در شرایط بروز تنش‌هایی مانند خشکی، شوری یا سرما گردیده است. اگرچه سیتوکینین‌ها با اثر بر باز شدن روزنه‌ها و کاستن عملکرد آبسیزیک اسید به‌ویژه در مسیر کانال‌های یونی، اثر بر پمپ‌های پروتونی الکتروژنیک و فعالیت آدنیلات سیکلاز باعث افزایش تعرق و کاهش پتانسیل آب می‌شوند، با این حال تا حدودی سبب رونق نرخ فتوسنتز نیز می‌شوند (Pospisilova *et al*., 2005).



شکل ۱: اثر تیمارهای فاقد هورمون و هورمونی کینتین ، ۲۴ـ اپی‌براسینولید و برهمکنش کینتین و ۲۴- اپی‌براسینولید بر سطح آبسیزیک‌اسید درونی برگ پرچم در شرایط بدون تنش و بروز تنش خشکی

مقادیر میانگین ۴ تکرار± انحراف استاندارد است. بر اساس آزمون دانکن، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P\leq 0/05$ است.

تغییرات مقدار رنگیزه‌ها

اثر ژنوتیپ، تنش خشکی و کاربرد براسینولید و نیز برهمکنش دو به دو و هر سه فاکتور در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد بر محتوای کلروفیل a، b و a+b معنی‌دار شدند در حالی که تمام حالت‌های نام برده به جز برهمکنش ژنوتیپ و هورمون بر نسبت کلروفیل a به b در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار گردید. برهمکنش ژنوتیپ و هورمون بر نسبت کلروفیل a به b معنی‌دار نبود. در حالی که اثر ژنوتیپ، تنش خشکی و کاربرد براسینولید در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد بر مقدار کاروتنویید معنی دار گردید، برهمکنش دو به دو و هر سه فاکتور تنها در سطح ۵ درصد بر مقدار

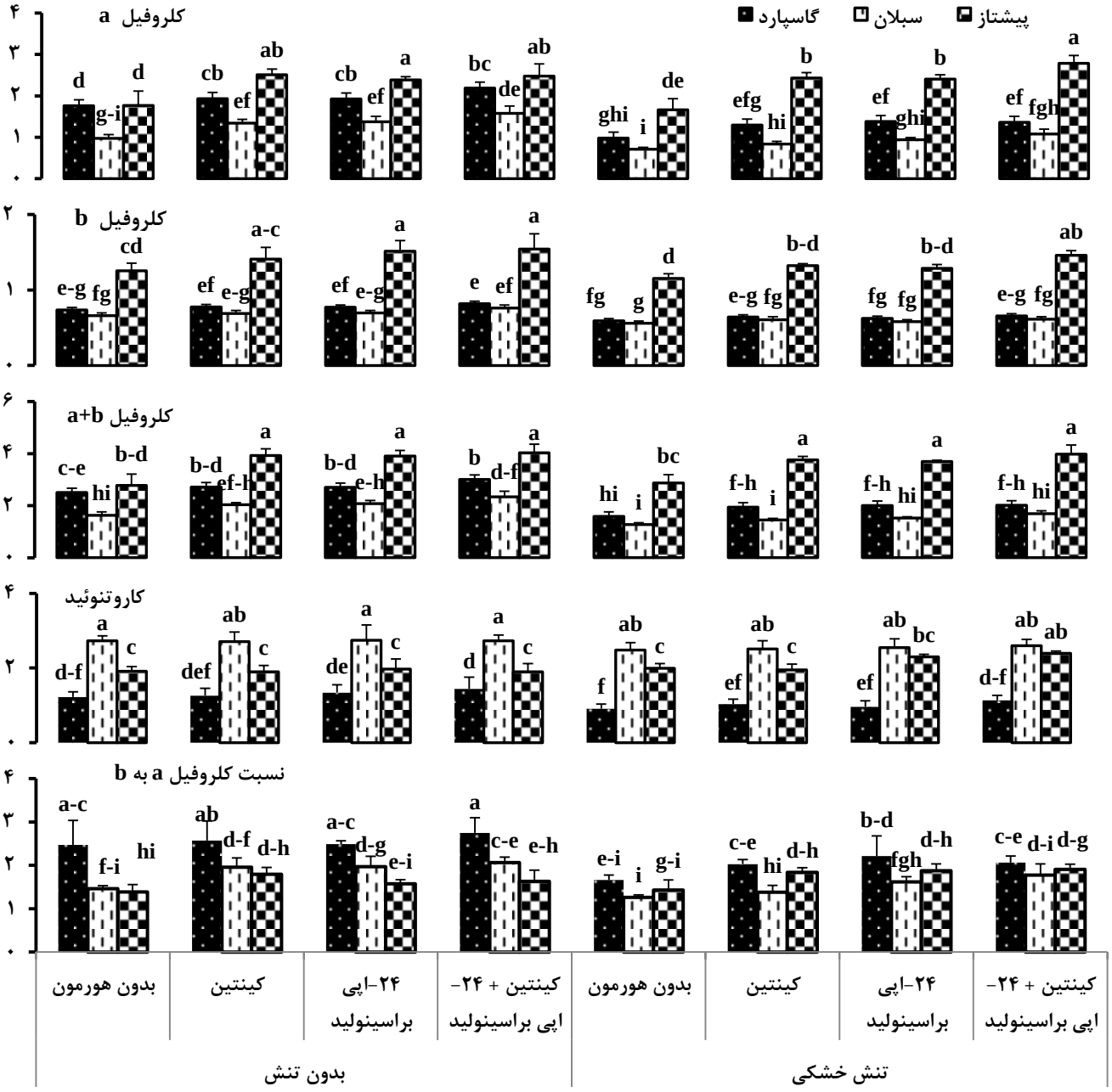
[Downloaded from cpj.ahvaz.iau.ir on 2024-12-29]
[DOR: 20.1001.1.2008403.1398.11.43.1.0]

کاروتنویید معنی دار بود (جدول ۲). در ظرفیت زراعی ۵۰ درصد، کاهش معنی‌دار مقدار کلروفیل a تنها در رقم حساس به میزان ۴۴/۳۱ درصد مشاهده شد. با این حال تنش خشکی منجر به تغییر معنی‌دار محتوای کلروفیل b در هیچ‌کدام از ارقام مورد مطالعه نگردید. همچنین در ظرفیت زراعی ۵۰ درص مقدار کلروفیل کل (a+b) و نسبت کلروفیل a/b تنها در رقم حساس و به ترتیب با میزان ۳۶/۴۳ درصد و ۳۲/۸۶ درصد نسبت شرایط آبیاری کامل، کاهش معنی‌داری نشان دادند. نتایج به‌دست آمده، تغییر معنی‌دار مقدار کاروتنویید در ارقام مورد مطالعه طی بروز تنش خشکی نسبت به شرایط آبیاری کامل را نشان نداد (شکل ۲).

کاهش مقدار رنگیزه‌ها نتیجه سنتز آهسته یا تخریب، تغییرات در سطح رونوشت برداری و تغییرات پس ترجمه ناخواسته آنزیم‌های مسیر سنتزی (به مانند تخریب آنزیم آمینولوولنیک اسید دهیدروژناز) یا شکستن سریع آن‌ها و تخریب کلروپلاست‌ها، طی بروز تنش اکسیداتیو ناشی از تنش های غیرزیستی یا زیستی نظیر خشکی است (Miller *et al*., 2010). همچنین کاهش نسبت کلروفیل a/b نشان دهنده حساس بودن مرکز واکنش رقم حساس مورد مطالعه به خصوص پروتئین‌های D1 و D2 و ناپایدرای بیشتر کلروفیل a نسبت به کلروفیل b است (Mafakheri *et al*., 2010). نتایج نشان داد تیمار برهمکنش کینتین و ۲۴-اپی‌براسینولید بیشترین اثر را بر مقدار رنگیزه‌ها در شرایط آبیاری و بروز تنش داشت و باعث افزایش مقدار رنگیزه‌ها شد. تیمار برهمکنش کینتین و ۲۴-اپی‌براسینولید با اثربیشتر بر رقم متحمل، مقدار کلروفیل a، b و a+b را در رقم متحمل و در ظرفیت زراعی ۵۰ درصد به ترتیب به میزان ۶۶/۴۰ درصد، ۲۶/۴۰ درصد و ۳۸/۸۱ درصد افزایش داد، در حالی که بیشترین اثر این تیمار بر نسبت کلروفیل a/b در رقم نیمه متحمل بود که این نسبت را به میزان ۴۰/۳۹ درصد افزایش داد. بیشترین تغییر معنی‌دار مقدار کاروتنویید، افزایش ۲۶/۶۳ درصد مقدار آن تحت تیمار برهمکنشی کینتین و ۲۴-اپی‌براسینولید در رقم پیشتاز در ظرفیت زراعی ۵۰ درصد بود (شکل ۲). نتایج تحقیقات گذشته، اثر برهمکنش چند نمونه سیتوکینین و براسینواسترویید بر افزایش محتوای رنگیزه در سلول‌های جلبک *Chlorella vulgaris* (Bajguz and Piotrowska-Niczyporuk, 2014)، اثر براسینواسترویید بر افزایش معنی‌دار محتوای کلروفیل و کاروتنویید در خیار (Xia *et al*., 2009)، افزایش مقدار کاروتنویید در گوجه فرنگی تحت اثر افزایش بیان فاکتور رونوشت‌برداری BZR1-1D طی کاربرد خارجی براسینواستروییدها (Morales *et al*., 2014) و اثر کاربرد خارجی بنزیل آمینوپورین بر روی محتوای کلروفیل و کاروتنویید دو رقم متحمل (پیشگام) و حساس (MV-17) گندم و با درجه بیشتر در رقم متحمل (Sarafraz-Ardakani *et al*., 2014) را نشان داد.

[Downloaded from cpj.ahvaz.iau.ir on 2024-12-29]

[DOR: 20.1001.1.2008403.1398.11.43.1.0]



شکل ۲: اثر تیمارهای فاقد هورمون و هورمونی کینتین، ۲۴- اپی‌براسینولید و برهمکنش کینتین و ۲۴- اپی‌براسینولید بر سطح کلروفیل a، b، a+b، کاروتنویید و نسبت کلروفیل a به b برگ پرچم در شرایط بدون تنش و بروز تنش خشکی

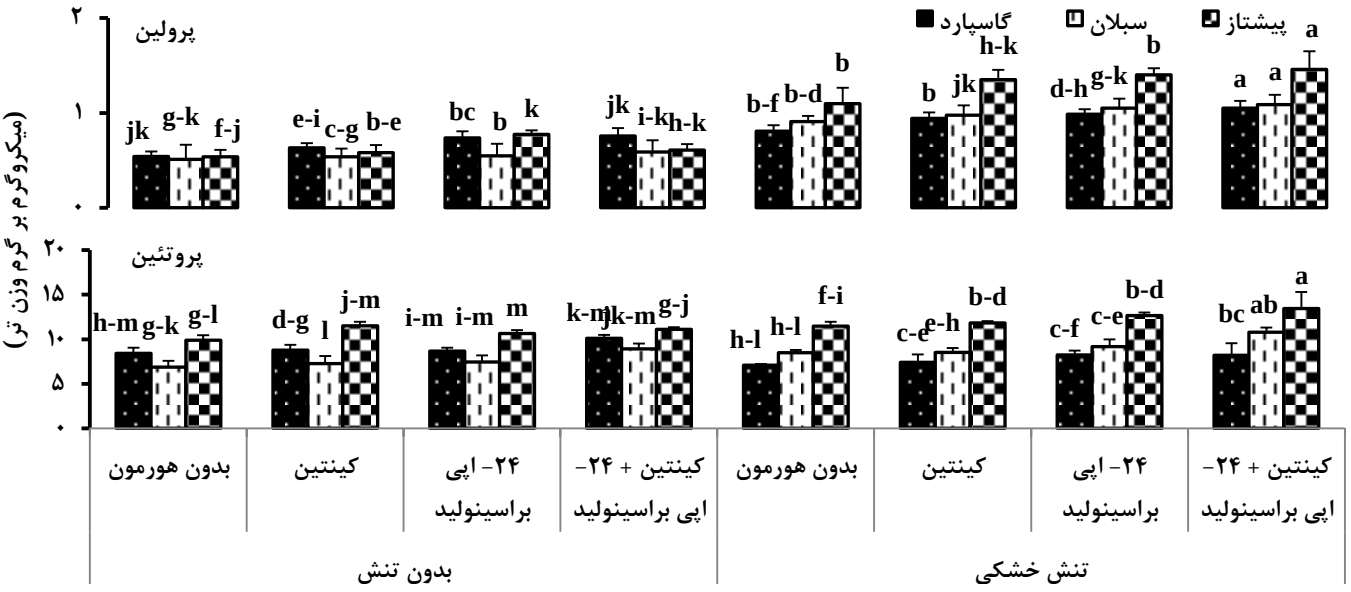
مقادیر میانگین ۴ تکرار± انحراف استاندارد است. بر اساس آزمون دانکن، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P\leq 0/05$ است.

تغییرات سطح پرولین

نتایج نشان داد که تاثیر ژنوتیپ، تنش و هورمون و نیز برهمکنش تنش × ژنوتیپ، تنش × هورمون و نیز برهمکنش هر سه فاکتور در سطوح ۱ درصد و ۵ درصد بر تغییرات محتوای پرولین معنی‌دار بود در حالی که برهمکنش هورمون و رقم

[Downloaded from cpj.ahvaz.iau.ir on 2024-12-29]
[DOR: 20.1001.1.2008403.1398.11.43.1.0]

تنها در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). رقم متحمل طی بروز خشکی بیشترین افزایش را در محتوای پرولین (۱۰۴/۱۶ درصد) نشان داد (شکل ۳). پژوهش‌های گذشته نشان داده است که طی بروز خشکی غلظت پرولین به بیش از ۸۰ درصد کل مخزن آمینواسیدی نیز می‌رسد (Talaat *et al*., 2015). پرولین نه تنها به عنوان حفاظت‌کنندگان اسمزی بلکه به عنوان یک آنتی‌اکسیدان، برهمکنش پایدار کننده غشاء و ساختارهای پروتئینی، تنظیم کننده اسیدوز سیتوپلاسمی، تعادل اسیدیتیه سیتوپلاسمی، حفظ $NADP^+/NADPH$ در تعامل با متابولیسم به خصوص در هنگام تنش و نیز تامین عوامل احیایی لازم برای حفظ فسفریلاسیون اکسیداتیو میتوکندری در جهت تولید ATP، دارای اهمیت است (Talaat and Shawky, 2014). در بسیاری از کارهای انجام گرفته افزایش آمینواسیدهای آزاد به‌ویژه پرولین و گلیسین بتایین تحت بروز تنش‌های اسمزی نظیر خشکی در ارقام متحمل نسبت به حساس بیشتر بوده است (Ashraf and Foolad, 2007). بیشترین تغییر معنی‌دار مقدار پرولین تحت اثر تیمار هورمونی برهمکنش کینتین و ۲۴ـ اپی‌براسینولید به میزان ۳۲/۸۰ درصد در رقم متحمل در ظرفیت زراعی ۵۰ درصد مشاهده شد (شکل ۳).



شکل۳: اثر تیمارهای فاقد هورمون و هورمونی کینتین، ۲۴ـ اپی‌براسینولید و برهمکنش کینتین و ۲۴ـ اپی‌براسینولید برمحتوای پرولین و پروتئین برگ پرچم در شرایط بدون تنش و بروز تنش خشکی

مقادیر میانگین ۴ تکرار± انحراف استاندارد است. بر اساس آزمون دانکن، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P\leq 0/05$ است.

مطالعات گذشته نشان داده است که کاربرد خارجی ۲۴ـ اپی‌براسینولید سبب افزایش بیشتر مقدار پرولین در گیاه ترب (Mahesh *et al*., 2013) و در برگ پرچم ارقام برنج (Farooq *et al*., 2009) تحت اثر تیمار کم‌آبی شده است. اثر

[Downloaded from cpj.ahvaz.iau.ir on 2024-12-29]
[DOR: 20.1001.1.2008403.1398.11.43.1.0]

ایزوفرم‌های براسینواستروییید در مسیرهای وابسته و غیروابسته به آبسیزیک اسید درونی بر افزایش رونوشت‌های پرولین ۵ ـ کربوکسیلات سنتاز (P_5CS) و اُرنیتین آمینوترانسفراز (OAT) و نیز کاهش فعالیت پرولین دهیدروژناز (Liu *et al*., 2016) می‌تواند دلیل احتمالی افزایش بیشتر پرولین در تیمار برهمکنشی دو هورمون باشد. برخی مطالعات حاکی از اثر معنی‌دار پایین و یا عدم معنی‌دار سیتوکینین‌ها بر تجمع پرولین بوده است که به نظر می‌آید این تغییرات به نوع سیتوکینین به کار رفته وابسته است (Sarafraz-Ardakani *et al*., 2014; Pospisilova *et al*., 2005).

تغییرات مقدار پروتئین

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ژنوتیپ، تنش و هورمون و برهمکنش دو به دو و هر سه عامل بر مقدار پروتئین در سطوح ۱ درصد و ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). طی بروز تنش خشکی، برهمکنش کینتین و ۲۴ـ اپی‌براسینولید با افزایش ۲۷/۱۲ درصد مقدار پروتئین نسبت به تیمار فاقد هورمون در رقم متحمل، بیشترین تغییر معنی‌دار در بین سایر تیمارهای هورمونی را ایجاد نمود (شکل ۳). پژوهش‌های گذشته نشان می‌دهد که سیتوکینین‌ها باعث کاهش تجزیه پروتئین‌ها و افزایش بیان برخی ژن‌های پروتئین‌های تنشی می‌شوند (Argueso *et al*., 2009). براسینواستروییدها نیز به مانند آبسیزیک اسید و در یک مسیر مشترک و گاها ترقیب کننده سبب افزایش بیان ژن‌های سنتزکننده پروتئین‌ها می‌شوند (Yuan *et al*., 2010). بنابراین افزایش میزان پروتئین‌ها در تیمار برهمکنش این دو هورمون بیش از تیمارهای انفرادی هورمون‌ها مشاهده شد.

جدول ۳: نتایج تجزیه واریانس صفات مربوط به کربوهیدرات‌ها، پرولین، پروتئین و وزن هزار دانه

منابع تغییرات	درجه آزادی	قندهای محلول کل	نشاسته	قندهای محلول کل/ نشاسته	پروتئین	پرولین	وزن هزار دانه
رقم	۲	۷۳/۸۹ **	۲۱/۱۳ **	۸/۲۲ *	۷۶/۲۲ **	۱۱۱/۲۱ **	۱۱۵/۳۹ **
تنش	۱	۸۹/۲۲ **	۹۰/۲۳ **	۷/۸۸ *	۴۵/۹۳ **	۲۳۷/۳۱ **	۸۱/۹۷ **
هورمون	۳	۲۳/۱۱ **	۳۳/۱۶ **	۷/۴۶ *	۳۸/۴۴ **	۳۶/۵۲ **	۱۸/۰۲ *
رقم × تنش	۲	۴۱/۰۵ **	۲۰/۳۱ *	۸/۷۷ *	۲۸/۴۲ ns	۲۸/۲۶ **	۱۹/۷۶۱ *
رقم × هورمون	۶	۹/۰۴ *	۳/۹۸ *	۳/۹۳ ns	۱۹/۸۵ **	۷/۹۱ *	۱۰/۶۹۱ ns
هورمون × تنش	۳	۲۴/۵۵ **	۱۹/۹۲ **	۷/۹۱ *	۲۶/۰۶ **	۱۷/۷۴ **	۲۲/۰۴ *
رقم × تنش × هورمون	۶	۸/۷۶ *	۴/۱۲ *	۷/۴۵ *	۱۵/۷۳ **	۱۸/۱۹ **	۲۰/۶۶ *
خطا	۷۲	۴/۲۴	۱/۹۷۵	۳/۶۱	۱/۹۳۴	۳/۵۱	۸/۴۸

* و ** به ترتیب نشان دهنده معنی‌داری در سطح ۵٪ و ۱٪ هستند. ns بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.

[Downloaded from cpj.ahvaz.iau.ir on 2024-12-29]

[DOR: 20.1001.1.2008403.1398.11.43.1.0]

قندهای محلول کل و نشاسته

اثر ژنوتیپ، تنش خشکی و کاربرد براسینولید بر مقدار قندهای محلول کل و نشاسته در سطوح احتمال ۱ درصد و ۵ درصد معنی‌دار بود، در حالی که در سطح احتمال ۵ درصد اثر معنی‌داری بر نسبت قندهای محلول کل به نشاسته داشتند. همچنین برهمکنش ژنوتیپ × تنش و تنش × هورمون در سطوح ۱ درصد و ۵ درصد بر نسبت قندهای محلول کل و نشاسته و در سطح ۵ درصد بر نسبت قندهای محلول کل به نشاسته اثر معنی‌داری داشتند. با این حال برهمکنش ژنوتیپ × هورمون تنها در سطح ۵ درصد اثر معنی‌داری بر مقدار قندهای محلول کل و نشاسته داشتند. نتایج تجزیه واریانس اثر معنی‌دار برهمکنش هر سه عامل را در سطح معنی‌داری ۵ درصد بر مقدار قندهای محلول کل و نشاسته و نسبت آن‌ها نشان داد (جدول ۳). مقایسه میانگین‌های محتوای قندهای محلول کل و نشاسته حاکی از افزایش مقدار قندهای محلول کل (رقم متحمل با بیشترین تغییر معنی‌دار و افزایش ۶۶/۴۴ درصد)، کاهش مقدار نشاسته (رقم حساس با بیشترین تغییر معنی‌دار و کاهش ۲۶/۸۵ درصد) افزایش نسبت قندهای محلول کل/نشاسته (مشاهده بیشترین تغییر معنی‌دار در رقم متحمل با ۸۴/۴۳ درصد افزایش) طی ظرفیت زراعی ۵۰ درصد در ارقام مورد مطالعه بود (شکل ۴). هیدرولیز نشاسته و کاهش آن و افزایش مقدار قندهای محلول کل یک دلیل مهم برای افزایش حفاظت اسمزی (Xia *et al*., 2009) و رونق مسیرهای ترارسانی علامت حفاظتی (Vanden Ende and Valluru, 2008) است. اثر تیمارهای هورمونی بر افزایش قندهای محلول کل در شرایط آبیاری کامل نسبت به ظرفیت زراعی ۵۰ درصد بارزتر بود. تیمار ۲۴ـ اپی‌براسینولید با افزایش ۴۶/۷۳ درصد مقدار قندهای محلول کل در رقم متحمل در ظرفیت زراعی ۱۰۰ درصد بیشترین اثر معنی‌دار را داشت. با این حال افزایش معنی‌دار مقدار قندهای محلول در رقم متحمل در شرایط کاربرد ۲۴ـ اپی‌براسینولید و بروز خشکی ۱۷/۳۴ درصد بود. همچنین ۲۴ـ اپی‌براسینولید باعث بیشترین کاهش معنی‌دار محتوای نشاسته برگ پرچم بویژه در رقم متحمل (۱۶/۷۹ درصد) طی بروز خشکی شد. همچنین بررسی اثر تیمارهای هورمونی بر مقدار نسبت قندهای محلول کل/نشاسته نشان داد که تیمار ۲۴ـ اپی‌براسینولید باعث بیشترین افزایش معنی‌دار این نسبت در رقم متحمل طی بروز خشکی شد (شکل ۴). در تایید نتایج به‌دست آمده، افزایش هیدرولیز نشاسته توام با افزایش قندهای ساده محلول و احیاء کننده تحت اسپری براسینواسترویید بر روی بخش هوایی گیاه بادام زمینی که در معرض تنش اسمزی (Vidya Vardhini and Seeta Ram Rao, 1998) مشاهده شد.

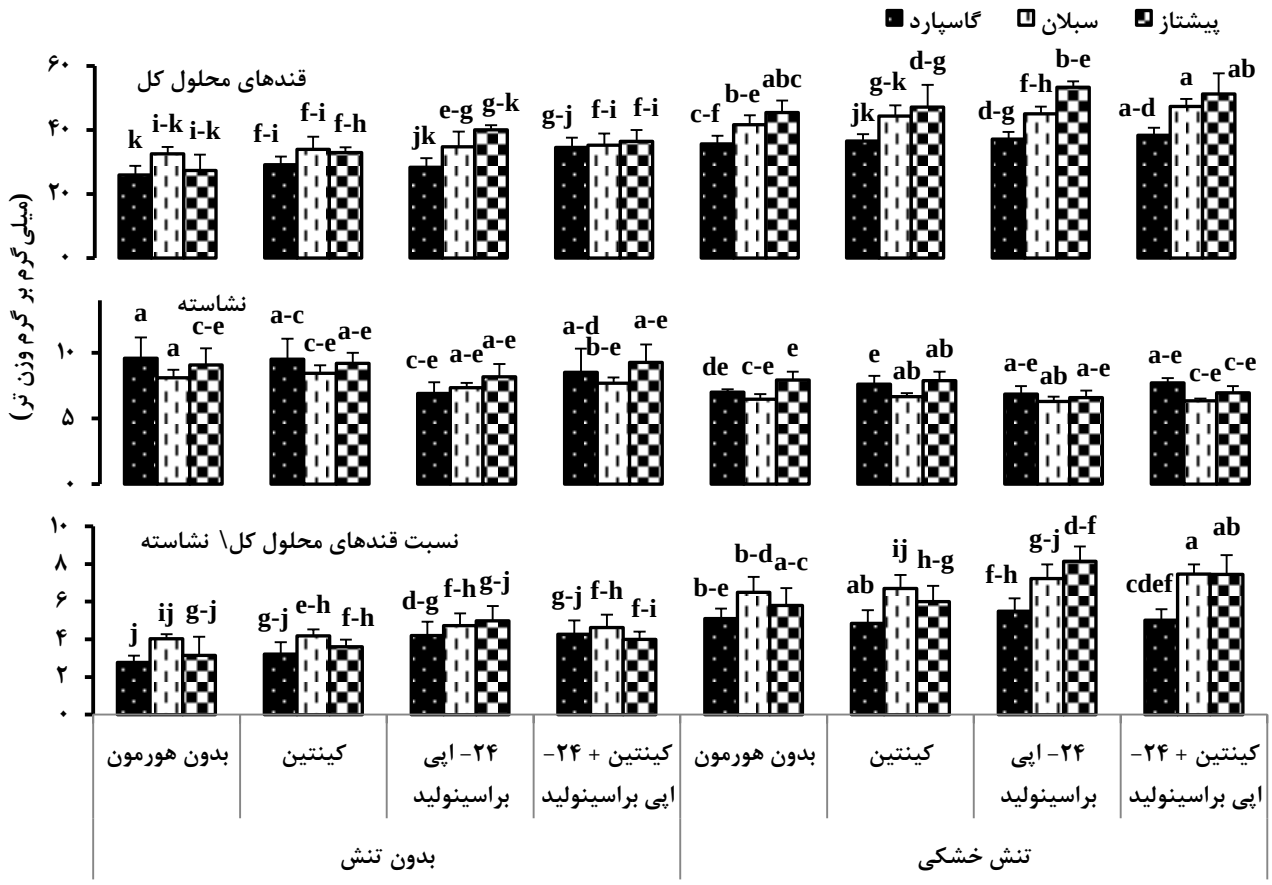
تغییرات وزن هزار دانه

اثر ژنونتیپ و تنش در سطوح احتمال ۱ درصد و ۵ درصد و براسینولید در سطح احتمال ۵ درصد بر وزن هزار دانه معنی‌دار بود. همچنین همکنش ژنوتیپ و تنش، تنش و هورمون و هر سه عامل در سطح احتمال ۵ درصد بر وزن هزار دانه

[Downloaded from cpj.ahvaz.iau.ir on 2024-12-29]

[DOR: 20.1001.1.2008403.1398.11.43.1.0]

تاثیر گذار بودند (جدول ۳). نتایج به‌دست آمده کاهش معنی‌دار ۲۹/۲۸ درصد و ۲۶/۹۴ درصد وزن هزار دانه را به ترتیب در ارقام حساس و نیمه متحمل طی بروز خشکی نشان داد. برهمکنش کینتین و ۲۴ـ اپی‌براسینولید باعث بیشترین افزایش معنی‌دار (۲۸/۴۲ درصد) وزن هزار دانه گردید (شکل ۵). افت میزان محصول و شاخص‌های مربوطه نظیر وزن هزار دانه و عملکرد دانه در ارقام زراعی حساس ناشی از افزایش شاخص‌های تنش اکسیداتیو و آسیب جدی دستگاه فتوسنتزی و بنابراین نزول متابولیسم کربوهیدرات‌ها برآورد گردیده است (Valliyodan and Nguyen, 2006).



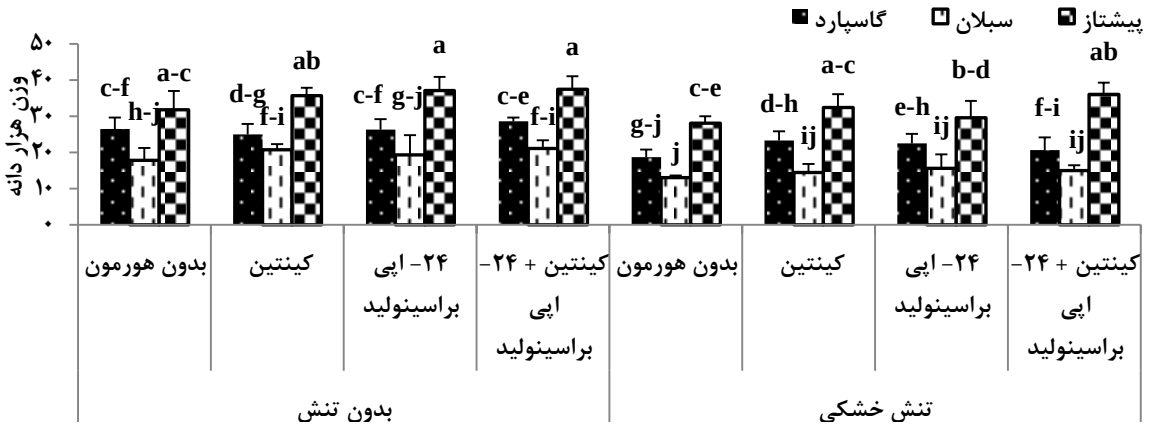
شکل ۴: اثر تیمارهای فاقد هورمون و هورمونی کینتین، ۲۴- اپی‌براسینولید و برهمکنش کینتین و ۲۴-اپی‌براسینولید بر محتوای قند محلول کل، نشاسته و نسبت قند محلول کل/نشاسته برگ پرچم در شرایط بدون تنش و بروز تنش خشکی

مقادیر میانگین ۴ تکرار± انحراف استاندارد است. بر اساس آزمون دانکن، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P\leq 0/05$ است.

به طور کلی هورمون‌های گیاهی در تعیین دانه‌بندی غلات و تامین مخزن کربوهیدراتی دخالت دارند. سیتوکینین‌ها با افزایش قدرت مخزن و تسریع نموندن تقسیم سلول‌ها در مخزن و در نتیجه افزایش پتانسیل مخزن عامل افزایش وزن دانه‌ها هستند (Yang, 2015). همچنین در یک بررسی نشان داده شده است که افزایش سرعت پر شدن دانه و کوتاه

[Downloaded from cpj.ahvaz.iau.ir on 2024-12-29]
[DOR: 20.1001.1.2008403.1398.11.43.1.0]

شدن دوره آن به طور نزدیکی مرتبط با افزایش سطح آبسیزیک اسید درونی در دانه های تنش دیده با آب است (Farooq *et al*., 2014). بنابراین تیمار ۲۴ـ اپی‌براسینولید می‌تواند با اثر بر افزایش سطح آبسیزیک اسید باعث بهبود عملکرد شود. همچنین رابطه نزدیکی بین متابولیسم کربوهیدرات و پایداری رنگیزه ها با ثبات عملکرد در گیاهان زراعی طی بروز شرایط تنش اسمزی از جمله خشکی و شوری گزارش شده است (Peleg and Blumwald, 2011) که هر دو شاخص مورد نظر در کار انجام شده به‌وسیله به صورت نسبی توسط هر دو تیمار هورمونی و بویژه تیمار برهمکنش دو هورمون در رقم متحمل طی بروز تنش خشکی افزایش یافت.



شکل ۵: اثر تیمارهای فاقد هورمون و هورمونی کینتین، ۲۴ـ اپی‌براسینولید و برهمکنش کینتین و ۲۴ـ اپی‌براسینولید بر وزن هزاردانه در شرایط بدون تنش و بروز تنش خشکی

مقادیر میانگین ۴ تکرار± انحراف استاندارد است. بر اساس آزمون دانکن، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P\leq 0/05$ است.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که تنش خشکی آسیب بیشتری به شاخص‌های رنگیزه‌ای و متابولیسم کربن در رقم گاسپارد (رقم حساس) وارد کرده است. با این حال رقم پیشتاز (رقم متحمل) بود که با منفعت جستن از تیمارهای هورمونی در جهت حفظ و بهبود محتوای رنگیزه‌ای خود و مقدار قندهای محلول کل و پرولین و در نتیجه بهبود مکانیسم‌های مقاومتی نظیر افزایش حفاظت اسمزی توانست عملکرد وزن هزار دانه خود را بهبود بخشد. تیمار برهمکنشی کینتین و ۲۴ـ اپی‌براسینولید اثر بیشتری از تیمارهای انفرادی کینتین و ۲۴ـ اپی‌براسینولید بر تحمل به خشکی ایجاد کرد. با این حال به نظر می‌آید در بین دو تیمار مورد مطالعه، تیمار ۲۴ـ اپی براسینولید نسبت به تیمار کینتین بواسطه افزایش سطح آبسیزیک اسید درونی اثر بیشتری بر بهبود شاخص‌های بیوشیمیایی و در نتیجه تحمل ارقام مورد مطالعه به تنش خشکی اعمال کرده باشد.

[Downloaded from cpj.ahvaz.iau.ir on 2024-12-29]

[DOR: 20.1001.1.2008403.1398.11.43.1.0]

منابع

سرافراز اردکانی، م.ر. ۱۳۹۸. پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی القاء شده توسط تیمارهای کینتین و ۲۴ـ اپی‌براسینواسترویید در سه رقم گندم (*Triticum aestivum* L.) طی بروز تنش خشکی در مرحله پر شدن دانه. نشریه فرآیند و کارکرد گیاهی. ۸ (۲۹): ۳۲۷-۳۱۴.

صادقی‌پور، ا. و بنکدار هاشمی، ن. ۱۳۹۴. بررسی اثر کاربرد براسینولید در تحمل به خشکی لوبیا چشم بلبلی. نشریه فیزیولوژی گیاهان زراعی. ۷ (۲۶): ۷۰-۵۷.

عیسوند، ح.ر. و شرفی، ا. ۱۳۹۵. اثر اسموپرایمینگ بذر در دماهای مختلف، بر سبز شدن، رشد گیاهچه و درصد اسانس مرزه خوزستانی (*Satureja Khuzestanica* Jamzad) تحت تنش خشکی. نشریه علوم و فناوری بذر ایران. ۵ (۲): ۳۵-۲۳.

Ali, Z., Basra, S. M. A., Munir, H., Mahmood, A. and Yousaf, S. 2011. Mitigation of drought stress in maize by natural and synthetic growth promoters. Journal of Agriculture and Social Science 7 (2): 56-62.

Anjume, S. A., Wang, L. C., Farooq, M., Hussain, M., Xue, L. L. and Zou, C. M. 2011. Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange. Journal of Agronomy and Crop Science 197 (3): 177-185.

Argueso, C. T., Ferreira, F. J. and Kieber, J. J. 2009. Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. Plant Cell and Environment 32 (9): 1147-1160.

Ashraf, M. and Foolad, M. R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmenta and Experimental Botany 59(2): 206 - 216.

Bajguz, A. and Piotrowska-Niczyporuk, A. 2014. Interactive effect of brassinosteroids and cytokinins on growth, chlorophyll, monosaccharide and protein content in the green alga Chlorella vulgaris (Trebouxiophyceae). Plant Physiology and Biochemistry 80: 176-183.

Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil 29: 205-207.

Bradford, M. M. 1979. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72 (7): 248-254.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28 (3): 350-356.

[Downloaded from cpj.ahvaz.iau.ir on 2024-12-29]

[DOR: 20.1001.1.2008403.1398.11.43.1.0]

Farooq, M., Hussain, M. and Siddique, K. H. M. 2014. Drought Stress in Wheat during Flowering and Grain-filling Periods. Journal of Critical Reviews in Plant Sciences 33 (4): 331-349.

Farooq, M., Wahid, A., Basra, S. M. A. and Din, I. U. 2009. Improving the water relations and gas exchange with brassinosteroids in rice under drought stress. Journal of Agronomy and Crop Science 195 (4): 262-269.

Kang, G. Z., Li, G. Z., Liu, G. Q., Xu, W., Peng, X. Q., Wang, C. Y., Zhu, Y. J. and Guo, T. C. 2013. Exogenous salicylic acid enhances wheat drought tolerance by influences on the expression genes related to ascorbate-glutathione cycle. Biologia Plantarum 57(4): 718–724.

Kaya, C., Akram, N. and Ashraf, M. 2018. Kinetin and indole acetic acid promote antioxidant defense system and reduce oxidative stress in maize (*Zea mays* L.) plants grown at boron toxicity. Plant Growth Regulation 37(1): 1258-1266.

Kelen, M., Cubukdem-Iralay, E., Sen, S. and Ozkan, G. 2004. Separation of abscisic acid, indol-3-acetic acid, gibberellic acid in 99R (Vitis berlandieri × Vitis rupestris) and rose Oil (Rosa damascena Mill.) by reversed phase liquid chromatography. Turkish Journal of Chemistry 28(5): 603-610.

Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology 148: 350-382.

Liu, Z., Li, L., Luo, Z., Zeng, F., Jiang, L. and Tang, K. 2016. Effect of brassinolide on energy status and proline metabolism in postharvest bamboo shoot during chilling stress. Postharvest Biology and Technology 111: 240-246.

Mafakheri, A., Siosemardeh, A., Bahramnejad, B., Struik, P. C. and Sohrabi, Y. 2010. Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. Australian Journal of Crop Science 4 (8): 580-585.

Mahesh, K., Balaraju, P., Ramakrishna, B. and Rao, S. S. 2013. Effect of brassinosteroids on germination and seedling growth of radish (Raphanus sativus L.) under PEG- 6000 induced water stress. American Journal of Plant Science 4 (12): 2305-2313.

Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. and Mittler, R. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. Plant Cell and Environment 33(4): 453-467.

Morales, L. M. M., Senn, M. E., Grozeff, G. E. G., Fanello, D. D., Carrion, C. A., Nunez, M., Bishop, G. J. and Bartoli, C. G. 2014. Impact of brassinosteroids and ethylene on ascorbic acid accumulation in tomato leaves. Plant Physiology and Biochemistry 74: 315-322.

Ogweno, J. O., Hu, W. H., Song, X. S., Shi, K., Mao, W. H., Zhou, Y. H. and Yu, J. Q. 2010. Photoinhibition-induced reduction in photosynthesis is alleviated by abscisic acid, cytokinin and brassinosteroid in detached tomato leaves. Plant Growth Regulation 60 (3): 175-182

[Downloaded from cpj.ahvaz.iau.ir on 2024-12-29]

[DOR: 20.1001.1.2008403.1398.11.43.1.0]

Ogweno, J. O., Song, X. S., Shi, K., Hu, W. H., Mao, W. H., Zhou, Y. H., Yu, J. Q. and Nogues, S. 2008. Brassinosteroids alleviate heat-induced inhibition of photosynthesis by increasing carboxylation efficiency and enhancing antioxidant systems in Lycopersicon esculentum. Journal of Plant Growth Regulation 27 (1): 49- 57.

Peleg, Z. and Blumwald, E. 2011. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. Current Opinion in Plant Biology 14 (3): 290-295

Pociecha, E., Dziurka, M., Oklestkova, J., Janeczko, A. 2016. Brassinosteroids increase winter survival of winter rye (*Secale cereale* L.) by affecting photosynthetic capacity and carbohydrate metabolism during the cold acclimation process. Plant Growth Regulation 80 (2): 127-135.

Pospisilova, J., Vagner, M., Malbeck, J., Travnickova, A. and Batkova, P. 2005. Interactions between abscisic acid and cytokinins during water stress and subsequent rehydration. Biologia Plantarum 49 (4): 533-540.

Sarafraz-Ardakani, M. R., Khavari-Nejad, R. A., Moradi, F. and Najafi, F. 2014. Abscisic acid and cytokinin-induced carbohydrate and antioxidant levels regulation in drought-resistant and –susceptible wheat cultivar during grain filling under field conditions. International Journal of Biosciences 5 (8): 11-24.

Shahbaz, M., Ashraf, M. and Athar, H. U. R. 2008. Does exogenous application of 24-epibrassinolide ameliorate salt induced growth inhibition in wheat (*Triticum aestivum* L.)? Plant Growth Regulation 55 (1): 51–64.

Tang, J., Han, Z. and Chai, J. 2016. Q &A: what are brassinosteroids and how do they act in plants? BMC Biology 14 (1): 1-5.

Talaat, N. B. and Shawky, B. T. 2014. Protective effects of arbuscular mycorrhizal fungi on wheat (*Triticum aestivum* L.) plants exposed to salinity. Environmental and Experimental Botany 98: 20-31.

Talaat, N. B., Shawky, B. and Ibrahim, A. S. 2015. Alleviation of drought-induced oxidative stress in maize (*Zea mays* L.) plants by dual application of 24-epibrassinolide and spermine. Environmental and Experimental Botany 113: 47-58.

Tanveer, M., Shahzad, B., Sharma, A. and Ahmad Khan, E. 2019. 24-Epibrassinolide application in plants: An implication for improving drought stress tolerance in plants. Journal of Plant Physiology and Bochemistry 135: 295-303.

Valliyodan, B. and Nguyen, H. T. 2006. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. Current Opinion in Plant Biology 9 (2): 189-195.

Veselov, D. S., Kudoyarova, G. R., Kudryakova, N. V. and Kusnetsov, V. V. 2017. Role of Cytokinins in Stress Resistance of Plants. Russian Journal of Plant Physiology 64 (1): 15–27.

[Downloaded from cpj.ahvaz.iau.ir on 2024-12-29]

[DOR: 20.1001.1.2008403.1398.11.43.1.0]

Vidya Vardhini, B. and Seeta Ram Rao, S. 1998. Effect of brassinosteroids on growth, metabolite content and yield Arachis hypogaea. Phytochemistry 48 (6): 927- 930.

Vanden Ende, W. and Valluru, R. 2008. Sucrose, sucrosyl ligosaccharides, and oxidative stress:scavenging and salvaging? Journal of Experimental Botany 60 (1): 9-18.

Verma, V., Ravindran, P. and Kumar, P. P. 2016. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. BMC Plant Biology 16 (86): 1-10.

Xia, X. J., Huang, L. F., Zhou, Y. H., Mao, W. H., Shi, K., Wu, J. X., Asami, T., Chen, Z. and Yu, J. Q. 2009. Brassinosteroids promote photosynthesis and growth by enhancing activation of Rubisco and expression of photosynthetic genes in Cucumis sativus. Planta 230 (6): 1185-1196.

Yang, J. 2015. Approaches to achieve high grain yield and high resource use efficiency in rice. Frontiers of Agricultural Science and Engineering 2 (2): 115-123.

Yuan, G-F., Jia, C-G., Li, Z., Sun, B., Zhang, L-P., Liu, N. and Wang, Q-M. 2010. Effect of brassinosteroids on drought resistance and abscisic acid concentration in tomato under water stress. Scientia Horticulturae 126 (2): 103-108.

Zhao, G., Xu, H., Zhang, P., Su, X. and Zhao, H. 2017. Effects of 24-epibrassinolide on photosynthesis and Rubisco activase gene expression in Triticum aestivum L. seedling under a combination of drought and heat stress. Plant Growth Regulation 8 (3): 377-384.

[Downloaded from cpj.ahvaz.iau.ir on 2024-12-29]

[DOR: 20.1001.1.2008403.1398.11.43.1.0]

Effect of cytokinin and brassinosteroid on some biochemical and physiological traits of wheat cultivars under drought tension at generative stage

M. Sarafraz Ardakani

Assistant Professor of Department of Biology, Yazd University, Yazd, Iran.

*Corresponding author: sarafraz.ardakani@yazd.ac.ir

Received date: 2019.02.06 **Accepted date: 2019.06.09**

Abstract

In order to investigate and compare the effect of external application of hormonal treatments on some biochemical characteristics and one-thousand grain weight in three wheat cultivars in terms of degree of tolerance to water deficit period including Pishtaz (tolerant), Sabalan (semi-tolerant) and Gaspard (susceptible) under drought tension during onset booting origin, the pot experiment as factorial design with four replications was conducted in Yazd University in 2015. Treatments included cultivar factor at three levels, drought tension at two levels (100% field capacity or control, 50% or drought tension) and hormone application at four levels without hormone, Kinetin (100 microMolar concentration), 24- epibrasinolide (1 microMolar) and their interaction. All analyzes were performed on the flag leaf. Drought incidence resulted in the most significant decrease in chlorophyll a, b, a + b content, chlorophyll a/b ratio, carotenoid, protein and one-thousand grain weight in susceptible cultivar (Gaspard). The highest significant increase in abscisic acid, soluble sugars, proline and soluble sugars / starch ratio was observed in tolerant cultivar. Among the hormonal treatments, 24-epibrasinolide had the most significant increase in intrinsic abscisic acid and soluble sugars / starch ratios, and the interaction of Kinetin and 24-epibrasinolide had the highest increase in pigment content, proline and protein content, as well as one -thousand grain weight during drought incidence particularly in tolerant cultivar (Pishtaz). The results of the present research showed that the effect of hormonal treatments on biochemical indices was more than their effect on one-thousand grain weight. Overall, the interaction treatment of Kinetin and 24-epibrasinolide had more effect on biochemical indices and one-thousand grain weight than individual hormone treatments. Pishtaz (tolerant) cultivar has benefited more from hormone treatments to better withstand the dehydration period.

Keywords: Abscisic acid, 24-epibrassinolide, Flag leaf and Kinetin.

[Downloaded from cpj.ahvaz.iau.ir on 2024-12-29]

[DOR: 20.1001.1.2008403.1398.11.43.1.0]