

اثر سیتوکینین و براسینواستروئید بر برخی خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ارقام

گندم تحت تنش خشکی در مرحله زایشی

محمد رضا سرافراز اردکانی*

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

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

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۱۹

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۱۷

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 آبسزیک 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 آبسزیک 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 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: آبسزیک اسید، ۲۴-اپی‌براسینولید، برگ پرچم و کینتین.

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 تنظیم‌کننده‌های رشد با تاثیری که بر همتهای 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 ترانس‌سانی علامت، عملکرد آبی 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 می‌باشند (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). براسینواستروئیدها به عنوان آنالوگ ساختاری هورمون‌های استروئیدی جانوری در گیاهان مدنظر می‌باشند (Tang *et al.*, 2016). این گروه از هورمون‌ها بسیاری از شبکه‌های متابولیسمی پیچیده در تکوین، رشد رویشی و تمایز دایی در گیاهان

را کنترل می کنند. همچنین براسینواستروئیدها برای حفاظت گیاهان در برابر تنش گرمایی، خشکی، شوری و اکسیداتیو از اهمیت بالایی برخوردار هستند (Pociecha *et al.*, 2016). مطالعات اثر براسینواستروئیدها بر روی غلات تحت تنش خشکی محدود بوده است (Anjume *et al.*, 2011). به عنوان نمونه اثر کاربرد خارجی دو ایزوفرم ۲۴-اپی براسینولید و ۲۸-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^۱ و اسپری (بر روی گیاهچه‌های ۵ برگه) 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 ۲۴-اپی براسینولید با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر بر دانه‌های 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)^۲ 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 ۲۴-اپی براسینولید به‌ویژه به صورت اسپری (در مقابل خیساندن بذور) و در غلظت‌های پایین (۲ میکرومولار در مقایسه با ۴ میکرومولار) بر لویا 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 بذرها^۳ ترب (*Raphanus Sativus* L.) در محلول‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میکرومولار ۲۴-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)^۳ گردید که در تیمار ۱ میکرومولار برای هر دو ایزوفرم مشهودتر بود (Mahesh *et al.*, 2013). براسینواستروئیدها و سیتوکینین‌ها برهمکنش نزدیکی با یکدیگر دارند. براسینواستروئیدها 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

می‌شوند. در این بین غلظت براسینواستروئید در این برهمکنش تعیین کننده است، زیرا برخی گزارشات نشان از اثر کمتر غلظت‌های بالای براسینواستروئیدها 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 براسینواستروئیدها در مواجهه با تنش‌ها و اثر افزایشی این هورمون بر سطح آبسزیک اسید درونی (Yuan *et al.*, 2010)، سطح اغلب ایزوفرم‌های سیتوکینین کاهش می‌یابد که می‌تواند ناشی از تاثیر آبسزیک اسید افزایش یافته در کاهش سطح سیتوکینین‌ها باشد (Sarafraz-Ardakani *et al.*, 2014). با این حال نتایج Ogwenو همکاران (۲۰۱۰) نشان داده است که برهمکنش بین براسینواستروئید، آبسزیک 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 میکرومولار) و ۲۴-آپی 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 آبسزیک 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 کاملاً 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)	نیترژن (میلی‌گرم بر لیتر)	پتاسیم (میلی‌گرم بر لیتر)	فسفر (میلی‌گرم بر لیتر)	کربن آلی (درصد)	هدایت الکتریکی (دسی‌زیمنس بر متر)	اسیدیته
رس - شن	۲۹/۴	۴۱/۱	۱۹/۶	۳۵۲/۰۷	۴۶۳/۲۴	۱۷/۰۶	۱/۱۹	۱/۲۳	۷/۴۴

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 به وسیله فویل آلومینیومی به طور کامل پوشانده شد، با خروج آب ثقیلی 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):

$$\text{رابطه ۱:} \quad \frac{\text{میزان آب موجود در گلدان قبل از آبیاری (گرم)} \times 100}{\text{وضعیت آب گلدان نسبت به ظرفیت زراعی}} = \text{میزان آب موجود در گلدان در حد ظرفیت زراعی (گرم)}$$

در مرحله کاشت گیاه، بذره‌های 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 به وسیله 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 گلدان‌ها 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 ۲۴-اپی براسینواستروئید) بر روی اندام هوایی انجام گرفت. در این آزمایش از توپین 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).

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 میلی لیتر از عصاره با ۴/۵ میلی لیتر استون ۸۰ درصد مخلوط گردید و در ۱۰ دقیقه در $3000 \times g$ 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 کاروتنوئید اندازه‌گیری شد. مقادیر کلروفیل و کاروتنوئید با استفاده از رابطه‌های ۲، ۳، ۴ و ۵ تعیین شدند (Lichtenthaler, 1987):

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

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

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

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

کربوهیدرات‌های محلول کل و نشاسته با روش فنل - 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 نمونه‌ها در $3000 \times g$ 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 نمونه‌ها در ۴۸۵ نانومتر قرائت گردید. مقادیر قندهای محلول کل و نشاسته با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز برآورد شد.

برای اندازه‌گیری پرولین مقدار ۰/۰۳ گرم برگ پرچم در ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوسالسیلیک ۳ درصد ساییده شد و مخلوط حاصل توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۲ صاف گردید. ۲ میلی لیتر از عصاره با ۲ میلی لیتر معرف نین هیدرین و ۲ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال مخلوط شد و به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس نمونه‌ها به ظرف یخ منتقل شدند. پس از اضافه کردن ۴ میلی لیتر 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 آبسزیک اسید مقدار ۲ گرم از ماده گیاهی تازه برداشته، در هاون چینی خرد گردید و با اضافه کردن ۴۰ میلی لیتر محلول استخراج (۰/۲۵ گرم

هیدروکسی تولوئن بوتیلن^۱) 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^۲ 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 تترافلورواتیلن ۰/۴۵ عبور داده شد و سپس به ستون HPLC تزریق گردید. اجزای محلول به دست آمده توسط دستگاه HPLC (مدل shambeck) با ستون C₁₈ (UV detector)، شدت جریان ۰/۷ ml/min 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 برگ در نیتروژن مایع و سائیده شدن بافت خرد شده در ۱۰۰ میلی‌گرم پلی وینیل پیرولیدون (PVP)، ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج شامل فسفات پتاسیم (۵۰ mM، pH= ۷) و سدیم متابای‌سولفیت^۳ (۱ mM) تهیه شد. مخلوط سائیده 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 آلومین 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 - اسمیرنوف و لون استفاده شد. آنالیز آماری داده‌ها به وسیله آزمون تجزیه واریانس (ANOVA) و برای

1- Butylated hydroxytoluene

2- Rotary Flash Evaporation (RFE)

3- Sodium Metabisulfite

مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan's Multiple Range) در سطح معنی داری ۵ درصد ($P \leq 0.05$) استفاده شد.

نتایج و بحث

تغییرات سطح آبسزیک 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 احتمال ۱ درصد و ۵ درصد بر افزایش سطح درونی آبسزیک اسید درونی (ABA) داشت (جدول ۲). طی بروز تنش در محیط، افزایش مقدار آبسزیک اسید در رقم متحمل (۲/۰۹) برابر طی بروز خشکی نسبت به شرایط آبیاری کامل) نسبت به دو رقم دیگر بیشتر بود. تیمار ۲۴-آبی‌براسینولید تنها تیمار هورمونی بود که در هر سه رقم و به‌ویژه رقم متحمل (۲/۳۵ برابر)، باعث افزایش مقدار آبسزیک اسید درونی در شرایط بدون تنش و بروز خشکی شد (شکل ۱). افزایش درونی آبسزیک اسید درونی در تمام تنش‌های زیستی و غیرزیستی مانند خشکی (Kang *et al.*, 2013) و به‌واسطه افزایش درونی یا کاربرد خارجی برخی تنظیم‌کننده‌های رشد نظیر ایزوفرم‌های براسینواستروئیدی (Yuan *et al.*, 2010) مشاهده شده است.

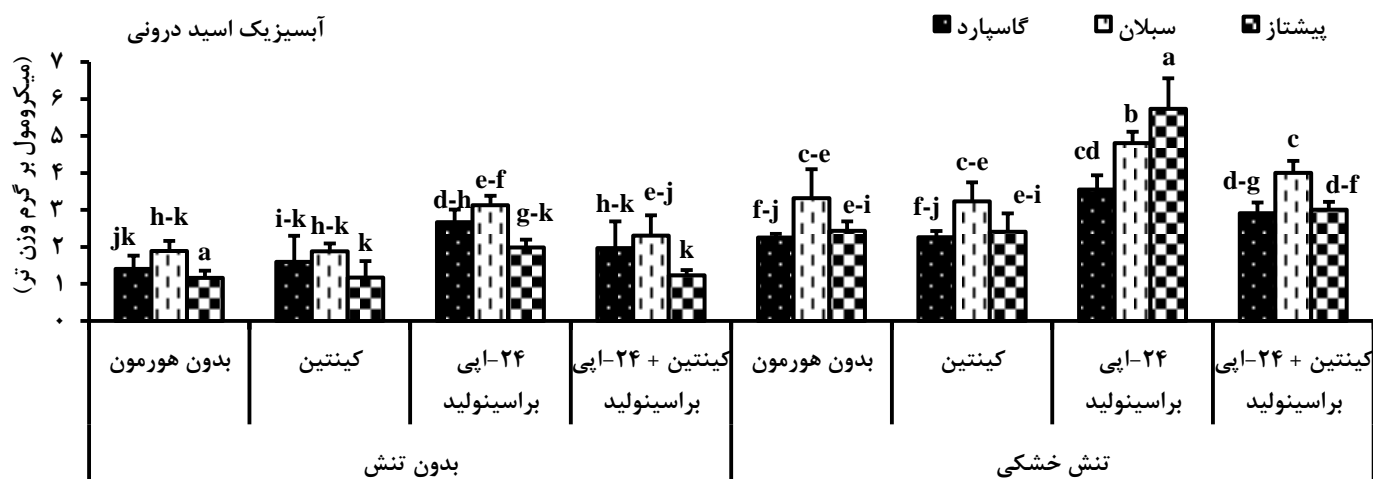
جدول ۲: نتایج تجزیه واریانس صفات مربوط به آبسزیک اسید و رنگیزه‌ها

منابع تغییرات	درجه آزادی	آبسزیک اسید	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل a+b	کلروفیل a/b	کاروتنوئید
رقم	۲	۶۴/۰۶ **	۲۷۷/۶۲ **	۴۴۹/۲۱ **	۲۵۰/۱۷ **	۳/۲۴ *	۷۱/۶۱ **
تنش	۱	۳۷۳/۱۷ **	۸۳/۹۰ **	۴۲/۵۰ **	۷۶/۴۵ **	۳/۰۴ *	۸/۲۳ **
هورمون	۳	۱۰۲/۹۸ **	۵۶/۹۵ **	۱۷/۲۰ **	۵۴/۱۹ **	۴/۸۴ *	۶/۹۶ **
رقم × تنش	۲	۳۱/۴۲ **	۲۸/۱۳ **	۱/۶۶ **	۱۶/۰۹ **	۱/۹۱ *	۲/۰۲ *
رقم × هورمون	۶	۷/۷۴ **	۸/۱۱ **	۲/۷۱ **	۳/۹۷ **	۱/۱۵ ^{ns}	۱/۹۶ **
هورمون × تنش	۳	۱۴/۲۲ **	۲/۷۶ *	۱/۹۰ **	۲/۳۱ **	۲/۲۸ *	۱/۸۶ *
رقم × تنش × هورمون	۶	۸/۱۲ **	۳/۷۴ **	۲/۶۲ **	۲/۷۰ **	۲/۹۰ *	۲/۰۵ **
خطا	۷۲	۰/۳۶۲	۰/۰۵۱	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 آبسزیک اسید درونی باعث بهبود شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و فتوسنتزی در ارقام گیاهان گندم (Ogwen *et al.*, 2008) گوجه فرنگی (Shahbaz *et al.*, 2008) و خیار (Xia *et al.*, 2009) شده است. افزایش معنی‌دار هورمون آبسزیک اسید درونی در کارهای مشابه و

بررسی انجام گرفته را می توان به فرا دست بودن براسینواستروئیدها بر مسیرهای ساخت و عملکردی آبسازیک اسید درونی نسبت داد (Yuan *et al.*, 2010). علی رغم عدم تغییر معنی دار سطح آبسازیک اسید درونی در تیمار کاربرد خارجی سیتوکینین در پژوهش انجام شده، اغلب مطالعات یک ارتباط خطی منفی بین تغییرات مقدار سیتوکینین ها و آبسازیک اسید را نشان داده به خصوص اینکه افزایش آبسازیک اسید درونی سبب کاهش میزان سیتوکینین ها به ویژه در شرایط بروز تنش هایی مانند خشکی، شوری یا سرما گردیده است. اگرچه سیتوکینین ها با اثر بر باز شدن روزنه ها و کاستن عملکرد آبسازیک اسید به ویژه در مسیر کانال های یونی، اثر بر پمپ های پروتونی الکتروژنیک و فعالیت آدنیلات سیکلاز باعث افزایش تعرق و کاهش پتانسیل آب می شوند، با این حال تا حدودی سبب رونق نرخ فتوسنتز نیز می شوند (Pospisilova *et al.*, 2005).



شکل ۱: اثر تیمارهای فاقد هورمون و هورمونی کینتین، ۲۴-اپی براسینولید و برهمکنش کینتین و ۲۴-اپی براسینولید بر

سطح آبسازیک اسید درونی برگ پرچم در شرایط بدون تنش و بروز تنش خشکی

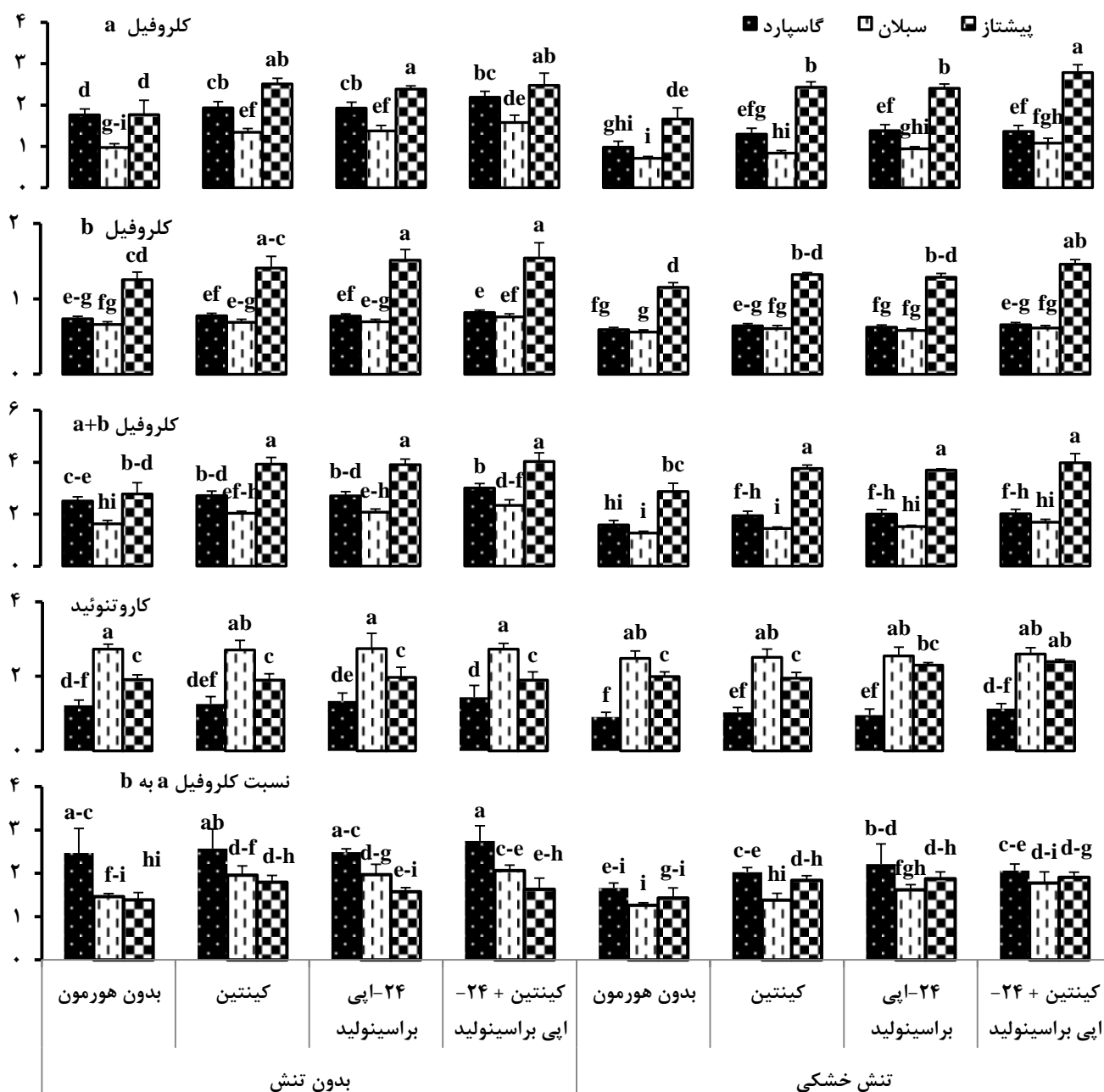
مقادیر میانگین \pm انحراف استاندارد است. بر اساس آزمون دانکن، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح $P \leq 0/05$ است.

تغییرات مقدار رنگیزه ها

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

کاروتنوئید معنی دار بود (جدول ۲). در ظرفیت زراعی ۵۰ درصد، کاهش معنی دار مقدار کلروفیل a تنها در رقم حساس به میزان ۴۴/۳۱ درصد مشاهده شد. با این حال تنش خشکی منجر به تغییر معنی دار محتوای کلروفیل b در هیچ کدام از ارقام مورد مطالعه نگردید. همچنین در ظرفیت زراعی ۵۰ درصد 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 معنی داری نشان دادند. نتایج به دست آمده، تغییر معنی دار مقدار کاروتنوئید 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 آمینولولونیک 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 ناپایداری 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 معنی دار مقدار کاروتنوئید، 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 براسینواستروئید بر افزایش محتوای رنگیزه در سلول‌های جلبک *Chlorella vulgaris* (Bajguz and Piotrowska-Niczyporuk, 2014)، اثر براسینواستروئید بر افزایش معنی دار محتوای کلروفیل و کاروتنوئید در خیار (Xia et al., 2009)، افزایش مقدار کاروتنوئید در گوجه فرنگی تحت اثر افزایش بیان فاکتور رونوشت‌برداری BZR1-ID طی کاربرد خارجی براسینواستروئیدها (Morales et al., 2014) و اثر کاربرد خارجی بنزیل آمینوپورین بر روی محتوای کلروفیل و کاروتنوئید دو رقم متحمل (پیشگام) و حساس (MV-17) گندم و با درجه بیشتر در رقم متحمل (Sarafraz-Ardakani et al., 2014) را نشان داد.

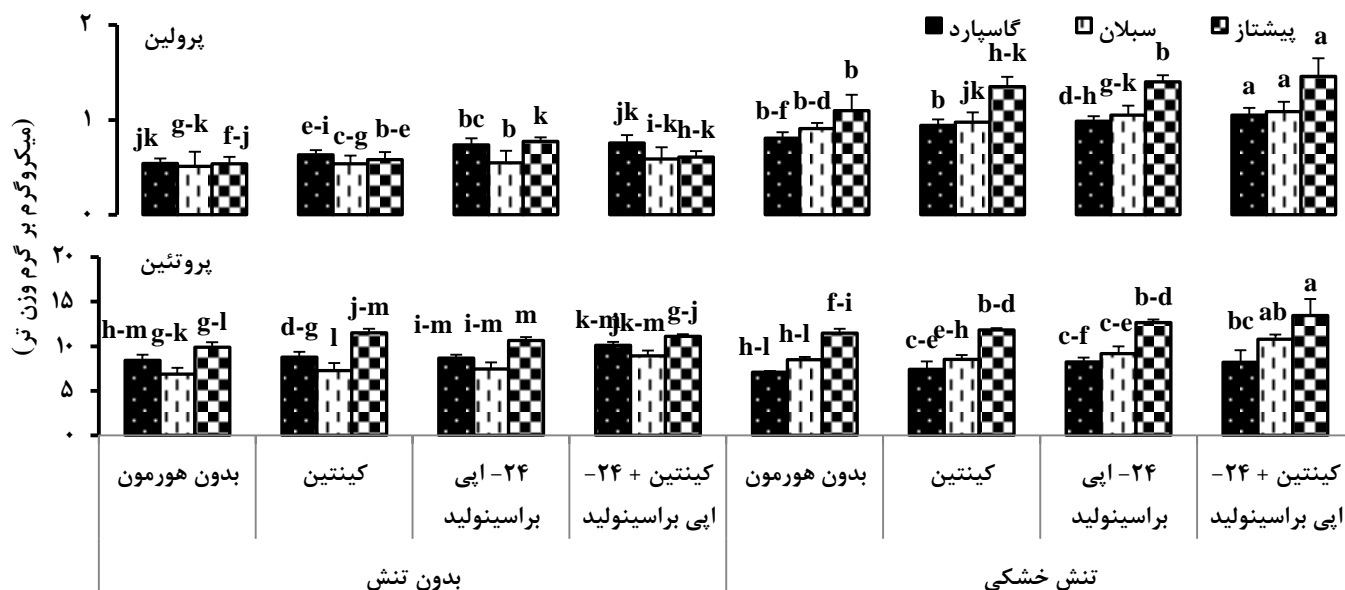


شکل ۲: اثر تیمارهای فاقد هورمون و هورمونی کینتین، ۲۴-اپی براسینولید و برهمکنش کینتین و ۲۴-اپی براسینولید بر سطح کلروفیل a، b، a+b، کاروتنوئید و نسبت کلروفیل a به b برگ پرچم در شرایط بدون تنش و بروز تنش خشکی مقادیر میانگین \pm تکرار \pm انحراف استاندارد است. بر اساس آزمون دانکن، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح $P \leq 0/05$ است.

تغییرات سطح پرولین

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

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 ۲۴-اپی‌براسینولید به میزان ۳۲/۸۰ درصد در رقم متحمل در ظرفیت زراعی ۵۰ درصد مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۳: اثر تیمارهای فاقد هورمون و هورمونی کینتین، ۲۴-اپی براسینولید و برهمکنش کینتین و ۲۴-اپی براسینولید

برمحتوای پرولین و پروتئین برگ پرچم در شرایط بدون تنش و بروز تنش خشکی

مقادیر میانگین ۴ تکرار \pm 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 ۲۴-اپی براسینولید 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

ایزوفورم‌های براسینواستروئید در مسیرهای وابسته و غیروابسته به آبسزیک اسید درونی بر افزایش رونوشت‌های پرولین ۵- کربوکسیلات سنتاز (P₅CS) و آرنتین 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 ۲۴-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). براسینواستروئیدها نیز به مانند آبسزیک اسید و در یک مسیر مشترک و گاهاً 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.

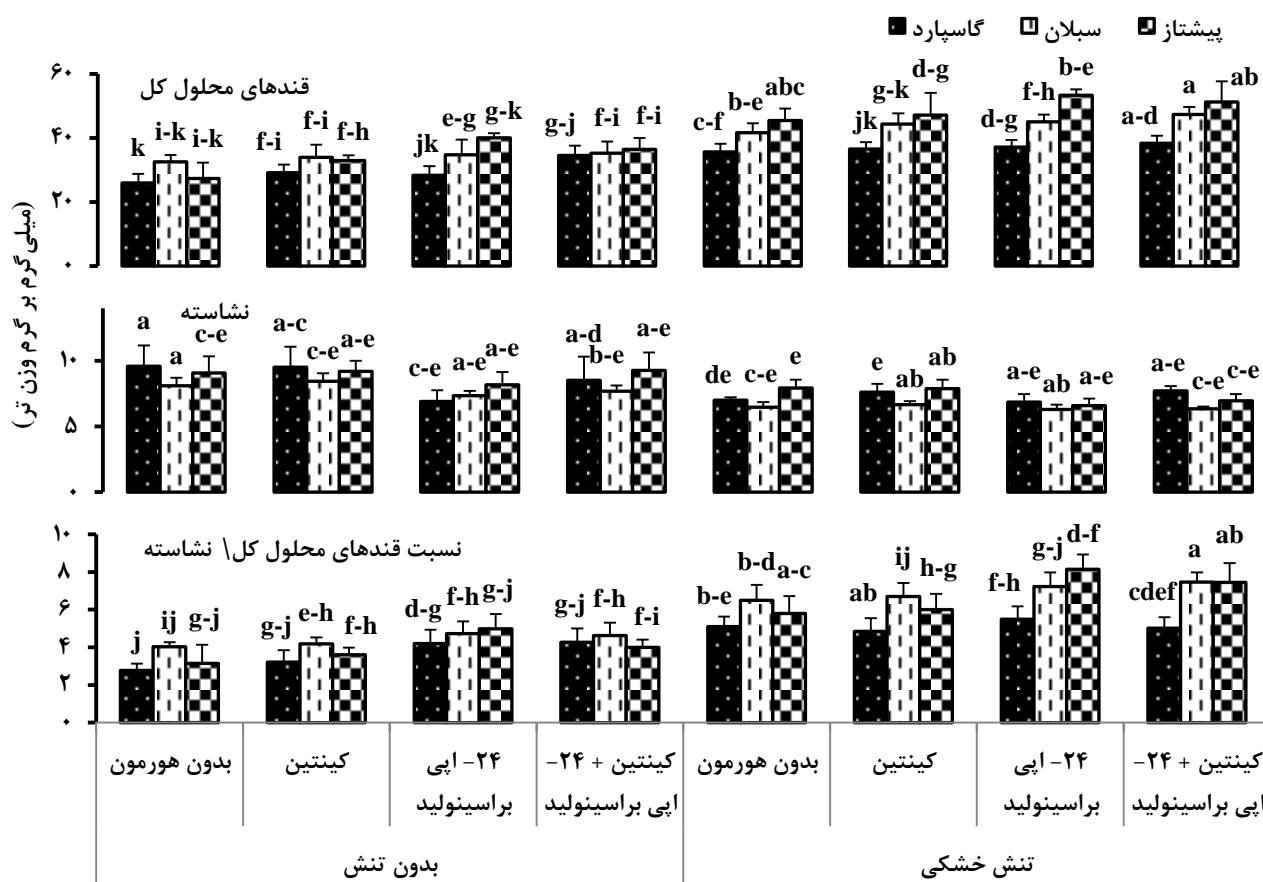
قندهای محلول کل و نشاسته

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 مسیره‌های ترانسانی 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 ۲۴- 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 کل در رقم متحمل در شرایط کاربرد ۲۴- اپی‌براسینولید و بروز خشکی ۱۷/۳۴ درصد بود. همچنین ۲۴- 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 ۲۴- اپی‌براسینولید باعث بیشترین افزایش معنی‌دار این نسبت در رقم متحمل طی بروز خشکی شد (شکل ۴). در تایید نتایج به‌دست آمده، افزایش هیدرولیز نشاسته توأم با افزایش قندهای ساده محلول و احیاء کننده تحت اسپری براسینواستروئید 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 ژنوتیپ 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

تاثیر گذار بودند (جدول ۳). نتایج به دست آمده کاهش معنی دار 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 ۲۴-اپی براسینولید باعث بیشترین افزایش معنی دار (۲۸/۴۲ درصد) وزن هزار دانه گردید (شکل ۵). افت میزان محصول و شاخص های مربوطه نظیر وزن هزار دانه و عملکرد دانه در ارقام زراعی حساس ناشی از افزایش شاخص های تنش اکسیداتیو و آسیب جدی دستگاه فتوسنتزی و بنابراین نزول متابولیسم کربوهیدرات ها برآورد گردیده است (Valliyyodan and Nguyen, 2006).

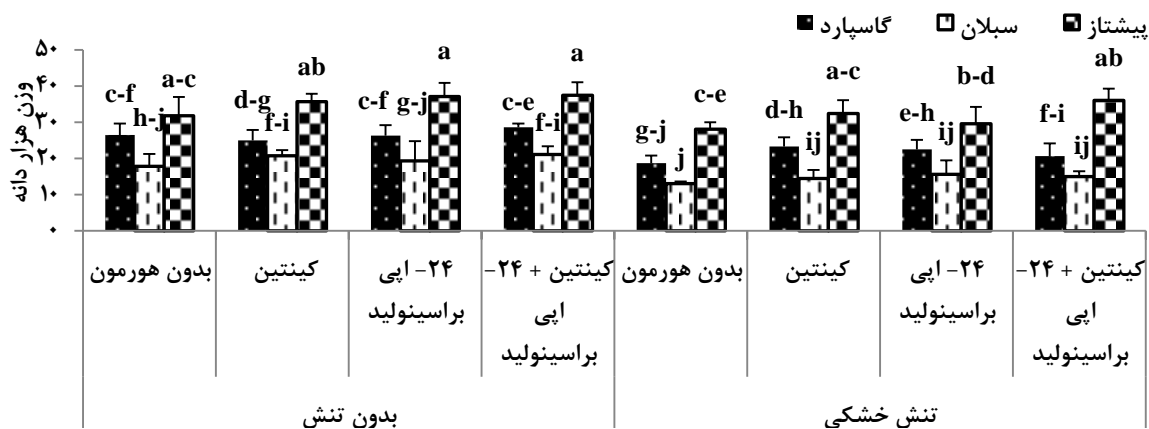


شکل ۴: اثر تیمارهای فاقد هورمون و هورمونی کینتین، ۲۴-اپی براسینولید و برهمکنش کینتین و ۲۴-اپی براسینولید بر محتوای قند محلول کل، نشاسته و نسبت قند محلول کل/نشاسته برگ پرچم در شرایط بدون تنش و بروز تنش خشکی

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

به طور کلی هورمون های گیاهی در تعیین دانه بندی غلات و تامین مخزن کربوهیدراتی دخالت دارند. سیتوکینین ها با افزایش قدرت مخزن و تسریع نمودن تقسیم سلول ها در مخزن و در نتیجه افزایش پتانسیل مخزن عامل افزایش وزن دانه ها هستند (Yang, 2015). همچنین در یک بررسی نشان داده شده است که افزایش سرعت پر شدن دانه و کوتاه

شدن دوره آن به طور نزدیکی مرتبط با افزایش سطح آبسزیک اسید درونی در دانه های تنش دیده با آب است (Farooq *et al.*, 2014). بنابراین تیمار ۲۴- اپی براسینولید می تواند با اثر بر افزایش سطح آبسزیک 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 به وسیله 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، ۲۴-اپی براسینولید و برهمکنش کینتین و ۲۴-اپی براسینولید بر وزن هزاردانه در شرایط بدون تنش و بروز تنش خشکی

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

نتیجه گیری

در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که تنش خشکی آسیب بیشتری به شاخص های رنگیزه های 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 رنگیزه های خود و مقدار قندهای محلول کل و پرولین و در نتیجه بهبود مکانیسم های مقاومتی نظیر افزایش حفاظت اسمزی توانست عملکرد وزن هزار دانه خود را بهبود بخشد. تیمار برهمکنشی کینتین و ۲۴-اپی براسینولید اثر بیشتری از تیمارهای انفرادی کینتین و ۲۴-اپی براسینولید بر تحمل به خشکی ایجاد کرد. با این حال به نظر می آید در بین دو تیمار مورد مطالعه، تیمار ۲۴-اپی براسینولید نسبت به تیمار کینتین بواسطه افزایش سطح آبسزیک اسید درونی اثر بیشتری بر بهبود شاخص های بیوشیمیایی و در نتیجه تحمل ارقام مورد مطالعه به تنش خشکی اعمال کرده باشد.

منابع

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

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

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): ۲۳-۳۵.

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.

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.

Ogwen, 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

Ogwen, 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 Biochemistry* 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.

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.

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-epibrassinolide (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-epibrassinolide had the most significant increase in intrinsic abscisic acid and soluble sugars / starch ratios, and the interaction of Kinetin and 24-epibrassinolide 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-epibrassinolide 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.