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

محمدرضا سرافراز اردکانی*[1]

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه یزد، یزد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۰۴، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۱۲/۱۳)

چکیده

برهمکنش هورمون‌ها نقش مهمی در تعادل گیاه با محیط به‌ویژه در مواجهه با تنش‌ها در هر دو مرحله رویشی و زایشی بازی می‌کند. بدین منظور آزمایشی به صورت برهمکنش تیمارهای انفرادی و مضاعف هورمون‌های کینتین و ۲۴-اپی‌براسینواستروئید با دو سطح آبیاری به صورت اعمال ظرفیت‌های زراعی ۱۰۰٪ (کنترل) و ۵۰٪ (تنش خشکی) از شروع مرحله گرده افشانی در سه رقم گندم متحمل (پیشتاز)، نیمه‌متحمل (سبلان) و حساس (گاسپارد) به خشکی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٤ تکرار در گلخانه طراحی شد. سپس میزان وزن تر و خشک و محتوای نسبی آب، آبسیزیک اسید، پراکسید هیدروژن و مالون‌دی‌آلدئید و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز برگ‌های پرچم در مرحله بعد از گرده‌افشانی بررسی و مقایسه شدند. طی بروز خشکی، میزان وزن تر و خشک و محتوای نسبی آب به‌ویژه در رقم گاسپارد کاهش معنی‌داری یافت. تحت تنش خشکی سطح آبسیزیک‌اسید درونی به‌ویژه در رقم مقاوم افزایش نشان داد. ۲۴-اپی‌براسینواستروئید مؤثرترین تیمار در افزایش وزن تر و خشک، بازیابی محتوای نسبی آب و افزایش سطح درونی آبسیزیک‌اسید برگ پرچم طی بروز خشکی به‌ویژه در رقم متحمل بود. تنش خشکی به صورت معنی‌داری سبب افزایش بیشتر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز در رقم پیشتاز نسبت به ارقام گاسپارد و سبلان شد. در مقابل تجمع کمتر مقدار پراکسید هیدروژن و مالون‌دی‌آلدئید نیز در رقم متحمل نسبت به دو رقم نیمه‌متحمل و حساس مشاهده شد. علی‌رغم اینکه تیمار انفرادی ۲۴-اپی‌براسینواستروئید مؤثرترین تیمار در افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مورد بررسی بود، ترکیب کینتین و ۲۴-اپی‌براسینواستروئید باعث بیشترین کاهش شاخص‌های تنش اکسیداتیو گردید. در یک نتیجه‌گیری کلی، رقم پیشتاز نسبت به ارقام سبلان و گاسپارد منفعت بیشتری از تیمارهای هورمونی در جهت افزایش کارایی آنتی‌اکسیدانی طی بروز تنش خشکی جست.

کلمات کلیدی: آبسیزیک‌اسید، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ۲۴-اپی‌براسینواستروئید، تنش اکسیداتیو، کینتین، گندم

مقدمه

در بین تمام تنش‌های غیرزیستی شناخته شده، خشکی مهمترین عامل محدود کننده رشد و تولید گیاهان زراعی در جهان است که آثار زیانباری را بویژه در مرحله زایشی به بار می‌آورد (Chaves *et al*., 2003). گندم (*Triticum aestivum* L.) به عنوان یک محصول زراعی مهم که عمدتاً در شرایط خشک و نیمه‌خشک کشت می‌شود، همواره تحت تأثیر این تنش قرار دارد که در مرحله شروع سنبله رفتن به این تنش

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: sarafraz.ardakani@yazd.ac.ir

بسیار حساس است (Caruso *et al*., 2009). این گیاه به علت دارا بودن ژنوتیپ‌های متعدد شناخته شده با درجات مختلف حساسیت به خشکی، یک سیستم مطالعه جذاب برای مطالعه این تنش به حساب می‌آید (Khanna-Chop and Selote, 2007). به مانند تمام تنش‌های غیرزیستی، یکی از مهمترین آثار تنش خشکی، برهم زدن تعادل مابین سیستم آنتی‌اکسیدانی و گونه های فعال اکسیژن در گیاه است. اگرچه حضور گونه‌های فعال اکسیژنی برای به راه انداختن واکنش‌های ترارسانی علامت در سطح درون و بین سلولی لازم است، اما تولید بیش از حد آنها باعث باعث تخریب سطوح مختلف ساختاری می‌گردد(Tange *et al*., 2010). بنابراین سیستم آنتی‌اکسیدانی مشتمل بر دو بازوی آنزیمی و غیرآنزیمی با تعدیل مقدار گونه‌های فعال اکسیژن سبب کاهش این خسارت‌ها می‌شود که بویژه در مرحله زایشی یک تهدید جدی برای محصول‌دهی می‌باشند(Guo *et al*., 2009). بدیهی است تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی با تیمارهای خارجی یا القائات درونی در همین راستا می‌باشد. کاربرد تنظیم کننده‌های رشد به صورت تیمارهای خارجی به عنوان یک راهکار مؤثر رو به رشد در جهت افزایش کارایی آنتی‌اکسیدانی، تولید و نیز افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاهان زراعی و دارویی در مرحله زایشی مورد توجه قرار گرفته است(Ghassemian *et al*., 2008). همچنین برهمکنش بین هورمون‌ها یک چالش مهم برای ارتباط بهتر گیاه با شرایط محیطی از جمله تنش‌ها می‌باشد. برهمکنش این هورمون‌ها با عملکردهای موافق یا متضاد در مسیرهای ترارسانی علامت نزدیک و دور از یکدیگر، یک چالش مهم برای ارتباط بهتر گیاه با شرایط محیطی از جمله تنش‌ها می‌باشد(Munné-Bosch and Muller, 2013). احتمالاً نقطه مشترک مسیر ترارسانی علامت اکثر هورمون‌ها برای آماده‌سازی گیاه برای مقابله تنش‌های محیطی از جمله خشکی، آبسیزیک‌اسید است(Kundua and Gantait, 2107). در بین هورمون‌های گیاهی، براسینواستروئیدها گروهی از هورمون‌های استرایولی هستند که از لحاظ ساختاری با هورمون‌های استروئیدی حشرات و حیوانات مرتبط هستند. این گروه از هورمون‌ها دارای نقش‌های وسیعی در فرآیندهای فیزیولوژیک و تکوینی شامل تقسیم و بزرگ شدن سلول، فتومورفوژنز، تمایززدایی چوب، رویش دانه و رسیدگی میوه می‌باشد. مطالعات متعدد نشان می‌دهد که براسینواستروئیدها قادرند توانایی گیاهان برای مقابله با تنش‌ها از جمله فلزات سنگین، تنش‌های آبی، شوری، دمای بالا و پایین و البته تنش‌های زیستی مانند پاتوژن‌ها را بهبود بخشند که البته یک اصل کلی در تمام موارد مورد مطالعه نبوده است(Bajguz and Hayat, 2009; Hayat *et al*., 2010; Vardhini, 2017). نتایج Farooq و همکاران (۲۰۰۹) تأثیر کاربرد خارجی براسینواستروئیدها بر بهبود بازیافت محتوای نسبی آب برگ، همانندسازی بیشتر CO_2 را نشان داد. مطالعات انجام شده توسط Yuan و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد که کاربرد خارجی براسینواستروئید باعث کاهش خسارت‌های اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی به موازات افزایش مقاومت آنتی‌اکسیدانی در گیاهان گوجه فرنگی(Yuan *et al*., 2010) و نیز چرخه آسکوربات–گلوتاتیون در ذرت(Talaat *et al*., 2015) شده است. مکانیسمی که بوسیله آن براسینواستروئیدها، پاسخ‌های تنشی و بیان این ژن‌ها در گیاهان را کنترل می‌کند تا حدی ناشناخته است و البته کاربرد خارجی این هورمون در گیاهان مختلف تأثیرات متفاوتی داشته است(Acharya and Assmann, 2009). یک مکانیسم پیشنهادی مهم این است که براسینواستروئیدها پاسخ‌های تنشی گیاهان را بواسطه ارتباط چلیپایی با دیگر هورمون‌ها بویژه آبسیزیک اسید، اتیلن و سالسیلیک اسید تنظیم می‌کنند(Divi *et al*., 2010). با اینحال ارتباط چلیپایی این هورمون با سیتوکینین‌ها بویژه در مواجهه با تنش‌ها به صورت یک مسئله مجهول باقی مانده است(Bajguze *et al*., 2014). سیتوکینین‌ها علی‌رغم برخی تشابهات کارکردی با براسینواستروئیدها در جنبه‌های تکوینی مانند رشد و تقسیم سلول‌ها و البته تهییج دستگاه آنتی‌اکسیدانی در تنش‌های غیرزیستی، به مانند براسینواستروئیدها وآبسیزیک‌اسید به عنوان یک هورمون شاخص برای مواجهه با تنش‌های محیطی از جمله خشکی شناخته نمی‌شوند. تحقیقات

نشان داده است که در بسیاری از موارد سطح این هورمون در تنش‌های غیرزیستی مانند کم آبی نزول نیز کرده است(Merewitz*et al.*, 2011). با اینحال استفاده از تکنیک‌های مولکولی جهت افزایش سطح درونی این هورمون‌ها و نیز کاربرد خارجی آنها باعث ایجاد شرایط بهتر گیاه برای تحمل آثار تنش شده است(Xu *et al.*, 2010; Merewits *et al.*, 2010; Pleg *et al.*, 2011). در بررسی‌هایی که در مورد ارتباط این دو هورمون انجام شده، افزایش سطح چند نمونه از سیتوکینین‌های درونی تحت تیمار خارجی براسینواستروئید (٢٤-اپی‌براسینولید) در دانه رست‌های گندم مشاهده گردید(Yuldashev *et al.*, 2012). نتایج Bajguz و همکاران (٢٠١٤) تأثیر برهمکنشی مؤثر تیمار ترکیبی برخی از انواع هورمون‌های براسینواستروئید و سیتوکینین را بر محتوای رنگیزه و پروتئین‌ها در جلبک سبز کلرلا را نشان داد. همچنین Fariduddin و همکاران (٢٠٠٤) تأثیر برهمکنشی ٢٤-اپی‌براسینواستروئید و کینتین را بر فتوسنتز، متابولیسم نیتروژن و عملکرد دانه گیاه *Vigna radiate* بررسی کردند. بنابراین با توجه به عملکرد نزدیک آنها در رشد و تکوین گیاه، علی رغم تفاوت مسیرهای عملکردی بویژه در شرایط تنشی، در بررسی انجام گرفته، تأثیر انفرادی و برهمکنش هورمون‌های براسینواستروئید (٢٤-اپی‌براسینواستروئید) و سیتوکینین (کینتین) بر مقاومت آنتی‌اکسیدانی سه رقم گندم متحمل (پیشتاز)، نیمه‌متحمل (سبلان) و حساس (گاسپارد) به تنش خشکی طی شرایط بروز خشکی در مرحله پس از گرده افشانی (پر شدن دانه) به صورت مقایسه‌ای مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در قالب یک طرح پژوهشی در مهرماه سال ١٣٩٥ در گروه زیست‌شناسی دانشگاه یزد شروع و تهیه و آنالیز نتایج تا اوایل فروردین ماه سال ١٣٩٦ به طول انجامید. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ٢٠ سانتیمتر و ارتفاع ٢٥ سانتیمتر حاوی ٣ کیلوگرم خاک شامل ترکیبی از خاک مزرعه و خاک‌برگ با نسبت ٤ به ١ انجام شد. بذرهای ٣ رقم گندم شامل گاسپارد (رقم حساس)، سبلان (رقم نیمه‌متحمل) و پیشتاز (رقم متحمل) از مؤسسه پاکان بذر اصفهان تهیه و به تعداد ٥ عدد در هر گلدان کاشته و بلافاصله آبیاری گردیدند. دو هفته بعد از شروع گرده‌افشانی (آغاز هفته سوم) در حالیکه رطوبت گلدان‌های تیمار شاهد در محدوده ظرفیت زراعی ١٠٠٪ نگه داشته شدند، تیمارهای خشکی شامل ٥٠ درصد ظرفیت زراعی برای برخی از گلدان‌ها اعمال شدند. مدت اعمال تیمار ٤ هفته به طول انجامید. برای کاربرد تیمارهای هورمونی، ابتدا سیتوکینین (کینتین ١٠٠ μM) و در ادامه تیمار ٢٤-اپی‌براسینواستروئید (١μM) به مقدار کافی بر روی برگ‌ها پاشیده شد (غلظت‌های هورمونی بهینه در محیط گلخانه بین انواع غلظت‌ها انتخاب شده بود). تیمار کنترل هورمونی محلول اتانول در آب دو بار تقطیر بود. کاربرد خارجی تیمار کینتین از شروع هفته دوم بعد از گرده افشانی و تیمار ٢٤-اپی‌براسینواستروئیداز شروع هفته چهارم بعد از گرده افشانی بود. برداشت‌های چهارم و پنجم (انتهای هفته چهارم و پنجم بعد از گرده‌افشانی) کامل‌ترین برداشت‌ها از لحاظ اندازه‌گیری و آنالیزها بودند. جهت نمونه‌برداری، برگ‌های پرچم در هر تکرار جدا گردید و بلافاصله در فویل‌های آلومینیومی پیچیده شد و به دمای ٢٠- درجه سانتیگراد منتقل گردیدند.

وزن تر (FW)، وزن خشک (DW) و محتوای نسبی آب برگ (LRWC): برای این منظور وزن تر برگ‌های پرچم (FW) در تیمارهای مختلف، توسط ترازوی دیجیتالی با دقت ٠/٠٠٠١ گرم اندازه گیری شد. سپس برگ‌های پرچم به مدت ٤ ساعت در ظروف آب مقطر در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند و پس از خشک کردن آنها با دستمال کاغذی، وزن آنها برای تعیین وزن حالت تورژسانس کامل(TW) اندازه گیری شد. بعد از این مرحله برگ‌های پرچم به مدت ٤٨ ساعت در آون با دمای ٦٥ درجه سانتیگراد قرار داده شد و سپس وزن خشک برگ‌های پرچم (DW) توسط ترازوی دیجیتالی تعیین گردید. محتوای نسبی آب برگ‌های پرچم با استفاده از فرمول

زیر تعیین گردید (Turner, 1981):

$$LRWC\ (\%) = [(F.W - D.W) / (T.W - D.W)] \times 100$$

اندازه‌گیری مقدار آبسیزیک‌اسید درونی (ABA): برای اندازه‌گیری مقدار آبسیزیک‌اسید درونی از روشی استفاده شد که سه هورمون ژیبرلیک اسید، ایندول‌استیک اسید و آبسیزیک اسید از یکدیگر جدا و آنالیز شدند. بدین منظور مقدار ۲ گرم از ماده گیاهی تازه برداشته شد و با اضافه کردن ٤٠ میلی‌لیتر محلول استخراج (۰/۲۵ گرم Butylated hydroxytoluene و ۰/۵ گرم سدیم آسکوربات (یا ۰/٤٤ گرم آسکوربیک اسید) در متانول ۹۰٪ با درجه خلوص HPLC حل گردیده و به حجم ۱ لیتر رسانیده شد.) در هاون چینی خرد گردید. نمونه‌ها در محیط تاریک و دمای ٤ درجه سانتیگراد به مدت ١٦ ساعت قرار داده شدند. نمونه‌ها 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 تبخیرکننده گردان (Rotary Flash Evaporation (RFE)) 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 pH 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 توسط هیدروکلریک اسید ۰/۲ نرمال به حدود ۲/۵ رسانده شد 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 ۰/٤۵ عبور داده شد و سپس به ستون HPLC تزریق گردید. اجزای محلول بدست آمده توسط دستگاه HPLC (مدل shambeck) با ستون C_{18} (دتکتور UV، شدت جریان ml/min ۰/۷ و حلال استیک‌اسید ۰/۲٪ و متانول ۱۰۰٪ به نسبت ۵۰:۵۰ در دمای ٤۰ درجه سانتیگراد) جدا گردیدند. مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج ۲٦۰ نانومتر قرائت شد (Kelen *et al*., 2004).

اندازه‌گیری شاخص‌های تنش اکسیداتیو: برای اندازه‌گیری مقدار پراکسید هیدروژن، مقدار ۱ گرم بافت تر گیاهی توسط ۵ میلی لیتر محلول ۰/۱ درصد TCA در حمام یخ ساییده شد، سپس عصاره بدست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد (دستگاه سانتریفوژ Beckman Coulter مدل Allegra – 64R). در مرحله بعدی به ۰/۵ میلی لیتر از محلول حاصل مقدار ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار با (pH۷) و ۱ میلی لیتر پتاسیم یدید۱ مولار اضافه شد. سپس جذب محلول حاصل در طول موج ۳۹۰ نانومتر (اسپکتروفتومتر مدل analytical jena-spekol 1500) خوانده شد و در پایان محتوای پراکسید هیدروژن نمونه‌ها (با ضریب خاموشی $۰/۲۸\ mM^{-1}\ cm^{-1}$) بر اساس میکرو مول پراکسید هیدروژن به ازای گرم وزن تر محاسبه گردید (Velikova *et al*., 2000).

پراکسیداسیون لیپیدی به صورت برآورد مقدار مالون‌دی‌آلدئید (MDA) در هر نمونه تعیین شد. بدین منظور مقدار ۱ گرم نمونه تر برگ پرچم در ۳ میلی‌لیتر محلول ۲۰٪ تری‌کلرواستیک اسید (Trichloroacetic acid) حاوی ۰/۵٪ تیوباربیتوریک اسید (Thiobarbituric acid) هموژنیزه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری قرار داده شد و سپس سریعاً در حمام یخ سرد شد. ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول حاصل در ۱۵۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط سانتریفیوژ شد. مقدار جذب روشناور در طول موج ۵۳۲ nm توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. ضمن آنکه مقدار جذب غیراختصاصی خوانده شده در طول موج ٦۰۰ nm از میزان جذب در ۵۳۲ nm کسر گردید. غلظت MDA با استفاده ازضریب خاموشی $Mm^{-1}cm^{-1}$ ۱۵۵ محاسبه گردید (Heath and Packer, 1968).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: برای تهیه عصاره آنزیمی، ابتدا ۱ گرم بافت برگی در هاون چینی با اضافه نمودن نیتروژن مایع خرد شد. به بافت خرد شده، ۱۰۰ میلی‌گرم پلی وینیل پیرولیدون (PVP) اضافه نموده و مجدداً

سائیده شد. به مخلوط حاصل ٣ میلی‌لیتر بافر استخراج شامل فسفات پتاسیم (pH٧ ، ٥٠ mM) و سدیم متابای‌سولفیت (mM ١ ,Sodium Metabisulfite) اضافه گردید. پس از اینکه نمونه‌ها به خوبی سائیده شدند، عصاره‌های گیاهی در rpm ١٥٠٠٠ و دمای ٤°C به مدت ٣٠ دقیقه سانتریفوژ شدند. فاز شفاف بالایی جدا و ١٠٥٠ میکرولیتر از آن با ٣٥٠ میکرولیتر گلیسرول ٥٠٪ (v/v) مخلوط شد، به طوریکه غلظت نهایی گلیسرول خالص در عصاره آنزیمی به ١٢/٥٪ رسید و بعد از انجماد در نیتروژن مایع به فریزر با دمای ٨٠°C- منتقل شد. همه مراحل تهیه عصاره آنزیمی در دمای ٤°C صورت گرفت (Rao *et al*., 1996).

جهت سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، مخلوط واکنشی شامل متیونین (١٣ mM)، نیتروبلوتترازولیوم (NBT- ٧٥µM)، EDTA (٠/١mM)، ریبوفلاوین (٢ µM) و سیانید پتاسیم (KCN- ٢٠ µM) در ٣ میلی‌لیتر بافرفسفات (pH٧، ٥٠ mM) حل شد. نمونه کنترل که شامل مخلوط تهیه شده به جز عصاره آنزیمی بود تحت تابش دو لامپ فلورسنت ٢٠ وات به مدت ١٥ دقیقه قرار گرفت. سپس جذب نمونه‌ها در ٥٦٠ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (دستگاه اسپکتروفتومتر Analytical مدل) خوانده شد. برای قرائت نمونه مجهول، مقدار١ میلی‌لیتر عصاره به ٣ میلی‌لیتر مخلوط واکنش اضافه شد. از محلول نور ندیده به عنوان بلانک برای صفر کردن دستگاه استفاده شد. همچنین محلول تحت نور و فاقد آنزیم به عنوان شاهد استفاده شد و از جذب نمونه‌ها کسر شد. در نهایت مقدار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر حسب تغییرات جذب به ازای میلی‌گرم پروتئین (mg^{-1} proteinunit) محاسبه گردید. یک واحد آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز، مقداری از عصاره است که باعث ٥٠٪ ممانعت نرخ کاهیدگی NBT می‌شود (Beauchamp and Fridovich., 1971).

١ میلی‌لیتر محلول واکنش مورد نیاز برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز شامل بافر فسفات پتاسیم ٥٠ میلی مولار با (pH٧) حاوی پراکسید هیدروژن ٠/١ میلی مولار و ٠/٥ میلی مولار آسکوربات بود که مقدار ٢٠٠ میکرولیتر عصاره آنزیم نیز به آن اضافه شد و کاهش جذب محلول، مادامیکه آسکوربات (با ضریب خاموشی $2/8\ mM^{-1}\ cm^{-1}$) اکسید گردید، به مدت ١ دقیقه در٢٩٠نانومتر خوانده شد. در نهایت میزان فعالیت آنزیم بر حسب میکرومول آسکوربات اکسید شده به ازای میلی‌گرم پروتئین در ١ دقیقه محاسبه شد (Nakano and Asada, 1987).

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز، ٢/٦ میلی‌لیتر مخلوط واکنشی شامل بافر فسفات پتاسیم ٥٠ میلی مولار با (pH٧) حاوی ٠/٤ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ١٥ میلی مولار آماده شد که مقدار ٤٠ میکرولیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه شد و کاهش جذب محلول در ٢٤٠ نانومتر خوانده شد. واکنش با افزودن پراکسید هیدروژن آغاز شد و کاهش جذب به مدت ٣٠ ثانیه اندازه گیری شد. در نهایت میزان فعالیت آنزیمی بر حسب میکرو مول پراکسید هیدروژن مصرف شده (با ضریب خاموشی $39/4\ mM^{-1}\ cm^{-1}$) در دقیقه به ازای گرم پروتئین محاسبه گردید (Aebi, 1984).

آنالیز آماری: پس از جمع‌آوری داده‌ها، به منظور بررسی نرمال بودن و همگن بودن داده‌های کمی، به ترتیب از آزمون های کولموگروف-اسمیرنوف و لون استفاده شد. آنالیز آماری داده‌ها بوسیله آزمون تجزیه واریانس (ANOVA) و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan's Multiple Range) در سطح معنی داری ٥٪ (P-Values ≤0.05) استفاده شد.

نتایج

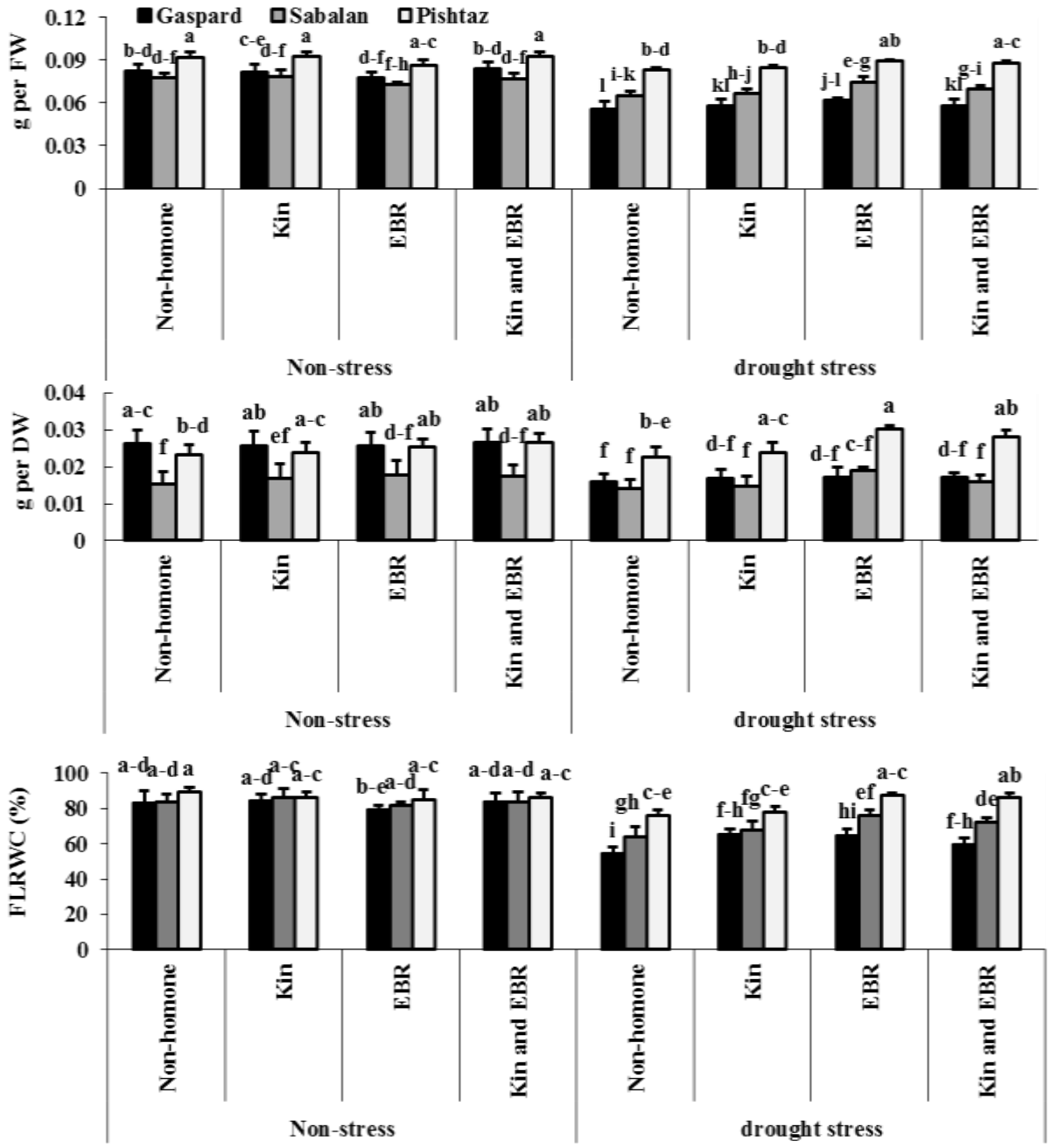
وزن تر (FW) و خشک(DW) و محتوای نسبی آب برگ پرچم(**FLRWC**): وزن تر برگ‌های پرچم در هر سه رقم و بویژه گاسپارد (رقم حساس) طی بروز تنش خشکی به صورت معنی‌داری کاهش یافت در حالیکه وزن خشک و متعاقباً محتوای نسبی آب برگ پرچم تنها در دو رقم گاسپارد و سبلان تحت ظرفیت زراعی ٥٠٪ به صورت معنی‌داری کاهش پیدا کرد که این کاهش در رقم حساس (گاسپارد-٣٩/٦٩٪ کاهش

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس تیمارهای فاقد هورمون (Non) و هورمونیکینتین (Kin)، ۲۴-اپی‌براسینواستروئید (EBR) و ترکیب کینتین و ۲۴-اپی‌براسینواستروئید (Kin/EBR) بر محتوای نسبی آب (RWC)، مقدار آبسیزیک‌اسید درونی (ABA)، شاخص‌های تنش اکسیداتو (MDA و H_2O_2) و آنتی‌اکسیدانی (فعالیت آنزیم‌های CAT و SOD, APX) برگ پرچم درسه رقم متحمل (پیشتاز- Pishtaz)، نیمه‌متحمل (سبلان- Sabalan) و حساس (گاسپارد- Gaspard) گندم در ظرفیت‌های زراعی ۱۰۰٪ (بدون تنش) و ۵۰٪ (بروز تنش خشکی) طی گذشت ۲۸ روز از گرده‌افشانی.

منابع بلوک	درجه آزادی	FW	DW	RWC	ABA	H_2O_2	MDA	SOD	APX	CAT
R	MS	۱/۱۳۲E-۵	۷/۸۴۷E-۵	۳۳	۱۱۷/۷۸۵	۰/۰۲۱	۰/۰۰۹	۱۲۰۸/۳۰۷	۱۲۷/۰۰۷	۹/۸۵۱ E-۵
	F	۰/۳۳۳۴ ns	۰/۰۰۰۰ ns	۰/۳۳ ns	۹۳/۱۵۲ *	۱۳/۵۴۲ *	۵۰/۳۶۴ *	۱۲۰۸/۰۶۵*	۶۲/۷۱۹*	۲/۹۴۹ns
H	MS	۲/۰۹۵E-۵	۵/۴۷۳E-۵	۱۲	۷۱/۰۲۸	۰/۰۲۸	۰/۰۰۷	۱۲۶/۲۸۴	۶۳/۴۱۷	۰/۰۰۳
	F	۰/۳۳۳۰ ns	۰/۰۰۰۰ ns	۰/۳۳۳۳ ns	۶/۷۲۱ ns	۳۰/۲۶۷*	۴۹/۳۵۰*	۷۵/۵۹۵*	۶۴/۳۱۶*	۰/۳۷۵ns
CV	MS	۰/۰۳	۰/۰۱	۱۲۲۲/۰۷۳	۵	۰/۰۵۶	۰/۰۲۸	۸/۰۰۰	۰/۰۰۵	۰/۰۰۹
	F	۰/۴۲۸۵ ns	۱/۰۰۰۰ns	۰/۵ ns	۰/۵ ns	۵/۰۷۵ ns	۷۸/۵۰۹*	۰/۴۷۰۶ ns	۰/۵۵۵۵ns	۰/۵۲۳۴ns
S	MS	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰	۴۲۹۳/۷۶۶	۵۱/۰۸۴	۰/۰۲۸	۸/۰۰۵	۱۲۷/۰۰۰	۲۲/۴۵۵	۰/۰۱۷
	F	۱/۰۰۷۹ns	۰/۰۰۰۰ ns	۱/۳۰۳۳ ns	۷۵/۲۵۵*	۵۰/۶۲۵ *	۴۱/۵۰۹*	۱۲۴/۰۰۹*	۴۱/۷۶۳۵*	۱/۴۵۱ns
R×H	MS	۴/۰۷۶E-۶	۳/۹۷۶E-۶	۱۰/۰۰۶	۱۲۸۵/۴۲	۰/۰۰۷	۰/۰۰۹	۱۳۱۲/۵۶۹	۱۳۱/۰۲۹	۰/۰۴۵
	F	۰/۱۱۱۱ ns	۱۲۱/۴۵۱ *	۷/۱۰۷۵ ns	۹۹/۱۰ *	۰/۱۱۸۶ ns	۰/۱۳۹۶ ns	۱۲۸۴/۲۱۵*	۱۳۳/۱۳۹*	۲/۹۴۹ns
R×CV	MS	۷/۰۷۱E-۶	۵/۵۸۱E-۵	۱۴/۱۱۰۶	۱۲۷/۸۵	۰/۰۰۷	۷/۰۱۰	۰/۴۲۹	۹۱/۰۰۷	۵/۳۷۶ E-۵
	F	۰/۰۰۰۰ ns	۱۹۵/۹۵۰ *	۸۱/۱۳۵۲ *	۴۸/۳۶۵*	۲۵/۵۰۶*	۴۸/۱۶۶*	۵۵/۲۷۳*	۱۱۰/۱۰۶*	۱/۴۱۱۹ns
R×S	MS	۷/۹۲۲E-۶	۵/۹۹۲E-۵	۳۴/۳۵۲۶	۸۴/۷۵	۰/۰۰۹	۲۸/۰۰۹	۸/۳۲۸	۸۶/۰۲۲	۰/۱۱۹
	F	۰/۰۰۰۰ ns	۱۴۰/۰۰۶ *	۶۵/۹۴۵۵ *	۵۶/۱۸۵ *	۰/۳۳۳۳ ns	۵۳/۰۰۵*	۶۰/۲۲۱*	۶۷/۱۷۶۹*	۲/۹۴۹ns
H×CV	MS	۲/۵۶۶E-۶	۸/۳۲۵E-۶	۲۵/۱۲۸۵	۱۰۰/۳۵	۰/۰۰۲	۱۹/۱۰۸	۱/۰۶۷	۵۰/۰۲۵	۰/۱۱۷
	F	۰/۱۶۶۶	۰/۱۶۶۶ ns	۵۱/۱۴۲۵ *	۶۶/۳۰۹ *	۰/۱۶۶۶ ns	۸۸/۵۱۱*	۰/۱۷۷۸ns	۸/۱۴۹ns	۲۳/۱۲۸*
H×S	MS	۰/۰۰۰	۱/۰۸۳E-۵	۲۳۳/۷۰۴۵	۱۹۵/۴۲۵	۰/۰۸۷	۹/۰۱۷	۱۱۹/۰۶۵	۶۱/۰۱۰	۰/۱۱۶
	F	۰/۰۰۰۰ ns	۰/۳۳۳۳	۴۱/۱۱۶۴ *	۹۰/۹۴۵ *	۸۹/۱۵۵*	۸۹/۱۱۵*	۱۴۱/۲۳۹*	۸۲/۱۴۲۹*	۲۹/۶۱۸*
CV×S	MS	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰ ns	۵۱۹/۴۰۱۷	۱۲۷/۳۷۹	۰/۸۵۱	۱۱۹/۱۱۶	۲۱/۰۷۵	۱۱۷/۰۳۵	۰/۰۴۰
	F	۰/۰۵ ns	۰/۰۰۰۰ ns	۵۵/۴۹۹۵ *	۸۷/۱۰۶ *	۲۵/۵۰۶*	۴۸/۵۴۵*	۱۱۱/۶۹۰*	۱۳۴/۵۲۹۱*	۲۳/۱۲۹ns
R×H×CV	MS	۳/۵۹۶E-۶	۳/۰۹۸E-۶	۴۵/۰۱۳	۱۶۴/۶۵۵	۰/۰۰۸	۶۹/۲۸۸۸	۱۶۲۴/۵۲۸	۴۲/۱۲۸	۰/۰۱۹
	F	۰/۰۵۵۵ ns	۰/۰۵۵۵ ns	۴۵/۰۵۵۵ *	۹۶/۲۷۵ *	۶۳/۳۱۱*	۱۱۰/۲۵*	۱۶۲۹/۴۰۵*	۶۰/۱۱۹*	۳۱/۶۲۶ns
R×H×S	MS	۱/۱۲۷E-۶	۱/۵۱۱E-۶	۹/۸۴۱	۷۶/۸۰۲	۰/۰۰۵	۰/۰۰۷	۱۸۵/۲۹۱	۷۱/۱۱۶۱	۷/۲۵۸ E-۵
	F	۰/۰۰۰۰	۰/۱۱۱۱ ns	۸۰/۱۰۸۴ *	*۹۳/۱۵۲	۰/۱۰۶۴ns	۰/۱۰۶۱ns	۱۷۳/۱۰۴*	۸۲/۰۰۴۲*	۰/۰۷۲۶ns
R×CV×S	MS	۶/۹۸۸E-۵	۲/۷۲۱E-۵	۱۷/۱۵۳	۸۰/۰۰۵	۰/۰۰۴	۸۵/۳۲۹	۸۰/۰۳۸	۷۶/۳۱۹	۶/۲۹۵ E-۵
	F	۶۸/۰۰۵ *	۴۶/۲۳۱ *	۳۳/۱۵۰۴ *	۵۶/۳۵۵*	۳/۱۸۱۸*	۹۴/۱۱۵*	۱۰۱/۴۳۶*	۱۹۶/۲۵۱*	۵۱/۱۷۷*
H×CV×S	MS	۴/۴۵۴E-۶	۳/۰۸۸E-۶	۲۰/۰۰۶۵	۱۰۵/۵۶۸	۰/۰۰۳	۰/۰۰۹	۷۹/۲۴۸	۰/۰۱۸	۴/۸۲۸ E-۵
	F	۴۶/۰۵۵ *	۰/۱۶۶۶ ns	۱۲۱/۱۶ *	۶۰/۴۵۵*	۷۴/۳۱۱*	۶۸/۸۲۴*	۶۹/۱۶۲*	۶۶/۲۶۹*	۱۱۳/۷۷۲*
R×H×CV×S	MS	۴/۱۵۶E-۶	۱/۸۵۱E-۶	۲۴/۱۱۵۲	۹۳/۸۴۵	۰/۰۰۴	۰/۰۰۹	۱۹/۷۲۷	۰/۰۲۱	۴/۳۲۲ E-۵
	F	۴۲/۱۵۹ *	۱۱۲/۱۹۱ *	۶۹/۰۵۳۸ *	۷۳/۲۵۹ *	۸۸/۱۰۳*	۸۱/۱۰۵*	۴۹/۳۱۸*	۱۳۵/۱۳۲۲*	۱۲۸۴/۱۱۴*

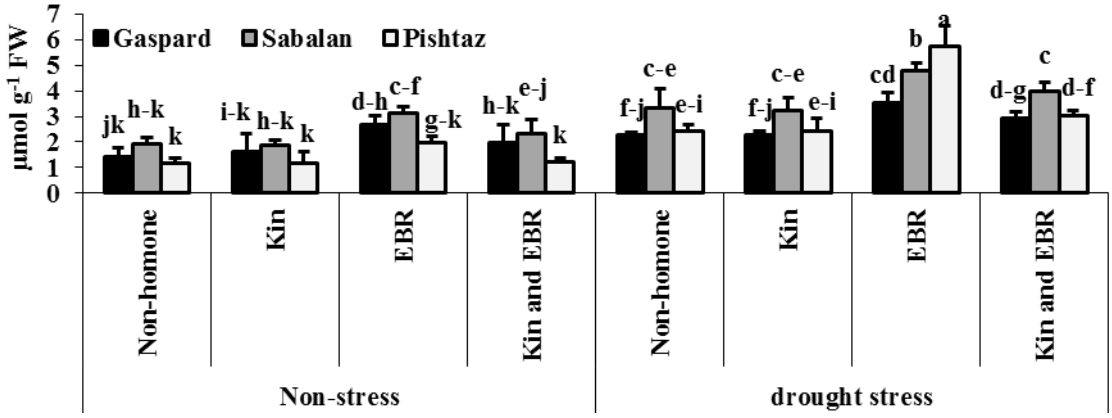
*** و ** به ترتیب نشان دهنده معنی‌داری در سطح ۵٪ و ۱٪ هستند. ns بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است. حروف لاتین R، H، CV و S به ترتیب نشان دهنده فاکتورهای تکرار، هورمون، رقم و تنش می‌باشند.**

درDW و ۵۲/۴۱٪ کاهش در RWC تحت ظرفیت زراعی ۵۰٪ در مقابل ظرفیت زراعی ۱۰۰٪) بیشتر بود (جدول ۱ و شکل ۱). تیمارهای هورمونی تأثیر معنی‌داری بر تغییر مقدار وزن تر برگ پرچم ارقام مورد مطالعه در هر دو ظرفیت زراعی ۵۰٪ و



شکل ۱- تأثیر تیمارهای فاقد هورمون (Non-hormone) و هورمون کینتین(Kin)، ۲۴-اپی‌براسینواستروئید (EBR) و ترکیب کینتین و ۲۴-اپی‌براسینواستروئید (Kin/EBR) بر میزان وزن تر و خشک و محتوای نسبی آب برگ پرچم (FLRWC) سه رقم متحمل (پیشتاز- Pishtaz) و نیمه‌متحمل (سبلان- Sabalan) و حساس (گاسپارد- Gaspard) گندم در ظرفیت‌های زراعی ۱۰۰٪ (بدون تنش) و ۵۰٪ (بروز تنش خشکی) طی گذشت ۲۸ روز بعد از گرده‌افشانی (مقادیر میانگین ٤ تکرار± انحراف استاندارد است. بر اساس آزمون دانکن، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح P≤ 0/05 است).

۱۰۰٪ نداشتند. این در حالی بود که وزن خشک و محتوای نسبی آب برگ پرچم گیاهان تحت تیمار ۲٤-اپی‌براسینواستروئید بیشترین افزایش معنی‌دار را در هر سه رقم و بویژه رقم متحمل (۳۳/۰۳٪ افزایش در DW، ۱٤/۷۵٪



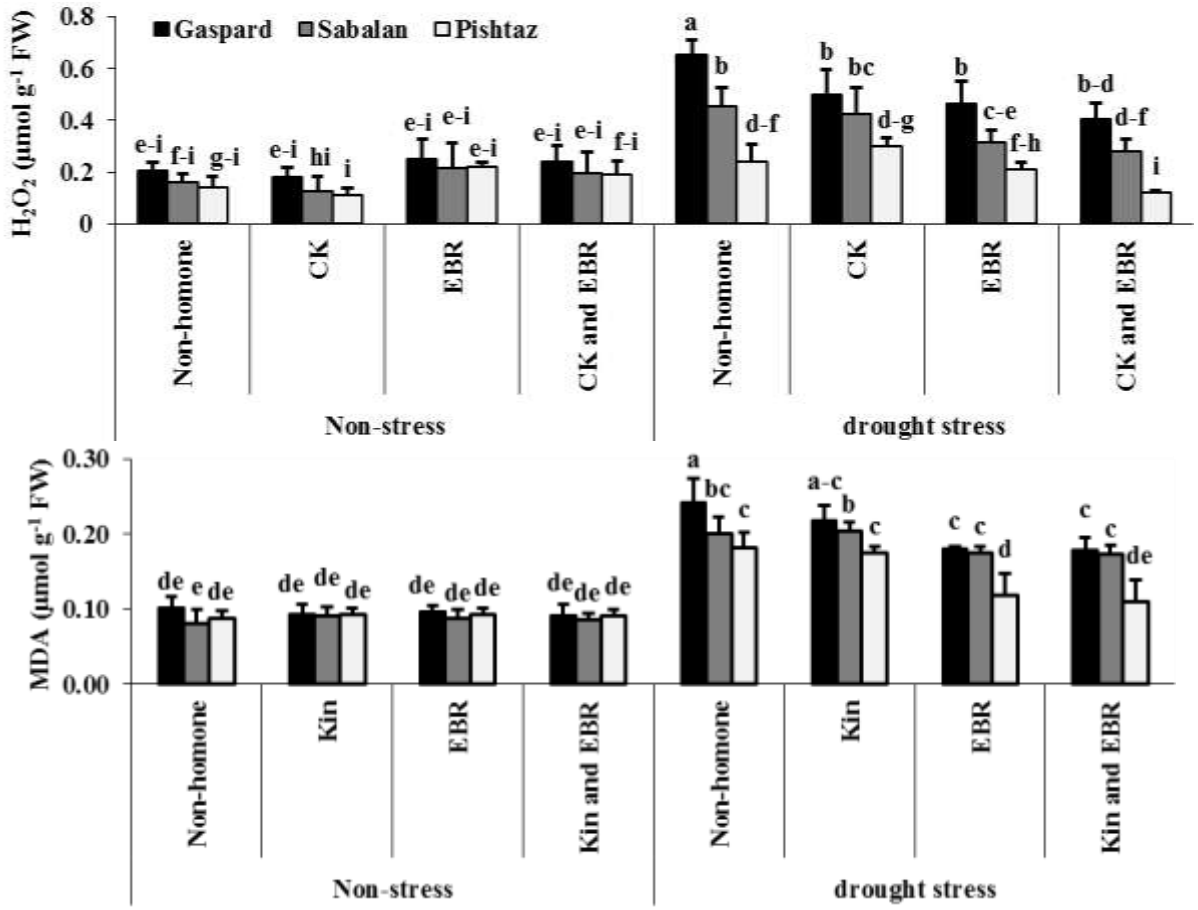
شکل ۲- تأثیر تیمارهای فاقد هورمون (Non-hormone) و هورمون کینین(Kin)، ٢٤-اپی‌براسینواستروئید (EBR) و ترکیب کینتین و ٢٤-اپی‌براسینواستروئید (Kin/EBR) سه رقم متحمل (پیشتاز- Pishtaz) و نیمه‌متحمل (سبلان- Sabalan) و حساس (گاسپارد- Gaspard) گندم در ظرفیت‌های زراعی ۱۰۰٪ (بدون تنش) و ۵۰٪ (بروز تنش خشکی) طی گذشت ۲۸ روز بعد از گرده‌افشانی (مقادیر میانگین ٤ تکرار± انحراف استاندارد است. بر اساس آزمون دانکن، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح $P\leq 0/05$ است).

افزایش در RWC) طی بروز خشکی نشان داد. با این حال در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪، تیمارهای هورمونی تأثیر معنی‌داری بر DW و FLRWC در هیچکدام از ارقام نگذاشتند (شکل ۱).

محتوای آبسیزیک‌اسید درونی(ABA): مطابق انتظار، سطح آبسیزیک‌اسید درونی(ABA)، در تیمارهای خشکی نسبت به آبیاری کامل در هر سه رقم به صورت معنی‌داری افزایش نشان داد که این افزایش در رقم متحمل (۲/۰۹ برابر) نسبت به دو رقم دیگر بیشتر بود. تیمار ٢٤-اپی‌براسینواستروئید تنها تیمار هورمونی بود که در هر سه رقم و بویژه رقم متحمل (۲/۳۵ برابر)، باعث افزایش مقدار ABA درونی در شرایط بدون تنش و بروز خشکی شد (شکل ۲).

شاخص‌های تنش اکسیداتیو: مقدار پراکسید هیدروژن و مالون‌دی‌آلدئید در هر سه رقم در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط آبیاری کامل به صورت معنی‌داری افزایش نشان داد که این افزایش در رقم حساس (۲/٥٦ برابر افزایش پراکسید هیدروژن و ۲/۳۷ برابر افزایش مالون‌دی‌آلدئید) چشمگیرتر بود (شکل ۳). در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ تأثیر معنی‌داری از تیمارهای هورمونی بر سطح پراکسید هیدروژن و مالون‌دی‌آلدئید در هیچکدام از ارقام مشاهده نگردید. تیمار برهمکنش ٢٤- اپی‌براسینواستروئید و کینتین باعث بیشترین کاهش معنی‌دار سطح پراکسید هیدروژن در هر سه رقم حساس، نیمه‌متحمل و متحمل طی شرایط خشکی گردید که این نزول در رقم متحمل اختلاف بیشتری در برابر ارقام حساس و نیمه‌متحمل (کاهش ۲/٦٨ برابر در رقم مقاوم در مقابل کاهش تقریبی ۱/٦ برابر در ارقام حساس و نیمه‌متحمل) داشت. البته تیمار انفرادی ٢٤- اپی‌براسینواستروئید توانست سطح پراکسید هیدروژن را در ارقام حساس و نیمه‌متحمل کاهش دهد. همچنین هر دو تیمار انفرادی ٢٤- اپی‌براسینواستروئید و برهمکنش آن با کینتین نیز باعث کاهش معنی‌دار مقدار مالون‌دی‌آلدئید در دو رقم حساس و متحمل شدند که البته مابین این دو تیمار هورمونی ارتباط معنی‌داری وجود نداشت. در بین تیمارهای هورمونی، کاهش ۱/٦٨ برابری مالون‌دی‌آلدئید در رقم متحمل در تیمار برهمکنش ٢٤- اپی‌براسینواستروئید و کینتین، چشمگیرتر بود. علی رغم نزول معنی‌دار مقدار پراکسید هیدروژن در تیمار انفرادی ٢٤- اپی‌براسینواستروئید در رقم سبلان (نیمه‌متحمل)، تغییر معنی‌دار مقدار مالون‌دی‌آلدئید در این رقم تحت این تیمار هورمونی و بروز خشکی مشاهده نشد (شکل ۳).

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و کاتالاز (CAT) در هر سه رقم طی شرایط خشکی نسبت به تیمار با طرفیت زراعی ۱۰۰٪ افزایش معنی‌داری نشان داد که

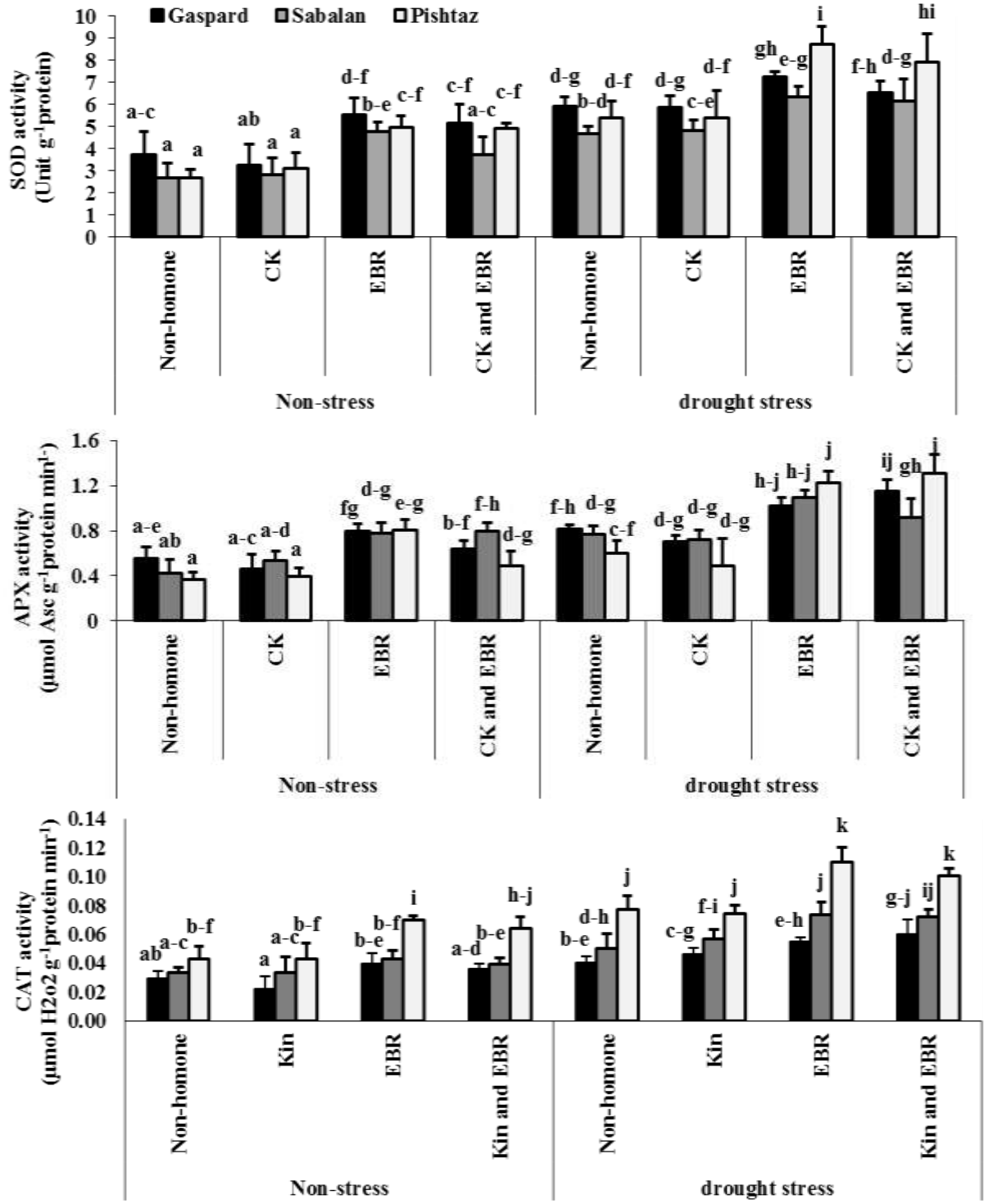


شکل ٣- تأثیر تیمارهای فاقد هورمون (Non-hormone) و هورمون کینتین(Kin)، ٢٤-اپی‌براسینواستروئید (EBR) و ترکیب کینتین و ٢٤-اپی‌براسینواستروئید (Kin/EBR) بر سطوح پراکسید هیدروژن(H_2O_2) و مالون‌دی‌آلدئید(MDA) برگ پرچم سه رقم متحمل (پیشتاز- Pishtaz) و نیمه‌متحمل (سبلان- Sabalan) و حساس (گاسپارد- Gaspard) گندم در ظرفیت زراعی ١٠٠٪ (بدون تنش) و ٥٠٪ (بروز تنش خشکی) طی گذشت ٢٨ روز بعد از گرده‌افشانی (مقادیر میانگین ٤ تکرار± انحراف استاندارد است. بر اساس آزمون دانکن، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P\leq 0/05$ است).

در رقم متحمل (پیشتاز) محسوس‌تر بود (٢/٠٤ برابر افزایش فعالیت SOD و ٦٧٪ افزایش فعالیت APX و ٧٤٪ افزایش فعالیت CAT). در بین تیمارهای هورمونی، تیمار انفرادی ٢٤-اپی‌براسینواستروئید بیشترین تأثیر معنی‌دار در جهت افزایش فعالیت آنزیمی بویژه در شرایط تنش خشکی داشت. این افزایش معنی‌دار در رقم متحمل در مقایسه با دو رقم دیگر و بویژه در مورد آنزیم SOD (٧٦٪ افزایش فعالیت در رقم متحمل) در هر دو حالت بدون تنش و بروز تنش محسوس‌تر بود (شکل ٤).

بحث

در اندازه‌گیری‌های بعمل آمده از برگ پرچم استفاده شد، که یک برگ استراتژیک در غلات از جمله گندم است (Galle *et al*., 2009). برگ پرچم مهمترین برگ در گیاه گندم است که دیرتر از بقیه بوجود آمده و نزدیک‌ترین برگ به سنبله است. برگ پرچم به جهت تولید فرآورده‌های فتوسنتزی و نیز طی فرآیند انتقال مجدد بویژه طی بروز تنش‌های غیرزیستی و تغییرات هورمونی، نقش مهمی در رشد و پرشدن دانه دارد. همچنین پایداری و دوام این برگ یک ویژگی خوب برای نشان دادن سلامت نمونه گیاهی است (Pepler *et al*., 2004).



شکل ٤- تأثیر تیمارهای فاقد هورمون (Non-hormone) و هورمون کینتین(Kin)، ٢٤-اپی‌براسینواستروئید (EBR) و ترکیب کینتین و ٢٤-اپی‌براسینواستروئید (Kin/EBR) بر فعالیت آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز(SOD)، آسکوربات پراکسیداز(APX) و کاتالاز(CAT) برگ پرچم سه رقم متحمل (پیشتاز- Pishtaz) و نیمه‌متحمل (سبلان- Sabalan) و حساس (گاسپارد- Gaspard) گندم در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ (بدون تنش) و ۵۰٪ (بروز تنش خشکی) طی گذشت ۲۸ روز بعد از گرده‌افشانی (مقادیر میانگین ٤ تکرار± انحراف استاندارد است. بر اساس آزمون دانکن، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح P≤ 0/05 است).

در آزمایش انجام گرفته، بروز تنش خشکی باعث کاهش مقدار وزن تر و خشک و محتوای نسبی آب برگ‌های پرچم (FLRWC) در ارقام مورد مطالعه و بویژه رقم حساس شد. بروز خشکی به علت محدودیت آب قابل دسترسی برای گیاه و کاهش توزیع مواد غذایی در خاک سبب کاهش انتقال مواد غذایی به بخش هوایی و برگ‌ها می‌شود. با اینحال کاهش رطوبت برگ باعث نزول پتانسیل آبی برگ و تورژسانس سلولی می‌شود. همچنین تولید گونه‌های رادیکالی فعال ناشی از تنش باعث تخریب ماکرومولکول‌های زیستی نظیر نوکلئیک اسیدها و پروتئین‌ها و ساختارهای غشایی می‌شود. این وقایع سبب کاهش سنتز مواد جدید و در نتیجه زیتوده می‌شود. بنابراین تنش خشکی در اکثر گیاهان باعث کاهش وزن خشک و محتوای نسبی آب برگ می‌شود (Wang *et al*., 2012). کاهش محتوای نسبی آب برگ منجر به کاهش فشار تورژسانس می‌شود که این امر محدودیت‌های جذب دی‌اکسید کربن و کاهش سرعت فتوسنتز را در پی خواهد داشت (Chaves *et al*., 2003). طی بروز خشکی، تیمار برهمکنش ۲۴-اپی‌براسینولید و کینتین تاثیر معنی‌داری در افزایش FLRWC داشت. با اینحال مطالعات گذشته نشان می‌دهد که براسینولید در بستن روزنه‌ها و البته کاهش تعرق و افزایش محتوای نسبی آب بافت نقش دارد (Farooq *et al*., 2009).

مطالعات انجام گرفته توسط Haubrick و همکاران (۲۰۰۶) بر روی گیاه *Vicia faba* و Li و همکاران (۲۰۰۸) بر روی گیاه *Robinia pseudoacacia* نشان دهنده تاثیر معنی‌دار تیمار خارجی هورمون براسینولید بر افزایش سطح آبسیزیک‌اسید درونی است که افزایش این هورمون در بستن روزنه‌ها و افزایش محتوای نسبی آب بافتی موثر می‌باشد. سیتوکینین هورمونی است که در هنگام بروز تنش خشکی و تحت تاثیر بالا رفتن مقدار آبسیزیک‌اسید درونی (که یکی از آثار تنش خشکی است) کاهش می یابد. با اینحال برخی مطالعاتی که بر روی تاثیر زآتین ریبوزید و بنزیل آمینوپورین انجام گرفته، نشان داده است که سیتوکینین‌ها با تاخیر فرآیند پیری قادر به افزایش محتوای نسبی آب بافتی هستند. با اینحال سیتوکینین‌ها با تاثیر بر باز شدن روزنه‌ها و کاستن عملکرد آبسیزیک اسید بویژه در مسیر کانال‌های یونی، تاثیر بر پمپ‌های پروتونی الکتروژنیک و فعالیت آدنیلات سیکلاز باعث افزایش تعرق و کاهش پتانسیل آب می‌شوند، هرچند که تا حدودی سبب رونق نرخ فتوسنتز می‌شوند. به طور کلی نسبت ABA/CK در بروز تنش‌های اسمزی یک عامل کلیدی در بهبود فشار تورژسانس و پتانسیل آب بافت می‌باشد (Pospisilova *et al*., 2000). همچنین افزایش سطح درونی هورمون آبسیزیک‌اسید به دلیل وقوع تنش یا تیمارهای بیرونی مانند کاربرد خارجی برخی تنظیم کننده‌های رشد مانند براسینولید باعث نزول سطح سیتوکینین‌های درونی می‌شود (Yuan *et al*., 2010). با اینحال مطالعات انجام گرفته مشخص کرده است که کاربرد سیتوکینین‌های خارجی مانند بنزیل آمینوپورین، بنزیل آدنین باعث افزایش سطح درونی سیتوکینین و متعاقب آن نزول آبسیزیک‌اسید و اثرات آن شده است (Pospisilova *et al*., 2000). در مطالعه انجام گرفته و در موافق با بررسی‌های گذشته، تیمار کینتین تاثیر معنی‌داری بر محتوای آب نسبی برگ‌های پرچم نداشت. همچنین برهمکنش آن با تیمار براسینولید از تاثیر معنی‌دار این تیمار بر افزایش معنی‌دار FLRWC کاسته بود (عدم تفاوت معنی‌دار بین محتوای آب نسبی در شرایط خشکی بین تیمارهای انفرادی ۲۴- اپی‌براسینولید و برهمکنش ۲۴- اپی‌براسینولید و کینتین). ارزیابی نتایج همبستگی در کار انجام گرفته نیز ارتباط مثبت و معنی‌داری مابین وزن خشک و محتوای نسبی آب با تغییرات مقدار آبسیزیک‌اسید درونی بویژه در شرایط کاهش ظرفیت زراعی (بروز تنش) نشان داد (جدول ۳).

مالون‌دی‌آلدهید، محصول مستقیم پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد و تحت تاثیر افزایش غلظت گونه‌های فعال اکسیژن نظیر پراکسید هیدروژن است که در اثر بروز تنش‌های محیطی نظیر خشکی افزایش می‌یابد. بسیاری از مطالعات انجام گرفته، افزایش مقدار پراکسید هیدروژن و مالون‌دی‌آلدهید در رقم‌های حساس بیشتر از ارقام متحمل را نشان داده است. مطابق با مطالعات انجام گرفته توسط Talaat و همکاران (۲۰۱۵) مقدار

جدول ۲- تاثیر کاربرد خارجی تیمارهای Kin، 24-EBL و Kin/24-EBL بر ضریب همبستگی مابین مقادیر اندازه‌گیری شده وزن تر (FW)، وزن خشک (DW)، محتوای نسبی آب (RWC)، آبسیزیک اسید (ABA)، مقدار پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، مالون‌دی‌آلدهید (MDA) و فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و کاتالاز (CAT) برگ پرچم در ارتباط با وزن هزار دانه و عملکرد دانه سه رقم متحمل (پیشتاز)، نیمه‌متحمل (سبلان) و حساس (گاسپارد) گندم تحت ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ طی گذشت ۲۸ روز بعد از گرده‌افشانی.

شاخص	FW	DW	RWC	ABA	H_2O_2	MDA	SOD	APX	CAT
FW	۱								
DW	۰/۱۵۲	۱							
RWC	۰/۰۷۱**	۰/۱۱۱**	۱						
ABA	۰/۱۷۱*	۰/۰۸۸*	۰/۱۹۳*	۱					
H_2O_2	۰/۰۰۰	۰/۰۵۰	۰/۰۹٤	۰/۱۱۲*	۱				
MDA	۰/۰۸۱	-۰/۰۱٤	۰/۰۲۱	۰/۰۰٦*	۰/۰۱۳*	۱			
SOD	۰/۰۵۹	۰/۰۱۲	۰/۰۱۲	۰/۰۷۳	۰/۰۵٤	۰/۰۰۰	۱		
APX	۰/۰۳۱	۰/۰۱۹	۰/۰۸۰	۰/۰۹۵	۰/۰۲۱*	۰/۰۰۳*	۰/۰۱٦	۱	
CAT	۰/۰۰۸	۰/۰۰٦	۰/۰۱۳	۰/۰٦۵	۰/۰۱٤	۰/۰۰۹	۰/۰۲۱	۰/۰۰۰	۱

***و** به ترتیب نشان دهنده معنی‌داری در سطوح ۵٪ و ۱٪ می باشند. اعداد بدون نشانه، بیانگر عدم معنی‌داری می‌باشند.**

افزایش یافته پراکسید هیدروژن و مالون‌دی‌آلدهید در رقم مقاوم ذرت کمتر از ارقام حساس و نیمه‌حساس بود در حالیکه افزایش بیشتر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در رقم متحمل (پیشتاز) نسبت به دو رقم دیگر مشاهده شد. مشاهده شده است که براسینولیدها می‌توانند فعالیت آنزیم‌های چرخه سوپراکسید دیسموتاز-آسکوربات-گلوتاتیون را از نظر فعالیت و سطح آنتی‌اکسیدان افزایش دهند (Bajguz and Hayat, 2009). Fariduddin و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز در گیاه *Brassica juncea* تحت تیمار ۲٤-اپی‌براسینولید افزایش یافتند. همچنین مطالعات نشان داده است که براسینولیدها از طریق تولید مولکول‌های میانجیگر نظیر نیتریک‌اکسید و تاثیر بر بیوسنتز آبسیزیک‌اسید و افزایش سطح درونی این هورمون می‌توانند سبب القاء فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی گردند (Zhang *et al*., 2011).

در کار انجام گرفته، یک همبستگی مثبت مابین افزایش سطح آبسیزیک‌اسید درونی با مقدار پراکسید هیدروژن و مالون‌دی‌آلدهید و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط بروز تنش وجود داشت. با اینحال در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ نیز ارتباط مثبتی بین سطح درونی هورمون آبسیزیک‌اسید و شاخص‌های تنش اکسیداتیو اندازه‌گیری شده مشاهده شد که می تواند دلیلی بر تاثیر تیمارهای هورمونی بر مقدار آبسیزیک اسید و افزایش پراکسید هیدروژن ناشی از تغییرات سطح درونی آبسیزیک‌اسید باشد.این مقدار از پراکسید هیدروژن افزایش یافته تحت تاثیر آبسیزیک‌اسید برای فراتنظیمی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان لازم می‌باشد (Ghassemian *et al*., 2008- جدول ۲ و۳). در آزمایش انجام گرفته، تاثیر معنی‌دار تیمار انفرادی کینتین و ترکیبی کینتین و ۲٤- اپی‌براسینولید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مشاهده نشد. مسیرهای عملکردی ژن‌های ایجاد مقاومت به تنش‌های محیطی مانند آنتی‌اکسیدان‌ها کمتر در مسیر ترارسانی علامت سیتوکینین‌ها واقع شده است (Merewitz *et al*., 2011). اگرچه در یک بررسی انجام شده توسط Ogweno و همکاران (۲۰۱۰) و تا حدی بر خلاف نتایج بدست آمده، هورمون سیتوکینین نیز

جدول ۳- تاثیر کاربرد خارجی تیمارهای Kin، 24-EBL و Kin/24-EBL بر ضریب همبستگی مابین مقادیر اندازه‌گیری شده وزن تر (FW)، وزن خشک (DW)، محتوای نسبی آب (RWC)، آبسیزیک اسید (ABA)، مقدار پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، مالون‌دی‌آلدهید (MDA) و فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و کاتالاز (CAT) برگ پرچم در ارتباط با وزن هزار دانه و عملکرد دانه سه رقم متحمل (پیشتاز)، نیمه‌متحمل (سبلان) و حساس (گاسپارد) گندم تحت ظرفیت زراعی ۵۰٪ (بروز خشکی) طی گذشت ۲۸ روز بعد از گرده‌افشانی.

شاخص	FW	DW	RWC	ABA	H_2O_2	MDA	SOD	APX	CAT
FW	۱								
DW	۰/۱۱۸*	۱							
RWC	۰/۱۵۱*	۰/۱۷٤**	۱						
ABA	۰/۱٤٥	۰/۱۹۸**	۰/۲۱۱**	۱					
H_2O_2	۰/۰۸۹	۰/۰٦۳*	۰/۱۰۷	۰/۱۹۰**	۱				
MDA	۰/۰۷٦	-۰/۰۳۹*	۰/۰۹۳	۰/۰٤٦*	۰/۳۰۲**	۱			
SOD	۰/۱۲٦	۰/۰۷۳*	۰/۱٤٦**	۰/۲۷٤**	۰/٤۲۱**	۰/۱٤۱**	۱		
APX	۰/۰۹۱*	۰/۰۸٥*	۰/۱۲۹**	۰/۲۹٦**	۰/٤۹٤**	۰/۱۸۳**	۰/٤٦٦**	۱	
CAT	۰/۰۷۹	۰/۰٥۲	۰/۱۸۱*	۰/۲٥٥**	۰/۳۱٦**	۰/۱۰۳**	۰/۳٦۷**	۰/۰٦۱**	۱

***و** به ترتیب نشان دهنده معنی‌داری در سطوح ۵٪ و ۱٪ می‌باشند. اعداد بدون نشانه، بیانگر عدم معنی‌داری می‌باشند.**

مانند براسینولیدها و آبسیزیک اسید باعث افزایش میزان آنتی‌اکسیدان ها در برگ گیاه گوجه فرنگی شد. با اینحال عملکرد سیتوکینین‌هایی مانند بنزیل آدنین، زآتین ریبوزید و بنزیل آمینوپورین به عنوان سرکوب کننده مستقیم گونه‌های فعال اکسیژن طی تیمارهای خارجی بدون افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مشاهده شده است (Stoparic and Maksimovic, 2008). همچنین Cueno و همکاران (۲۰۱۲) فراتنظیمی نسبی یکی از ایزوفرم‌های آنزیم سیتوکینین دهیدروژناز (CKX35) (آنزیم غیرفعال کننده سیتوکینین‌های بافت برگی) که منجر به کاهش سیتوکینین بافت برگی مرتبط با افزایش پراکسید هیدروژن می‌گردد را علت آسیب دستگاه فتوسنتزی بیان کردند. این حالت می‌تواند توجیه کننده کاهش بیشتر مقدار پراکسید هیدروژن و مالون‌دی‌آلدهید در تیمار ترکیبی خارجی کینتین و ۲۴- اپی‌براسینولید باشد در حالیکه حداکثر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در تیمار انفرادی ۲۴- اپی‌براسینولید مشاهده شد.

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی می‌توان گفت که در بررسی انجام شده، تیمار انفرادی ۲۴- اپی‌براسینولید نسبت به تیمارهای کینتین و ترکیب کینتین و ۲۴- اپی‌براسینولید در افزایش محتوای نسبی آب، غلظت آبسیزیک‌اسید درونی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان موثرترین تیمار بود. در حالیکه ترکیب کینتین و ۲۴- اپی‌براسینولید بهترین تیمار در کاهش شاخص‌های تنش اکسیداتیو بود. رقم پیشتاز به عنوان رقم متحمل به تنش خشکی توانست نسبت به ارقام سبلان و گاسپارد به عنوان ارقام نیمه‌متحمل و حساس منفعت بیشتری از تیمارهای هورمونی در جهت افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و متعاقب آن کاهش خسارت‌های اکسیداتیو ببرد. همچنین با توجه به آنالیز نتایج همبستگی، تاثیر تیمارهای هورمونی بر ارتباط شاخص‌های مورد اندازه‌گیری طی ظرفیت زراعی ۵۰٪ (بروز خشکی) معنی‌دارتر از مشاهدات انجام گرفته در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ (عدم تنش در محیط) بود.

منابع

Acharya, B. R. and Assmann, S. M. (2009) Hormone interactions in stomatal function. Plant Molecular Biology 69: 451–462.

Aebi, H. E. (1984) "Catalase *in vitro*". Method's Enzymology 105: 121-126.

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.

Bajguz, A. and Hayat, S. (2009) Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses.Plant Physiology and Biochemistry47: 1–8.

Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an essay applicable to acrylamide gels. Anal Biochemistry 44: 276–287.

Caruso, G., Cavaliere, C., Foglia, P., Gubbiotti, R., Samperi, R. and Lagana, A. (2009) Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. Plant Science 177: 570–576.

Chaves, M. M., Maroco, J. P. and Periera, J. S. (2003) Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. Functional of Plant Biology 30: 239-264.

Cueno, M. E., Imaib, K., Ochiaib, K. and Okamotoa, T. (2012) Cytokinin dehydrogenase differentially regulates cytokinin and indirectly affects hydrogen peroxide accumulation in tomato leaf. Journal of Plant Physiology 169: 834– 838.

Divi, U. K., Rahman, T. and Krishna, P. (2010) Brassinosteroid-mediated stress tolerance in Arabidopsis shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. Bio Med Central Plant Biology 10:1-14.

Fariduddin, Q., Khanam, S., Hasan, S. A., Ali, B., Hayat, S. and Ahmad, A. (2009) Effect of 28-homobrassinolide on the drought stress-induced changes in photosynthesis and antioxidant system of *Brassica juncea* L. Acta Physiologiae Plantarum 31: 889–897.

Fariduddin, Q., Ahmad, A. and Hayat, S. (2004) Responses of *Vigna radiata* to foliar application of 28-homobrassinolide and kinetin. Bologia Plantarum 48: 465-468.

Farooq, M., Wahid, A., Basra, S. M. A. and Islam-ud-D. (2009) Improving water relations and gas Exchange with brassinosteroids in rice under drought stress. Journal of Agronomy and Crop Science 195: 262–269.

Galle, A., Csiszar, J., Secenji, M., Guoth, A., Cseuz, L., Tari, I., Gyorgyey, J. and Erdei, L. (2009) Glutathione transferase activity and expression patterns during grain filling in flag leaves of wheat genotypes differing in drought tolerance: Response to water deficit. Journal of Plant Physiology 166: 1878-1891.

Ghassemian, M., Lutes, J., Hur-Song, C., Lange, I., Chen, W., Zhu, T., Wang, X. and Lange, M.(2008) Abscisic acid-induced modulation of metabolic and redox control pathways in *Arabidopsis thaliana*. Phytochemistry 69: 2899-2911.

Guo, P., Baum, M., Grando, S., Ceccarelli, S., Bai, G., Li, R., Von Korff, M., Varshney, R. K., Graner, A. and Valkoun, J. (2009) Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. Journal of Experimental Botany 60: 3531–3544.

Haubrick, L. L., Torsethaugen, G. and Assmann, S. M. (2006) Effect of brassinolide, alone and in concert with abscisic acid, on control of stomatal aperture and potassium currents of *Vicia faba*guard cell protoplasts. Physiologiae Plantarum 128: 134–143.

Hayat, S., Hasan, S. A., Hayat, Q. and Ahmad, A. (2010) Brassinosteroids protect *Lycopersicon esculentum* from cadmium toxicity applied as shotgun approach. Protoplasma 239: 3–14.

Heath, R. L. and Packer, L. (1968) "Photo peroxidation in isolated chloroplasts 1 kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation." Archives of Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.

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: 603-610.

Khanna-Chop, R. and Selote, D. S. (2007) Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than-susceptible wheat cultivar under field conditions. Environmental and Experimental Botany 60: 276-283.

Kundua, S. and Gantait, S. (2107) Abscisic acid signal crosstalk during abiotic stress response. Plant Gene 11:61-69.

Li, K. R., Wang, H. H., Han, G., Wang, Q. J. and Fan, J. (2008) Effects of brassinolide on thesurvival, growth and drought resistance of *Robinia pseudoacacia* seedlings under water-stress. New Forests 35: 255–266.

Munne-Bosch, S. and Muller, M. (2013) Hormonal cross-talk in plant development and stress responses. Plant Science 4:1-2.

Merewitz, E., Gianfagna, T., and Huang, B. (2010) Effects of SAG12-ipt and HSP18.2-ipt.expression on cytokinin production, root growth and leaf senescence in creeping bentgrass exposed to drought stress. Journal of the American Society for Horticultural Science 135: 230–239.

Merewitz, E. B., Du, H., Yu, W., Liu, Y., Gianfagna, T. and Huang, B. (2011) Elevated cytokinin content in *ipt* transgenic creeping bentgrass promotes drought tolerance through regulating metabolite accumulation. Journal of Experimental Botany 56: 233-244.

Nakano, Y. and Asada, K. (1987) "Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplast: in inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical". Plant Cell Phsiology 28: 131-140.

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: 175-182.

Pepler, S., Gooding, M. J. and Ellias, R. H. (2004) Modelling simultaneouslywater content and dry matter dynamics of wheat grains. Field Crop Researchg

Pospisilova, J., Synkova, H. and Rulcova, J. (2000) Cytokinin and water stress. Biologia Plantarum 43:321-328.

Rao, M. V., Paliyath, G. and Ormrod, D. P. (1996) Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology 110: 125–136.

Stoparic, G. and Maksimovic, I. (2008) The Effect of cytokinins on the concentration of hydroxyl radicals and the intensity of lipid peroxidation in nitrogen deficient wheat. Cereal Research Communications 36: 601-609.

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.

Tang, K., and Zhan, J. C., Yang, H-R.and Huang, W. D. (2010) Changes of resveratrol and antioxidant enzymes during UV-induced plant defense response in peanut seedlings. Journal of Plant Physiology 167:95–102

Turner, N. C.(1981) Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water stress. Plant and Soil 58: 339-366.

Vardhini, B. V. (2017) Modifications of morphological and anatomical characteristics of plants by application of brassinosteroids under various abiotic stress conditions - A review. Plant gene 11: 70-89.

Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant system in acid treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. Plant Science 151: 59-66.

Wang, C. J., Yang, W., Wang, C., Gu, C., Niu, D. D., Liu, H. X., Wang, Y. P. and Guo, J. H. (2012) Induction of drought tolerance in cucumber plants by a consortium of three plant growth promoting rhizobacterium strains. PlOS One
7: 1-12.

Xu, Y., Gianfagna, T. and Huang, B. (2010) Proteomic changes associated with expression of a gene (*ipt*) controlling cytokinin synthesis for improving heat tolerance in a perennial grass species. Journal of Experimental Botany 61: 3273–3289.

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 concentrationin tomato under water stress. Scientia Horticulturae 126:103-108.

Yuldashev, R., Avalbaev, A., Bezrukova, M., Vysotskaya, L., Khripach, V. and Shakirova, F. (2012) Cytokinin oxidase is involved in the regulation of cytokinin content by 24-epibrassinolide in wheat seedlings. Plant Physiology and Biochemistry 55: 1-6.

Zhang, A., Zhang, J., Zhang, J., Ye, N., Zhang, H., Tan, M. and Jiang, M. (2011) Nitric oxide mediates brassinosteroid-induced aba biosynthesis involved in oxidative stress tolerance in maize leaves. Plant and Cell Physiology 52: 181-192.