

پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی القاء شده توسط تیمارهای کیتین و ۲۴-اپی‌براسینواستروئید در سه رقم گندم (*Triticum aestivum* L.) طی بروز تنش خشکی در مرحله پر شدن دانه

محمد رضا سرافراز اردکانی^{۱*}

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 کیتین 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 (پشتاز)، نیمه‌متحمل (سبلان) و حساس (گاسپارد) به خشکی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار در گلخانه طراحی شد. سپس میزان وزن تر و خشک و محتوای نسبی آب، آبسزیک اسید، پراکسید هیدروژن و مالون‌دی‌آلدئید و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، آسکورات 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 آبسزیک‌اسید 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 آبسزیک‌اسید برگ پرچم طی بروز خشکی به‌ویژه در رقم متحمل بود. تنش خشکی به صورت معنی‌داری سبب افزایش بیشتر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، آسکورات پراکسیداز و کاتالاز در رقم پشتاز 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 باعث بیشترین کاهش شاخص‌های تنش اکسیداتیو گردید. در یک نتیجه‌گیری کلی، رقم پشتاز نسبت به ارقام سبلان و گاسپارد منفعت بیشتری از تیمارهای هورمونی در جهت افزایش کارایی آنتی‌اکسیدانی طی بروز تنش خشکی جست.

کلمات کلیدی: آبسزیک‌اسید، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ۲۴-اپی‌براسینواستروئید، تنش اکسیداتیو، کیتین، گندم

مقدمه

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

در بین تمام تنش‌های غیرزیستی شناخته شده، خشکی مهمترین عامل محدود کننده رشد و تولید گیاهان زراعی در جهان است که آثار زیانباری را به‌ویژه در مرحله زایشی به بار

این گروه از هورمون‌ها دارای نقش‌های وسیعی در فرآیندهای فیزیولوژیک و تکوینی شامل تقسیم و بزرگ شدن سلول، فتومورفوزن، تمایزدایی 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 Farooq و همکاران (۲۰۰۹) تأثیر کاربرد خارجی براسینواستروئیدها بر بهبود بازیافت محتوای نسبی آب برگ، همانندسازی بیشتر CO₂ 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 آبسزیک اسید، اتیلن و سالیسیلیک 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 (Bajguz 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 و آبسزیک اسید به عنوان یک هورمون شاخص برای مواجهه با تنش‌های محیطی از جمله خشکی شناخته نمی‌شوند. تحقیقات

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 گونه‌های فعال اکسیژن در گیاه است. اگرچه حضور گونه‌های فعال اکسیژنی برای به راه انداختن واکنش‌های ترانسانی علامت در سطح درون و بین سلولی لازم است، اما تولید بیش از حد آنها 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 ترانسانی 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 ترانسانی علامت اکثر هورمون‌ها برای آماده‌سازی گیاه برای مقابله تنش‌های محیطی از جمله خشکی، آبسزیک اسید است (Kundua and Gantait, 2017). در بین هورمون‌های گیاهی، براسینواستروئیدها گروهی از هورمون‌های استرایولی هستند که از لحاظ ساختاری با هورمون‌های استروئیدی حشرات و حیوانات مرتبط هستند.

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., 2011; Pleg et al., 2010). در بررسی‌هایی که در مورد ارتباط این دو هورمون انجام شده، افزایش سطح چند نمونه از سیتوکینین‌های درونی تحت تیمار خارجی براسینواستروئید (۲۴-پی‌براسینوئید) در دانه رست‌های گندم مشاهده گردید (Yuldashev et al., 2012). نتایج Bajguz و همکاران (۲۰۱۴) 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 (۲۰۰۴) تأثیر برهمکنشی ۲۴-پی‌براسینواستروئید و کیتین 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، علی‌رغم تفاوت مسیرهای عملکردی بویژه در شرایط تنشی، در بررسی انجام گرفته، تأثیر انفرادی و برهمکنش هورمون‌های براسینواستروئید (۲۴-پی‌براسینواستروئید) و سیتوکینین (کیتین) 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 ۱۳۹۵ در گروه زیست‌شناسی دانشگاه یزد شروع و تهیه و آنالیز نتایج تا اوایل فروردین ماه سال ۱۳۹۶ به طول انجامید. آزمایش در قالب 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. بذره‌های ۳ رقم گندم شامل گاسپارد (رقم حساس)، سبلان (رقم نیمه‌متحمل) و پیش‌تاز (رقم متحمل) از مؤسسه پاکان بذر اصفهان تهیه و به تعداد ۵ 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 ۱۰۰٪ نگه داشته شدند، تیمارهای خشکی شامل ۵۰ درصد ظرفیت زراعی برای برخی از گلدان‌ها اعمال شدند. مدت اعمال تیمار ۴ هفته به طول انجامید. برای کاربرد تیمارهای هورمونی، ابتدا سیتوکینین (کیتین $100 \mu\text{M}$) و در ادامه تیمار ۲۴-پی‌براسینواستروئید ($1 \mu\text{M}$) 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 کیتین از شروع هفته دوم بعد از گرده افشانی و تیمار ۲۴-پی‌براسینواستروئید از 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 ۲۰- 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 ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. سپس برگ‌های پرچم به مدت ۴ 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) اندازه‌گیری شد. بعد از این مرحله برگ‌های پرچم به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۶۵ 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):

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

اندازه‌گیری مقدار آبسزیک اسید درونی (ABA): برای

اندازه‌گیری مقدار آبسزیک اسید درونی از روشی استفاده شد که سه هورمون ژیبیرلیک اسید، ایندول استیک اسید و آبسزیک اسید از یکدیگر جدا و آنالیز شدند. بدین منظور مقدار ۲ گرم از ماده گیاهی تازه برداشته شد و با اضافه کردن ۴۰ میلی‌لیتر محلول استخراج (۰/۲۵) گرم Butylated hydroxytoluene و ۰/۵ گرم سدیم آسکوربات (یا ۰/۴۴ 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 ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ 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 پلی‌تترافلوئورواتیلن ۰/۴۵ عبور داده شد و سپس به ستون HPLC تزریق گردید. اجزای محلول بدست آمده توسط دستگاه HPLC (مدل shambeck) با ستون C₁₈ (دکتور UV، شدت جریان ۰/۷ ml/min و حلال استیک اسید ۰/۲٪ و متانول ۱۰۰٪ 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).

اندازه‌گیری شاخص‌های تنش اکسیداتیو: برای

اندازه‌گیری مقدار پراکسید هیدروژن، مقدار ۱ گرم بافت تر گیاهی توسط ۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ درصد TCA در حمام یخ ساییده شد، سپس عصاره بدست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد (دستگاه سانتریفیوژ Beckman Coulter مدل Allegra - 64R). در مرحله بعدی به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول حاصل مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار با (pHV) و ۱ میلی‌لیتر پتاسیم یدید ۱ 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 $0.28 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) 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 ۱۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط سانتریفیوژ شد. مقدار جذب روشن‌آور در طول موج ۵۳۲ nm توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. ضمن آنکه مقدار جذب غیراختصاصی خوانده شده در طول موج ۶۰۰ nm از میزان جذب در ۵۳۲ nm کسر گردید. غلظت MDA با استفاده از ضریب خاموشی $155 \text{ Mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ محاسبه گردید (Heath and Packer, 1968).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: برای تهیه

عصاره آنزیمی، ابتدا ۱ گرم بافت برگ در هاون چینی با اضافه نمودن نیتروژن مایع خرد شد. به بافت خرد شده، ۱۰۰ میلی‌گرم پلی‌وینیل‌پیرولیدون (PVP) اضافه نموده و مجدداً

۰/۵ میلی مولار آسکوربات بود که مقدار ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیم نیز به آن اضافه شد و کاهش جذب محلول، مادامیکه آسکوربات (با ضریب خاموشی $2/8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) اکسید گردید، به مدت ۱ دقیقه در ۲۹۰ نانومتر خوانده شد. در نهایت میزان فعالیت آنزیم بر حسب میکرومول آسکوربات اکسید شده به ازای میلی‌گرم پروتئین در ۱ دقیقه محاسبه شد (Nakano and Asada, 1987).

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز، ۲/۶ میلی‌لیتر مخلوط واکنشی شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با (pHV) حاوی ۰/۴ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی مولار آماده شد که مقدار ۴۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه شد و کاهش جذب محلول در ۲۴۰ نانومتر خوانده شد. واکنش با افزودن پراکسید هیدروژن آغاز شد و کاهش جذب به مدت ۳۰ ثانیه اندازه‌گیری شد. در نهایت میزان فعالیت آنزیمی بر حسب میکرومول پراکسید هیدروژن مصرف شده (با ضریب خاموشی $39/4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) 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 آزمون‌های 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 ۰/۵ (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 ۰/۵۰ به صورت معنی‌داری کاهش پیدا کرد که این کاهش در رقم حساس (گاسپارد-۳۹/۶۹) کاهش

سائیده شد. به مخلوط حاصل ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج شامل فسفات پتاسیم (pHV، ۵۰ mM) و سدیم متابای سولفیت (Sodium Metabisulfite، ۱ mM) اضافه گردید. پس از اینکه نمونه‌ها به خوبی سائیده شدند، عصاره‌های گیاهی در rpm ۱۵۰۰۰ و دمای 4°C به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. فاز شفاف بالایی جدا و ۱۰۵۰ میکرولیتر از آن با ۳۵۰ میکرولیتر گلیسرول ۰/۵۰ (v/v) مخلوط شد، به طوری‌که غلظت نهایی گلیسرول خالص در عصاره آنزیمی به ۱۲/۵٪ رسید و بعد از انجماد در نیتروژن مایع به فریزر با دمای -80°C منتقل شد. همه مراحل تهیه عصاره آنزیمی در دمای 4°C صورت گرفت (Rao et al., 1996).

جهت سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، مخلوط واکنشی شامل متیونین (۱۳ mM)، نیتروبلوتترازولیوم (NBT- $75 \mu\text{M}$)، EDTA (۱ mM)، ریبوفلاوین ($2 \mu\text{M}$) و سیانید پتاسیم (KCN- $20 \mu\text{M}$) در ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات (pHV، ۵۰ mM) حل شد. نمونه کنترل که شامل مخلوط تهیه شده به جز عصاره آنزیمی بود تحت تابش دو لامپ فلورسنت ۲۰ وات به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. سپس جذب نمونه‌ها در ۵۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (دستگاه اسپکتروفتومتر Analytical مدل) خوانده شد. برای قرائت نمونه مجهول، مقدار ۱ میلی‌لیتر عصاره به ۳ 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 ($\text{mg}^{-1} \text{ protein unit}$) محاسبه گردید. یک واحد آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز، مقداری از عصاره است که باعث ۰/۵۰ ممانعت نرخ کاهیدگی NBT می‌شود (Beauchamp and Fridovich., 1971).

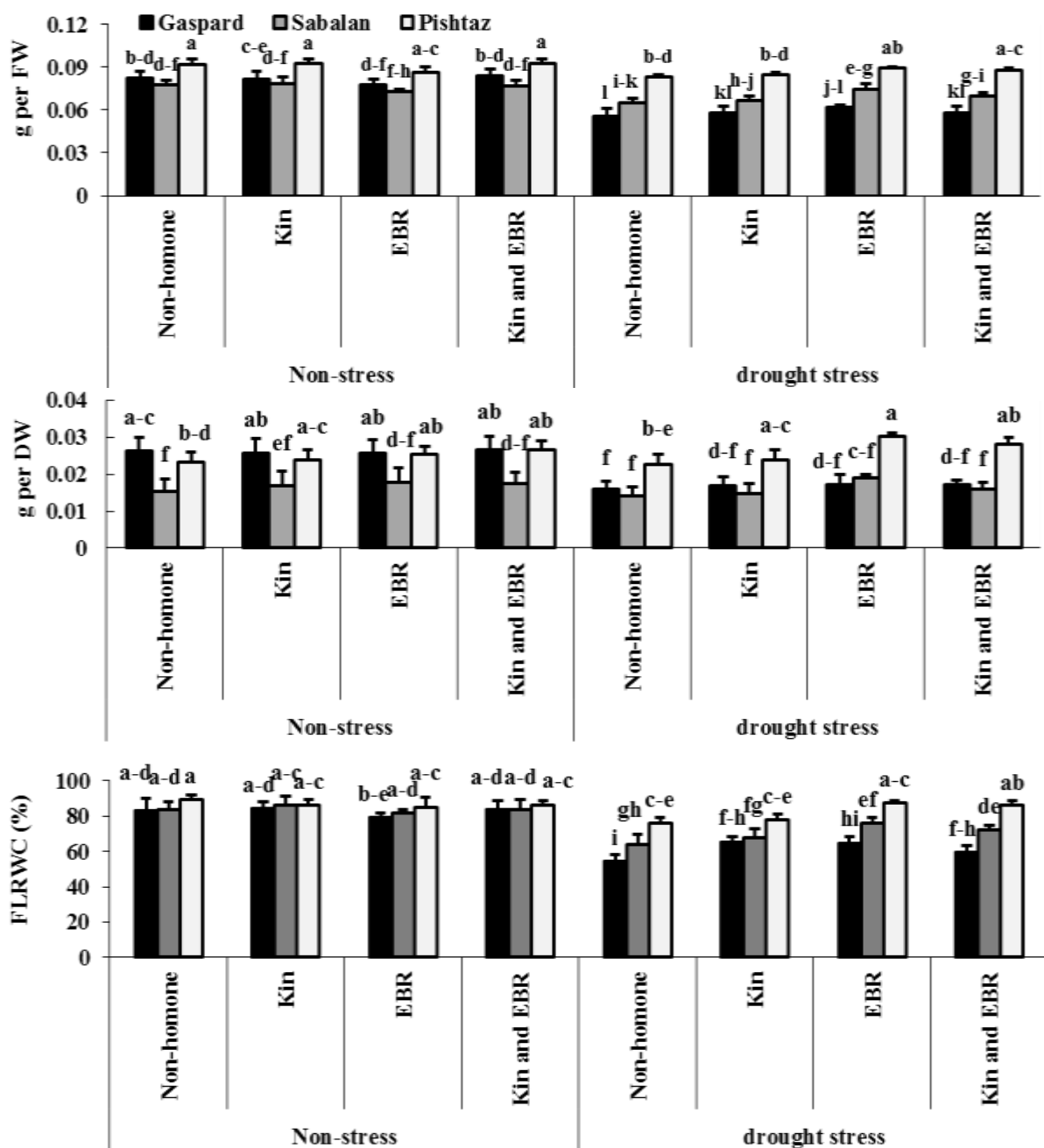
۱ میلی‌لیتر محلول واکنش مورد نیاز برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با (pHV) حاوی پراکسید هیدروژن ۰/۱ میلی مولار و

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس تیمارهای فاقد هورمون (Non) و هورمونیکیتین (Kin)، ۲۴- پی-براسینواستروئید (EBR) و ترکیب کیتین و ۲۴- پی-براسینواستروئید (Kin/EBR) بر محتوای نسبی آب (RWC)، مقدار آبسزیک اسید درونی (ABA)، شاخص‌های تنش اکسیداتو (MDA و H₂O₂) و آنتی‌اکسیدانی (فعالیت آنزیم‌های CAT و APX و SOD) برگ پرچم در سه رقم متحمل (پیش‌تاز - Pish taz)، 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.

CAT	APX	SOD	MDA	H ₂ O ₂	ABA	RWC	DW	FW	درجه آزادی	منابع بلوک
۹/۸۵۱ E-۵	۱۲۷/۰۰۷	۱۲۰/۳۰۷	۰/۰۰۹	۰/۰۲۱	۱۱۷/۷۸۵	۳۳	۷/۸۴۷ E-۵	۱/۱۳۲ E-۵	MS	R
۲/۹۴۹ ^{ns}	۶۲/۸۱۹*	۱۲۰/۸۰۶۵*	۵۰/۳۶۴*	۱۳/۵۴۲*	۹۳/۱۵۲*	۰/۳۳ ^{ns}	۰/۰۰۰۰ ^{ns}	۰/۳۳۳۴ ^{ns}	F	
۰/۰۰۳	۶۳/۴۱۷	۱۲۶/۲۸۴	۰/۰۰۷	۰/۰۲۸	۱۲	۷۱/۰۲۸	۵/۴۷۳ E-۵	۲/۰۹۵ E-۵	MS	H
۰/۳۷۵ ^{ns}	۶۴/۳۱۶*	۷۵/۵۹۵*	۴۹/۳۵۰*	۳۰/۲۶۷*	۶/۷۲۱ ^{ns}	۰/۳۳۳۳ ^{ns}	۰/۰۰۰۰ ^{ns}	۰/۳۳۳۰ ^{ns}	F	
۰/۰۰۹	۰/۰۰۵	۸/۰۰۰	۰/۰۲۸	۰/۰۵۶	۵	۱۲۲۲/۰۷۳	۰/۰۱	۰/۰۳	MS	CV
۰/۵۲۳۴ ^{ns}	۰/۵۵۵۵ ^{ns}	۰/۴۷۰۶ ^{ns}	۷۸/۵۰۹*	۵/۰۷۵ ^{ns}	۰/۵ ^{ns}	۰/۵ ^{ns}	۱/۰۰۰۰ ^{ns}	۰/۴۲۸۵ ^{ns}	F	
۰/۰۱۷	۲۲/۴۵۵	۱۲۷/۰۰۰	۸/۰۰۵	۰/۰۲۸	۵۱/۰۸۴	۴۲۹۳/۷۶۶	۰/۰۰۰	۰/۰۰۳	MS	S
۱/۴۵۱ ^{ns}	۴۱/۷۳۵*	۱۲۴/۰۰۹*	۴۱/۵۰۹*	۵۰/۶۲۵*	۷۵/۲۵۵*	۱/۳۰۳۳ ^{ns}	۰/۰۰۰۰ ^{ns}	۱/۰۰۰۷ ^{ns}	F	
۰/۰۴۵	۱۳۱/۰۲۹	۱۳۱۲/۵۶۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۷	۱۲۸۵/۴۲	۱۰/۰۰۶	۳/۹۷۶ E-۶	۴/۰۷۶ E-۶	MS	R×H
۲/۹۴۹ ^{ns}	۱۳۳/۱۳۹*	۱۲۸۴/۲۱۵*	۰/۱۳۹۶ ^{ns}	۰/۱۱۸۶ ^{ns}	۹۹/۱۰*	۷/۱۰۷۵ ^{ns}	۱۲۱/۴۵۱*	۰/۱۱۱۱ ^{ns}	F	
۵/۳۷۶ E-۵	۹۱/۰۰۷	۰/۴۲۹	۷/۰۱۰	۰/۰۰۷	۱۲۷/۸۵	۱۴/۱۱۰۶	۵/۵۸۱ E-۵	۷/۰۷۱ E-۶	MS	R×CV
۱/۴۱۱۹ ^{ns}	۱۱۰/۰۱۶*	۵۵/۲۷۳*	۴۸/۱۶۶*	۲۵/۵۰۶*	۴۸/۳۶۵*	۸۱/۱۳۵۲*	۱۹۵/۹۵۰*	۰/۰۰۰۰ ^{ns}	F	
۰/۱۱۹	۸۶/۰۲۲	۸/۳۲۸	۲۸/۰۰۹	۰/۰۰۹	۸۴/۷۵	۳۴/۳۵۲۶	۵/۹۹۲ E-۵	۷/۹۲۲ E-۶	MS	R×S
۲/۹۴۹ ^{ns}	۶۷/۱۷۶۹*	۶۰/۲۲۱*	۵۳/۰۰۵*	۰/۳۳۳۳ ^{ns}	۵۶/۱۸۵*	۶۵/۹۴۵۵*	۱۴۰/۰۰۶*	۰/۰۰۰۰ ^{ns}	F	
۰/۱۱۷	۵۰/۰۲۵	۱/۰۶۷	۱۹/۱۰۸	۰/۰۰۲	۱۰۰/۳۵	۲۵/۱۲۸۵	۸/۳۲۵ E-۶	۲/۵۶۶ E-۶	MS	H×CV
۲۳/۱۲۸*	۸/۱۴۹ ^{ns}	۰/۱۷۷۸ ^{ns}	۸۸/۵۱۱*	۰/۱۶۶۶ ^{ns}	۶۶/۳۰۹*	۵۱/۱۴۲۵*	۰/۱۶۶۶ ^{ns}	۰/۱۶۶۶	F	
۰/۱۱۶	۶۱/۰۱۰	۱۱۹/۰۶۵	۹/۰۱۷	۰/۰۸۷	۱۹۵/۴۲۵	۲۳۳/۷۰۴۵	۱/۰۸۳ E-۵	۰/۰۰۰	MS	H×S
۲۹/۶۱۸*	۸۲/۱۴۲۹*	۱۴۱/۲۳۹*	۸۹/۱۱۵*	۸۹/۱۵۵*	۹۰/۹۴۵*	۴۱/۱۱۶۴*	۰/۳۳۳۳	۰/۰۰۰۰ ^{ns}	F	
۰/۰۴۰	۱۱۷/۰۳۵	۲۱/۰۷۵	۱۱۹/۱۱۶	۰/۸۵۱	۱۲۷/۳۷۹	۵۱۹/۴۰۱۷	۰/۰۰۰ ^{ns}	۰/۰۰۱	MS	CV×S
۲۳/۱۲۹ ^{ns}	۱۳۴/۵۲۹۱*	۱۱۱/۶۹۰*	۴۸/۵۴۵*	۲۵/۵۰۶*	۸۷/۰۱۶*	۵۵/۴۹۹۵*	۰/۰۰۰۰ ^{ns}	۰/۰۵ ^{ns}	F	
۰/۰۱۹	۴۲/۱۲۸	۱۶۲۴/۵۲۸	۶۹/۲۸۸۸	۰/۰۰۸	۱۶۴/۶۵۵	۴۵/۰۱۳	۳/۰۹۸ E-۶	۳/۵۹۶ E-۶	MS	R×H×CV
۳۱/۶۲۶ ^{ns}	۶۰/۱۱۹*	۱۶۲۹/۴۰۵*	۱۱۰/۲۵*	۶۳/۳۱۱*	۹۶/۲۷۵*	۴۵/۰۵۵۵*	۰/۰۵۵۵ ^{ns}	۰/۰۵۵۵ ^{ns}	F	
۷/۲۵۸ E-۵	۷۱/۱۱۶۱	۱۸۵/۲۹۱	۰/۰۰۷	۰/۰۰۵	۷۶/۸۰۲	۹/۸۴۱	۱/۵۱۱ E-۶	۱/۱۲۷ E-۶	MS	R×H×S
۰/۰۷۲۶ ^{ns}	۸۲/۰۰۴۲*	۱۷۳/۱۰۴*	۰/۱۰۶۱ ^{ns}	۰/۱۰۶۴ ^{ns}	*۹۳/۱۵۲	۸۰/۱۰۸۴*	۰/۱۱۱۱ ^{ns}	۰/۰۰۰۰	F	
۶/۲۹۵ E-۵	۷۶/۳۱۹	۸۰/۰۳۸	۸۵/۳۲۹	۰/۰۰۴	۸۰/۰۰۵	۱۷/۱۵۳	۲/۷۲۱ E-۵	۶/۹۸۸ E-۵	MS	R×CV×S
۵۱/۱۷۷*	۱۹۶/۲۵۱*	۱۰۱/۴۳۶*	۹۴/۱۱۵*	۳/۱۸۱۸*	۵۶/۳۵۵*	۳۳/۱۵۰۴*	۴۶/۲۳۱*	۶۸/۰۰۵*	F	
۴/۸۲۸ E-۵	۰/۰۱۸	۷۹/۲۴۸	۰/۰۰۹	۰/۰۰۳	۱۰۵/۵۶۸	۲۰/۰۰۶۵	۳/۰۸۸ E-۶	۴/۵۴ E-۶	MS	H×CV×S
۱۱۳/۷۷۲*	۶۶/۲۶۹*	۶۹/۱۶۲*	۶۸/۸۲۴*	۷۴/۳۱۱*	۶۰/۴۵۵*	۱۲۱/۱۶*	۰/۱۶۶۶ ^{ns}	۴۶/۰۵۵*	F	
۴/۳۲۲ E-۵	۰/۰۲۱	۱۹/۷۲۷	۰/۰۰۹	۰/۰۰۴	۹۳/۸۴۵	۲۴/۱۱۵۲	۱/۸۵۱ E-۶	۴/۱۵۶ E-۶	MS	R×H×CV×S
۱۲۸۴/۱۱۴*	۱۳۵/۱۳۲۲*	۴۹/۳۱۸*	۸۱/۱۰۵*	۸۸/۱۰۳*	۷۳/۲۵۹*	۶۹/۰۵۳۸*	۱۱۲/۱۹۱*	۴۲/۱۵۹*	F	

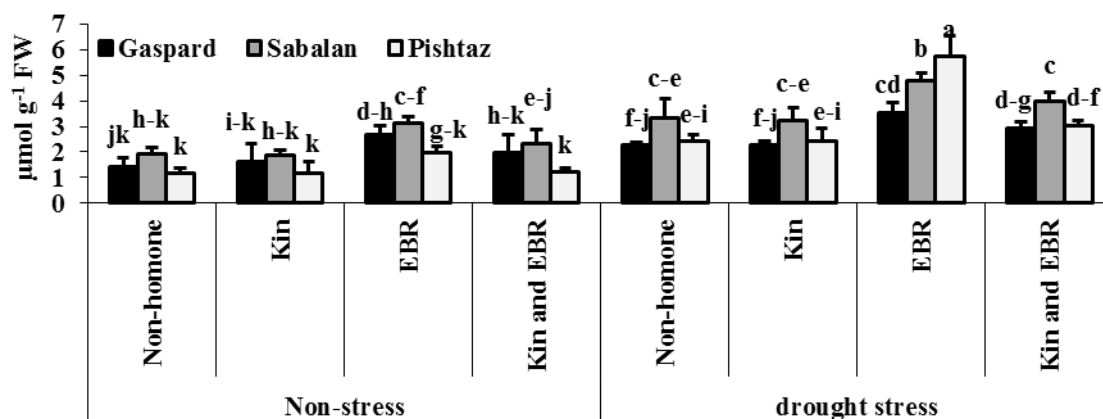
* و ** به ترتیب نشان دهنده معنی‌داری در سطح ۵٪ و ۱٪ هستند. ns بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است. حروف لاتین R، H، CV و S به ترتیب نشان دهنده فاکتورهای تکرار، هورمون، رقم و تنش می‌باشند.

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



شکل ۱- تأثیر تیمارهای فاقد هورمون (Non-hormone) و هورمون کیتین (Kin)، ۲۴-اپی‌براسینواستروئید (EBR) و ترکیب کیتین و ۲۴-اپی‌براسینواستروئید (Kin/EBR) بر میزان وزن تر و خشک و محتوای نسبی آب برگ پرچم (FLRWC) سه رقم متحمل (پیشناز - 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 \pm تکرار \pm انحراف استاندارد است. بر اساس آزمون دانکن، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح $P \leq 0/05$ است).

۱۰۰٪ نداشتند. این در حالی بود که وزن خشک و محتوای نسبی آب برگ پرچم گیاهان تحت تیمار ۲۴-اپی‌براسینواستروئید بیشترین افزایش معنی‌دار را در هر سه رقم و بویژه رقم متحمل (۳۳/۰۳٪ افزایش در DW، ۱۴/۷۵٪

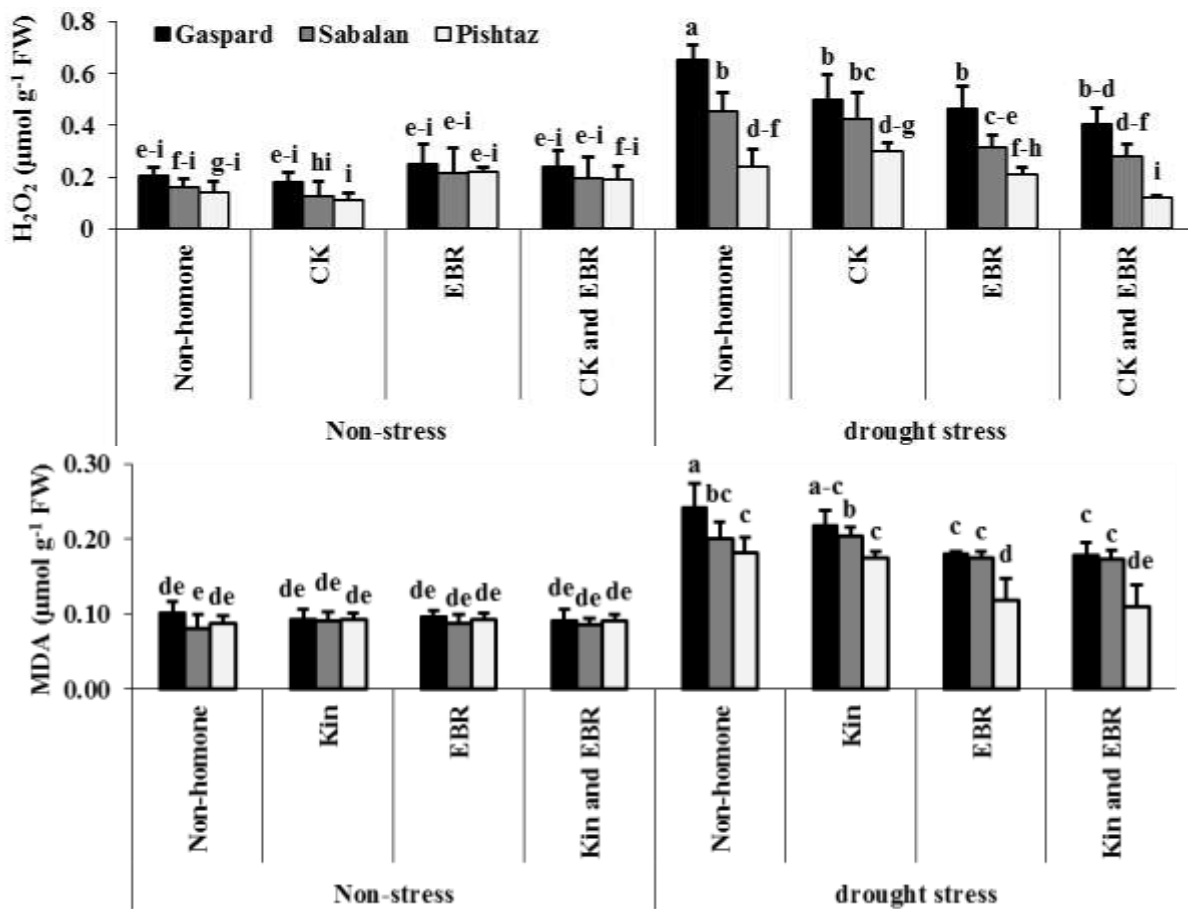


شکل ۲- تأثیر تیمارهای فاقد هورمون (Non-hormone) و هورمون کینین (Kin)، ۲۴-اپی‌براسینواستروئید (EBR) و ترکیب کینتین و ۲۴-اپی‌براسینواستروئید (Kin/EBR) سه رقم متحمل (پیش‌تاز - Pishtaz) و نیمه‌متحمل (سبلان - Sabalan) و حساس (گاسپارد - Gaspard) گندم در ظرفیت‌های زراعی ۱۰۰٪ (بدون تنش) و ۵۰٪ (بروز تنش خشکی) طی گذشت ۲۸ روز بعد از گرده‌افشانی (مقادیر میانگین \pm 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 آبسیزیک اسید درونی (ABA): مطابق انتظار، سطح آبسیزیک اسید 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 ۲۴-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 (۲/۵۶ 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 ۲۴-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 ۲/۶۸ برابر در رقم مقاوم در مقابل کاهش تقریبی ۱/۶ برابر در ارقام حساس و نیمه‌متحمل) داشت. البته تیمار انفرادی ۲۴-اپی‌براسینواستروئید نتوانست سطح پراکسید هیدروژن را در ارقام حساس و نیمه‌متحمل کاهش دهد. همچنین هر دو تیمار انفرادی ۲۴-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 ۱/۶۸ برابری مالون‌دی‌آلدئید در رقم متحمل در تیمار برهمکنش ۲۴-اپی‌براسینواستروئید و کینتین، چشمگیرتر بود. علی‌رغم نزول معنی‌دار مقدار پراکسید هیدروژن در تیمار انفرادی ۲۴-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 ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ افزایش معنی‌داری نشان داد که

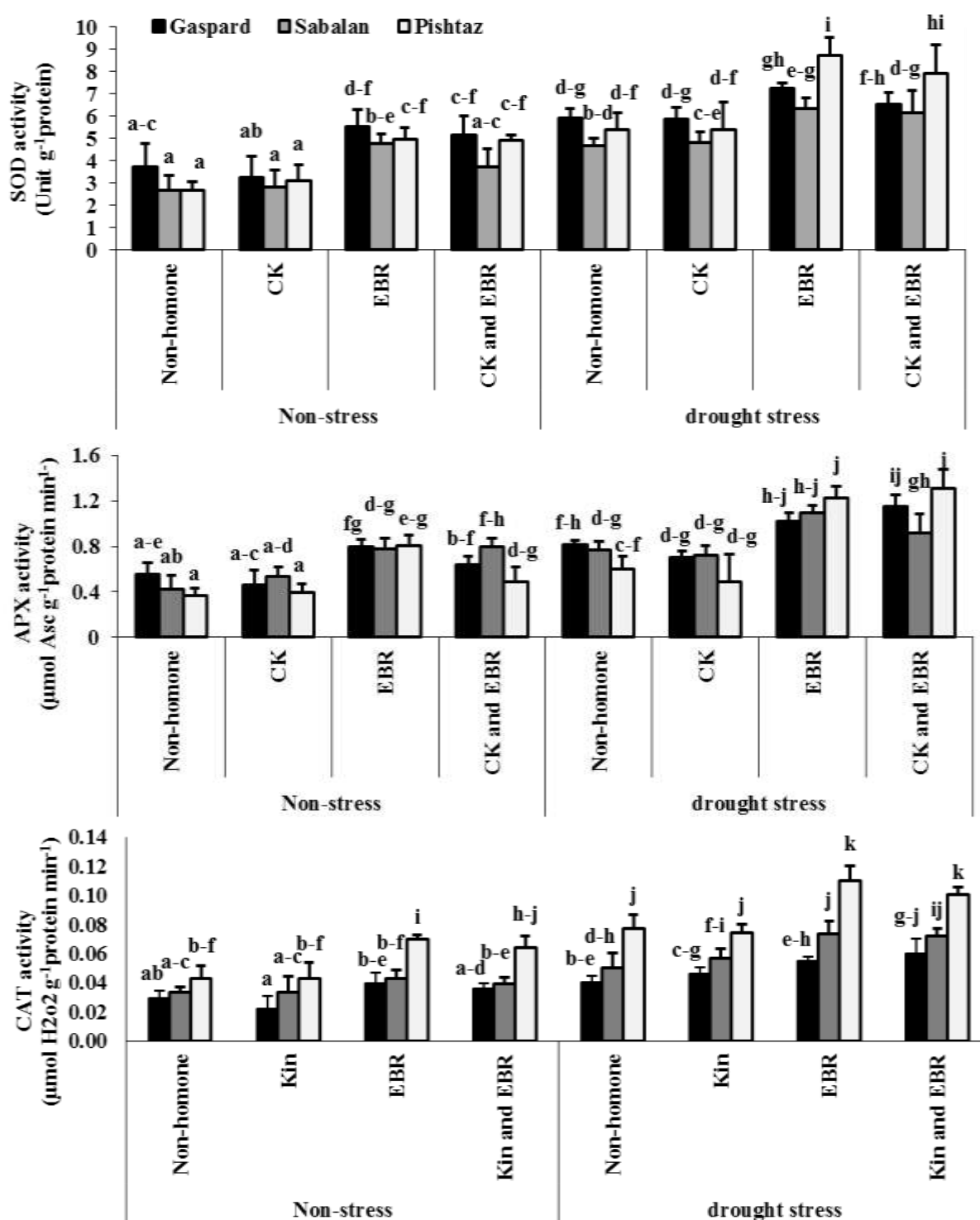


شکل ۳- تأثیر تیمارهای فاقد هورمون (Non-hormone) و هورمون کیتین (Kin)، ۲۴-اپی‌براسینواستروئید (EBR) و ترکیب کیتین و ۲۴-اپی‌براسینواستروئید (Kin/EBR) بر سطوح پراکسید هیدروژن (H₂O₂) و مالون‌دی‌آلدئید (MDA) برگ پرچم سه رقم متحمل (پشتاز- Pishtaz) و نیمه‌متحمل (سبالان- Sabalan) و حساس (گاسپارد- Gaspard) گندم در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ (بدون تنش) و ۵۰٪ (بروز تنش خشکی) طی گذشت ۲۸ روز بعد از گرده‌افشانی (مقادیر میانگین ± تکرار ± انحراف استاندارد است. بر اساس آزمون دانکن، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P ≤ 0/05 است).

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).

در رقم متحمل (پشتاز) محسوس‌تر بود (۲/۰۴ برابر افزایش فعالیت SOD و ۶۷٪ افزایش فعالیت APX و ۷۴٪ افزایش فعالیت CAT). در بین تیمارهای هورمونی، تیمار انفرادی ۲۴-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 (۷۶٪ افزایش فعالیت در رقم متحمل) در هر دو حالت بدون تنش و بروز تنش محسوس‌تر بود (شکل ۴).



شکل ۴- تأثیر تیمارهای فاقد هورمون (Non-hormone) و هورمون کینتین (Kin)، ۲۴-ایپبراسینواستروئید (EBR) و ترکیب کینتین و ۲۴-ایپبراسینواستروئید (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 ± تکرار ± انحراف استاندارد است. بر اساس آزمون دانکن، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح $P \leq 0/05$ 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 کیتین 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 می‌یابد. با اینحال برخی مطالعاتی که بر روی تاثیر زاتین ریپوزید 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 کیتین 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 کیتین). 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).

مالون‌دی‌آلدئید، 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 مالون‌دی‌آلدئید 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)، آبسزیک اسید (ABA)، مقدار پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و فعالیت آنزیم‌های 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	۰/۰۹۴	۰/۱۱۲*	۱				
MDA	۰/۰۸۱	-۰/۰۱۴	۰/۰۲۱	۰/۰۰۶*	۰/۰۱۳*	۱			
SOD	۰/۰۵۹	۰/۰۱۲	۰/۰۱۲	۰/۰۷۳	۰/۰۵۴	۰/۰۰۰	۱		
APX	۰/۰۳۱	۰/۰۱۹	۰/۰۸۰	۰/۰۹۵	۰/۰۲۱*	۰/۰۰۳*	۰/۰۱۶	۱	
CAT	۰/۰۰۸	۰/۰۰۶	۰/۰۱۳	۰/۰۶۵	۰/۰۱۴	۰/۰۰۹	۰/۰۲۱	۰/۰۰۰	۱

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

مالون‌دی‌آلدئید و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط بروز تنش وجود داشت. با اینحال در ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ نیز ارتباط مثبتی بین سطح درونی هورمون آبسزیک‌اسید و شاخص‌های تنش اکسیداتیو اندازه‌گیری شده مشاهده شد که می‌تواند دلیلی بر تاثیر تیمارهای هورمونی بر مقدار آبسزیک اسید و افزایش پراکسید هیدروژن ناشی از تغییرات سطح درونی آبسزیک‌اسید باشد. این مقدار از پراکسید هیدروژن افزایش یافته تحت تاثیر آبسزیک‌اسید برای فراتنظیمی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان لازم می‌باشد (Ghassemian *et al.*, 2008- جدول ۲ و ۳). در آزمایش انجام گرفته، تاثیر معنی‌دار تیمار انفرادی کیتین و ترکیبی کیتین و ۲۴-اپی‌براسینولید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مشاهده نشد. مسیرهای عملکردی ژن‌های ایجاد مقاومت به تنش‌های محیطی مانند آنتی‌اکسیدان‌ها کمتر در مسیر ترانس‌اسی‌علامت 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

افزایش یافته پراکسید هیدروژن و مالون‌دی‌آلدئید 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 ۲۴-اپی‌براسینولید افزایش یافتند. همچنین مطالعات نشان داده است که براسینولیدها از طریق تولید مولکول‌های میانجیگر نظیر نیتریک‌اسید و تاثیر بر بیوسنتز آبسزیک‌اسید 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 آبسزیک‌اسید درونی با مقدار پراکسید هیدروژن و

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)، آبسزیک اسید (ABA)، مقدار پراکسید هیدروژن (H₂O₂)، مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و فعالیت آنزیم‌های 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 ₂ O ₂	MDA	SOD	APX	CAT
FW	۱								
DW	۰/۱۱۸*	۱							
RWC	۰/۱۵۱*	۰/۱۷۴**	۱						
ABA	۰/۱۴۵	۰/۱۹۸**	۰/۲۱۱**	۱					
H ₂ O ₂	۰/۰۸۹	۰/۰۶۳*	۰/۱۰۷	۰/۱۹۰**	۱				
MDA	۰/۰۷۶	-۰/۰۳۹*	۰/۰۹۳	۰/۰۴۶*	۰/۳۰۲**	۱			
SOD	۰/۱۲۶	۰/۰۷۳*	۰/۱۴۶**	۰/۲۷۴**	۰/۴۲۱**	۰/۱۴۱**	۱		
APX	۰/۰۹۱*	۰/۰۸۵*	۰/۱۲۹**	۰/۲۹۶**	۰/۴۹۴**	۰/۱۸۳**	۰/۴۶۶**	۱	
CAT	۰/۰۷۹	۰/۰۵۲	۰/۱۸۱*	۰/۲۵۵**	۰/۳۱۶**	۰/۱۰۳**	۰/۳۶۷**	۰/۰۶۱**	۱

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

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی می‌توان گفت که در بررسی انجام شده، تیمار انفرادی ۲۴-اپی‌براسینولید نسبت به تیمارهای کیتین و ترکیب کیتین و ۲۴-اپی‌براسینولید در افزایش محتوای نسبی آب، غلظت آبسزیک‌اسید درونی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان موثرترین تیمار بود. در حالیکه ترکیب کیتین 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.

مانند براسینولیدها و آبسزیک اسید باعث افزایش میزان آنتی‌اکسیدان‌ها در برگ گیاه گوجه فرنگی شد. با اینحال عملکرد سیتوکینین‌هایی مانند بنزیل آدنین، زآتین ریوزید 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 مالون‌دی‌آلدئید در تیمار ترکیبی خارجی کیتین و ۲۴-اپی‌براسینولید باشد در حالیکه حداکثر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در تیمار انفرادی ۲۴-اپی‌براسینولید مشاهده شد.

- 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 Biochemistry* 47: 1–8.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay 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 Pereira, 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. (2007) 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 the survival, 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: inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical". *Plant Cell Physiology* 28: 131-140.
- 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: 175-182.
- Pepler, S., Gooding, M. J. and Ellias, R. H. (2004) Modelling simultaneously water content and dry matter dynamics of wheat grains. *Field Crop Research*
- 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. *PIOS 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 concentration in 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.