

## تأثیر پاکلوبوترازول بر بهبود تحمل به خشکی در گیاهچه‌های کلزا (*Brassica napus L.*) در شرایط کشت درون شیشه (*in vitro*)

رویا رضوی زاده<sup>۱\*</sup> و مهری عموبیگی<sup>۱</sup>

گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران- ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۹/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۱۴)

چکیده:

تنش خشکی به عنوان یک عامل محدود کننده تولیدات گیاهی است. جهت به حداقل رساندن اثرات سوء این تنش ترکیبات متعددی مورد استفاده قرار گرفته است. در این پژوهش اثر پاکلوبوترازول به عنوان یک تنظیم کننده تریازولی بر پارامترهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهچه‌های کلزا تحت تنش خشکی در شرایط کشت درون شیشه بررسی شده است. بدراهای گیاه کلزا پس از ضدعفونی، در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های صفر، ۴ و ۸ درصد وزنی مانیتول (سطوح مختلف خشکی) و غلظت‌های صفر، ۱۰ و ۲۰ ppm پاکلوبوترازول کشت گردیدند. همچنین جداکشت‌های ساقه گیاهچه‌های کلزا ای حاصل از کشت بدرا در محیط‌های کشت MS حاوی هورمون‌های ریشه‌زایی و کالوس‌زایی به همراه مانیتول (۰، ۴ و ۸٪) و پاکلوبوترازول (۰ و ۱۰ ppm) کشت گردید. نتایج به دست آمده پس از ۴ هفته نشان داد طول اندام هوایی و ریشه، وزن خشک ریشه و اندام هوایی، مقدار کلروفیل a، کلروفیل کل، کاروتینوئیدها، درصد ریشه‌زایی، درصد کالوس‌زایی و وزن ترکالوس‌ها در تنش خشکی کاهش معنی‌داری داشته است، در حالی که مقدار پراکسیداسیون لپید و قندهای احیا کننده و پرولین تحت تنش خشکی افزایش یافت. کاهش میزان پراکسیداسیون لپید و افزایش طول و وزن ریشه و اندام هوایی، قندهای احیاء کننده، پرولین، رنگزه‌های فتوسترنزی و پروتئین در گیاهچه‌هایی که به طور توازن با پاکلوبوترازول و تنش خشکی تیمار شده بودند، نسبت به گیاهچه‌هایی که فقط در معرض تنش خشکی بودند؛ احتمالاً نشان دهنده کاهش خسارت ناشی از تنش خشکی در این گیاهچه‌ها است. بنابراین پاکلوبوترازول به ویژه در غلظت ۱۰ ppm در رفع آسیب‌های حاصل از تنش در گیاهچه کلزا موثرتر بود.

کلمات کلیدی: پاکلوبوترازول، تنش خشکی، کشت درون شیشه‌ای، کلزا

مقدمه:

است. دانه‌های روغنی به دلیل تولید روغن‌های با کیفیت بالا و درصد زیادی از اسیدهای چرب مرغوب از اهمیت شایانی در تغذیه انسان برخوردار است (آلیاری و همکاران، ۱۳۷۸). در بین دانه‌های روغنی، کلزا به دلایل متعددی از اولویت خاصی برخوردار بوده و با توجه به نیاز مبرم

جنس *Brassica L.* متعلق به تیره Cruciferae و واجد ۵ گونه در ایران است. گونه *Brassica napus L.* یکی از گونه‌های زراعی و کاشته شده این جنس است، که در زبان انگلیسی به Conola، Rapeseed rape و معروف

\* نویسنده مسؤول، نشانی پست الکترونیکی: Razavi.roya@gmail.com

مقاومت به خشکی، شوری، سرما، گرمای، آلودگی هوا، شرایط غرقابی، کمبود نیتروژن و اشعه ماوراء بمنش می شود (Radmacher, 1995). پاکلوبوترازول همچنین یک تنظیم کننده بیوستتر جیرلین است و اکسیداسیون کارن به کارنیک اسید که توسط کارن اکسیداز انجام می شود را مهار می کند (Hedden and Graebe, 1985). تاثیر پاکلوبوترازول به عنوان یک ماده ضد تعرق بر روابط آبی و تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه ثابت شده است. پاکلوبوترازول موجب کاهش تعرق، ارتفاع، بیوماس، سطح برگی و افزایش مقاومت روزنها می شود (Nishizawa, 1993) از تغییرات بیوشیمیایی پاکلوبوترازول می توان افزایش کلروفیل و پرولین را نام برد (Hajihashemi et al., 2006).

هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر کاربرد تنظیم کننده پاکلوبوترازول بر وزن زا در بهبود فاکتورهای رشد و نموی و فعالیتهای فیزیولوژیکی گیاهچه کلزا و جداکشت های حاصل از آن در شرایط کشت درون شبشهای و تحت تنش خشکی و افزایش تحمل در مقابله با شرایط تنش می باشد.

### مواد و روش ها:

**مواد گیاهی:** در این تحقیق از گیاهچه کلزا (*B. napus* L.) رقم اکاپی استفاده گردید. ابتدا بذر های تهیه شده از شرکت پاکان بذر اصفهان با آب مقطور شستشو و سپس با اتانول ۷٪ به مدت ۱ دقیقه و محلول ۲۰ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۲۰ دقیقه ضد عفونی شدند. تعداد ۱۰ بذر کلزا در هر شبشه حاوی غلاظت های صفر، ۴ و ۸ درصد وزنی مانیتول (سطح مختلف خشکی) و غلاظت های صفر، ۱ و ۲۰ ppm پاکلوبوترازول قرار داده شد. به این منظور ابتدا محلول پایه ۱۰۰ ppm پاکلوبوترازول در آب مقطور تهیه شد و با توجه به غلاظت تیمار، حجم مناسبی از آن به محیط کشت اضافه گردید. پس از بستن درب محیط های کشت به اتاق کشت با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  و رطوبت ۹۵-۹۸٪ منتقل شدند. ۴ هفته بعد از رشد، گیاهچه های حاصل برای

کشور به تولید دانه های روغنی و روغن های گیاهی، سطح زیرکشت آن در حال افزایش است. این گیاه جهت تولید روغن گیاهی، غذای حیوانات و نیز سوخت های بیولوژیک استفاده می شود و پس از سویا و نخل، سومین محصول کشت شده جهت تولید روغن گیاهی در دنیا است. این گیاه از نظر اقتصادی و ارزش غذایی دارای اهمیت است (سعیدی و صدقی، ۱۳۸۷).

تنش محیطی از مهمترین عوامل کاهش دهنده محصولات کشاورزی در سطح جهان است. در این میان، آب جایگاه ویژه ای داشته و همواره از آن به عنوان تاثیر گذارترین عامل بر رشد گیاه یاد می شود. کمبود آب بیشترین سهم را در کاهش عملکرد گیاهان زراعی دارد (عظیم زاده، ۱۳۷۱). کشور ایران با متوسط نزوالت آسمانی ۲۴۰ میلی متر حدود یک سوم میزان نزولات سالانه جهانی (۷۰۰ میلی متر) را داشته و دارای اقلیم خشک و نیمه خشک است. با توجه به میانگین نرخ رشد جمعیت، تخمین زده می شود که نیاز به آب هر ۳۵ سال دو برابر افزایش پیدا می کند (وهابزاده و علیزاده، ۱۳۷۸). خشکی می تواند در اثر یک یا چند عامل آب و هوایی، که موجب کمبود آب در داخل گیاه می شود به وجود آید. کاهش مقدار آب در دستر س گیاه منجر به تنش خشکی و بروز تغییرات نامناسب مورفولوژیک و فیزیولوژیک در گیاه می شود. از جمله می توان به کاهش طول ساقه، سطح برگی، وزن تر و خشک (Sankar et al., 2007)، محتوی کلروفیل و کارتونیت (Oraki et al., 2012)، افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و پرولین (Tatar and Gevrek, 2008) اشاره کرد.

پاکلوبوترازول یک کاهش دهنده رشد گیاهی است که به گروه تریازول ها تعلق دارد. مولکول پاکلوبوترازول یک ساختار حلقوی محتوی ۳ اتم نیتروژن است و دارای دو اناتومر (2R,3R) که فعالیت قارچ کشی دارد و اناتومر (2S,3S) که فعالیت تنظیم کننده گیاه را فراهم می کند (Sugavanam, 1984) است. پاکلوبوترازول سبب ایجاد

مقدار رنگیزه‌های فتوستزی بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر محاسبه و ارائه گردیدند.

**سنجهش میزان مالوندی‌آلدئید (MDA):** برای اندازه‌گیری مالوندی‌آلدئید از روش Heat و Packer (۱۹۶۸) استفاده شد. طبق این روش ۰/۲ گرم بافت تازه برگی در هاون چینی حاوی ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد ساییده شد. عصاره حاصل به مدت ۵ دقیقه در دور g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. به ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی حاصل، ۴ میلی‌لیتر محلول TCA ۲۰ درصد که حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید (TBA) بود؛ اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حمام آب گرم حرارت داده شد. سپس بلافالسله در بین سرد شد و دوباره مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دور g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. شدت جذب این محلول با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. جذب بقیه رنگیزه‌های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کسر گردید. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل  $cm^{-1}mM^{-1}$  ۱۵۵ استفاده شد و نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر حسب وزن‌تر ارائه گردیدند.

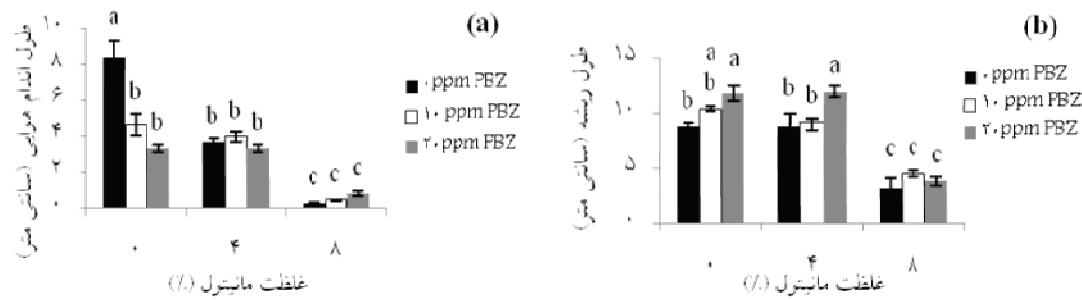
**سنجهش مقدار قندهای احیاکننده:** ۰/۰۲ گرم از بافت تازه برگ توزین گردید و با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر در هاون چینی سائیده شد. مقدار قندهای احیاکننده در برگ‌ها به روش Somogyi-Nelson (Somogyi-Nelson ۱۹۵۲) اندازه‌گیری شد. شدت جذب محلول‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد، سپس با استفاده از منحنی استاندارد غلظت قندهای احیا کننده بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر محاسبه و گزارش گردید. اندازه‌گیری مقدار پرولین: مقدار پرولین در برگ‌ها و ریشه به روش Bate و همکاران (Bate and coworkers ۱۹۷۳) اندازه‌گیری شد. بر طبق این روش ۰/۰۲ گرم از بافت تازه برگ و ریشه توزین گردید و هر نمونه جدآگانه با ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالسیلیک ۳ درصد در هاون چینی سائیده شد. بعد از

اندازه‌گیری پارامترهای مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیابی استفاده گردیدند.

برای القای کالوس و بررسی درصد کالوس‌زایی جداکشتها در سطوح مختلف تنش خشکی و غلظت‌های مختلف پاکلوبوترازول، جداکشتهای ساقه به طول ۱ cm از گیاهچه‌های کلزا ۴ هفته حاصل از کشت بذر در محیط‌های کشت MS تکمیل شده با ۲mg/L NAA (دی‌کلروفونوكسی‌استیک‌اسید)، ۲mg/L IAA (اندول‌استیک‌اسید) (نفتالن‌استیک‌اسید) و ۲mg/L (پاک مهر، ۱۳۸۹) به همراه مانیتول (صفر، ۴ و ۸ درصد وزنی) و پاکلوبوترازول (۰ و ۱۰ ppm) به مدت ۴ هفته کشت گردید. همچنین به منظور بررسی درصد ریشه زایی، جداکشتها در محیط کشت MS تکمیل شده با ۱mg/L NAA (پاک مهر، ۱۳۸۹) و غلظت‌های ذکر شده مانیتول و پاکلوبوترازول کشت گردیدند. این آزمایش با ۳ تکرار و ۱۰ نمونه در هر تکرار انجام گرفت.

**اندازه‌گیری طول و وزن خشک ساقه و ریشه:** اندازه‌گیری طول ساقه و ریشه در گیاهچه کلزا با استفاده از خطکش میلی‌متری انجام شد و بر اساس واحد سانتی‌متر گزارش شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک نمونه‌ها در فویل آلومینیومی پیچیده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. وزن خشک نمونه‌ها با ترازوی دیجیتالی مدل KERN pls با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد.

**سنجهش مقدار کلروفیل و کاروتینوئید:** برای سنجش مقدار کلروفیل و کاروتینوئید از روش Lichtenthaler (Lichtenthaler ۱۹۸۷) استفاده شد. برای استخراج این رنگیزه‌ها، برگ‌ها در استن ۸۰ درصد خوب سائیده شدند. پس از صاف کردن، جذب آنها در طول موج‌های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲۰ و ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر RAY LEIGH UV 1601 خوانده شد. جهت تنظیم دستگاه از استن ۸۰ درصد استفاده شد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری



شکل ۱- بررسی اثر متقابل خشکی (مانیتول) و پاکلوبوترازول (PBZ) بر طول اندام هوایی(a) و عمق ریشه (b) گیاهچه‌های کلزا. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون Duncan می باشد ( $p \leq 0.05$ ).

سطوح معنی دار بودن تیمارها در سطح  $p \leq 0.05$  محاسبه گردید.

#### نتایج:

**طول اندام هوایی:** تیمار خشکی باعث کاهش معنی دار طول اندام هوایی نسبت به گروه شاهد در محیط بدون مانیتول شد. در تیمار توأم خشکی و پاکلوبوترازول، پاکلوبوترازول در طول اندام هوایی گیاهچه‌های تحت تنش خشکی اثر معنی داری نداشت (شکل ۱a).

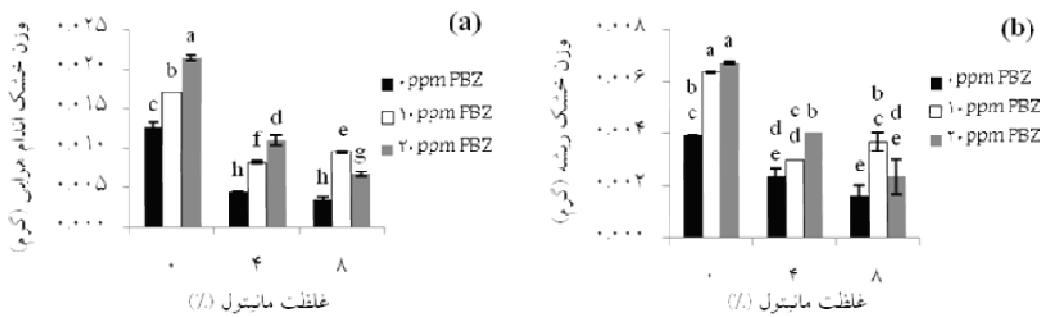
**عمق ریشه:** تیمار خشکی باعث کاهش معنی دار عمق ریشه در خشکی و پاکلوبوترازول، پاکلوبوترازول در مانیتول شد. در محیط بدون مانیتول عمق ریشه در گیاهچه‌هایی که با ۲۰ ppm پاکلوبوترازول تیمار شده بودند، نسبت به گروه شاهد افزایش معنی داری یافت. در تیمار توأم خشکی و پاکلوبوترازول، تیمار پاکلوبوترازول در غلظت ۲۰ ppm موجب افزایش معنی دار عمق ریشه گیاهچه‌های تحت تنش خشکی ۴٪ مانیتول گردید (شکل ۱b).

**وزن خشک اندام هوایی:** تنش خشکی باعث کاهش معنی داری در وزن خشک اندام هوایی گیاهچه‌ها نسبت به گروه شاهد شد. در محیط بدون مانیتول هر دو غلظت پاکلوبوترازول باعث کاهش معنی دار وزن خشک اندام

سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها و اضافه کردن معرف نین هیدرین و اسید استیک خالص به محلول رویی، قرار دادن در بن ماری به مدت یک ساعت، افزودن تولوئن و جداسازی محلول بالایی، شدت جذب محلول‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. سپس با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت پرولین بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه و گزارش گردید.

**ستجش مقدار کل پروتئین‌ها:** ۰/۰۲ گرم از بافت تازه برگ توزین گردید و با ۴ میلی‌لیتر بافر فسفات نمکی در هاون چینی که در درون یخ قرار داده شده بود؛ سائیده شد. پس از سانتریفیوژ نمودن به محلول رویی معرف A (کربنات سدیم اشباع)، معرف B (محلول سولفات مس یک درصد)، معرف C (ترکیبی از معرف‌های فوق) و معرف D (فولن-سیوکالتو) مطابق با روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) افزوده و در بن ماری در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر خوانده شد. در پایان میزان پروتئین بر حسب میلی‌گرم به گرم وزن تر با استفاده از رسم منحنی استاندارد توسط آلبومن گاوی محاسبه و گزارش گردید.

**محاسبات آماری:** تمام آزمایشات طبق طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایشات فاکتوریل انجام شد و آنالیز واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. مقایسه میانگین براساس آزمون Duncan انجام گردید و



شکل ۲- بررسی اثر متقابل خشکی (مانیتول) و پاکلوبوترازول (PBZ) بر وزن خشک اندام هوایی(a) و ریشه (b) گیاهچه‌های کلزا. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون Duncan می باشد (p≤0.05).

در هر دو غلظت پاکلوبوترازول میزان کلروفیل *b*، کلروفیل *a*، کلروفیل کل و کارتنوئیدها در گیاهچه‌های تحت تنش ۴٪ مانیتول افزایش معنی داری یافت. به کار بردن پاکلوبوترازول در غلظت ۱۰ ppm افزایش معنی داری در میزان کلروفیل *b*، کلروفیل کل و کارتنوئیدها در سطح خشکی ۸٪ مانیتول ایجاد کرد (شکل ۳).

**قدنهای احیاکننده:** تیمار خشکی باعث افزایش قندهای احیاکننده اندام هوایی گردید تیمار پاکلوبوترازول به تنهایی نیز باعث افزایش معنی دار میزان قندهای احیا کننده نسبت به شاهد شد. افزایش قندهای احیاکننده در تنش خشکی ۴٪ مانیتول و ۲۰ ppm پاکلوبوترازول و همچنین تنش خشکی ۸٪ مانیتول و ۱۰ و ۲۰ ppm پاکلوبوترازول نسبت به همان سطح تنش خشکی مشاهده شد (شکل ۴ a).

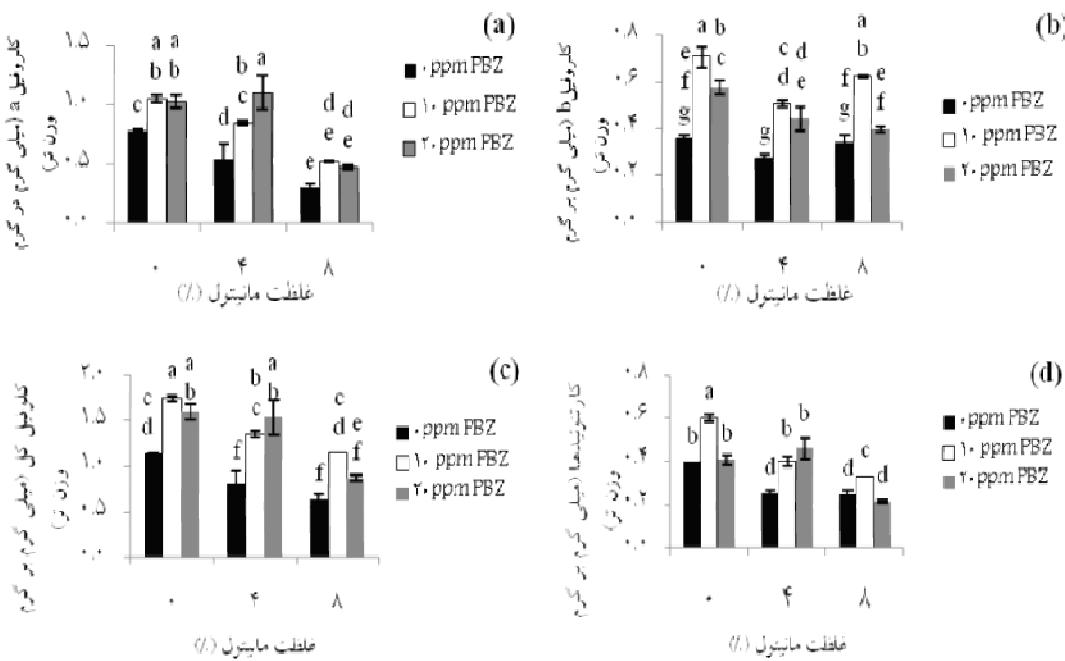
**تجمع مالوندی‌آلدهید (MDA):** در این آزمایش تنش خشکی ۸٪ موجب افزایش معنی داری در میزان MDA گردید. تیمار پاکلوبوترازول به تنهایی باعث کاهش معنی دار MDA نسبت به گروه شاهد گردید. در تیمار تؤام مانیتول و پاکلوبوترازول، هر دو غلظت پاکلوبوترازول میزان MDA را در گیاهچه‌های تحت تنش خشکی ۴ و ۸٪ به طور معنی داری کاهش داد (شکل ۴ b).

**پرولین ریشه و اندام هوایی:** مقدار پرولین اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌های تحت تنش خشکی ۴٪ مانیتول

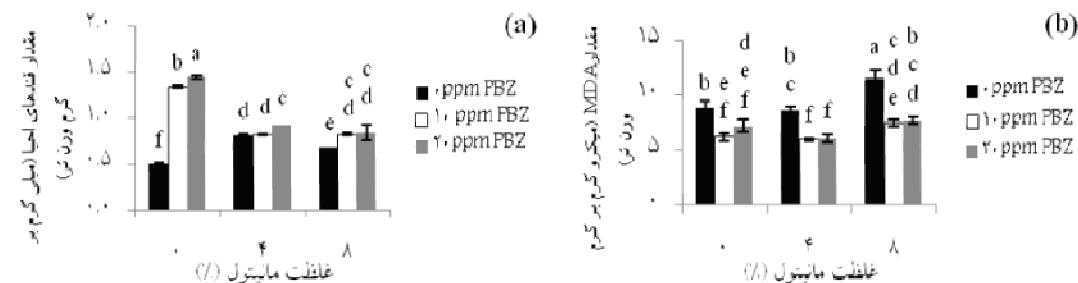
هوایی گیاهچه‌های کلزا نسبت به گروه شاهد شد. در تیمار تؤام خشکی و پاکلوبوترازول، هر دو غلظت پاکلوبوترازول باعث افزایش معنی داری در وزن خشک اندام هوایی گیاهچه‌های تحت خشکی ۴ و ۸٪ مانیتول گردید (شکل ۲ a).

**وزن خشک ریشه:** تنش خشکی باعث کاهش معنی داری در وزن خشک ریشه گیاهچه نسبت به گروه شاهد شد. در محیط بدون تنش خشکی تیمار پاکلوبوترازول باعث افزایش معنی دار وزن خشک ریشه گیاهچه‌های کلزا نسبت به گروه شاهد گردید. در تیمار تؤام خشکی و پاکلوبوترازول، در گیاهچه‌های تحت تیمار پاکلوبوترازول ۲۰ ppm و تنش خشکی ۴٪ مانیتول و همچنین در گیاهچه‌های تحت تیمار ۱۰ ppm پاکلوبوترازول و تنش خشکی ۸٪ مانیتول وزن خشک ریشه، نسبت به گیاهچه‌ها در همان سطح تنش خشکی افزایش معنی داری مشاهده گردید (شکل ۲ b).

**کلروفیل *a* و کلروفیل کل و کارتنوئیدها:** در گیاهچه مورد مطالعه میزان کلروفیل *a*، کلروفیل کل و کارتنوئیدها با افزایش خشکی کاهش معنی داری نسبت به گروه شاهد نشان داد. هر دو غلظت پاکلوبوترازول در گیاهان بدون تیمار خشکی باعث افزایش معنی دار میزان کلروفیل *a* و کلروفیل کل گردید. در حالی که تیمار پاکلوبوترازول فقط در غلظت ۱۰ ppm افزایش معنی داری در میزان کارتنوئیدها نسبت به گروه شاهد بدون مانیتول ایجاد کرد.



شکل ۳- بررسی اثر متقابل خشکی (مانیتول) و پاکلوبوترازول (PBZ) بر میزان کلروفیل a (a)، کلروفیل b (b)، کلروفیل کل (c) و گیاهچه های کلزا (d) مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون Duncan می باشد  $(p \leq 0.05)$ .

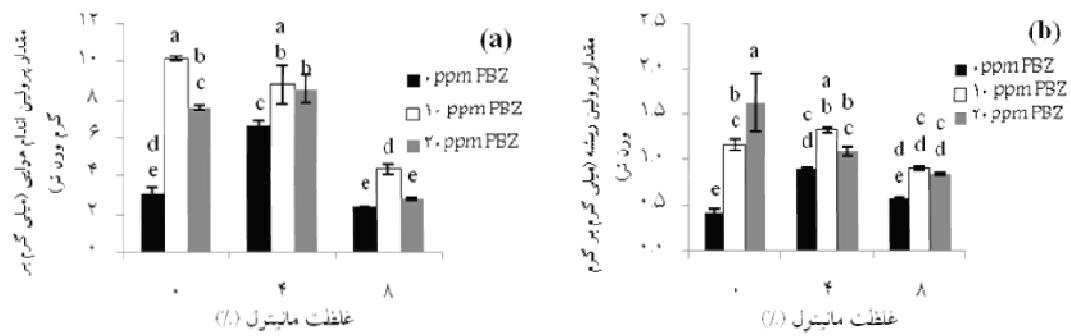


شکل ۴- بررسی اثر متقابل خشکی (مانیتول) و پاکلوبوترازول (PBZ) بر مقدار قندهای احیا کننده (a) و میزان MDA (b) گیاهچه های کلزا مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون Duncan می باشد  $(p \leq 0.05)$ .

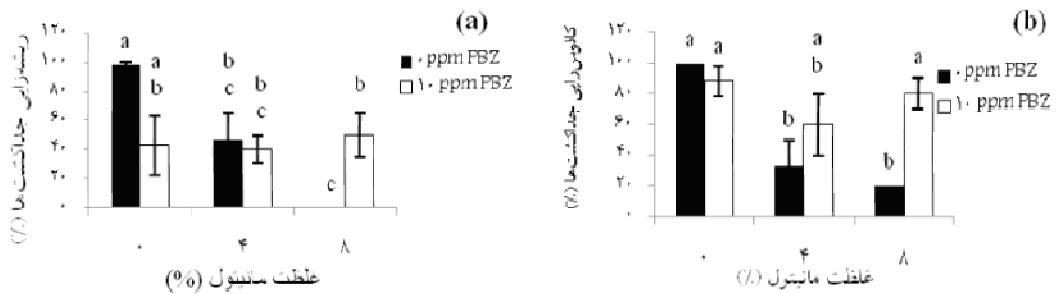
تنش خشکی ۴٪ مانیتول گردید. همچنین پاکلوبوترازول در غلظت ۲۰ ppm در پرولین اندام هوایی گیاهچه های در سطح تنش خشکی ۴٪ مانیتول افزایش معنی داری ایجاد کرد.

درصد ریشه زایی: پس از ۴ هفته، بیشترین درصد ریشه زایی در قطعات جدا کشتم کشت شده در محیط MS

افراش یافت (شکل ۵). تیمار پاکلوبوترازول در محیط بدون تنش خشکی موجب افزایش معنی دار میزان پرولین اندام هوایی و ریشه گیاهچه ها نسبت به گیاهان گروه شاهد شد. به کار بردن پاکلوبوترازول در غلظت ۱۰ ppm باعث افزایش معنی دار پرولین اندام هوایی گیاهچه ها در هر دو سطح تنش خشکی و همچنین پرولین ریشه در سطح



شکل ۵- بررسی اثر متقابل خشکی (مانیتول) و پاکلوبوترازول (PBZ) بر میزان پرولین اندام هوایی (a) و پرولین ریشه (b) گیاهچه‌های کلزا. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون Duncan می‌باشد ( $p \leq 0.05$ ).



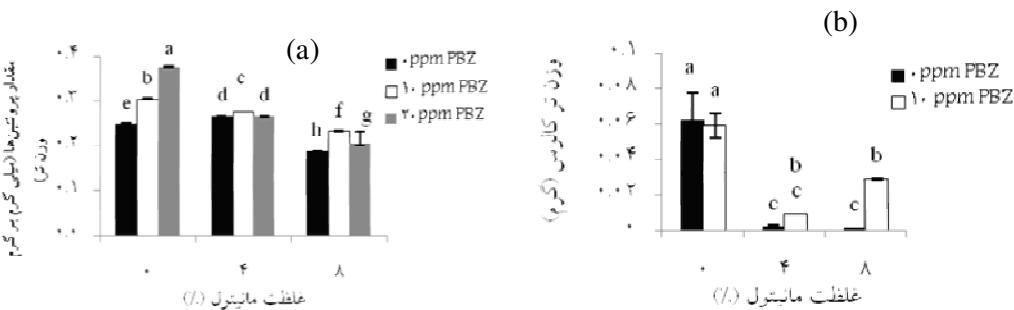
شکل ۶- اثر متقابل خشکی (مانیتول) و پاکلوبوترازول (PBZ) بر درصد ریشه‌زایی جداكته‌های کلزا (a) و درصد کالوس‌زایی جداكته‌های کلزا (b). مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون Duncan می‌باشد ( $p \leq 0.05$ ).

معنی داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافت و در قطعات جداکشت به ویژه در تنفس خشکی ۸٪ مانیتول آثاری از قهقهه‌ای شدن مشاهده شد. در تیمار توأم خشکی و پاکلوبوترازول، درصد کالوس‌زایی در محیط حاوی پاکلوبوترازول و تنفس خشکی ۸٪ مانیتول نسبت به جداکشت‌های تحت تنفس، به طور معنی داری افزایش یافت (شکل ۶).

**مقدار پروتئین:** پروتئین کل در گیاهچه‌های تحت تنفس خشکی ۴٪ مانیتول افزایش و تحت تنفس خشکی ۸٪ مانیتول نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری یافت. در محیط بدون مانیتول هر دو غلظت پاکلوبوترازول افزایش معنی داری در میزان پروتئین‌ها نسبت به گروه شاهد ایجاد کرد. در تیمار توأم پاکلوبوترازول و خشکی، پاکلوبوترازول موجب افزایش معنی دار پروتئین‌ها گردید که این افزایش

حاوی هورمون ریشه‌زایی مشاهده شد (۹۸٪). ریشه‌ها به خوبی رشد کردند به نحوی که تمام سطح محیط کشت از ریشه‌های سفید رنگ و منشعب پوشیده شد. با افزایش تنفس خشکی درصد ریشه‌زایی جداکشت‌ها به طور معنی داری کاهش یافت. در سطح خشکی ۸٪ مانیتول هیچ یک از جداکشت‌ها ریشه تولید نکردند (۰٪). در جداکشت‌های تحت تیمار پاکلوبوترازول و خشکی ۸٪ مانیتول، ریشه با انشعابات فراوان تشکیل شد و درصد ریشه‌زایی به طور معنی داری افزایش یافت (شکل ۶a).

**درصد کالوس‌زایی:** پس از ۴ هفته، در همه قطعات جداکشت در محیط MS حاوی هورمون‌های کالوس‌زایی تمایز زدایی صورت گرفت و کالوس تشکیل شد (۱۰۰٪ کالوس‌زایی) و کالوس‌ها سبز رنگ، ترد و شکننده بودند. با افزایش تنفس خشکی درصد کالوس‌زایی، به طور



شکل ۷- اثر مقابله خشکی (مانیتوول) و پاکلوبوترازول (PBZ) بر وزن تر کالوس های (a) و بر وزن تر کالوس های (b) گیاهچه کلزا. مقدار میانگین سه تکرار و حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون Duncan می باشد ( $p \leq 0.05$ ).

نقش پاکلوبوترازول بر پارامترهای رشد گزارش های متعددی وجود دارد. از جمله گزارش شده است که پاکلوبوترازول کاهش رشد ناشی از تنفس سرمایی (Pinhero and Fletcher, 1994) و تنفس خشکی (Matta *et al.*, 1998) را بهبود می بخشد. با توجه به اینکه رشد و تقسیم سلولی نیازمند حفظ فشار تورژسانس می باشد و سلول ها باید حجم مناسبی برای تقسیم داشته باشند؛ بنابراین به دنبال کمبود آب و ایجاد تنفس اسموتیک، با از دست رفتن آب سلول ها، فشار تورژسانس و حجم سلول کاهش یافته و این امر موجب کاهش رشد و تقسیم سلولی می گردد (Xing and Zhu, 2002). لذا بهبود پارامترهای رشد در گیاهچه های تحت تنفس خشکی و پاکلوبوترازول را می توان به نقش پاکلوبوترازول در افزایش محتوی آب سلول ها نسبت داد (Berova and Zlatev, 2003).

یکی از ویژگی های مطلوب جهت ارزیابی تأثیر تنفس خشکی بر گیاهان، تعیین وزن خشک گیاه می باشد. بنابراین روند عمومی که گیاهان در شرایط تنفس خشکی با آن روبرو هستند، کاهش وزن خشک می باشد (Farooq *et al.*, 2009). در این پژوهش نیز تنفس خشکی موجب کاهش وزن خشک اندام هوایی و ریشه گردید. یکی از دلایل کاهش وزن خشک در گیاهان تحت تنفس خشکی، کاهش فتوستتر می باشد. تنفس خشکی از طریق اختلال در ساختار غشاء، ایجاد بی نظمی در ساختار اندامکها و به هم ریختن عملکرد روزنه ها موجب کاهش نرخ فتوستتر و در نهایت کاهش رشد گیاه می شود (Zhang *et al.*, 1997). در این

در سطح خشکی ۴٪ مانیتوول با پاکلوبوترازول ۱۰ ppm و ۲۰ ppm در سطح خشکی ۸٪ مانیتوول با غلاظت ۱۰ ppm و ۲۰ ppm پاکلوبوترازول معنی دار شد (شکل a).

**وزن تر کالوس:** در هر دو سطح تنفس خشکی کاهش معنی داری در وزن تر کالوس ها نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. وزن تر کالوس های تولید شده در محیط حاوی پاکلوبوترازول و بدون مانیتوول تفاوت معنی داری نسبت به کالوس های بدون تیمار نداشت. در تیمار توأم پاکلوبوترازول و تنفس خشکی، پاکلوبوترازول فقط توانست وزن تر کالوس های تحت تنفس خشکی ۸٪ مانیتوول را به طور معنی داری افزایش دهد (شکل b).

## بحث:

تنفس خشکی به عنوان یک عامل مهم محیطی بر پارامترهای رشد گیاه اثر می گذارد. گزارش هایی مبنی بر کاهش طول ریشه و ساقه تحت تنفس خشکی وجود دارد (Khoshsohan *et al.*, 2012). در این پژوهش نیز کاهش طول ریشه و ساقه تحت تنفس خشکی مشاهده گردید. مشخص گردیده است که گونه های مقاوم به خشکی، با تغییر صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و آناتومی قادر به ایجاد ساختارهای مقاوم به خشکی می باشند. از جمله اینکه ژنتیک های برتر کلزا سیستم ریشه ای خود را به نحو مؤثر گسترش داده و قادر به استفاده حداقل از رطوبت موجود در خاک می باشند (تورچی و همکاران ۱۳۸۴). در مورد

تحت تیمار توأم پاکلوبوترازول و خشکی نسبت به گیاهچه‌های تحت همان مقدار خشکی افزایش داد. کارتنتوئیدها ترکیبات تتراترپنی می‌باشند که به عنوان حامی رنگیزه‌های فتوستتری و غیر فتوستتری شناخته شده‌اند که می‌توانند انرژی اضافی طول موج‌های کوتاه را بگیرند و اکسیژن یکتاپی را به اکسیژن سه تاپی تبدیل کرده و با گرفتن رادیکال‌های اکسیژن تولید شده نقش آنتی‌اکسیدانی از خود بروز دهند (Inze and Montagu, 2000). در این تحقیق کاهش معنی‌داری در مقدار کاروتوئید طی تنش خشکی مشاهده شد. در حالی که پاکلوبوترازول در شرایط تنش و غیر تنش موجب افزایش کارتنتوئیدها گردید. نتایج مشابهی از اثر حفاظتی پاکلوبوترازول از طریق افزایش مقدار کارتنتوئیدها بر گیاهان تحت تنش خشکی گزارش شده است (Amina and Hanan, 2011; Percival and Noviss, 2008) تجمع کربوهیدرات‌ها که در تنظیم اسمزی جهت مقاومت به خشکی در گیاهان نقش ایفا می‌کند اغلب تحت تنش خشکی و دهیدراسیون مشاهده شده است. علاوه بر نقش قندها در تعديل اسموتیکی، قندها در حفظ پروتئین‌ها، حفظ سیالیت غشا و زدودن رادیکال‌های آزاد اکسیژن نقش دارند. تجمع قندهای محلول طی تنش خشکی در آفتابگردان گزارش شده است (Oraki et al., 2012). در مطالعه حاضر میزان قندها در گیاهچه‌های تحت خشکی افزایش یافت. میزان قندها در گیاهان تحت خشکی افزایش قندها در شرایط کمبود آب در گیاه *Brassica rapus* را تحرک بیشتر ذخایر پلی‌ساقاریدی دانستند. طی تنش خشکی در گیاه گندم مقدار تجمع قندها با تیمار پاکلوبوترازول افزایش یافت (Amina and Hanan, 2011). به نظر می‌رسد کاربرد پاکلوبوترازول در این تحقیق از طریق افزایش قندها سبب افزایش سازگاری گیاهچه‌ها به شرایط تنش شده است. از آنجایی که پاکلوبوترازول باعث تعديل در کاهش مقدار رنگیزه‌های فتوستتری در شرایط تنش خشکی می‌شود، بنابراین افزایش مقدار قندها در تیمار توأم خشکی و پاکلوبوترازول را می‌توان به نقش پاکلوبوترازول در تعديل

پژوهش پاکلوبوترازول وزن خشک اندام هوایی و ریشه را در گیاهچه‌های کلزا تحت تنش خشکی بهبود بخشید. نتایج مشابهی از افزایش وزن خشک ریشه و اندام هوایی با به کار بردن پاکلوبوترازول در گیاهان تحت تنش گزارش شده است (Gilley and Fletcher, 1997). در واقع می‌توان این گونه توجیه کرد که افزایش رشد ریشه و گسترش سیستم ریشه‌ای در گیاهچه‌های تحت تیمار پاکلوبوترازول موجب افزایش توده ریشه و افزایش وزن خشک گردیده است.

در این پژوهش کاهش مقدار کلروفیل *a* و کلروفیل کل گیاهچه‌های تحت تنش خشکی مشاهده شد. گزارش مشابهی مبنی بر کاهش مقدار کلروفیل در آفتابگردان وجود دارد (Oraki et al., 2012). رادیکال‌های آزاد تولید شده در طی تنش باعث تجزیه رنگیزه‌های فتوستتری و در نتیجه کاهش رنگیزه‌ها می‌گردد (Sairam et al., 1998). تنش خشکی همچنین با افزایش برخی از تنظیم‌کننده‌های رشد نظیر اتیلن و اسید‌آبسیزیک، فعالیت کلروفیل‌از را تحریک و باعث تجزیه کلروفیل می‌گردد (Draikewicz, 1994). بنابراین کاهش مقدار کلروفیل مشاهده شده در این تحقیق احتمالاً می‌تواند به دلیل کاهش سنتز کلروفیل و افزایش تجزیه آن باشد. در این پژوهش افزایش میزان کلروفیل کل با به کار بردن پاکلوبوترازول مشاهده شد. افزایش غلظت کلروفیل در برگ‌های گیاهان تیمار شده با پاکلوبوترازول ممکن است به افزایش غلظت کلروفیل در هر کلروپلاست، افزایش تعداد کلروپلاست در هر سلول برگ و افزایش تعداد سلول‌ها در واحد سطح برگ مربوط باشد (Kishorekumar et al., 2006). همچنین مشاهده شده است که پاکلوبوترازول باعث افزایش رنگیزه‌های فتوستتری در گیاهان تحت تیمار خشکی (Amina and Hanan, 2011; Percival and Noviss, 2008) و تیمار سرمایی (Pinhero and Fletcher, 1994) شده است. در این پژوهش نیز پاکلوبوترازول مقدار رنگیزه‌های فتوستتری را به طور قابل توجهی در برگ گیاهچه‌های کلزا

بیوستز پرولین و کاهش فعالیت پرولین دهیدروژنаз و پرولین اکسیداز در مسیر کاتابولیسم پرولین ناشی می‌شود (Parida and Das, 2005). بنابراین دلیل تجمع پرولین در گیاهچه کلزا افزایش بیوستز پرولین و یا کاهش تجزیه آن در اثر تیمار با پاکلوبوترازول می‌باشد.

پروتئین‌های زیادی در گیاهان شناخته شده‌اند که در تنش خشکی بیان می‌شوند و حتی بیان بسیاری از پروتئین‌های که جزء متابولیسم اصلی گیاهان هستند در شرایط تنش خشکی افزایش نشان می‌دهند. از جمله پروتئین‌های که در تنش اسمزی افزایش پیدا می‌کنند می‌توان به پروتئین‌های فراوان با تأثیر جنبن زایی (LEA‌ها)، دهیدرین‌ها، پروتئین‌های مربوط به سیستم دفاعی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و پروتئین‌های دخیل در ستر محافظت کننده‌های اسمزی اشاره کرد (Sha Vali Khan *et al.*, 2007). بنابراین به نظر می‌رسد در گیاهچه‌های کلزا تحت تنش خشکی ملایم (۴٪/مانیتول) گروههایی از پروتئین‌های فوق افزایش یافته و سبب مقاومت گیاهچه‌ها به تنش شده‌اند. از طرفی با توجه به نقش پرولین در حفاظت پروتئین‌ها در برابر دناتوره شدن (Delauney and Verma, 1993؛ Afzaiš مقدار پروتئین‌ها تحت تنش خشکی ملایم را می‌توان به افزایش پرولین در این سطح تنش نسبت داد. در مقابل کاهش مقدار پروتئین‌ها در غلاظت بالاتر مانیتول (۸٪) می‌تواند به دلیل کاهش فتوستز و کاهش مواد مورد نیاز برای ستر پروتئین‌ها باشد (Havaux *et al.*, 1987). از دلایل دیگر کاهش پروتئین‌ها در این سطح تنش خشکی، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد چرا که این ترکیبات موجب مهار ستر پروتئین‌ها و یا منجر به دناتوره شدن آنها می‌گردند (Sgherri and Navari-Izzo, 1995).

در این پژوهش به کار بردن پاکلوبوترازول در شرایط تنش و غیرتنش موجب افزایش پروتئین‌ها شده است. گزارش مشابهی مبنی بر افزایش میزان پروتئین‌ها در گیاهان گندم تیمار شده با پاکلوبوترازول وجود دارد (Nouriyani *et al.*, 2012). می‌توان این‌گونه اظهار کرد که پاکلوبوترازول با القای ستر

کاهش مقدار رنگیزه‌های فتوستزی نسبت داد. رادیکال‌های سوپراکسید تولید شده توسط خشکی باعث پراکسیداسیون لیپیدها می‌شوند (Sairam *et al.*, 1998). نتیجه پراکسیداسیون مقدار مالون دی‌آلدئید می‌باشد. در این تحقیق مقدار مالون دی‌آلدئید در تنش خشکی در گندم گزارش شده است (Tatar and Gevrek, 2008). پاکلوبوترازول همچنین با جاروب کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن در طول تنش خشکی موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدها، حفظ تمامی غشا و کاهش تراوش الکتروولیت‌ها در دانه‌رست گندم گردید (Amina and Hanan, 2011؛ Gilley and Fletcher, 1997). در این تحقیق مشخص است که پاکلوبوترازول میزان پراکسیداسیون لیپیدها ناشی از تنش خشکی را کاهش داده است، بنابراین احتمالاً پاکلوبوترازول به نوعی با کاهش پراکسیداسیون لیپیدها از طریق اثر بر مکانیسم‌های دفاع آنزیمی و غیرآنزیمی، گیاهچه کلزا را در مقابل تنش اکسایشی محافظت کرده است.

تحت تنش خشکی ۴٪/مانیتول میزان پرولین اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌های کلزا افزایش یافت. تجمع پرولین تحت تنش خشکی می‌تواند به دلیل نقش آن به عنوان یک اسمولیت در تنظیم اسمزی و حفاظت از بسیاری از پروتئین‌ها و آنزیم‌های سیتوپلاسمی باشد (Delauney and Verma, 1993). گزارش‌های متعددی حاکی از این است که پاکلوبوترازول بر میزان پرولین اثر می‌گذارد. گزارش شده است که پاکلوبوترازول موجب افزایش مقدار پرولین در گندم شده است (Tatar and Gevrek, 2008). همچنین گزارش شده است که پاکلوبوترازول موجب افزایش پرولین در گیاهان تحت تنش شده است (Amina and Hanan, 2011؛ Percival and Noviss, 2008). در پژوهش حاضر نیز پاکلوبوترازول مقدار پرولین را به طور قابل توجهی در اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌های کلزا افزایش داده است. افزایش میزان پرولین از افزایش فعالیت آنزیم دلتا-۱ پرولین-۵-کربوکسیلات‌ردوکتاز در مسیر

(Aazami *et al.*, 2010). در این پژوهش نیز درصد ریشه‌زایی جداکشت‌ها در شرایط تنش خشکی کاهش یافت. تاثیر پاکلوبوترازول بر رشد و نمو گیاهان در شرایط کشت درون شیشه‌ای خیلی کم مطالعه شده است. در این تحقیق پاکلوبوترازول درصد کالوس‌زایی، درصد ریشه‌زایی و وزن‌تر کالوس‌ها را تحت تنش خشکی تا حد معنی داری بهبود بخشید. نتایج متفاوتی از تأثیر پاکلوبوترازول بر ریشه‌زایی در شرایط کشت درون شیشه‌ای به دست آمده است. پاکلوبوترازول تشکیل ریشه را در جداکشت‌ها در تعدادی از گونه‌ها بهبود بخشید (Davis *et al.*, 1986). در حالی که درصد ریشه‌زایی در *Phaseolus* جداکشت‌های تیمار شده با پاکلوبوترازول در *wiesman and Riov*, 1994 کاهش یافت (wiesman and Riov, 1994). در کل توانایی تولید ریشه به منظور ریزازدیادی گونه‌های گیاهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و تولید مطلوب ریشه سهم زیادی در انتقال موفقیت‌آمیز گیاه به خاک دارد (Nizam and Te-chato, 2009). یکی از مکانیسم‌های سازشی گیاه به تنش خشکی بهبود سیستم ریشه‌زایی گیاه است (Misra *et al.*, 1996). بنابراین افزایش درصد ریشه‌زایی توسط پاکلوبوترازول در شرایط خشکی نشان‌دهنده نقش آن در افزایش مقاومت به تنش است. همچنین پاکلوبوترازول با حفظ توانایی تکثیر سلول‌ها و محتوای آب بافت موجب بهبود درصد کالوس‌زایی و وزن‌تر کالوس‌های کلزا در شرایط تنش گردید.

#### نتیجه‌گیری:

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد گیاهچه‌های کلزا تا حدودی مقاوم به تنش خشکی هستند اما با افزایش شدت تنش، مکانیسم‌های مقاومتی گیاهچه برای مقابله با این تنش شدید کارآمد نیستند. تیمار گیاهچه‌ها با پاکلوبوترازول توانست با ایجاد تغییراتی در فرآیندهای

پروتئین‌هایی مشابه با پروتئین‌های مقاومتی سنتز شده طی تنش و همچنین با ممانعت از تخریب پروتئین‌ها از طریق افزایش سیستم دفاعی و اسمولیت‌هایی مانند پروولین موجب افزایش مقدار پروتئین‌ها و حفاظت از آنها و در نهایت افزایش مقاومت گیاهچه کلزا به تنش خشکی گردیده است.

همچنین در این پژوهش با افزایش تنش خشکی درصد کالوس‌زایی و وزن‌تر کالوس‌ها کاهش یافت. در بررسی Abdelsamad و همکاران (۲۰۰۷) بر روی گندم نیز مشخص شد که درصد کالوس‌زایی و وزن‌تر کالوس‌ها تحت تنش خشکی در شرایط کشت درون شیشه‌ای کاهش می‌یابد و این کاهش به ژنوتیپ گیاه بستگی دارد و همبستگی مثبتی را بین تشکیل کالوس و وزن کالوس نشان دادند. عموماً میزان توانایی تشکیل کالوس یک ویژگی کارآمد برای بررسی پاسخ گیاه و میزان مقاومت به تنش خشکی محسوب می‌شود و وزن‌تر کالوس یک ویژگی کمی برای بررسی سرعت رشد کالوس در نظر گرفته می‌شود (Abdelsamad *et al.*, 2007). کاهش رشد و وزن‌تر کالوس تحت تنش خشکی در *Pinus taeda* گزارش شده است (Newton *et al.*, 1986). کاهش وزن‌تر کالوس نشان‌دهنده از دست رفتن آب سلول در شرایط تنش است (Newton *et al.*, 1986). گزارش‌های دیگری مبنی بر کاهش وزن‌تر و محتوی آب کالوس تحت تنش خشکی القا شده با پلی‌ایتلین‌گلیکول (PEG) وجود دارد (Abdul-Qadir and Al-Ka'aby, 2011; Ehsanpour and Razavizadeh, 2005). قهوه‌ای شدن در بافت‌های گیاهی به وسیله پلی‌فنل‌اکسیداز صورت می‌گیرد و عموماً بعد از آسیب دیدن بافت‌ها ایجاد می‌گردد (احسان پور و امینی ۱۳۸۲). بنابراین آثار قهوه‌ای شدن در جداکشت‌های تحت تیمار ۸٪ مانیتور در این تحقیق نشان دهنده آسیب زیاد به بافت‌ها است. همچنین حضور PEG در محیط کشت بر پارامترهای مربوط به باززنایی جداکشت‌ها موثر است. اضافه کردن PEG به محیط کشت، رشد کالوس و ظرفیت باززنایی گیاه گوجه فرنگی را کاهش داد

فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی اثرات تخریبی ناشی از تنفس خشکی را در این گیاهان بهبود بخشد.

### تشکر و قدردانی:

نویسندهای این مقاله از قطب تنفس های گیاهی دانشگاه اصفهان تشکر و قدردانی می نمایند.

- haploid wheat using biochemical genetic markers on *in vitro* culture. Journal of Applied Sciences Research 3: 1589-1599.
- Abdul-Qadir, L. H. and Al-Ka'aby, H. K. (2011) The effect of water stress on callus and somatic embryos formation of rice (*Oryza sativa* L.) cv. Jasmine cultured *in vitro*. Journal of Basrah Researches (Sciences) 315: 1817-2695.
- Amina, A. A. and Hanan, H. L. (2011) Differential effects of paclobutrazol on water stress alleviation through electrolyte leakage, phytohormones, reduced glutathione and lipid peroxidation in some wheat genotypes (*Triticum aestivum* L.) grown *in vitro*. Romanian Biotechnological Letters 6: 6710-6721.
- Bates, L. Waldren, R. and Teare, I. (1973) Rapid determination of free prolin for water-stress studies. Plant and soil 39:205-207.
- Berova. M. and Zlatev. Z. (2003) Physiological response of paclobutrazol-treated triticale plants to water stress. Biologia Plantarum 46: 133-136.
- Davis, T. D., Walser, R. H., Soerenson, K. and Sankhla, N. (1986) Rooting and subsequent growth of cuttings treated with paclobutrazol. Plant Propagation 32: 7-9.
- Delauney, A. J. and Verma. D. P. (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. The Plant Journal 4:215-223.
- Draikewicz, M. (1994) Chlorophylase occurrence functions, mechanism of action, effect of extra and internal factor. Photosynthetica 30: 321-327.
- Ehsanpour, A. A. and Razavizadeh, R. (2005).Effect of UV-C on drought tolerance of Alfalfa plant (*Medicago sativa* L.) callus. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 1: 107-110.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. and Basra, S. M. A. (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. Agronomy for Sustainable Development 29: 185-212.
- Gilley, A. and Fletcher. R. A. (1997) Relative efficacy of paclobutrazol, propiconazole and tetraconazole as stress protectants in wheat seedlings. Plant Growth Regulation 21:169–175.
- Hajihashemi, S., Kiarostami, K., Enteshari, S. and Saboora, A. (2006) The effect of salt stress and paclobutrazol on some physiological parameters of two salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of wheat. Pakistan Journal Biological sciences 9: 1370- 1374.
- منابع:
- احسان پور، ع. ا. و امینی، ف. (۱۳۸۲) کشت سلول و بافت گیاهی. جهاد دانشگاهی اصفهان، اصفهان.
- آلیاری، ه. ف.، شکاری، ف. و شکاری، ف. (۱۳۷۸) دانه‌های روغنی (زراعت و فیزیولوژی). انتشارات عمیدی، تبریز.
- پاک مهر، ی. (۱۳۸۹) مطالعه اثر شوری بر پارامترهای رشدی و اندامزایی گیاه کلزا (*Brassica napus*) در شیشه. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه پیام نور، اصفهان، ایران.
- تورچی، م.، شیخ، ف.، ولی زاده، م.، شکیبا، م. ر.، و پاسبان اسلام، ب. (۱۳۸۴) رابطه خصوصیات مورفو‌لولوژیکی ریشه با مقاومت به کمبود آب در تعدادی از ژنوتیپ‌های برتر کلزا (*Brassica napus* L.). علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ۱۵: ۱۵-۲۶.
- سعیدی، ق.، صدقی، آ. (۱۳۸۷) تاثیر بعضی از عناصر غذایی بر مصرف و کم مصرف بر عملکرد دانه، میزان روغن و سایر صفات زراعی دو رقم کلزا (*Brassica napus* L.) در اصفهان، مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ۴۵: ۲۰-۲۷.
- عظیم زاده، م. (۱۳۷۲). تعیین الگوی رشد در سه رقم گندم و دو رقم جو، پایان نامه ارشد، دانشگاه مشهد، مشهد، ایران.
- وهابزاده، ع. و علیزاده، م. ا. (۱۳۷۸). آخرین واحه، آب مایه حیات. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، مشهد.
- Aazami, M. A., Torabi, M. and Jalili, E. (2011) *In vitro* response of promising tomato genotypes for tolerance to osmotic stress. African Journal of Biotechnology 9: 4014-4017.
- Abdelsamad, A., El-Sayed, O. E. and Hayam, F. I. (2007) Development of drought tolerant double

- Nizam, K. and Te-chato, S. (2009). Optimizing of root induction in oil palm plantlets for acclimatization by some potent plant growth regulators (PGRs). *Journal of Agricultural Technology* 5: 371-383.
- Nouriyani, H., Majidi, E., Seyyednejad, S. M., Siadat, S. A. and Naderi, A. (2012) Effect of Paclobutrazol under Different Levels of Nitrogen on Some Physiological Traits of Two Wheat Cultivars (*Triticum aestivum* L.). *World Applied Sciences Journal* 16: 1-6.
- Oraki, H. Parhizkar khajani, F. and Aghaalikhana, M. (2012) Effect of water deficit stress on proline contents, soluble sugars, chlorophyll and grain yield of sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrids. *African Journal of Biotechnology* 25: 164-168.
- Parida, A. K. and Das, A. (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60: 324-349.
- Percival, C. G. and Noviss, K. (2008) Triazole induced drought tolerance in horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*). *Tree Physiology* 28: 1685-1692.
- Pinhero, R. and Fletcher, R. (1994) Paclobutrazol and ancyimidol protect corn seedlings from high and low temperature stresses. *Plant Growth Regulation* 15: 47-53.
- Rademacher, W. (1995) Growth retardants: biochemical features and applications in horticulture. *Acta Horticulturae* 394: 57 -73.
- Sairam, R. K., Deshmukh, P. S. and Saxena, D. C. (1998) Role of antioxidant systems in wheat genotype tolerance to water stress. *Biologia Plantarum*. 41: 387-394.
- Sankar, B., Jaleel C. A., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. (2007) Drought-induced biochemical modifications and proline metabolism in *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. *Acta Botanica Croatica* 66: 43-56.
- Sgherri, C. L. M. and Navari-Izzo, F. (1995) Sunflower seedling subjected to increasing water deficit stress: oxidative stress and defence mechanisms. *Physiologia Plantarum*. 93:25-30.
- Sho Vali Khan, P. S., Hoffman, L., Renaud, J. and Housman, J. F. (2007) Current initiatives in proteomic for analysis of plant salt tolerance. *Current Sciences* 93: 807-817.
- Somogyi-Nelson, M. (1952) Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* 195:19-29.
- Sugavanam, B. (1984) Diastereoisomers and enantiomers of paclobutrazol: Their preparation and biological activity. *Pesticide Sciences* 15:296-302.
- Havaux, M., canaai, O. and Malkin, S. (1987) Inhibition of photosynthetic activies under slow water stress measured *in vivo* by photoacoustic method. *Physiologia Plantarum* 70: 503-510.
- Heat, R. L. and Packer, L. (1968) Photo per oxidation in isolated chloroplast. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Hedden, P. and Graebe, J. E. (1985) Inhibition of gibberellin biosynthesis by paclobutrazol in cell free homogenates of *Cucurbita maxima* endosperm and *Malus pumila* embryos. *Plant Growth Regulation* 4:111-122.
- Inze, D. and Montagu, M. V. (2000) Oxidative stress in plants. *Cornavall* Great Britain.
- Khoshsokhan, F., Babalar, M., Chaghazardi, H. R. and Fatahi moghadam, M. R. (2012) Effect of salinity and drought stress on Germination indices of two thymus species. *Cercetări Agronomice în Moldova* 149:27-35.
- Kishorekumar, A., Abdul Jaleel, C., Manivannan, P. Sankar, B., Sridharan, R., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. (2006) Differential effects of hexaconazole and paclobutrazol on the foliage characteristics of Chinese potato (*Solanostemon rotundifolius*). *Acta Biologica Szegeiensis* 50: 127-129.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chorophylls and carotenoids: pigments photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymol* 148: 350-382.
- Lowry, O. H., Roscberrough, N. J., Farr, A. L. and Randal, R. J. (1951) Protein mesurment with the folin-phenol reagent. *Biology Chemistery Journal* 193: 265-275.
- Matta, M., Tominago, S. and Kozaki, I. (1998) Relative effects of growth retardant (paclobutrazol) and water stress on tree growth and photosynthesis in ponkan (*Citrus reticulate* Blanco). *Japanese Society Horticultural Science* 67: 28-34.
- Misra, A. N., Murmu, B., Singh, P. and Misra, M. (1996) Growth and proline accumulation mung bean seedlings as affected by sodium chloride. *Plant Biology* 38: 531-536.
- Moradshahi, A. B., Eskandari, S. and Choldebani, B. (2004) Some physiological response of canola (*Brassica rapus* L.) to water deficit stress under laboratory condition. *Iranian Journal Science and Technology* 28: 43-50.
- Newton, R. J., Sen, S. and Puryear, J. D. (1986) Free proline changes in *Pinus taeda* L. callus in response to drought stress. *Tree Physiology* 1: 325-332.
- Nishizawa, T. (1993) The effect of paclobutrazol on growth and yield during first year greenhouse strawberry production. *Scientia Horticulturae* 54: 267-274.

- Zhang, J., Jia, W. and Zhang., D. P. (1997) Reexport and metabolism of xylem-delivered ABA in attached maize leaves under different transpirational fluxes and xylem ABA concentration. *Journal of Experimental Botany* 48:1557-1564.
- Tatar, O. and Gevrek, M. N. (2008) Influence of water on proline accumulation, lipid peroxidation and water content of wheat. *Asian Journal of Plant Sciences* 34: 1-4.
- Wiesman, Z. and Riov, J. (1994) Interaction of paclobutrazol and indole-3-butyric acid in relation to rooting of mung bean (*Vigna radiata*) cuttings. *Physiologia Plantarum* 92: 608–612.
- Xing, L. and Zhu, J. H. (2002) Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell and Environment* 25:131-139.