

مطالعه اثر محلول پاشی براسینواستروئید بر برخی صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گلابی وحشی (*Pyrus bioessieriana* Buhse) طی تنش خشکی

سید مرتضی زاهدی^{۱*}، مرجان السادات حسینی^۲ و مهدیه کریمی^۳

^۱گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران، ^۲گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران، ^۳گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۳۱، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۰۸/۱۷)

چکیده

گلابی‌های وحشی علی‌رغم تولید میوه‌های با بازار پسنندی ضعیف، به عنوان پایه در مناطق معتدله دارای تنش‌های محیطی از جمله تنش خشکی و غرقابی می‌توانند مورد استفاده قرار بگیرند که براسینواستروئیدها می‌توانند به صورت مؤثری مقاومت به تنش خشکی را در محصولات زراعی و باغی افزایش دهند. جهت بررسی تأثیر کاربرد براسینواستروئید بر برخی صفات رشدی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نهال گلابی وحشی (*Pyrus bioessieriana* Buhse) تحت تنش خشکی آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل سطوح مختلف تنش خشکی (۱۰۰ (شاهد)، ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی) و غلظت‌های مختلف براسینواستروئید (صفر، ۳ و ۱۰ میلی‌مولار) بود. در این آزمایش صفات وزن خشک برگ، ریشه و ساقه، ارتفاع گیاه، محتوای رطوبت نسبی، نشت الکترولیت، کلروفیل *a* و *b*، کاروتنوئید، پرولین، قندهای محلول، مالون دآلدئید، پراکسید هیدروژن، آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد تنش خشکی باعث کاهش معنی‌دار وزن خشک برگ، ریشه و ساقه، ارتفاع گیاه، محتوای رطوبت نسبی، کلروفیل *a*، *b* و کاروتنوئید گردید؛ اما براسینواستروئید باعث افزایش معنی‌دار این صفات و تقلیل اثرات منفی تنش خشکی روی گلابی وحشی گردید. برهمکنش کاربرد براسینواستروئید در غلظت ۱۰ میلی‌مولار و تنش خشکی ۲۵ درصد ظرفیت زراعی بالاترین تجمع قندهای محلول، پرولین، پراکسید هیدروژن و بالاترین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز را نشان داد. به نظر می‌رسد در شرایط تنش، محلول پاشی براسینواستروئید با افزایش غلظت اسمولیت‌هایی مانند قندهای محلول و پرولین و در نتیجه کمک به حفظ فشار اسمزی در سلول‌ها و افزایش تولید پراکسید هیدروژن تا حد متوسط، در افزایش تحمل به تنش خشکی گیاه کمک می‌کند.

واژه‌های کلیدی: تنش خشکی، گلابی وحشی، کاروتنوئید، پراکسید هیدروژن، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز

مقدمه

شمال و ترکمنستان، منبع غنی از ژنوتیپ‌های گلابی وحشی محسوب می‌شود. گلابی بعد از انگور و سیب مهم‌ترین میوه مناطق معتدله به شمار می‌رود و بنابراین استفاده کردن از پایه‌های مناسب برای تولید گلابی بسیار حائز اهمیت است.

گلابی (*Pyrus*) از خانواده گلسرخیان (Rosaceae) بوده و منشأ پیدایش آن کوهستان‌های شمال چین است. در ایران بیش از ده گونه از این جنس وجود دارد و کشور ایران به ویژه جنگل‌های

*نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: s.m.zahedi@maragheh.ac.ir

پژوهشگران معتقدند که گلابی‌های وحشی علی‌رغم تولید میوه‌هایی با بازار پسندی ضعیف، به عنوان پایه در مناطق معتدله دارای تنش‌های محیطی از جمله تنش خشکی و غرقابی می‌توانند مورد استفاده قرار بگیرند. پژوهش‌ها نشان داده است که کنترل هدایت روزنه‌ای، افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها و سطح ویژه برگ از جمله مکانیسم‌های این گیاه در مقابله با تنش‌های محیطی است (زرافشار و همکاران، ۱۳۹۴). درختان این گونه اندازه متوسطی دارند که حداکثر به ۵ متر می‌رسند و برگ‌ها سبز براق و بیضی شکل هستند. این گونه علاوه بر اینکه پایه مناسبی برای ارقام مختلف گلابی در مناطق خشک است، دارای ویژگی‌های دارویی نیز می‌باشد. برگ‌ها و پوست نهال دارای نوعی فنل گلوکوزیدی به نام آربوتین (Arbutin) است و این گیاه دارای آنتی‌اکسیدان‌ها و ویژگی‌های دارویی فراوانی است که از این مواد در محصولات ضد آفتاب استفاده می‌شود (Coureau and Coiffard, 2000).

تنش خشکی به عنوان یکی از جدی‌ترین تنش‌های محیطی، اثرات زیان‌بار فراوانی بر رشد رویشی و زایشی گیاهان می‌گذارد و در کشور ایران به علت موقعیت جغرافیایی، تنش کمبود آب یکی از محدودکننده‌ترین تنش‌های غیرزیستی است (هاشمی‌دزفولی و کوچکی، ۱۳۷۴). خشکی یک فرآیند فیزیکی-شیمیایی پیچیده است و گونه‌های فعال اکسیژن ایجاد شده توسط تنش می‌توانند با مولکول‌های زیستی مانند: لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک واکنش داده و منجر به پراکسیداسیون لیپید و جهش در اسیدهای نوکلئیک و تغییر پروتئین‌ها شوند که این امر به مختل شدن متابولیسم طبیعی، کاهش بازدهی آب و دی‌اکسیدکربن و در نهایت باردهی گیاه منجر خواهد شد (Kusvuran, 2012). درختان چوبی مکانیسم‌های متفاوتی برای مقابله با کم آبی از جمله کم کردن رشد، تجمع اسمولیت‌ها و تغییرات هورمونی دارند. تیمار تنش خشکی منجر به افزایش کاروتنوئید، ماده خشک و پرولین و تغییرات تبادل گازی در روزنه‌های گلابی وحشی گردیده است (Zarafshar et al., 2014).

براسینواستروئیدها گروهی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی

با ویژگی‌های شناخته شده بر افزایش تقسیم و رشد سلول در ریشه‌ها، ساقه‌ها و افزایش رشد گیاه هستند که به صورت ویژه سبب کم کردن اثرات منفی تنش‌های محیطی در گیاهان می‌گردند (Choudhary et al., 2012). براسینواستروئیدها توانایی بالایی در افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش شوری (Hayat et al., 2010)، خشکی (Fariduddin et al., 2009) و دمای بالا (Fariduddin et al., 2011) دارند. مطالعات نشان می‌دهد براسینواستروئیدها منجر به کاهش اثرات کمبود آب در برخی از گیاهان از جمله آرابیدوپسیس، کلزا (Kagale et al., 2007) و گوجه‌فرنگی (Yuan et al., 2010) می‌شوند. افزایش بازدهی آب و دی‌اکسید کربن از طریق تنظیم تولید آبسزیک اسید (Farooq et al., 2009) و بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی از جمله تنظیم بیان ژن‌های تولیدکننده آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز از دیگر اثرات براسینواستروئیدها در زمان تنش خشکی گزارش شده است (Fariduddin et al., 2009).

بسیاری از گزارش‌ها نشان داده‌اند که براسینواستروئیدها می‌توانند با ایجاد تغییرات مثبت روی صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی و فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی به صورت مؤثری مقاومت به تنش خشکی را در محصولات زراعی و باغی افزایش دهند. مطالعات اندکی روی بررسی اثرات آن‌ها بر افزایش مقاومت به خشکی گونه‌های چوبی وجود دارد و هیچ مطالعه‌ای در مورد ارزیابی فعالیت نسبی آنها در بالا بردن مقاومت گونه‌های گلابی تحت تنش خشکی یافت نشد. به همین منظور پژوهشی جهت بررسی نقش احتمالی کاربرد بیرونی این هورمون در افزایش و بهبود مقاومت به خشکی گلابی وحشی بر پایه ارزیابی تغییرات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در این گونه انجام شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به صورت گلخانه‌ای و در بهار و تابستان سال ۱۳۹۵ انجام شد. جهت انجام آزمایش از بذور گلابی وحشی در منطقه لیسار (۳۷° شمالی و ۴۸° شرقی) استان گیلان

FW: وزن تازه برگ، DW: وزن خشک برگ و TW: وزن آماس می باشد.

اندازه گیری میزان نشت الکترولیت ها با استفاده از روش Lutts و همکاران (۱۹۹۶) انجام شد. به این منظور قطعات برگي به اندازه $2 \times 1 \text{ cm}$ به لوله های حاوی ۱۰ میلی لیتر آب مقطر انتقال داده شد. لوله ها به مدت ۱۷ ساعت در محیط تاریک روی شیکر قرار گرفتند و میزان هدایت الکتریکی اولیه (EC_1) با استفاده از دستگاه EC متر (مدل اینولب ۷۲۰) اندازه گیری شد. سپس نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه و فشار ۱/۵ اتمسفر قرار داده و بعد از خنک شدن در دمای اتاق هدایت الکتریکی بیشینه (EC_2) اندازه گیری و درصد نشت الکترولیت (EC) از طریق معادله ۲ محاسبه شد.

$$EC = (EC_1/EC_2) \times 100 \quad (\text{معادله ۲})$$

جهت اندازه گیری میزان کلروفیل و کاروتنوئید، ۰/۲ گرم از برگ تازه در یک هاون چینی با ۵ میلی لیتر استون ساییده و به صورت یک توده یکنواخت درآمد. محلول حاصل با سانتریفیوژ (مدل فرولبو، فرانسه) به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از جدا کردن عصاره رویی مرحله بالا دو بار دیگر تکرار گردید و در نهایت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل کری ۱۰۰، واریان آمریکا)، میزان جذب آن در طول موج های ۶۴۵ و ۶۶۴ نانومتر قرائت گردید و کلروفیل های a ، b و کاروتنوئید (میلی گرم بر گرم وزن تر) توسط روابط ذیل محاسبه گردید (Porra, 2002).

(معادله ۳)

$$a = (A_{664} \times 12/25) - (A_{645} \times 2/55) \quad (\text{معادله ۴})$$

$$b = (A_{664} \times 4/91) - (A_{645} \times 20/31) \quad (\text{معادله ۵})$$

$$104 \times \text{کلروفیل} = (A_{645} \times 3/27 - A_{664} \times 1000) \quad (\text{کلروفیل } b)$$

در معادله های بالا A_{664} و A_{645} و A_{670} به ترتیب میزان جذب در طول موج های ۶۶۴ و ۶۴۵ و ۶۷۰ نانومتر می باشد.

پرویلین با روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) اندازه گیری

استفاده شد. پس از کشت بذور و رشد آن ها، نهال های دوساله گلایی وحشی که از نظر رشد و قطر ساقه یکسان و همگن بودند، انتخاب شدند و بعد از استقرار مناسب، اعمال تنش با چهار سطح، بدون تنش آبیاری (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی، شاهد)، تنش ملایم (۷۵ درصد ظرفیت زراعی)، تنش متوسط (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) و تنش شدید (۲۵ درصد ظرفیت زراعی) صورت گرفت. به منظور اعمال تنش از روش وزن کردن گلدان ها استفاده گردید و برای جلوگیری از تبخیر، سطح گلدان با پلاستیک پوشانده شد. وزن خاک اشباعی که با بیرون رفتن آب از انتهای گلدان به وزن ثابت رسیده بود از وزن خاک خشک کم شد و میزان ظرفیت زراعی به این روش به دست آمد. تیمارهای ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد نسبت به ظرفیت زراعی سنجیده شد و سپس گلدان ها روزانه وزن (با توجه به افزایش روزانه وزن خود گیاه) و برای رسیدن به سطح هر تنش، مقدار آب محاسبه شده اضافه می شد. محلول های براسینوستروئید (سیگما- آلد ریچ، آمریکا) در دو غلظت شامل ۳ و ۱۰ میلی مولار با حل کردن در محلول اتانول و به حجم رساندن با آب مقطر، تهیه (Behnamnia et al., 2015) و برای اعمال تیمار از روش محلول پاشی بر روی اندام هوایی استفاده شد. تیمار شاهد بدون محلول پاشی بود. تیمارهای براسینوستروئید بعد از شروع دوره تنش خشکی و آبیاری آخر و فقط یک مرتبه به صورت محلول پاشی بر روی نهال ها انجام شد (زرافشار و همکاران، ۱۳۹۴).

برای اندازه گیری وزن خشک برگ، ساقه و ریشه، بعد از قرارگیری این اندام ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد در داخل آون، وزن آن ها توسط ترازو دیجیتال با دقت ۰/۰۱ اندازه گیری شد. جهت اندازه گیری ارتفاع بوته از خط کش میلی متری استفاده شد و ارتفاع گیاه از سطح خاک تا آخرین برگ ثبت و گزارش گردید.

محتوای نسبی آب برگ (Relative Water Content) با روش Turner (۱۹۸۱) و با جایگذاری در معادله ۱ اندازه گیری شد.

(معادله ۱)

$$\text{محتوای نسبی آب برگ} = \frac{FW - DW}{TW - DW} \times 100$$

شد. مقدار ۲ میلی‌لیتر از محلول به دست آمده از ترکیب ۰/۵ گرم بافت تازه برگ همراه با ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالسیلیک ۳٪ با ۲ میلی‌لیتر اسید استیک و ۲ میلی‌لیتر ناین هیدرین ترکیب شده و پس از ۲ ساعت قرار گرفتن در بن‌ماری، ۴ میلی‌لیتر تولوئن به آن اضافه گردید و جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید و با جایگذاری در معادله ۶ (میلی گرم بر وزن تر) به دست آمد.

(معادله ۶)

پرویلین = [وزن نمونه (۰/۵ گرم) / حجم عصاره (۱۰ میلی‌لیتر)] × [۱۰۰۰ / عدد قرائت شده]

اندازه‌گیری قندهای محلول با روش Paquin و Lechasseur (۱۹۷۹) انجام شد. بدین منظور ۰/۵ گرم از بافت تازه برگ پس از کوبیده شدن با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۶٪، با ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ همگن و سانتریفیوژ شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره الکلی با ۳ میلی‌لیتر آنترون مخلوط گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. میزان جذب با اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر قرائت شد و با معادله ۷ به دست آمد.

(معادله ۷)

قندهای محلول (میلی گرم بر وزن تر) = {برگ (۰/۵ گرم) / عصاره (۱۵ میلی‌لیتر)} × {۱۰۰۰ / عدد قرائت شده}

غلظت مالون دآلدئید به عنوان شاخص پراکسیداسیون غشاء، بر اساس روش Heath و Packer (۱۹۶۹) اندازه‌گیری شد. بر طبق این روش ۰/۲ گرم از بافت تازه برگ در ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۱ درصد کوبیده و سانتریفیوژ شد. به یک میلی‌لیتر از محلول رویی ۴ میلی‌لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد که حاوی ۰/۵ درصد تیوباربتوریک اسید است، اضافه شد. مخلوط در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد از قرارگیری روی یخ، غلظت مالون دآلدئید با استفاده از معادله ۸ محاسبه شد.

(معادله ۸)

$A = EBC$
 $A =$ جذب $E =$ ضریب خاموش معادل $1.55 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ، $B =$ عرض کووت، $C =$ غلظت کمپلکس بر حسب میلی‌مولار.

برای اندازه‌گیری غلظت پراکسید هیدروژن از روش (Sergiev et al., 2001) استفاده گردید. ۰/۱ گرم نمونه برگ با پنج میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد ساییده و مخلوط سانتریفیوژ شد. پس از آن ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره به همراه ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات و ۲ میلی‌لیتر معرف یک مولار یدید پتاسیم به مدت یک ساعت در تاریکی قرار داده شد. میزان جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۹۰ نانومتر قرائت گردید. غلظت پراکسید هیدروژن نمونه‌ها بر حسب میلی‌مول بر گرم وزن تر محاسبه گردید (معادله ۹).

(معادله ۹)

پراکسید هیدروژن = [وزن تر نمونه (0.1g) / حجم عصاره (۵ ml)] × [1000 / عدد قرائت شده]

فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محلول‌ها شامل ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH=۷) ۵۰ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود و در نهایت ۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد به آن اضافه و فعالیت آنزیم به مدت ۲ دقیقه در فواصل ۲۰ ثانیه‌ای ثبت گردید. میزان فعالیت آنزیم (بر حسب میلی‌گرم در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) از رابطه زیر محاسبه گردید (Aebi, 1984).

(معادله ۱۰)

$$\text{Activity U}_{\text{ml}} = \frac{(A_{240}(t_2) - A_{240}(t_1)) \times l \times V_t \times dt}{E \times l \times t \times V_s}$$

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. محلول واکنش شامل ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات سدیم (۷/۸ pH)، ۱ میلی‌مول NBT، ۲۰ میلی‌مول متیونین، ۰/۱ مول EDTA و ۰/۲ میلی‌مول ریبوفلاوین بود که برای تهیه هر ۱۰۰ میلی‌لیتر از آن، مقدار ۱/۷۹ گرم فسفات سدیم آبدار ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) در ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید و پس از افزودن ۰/۰۸۸ گرم NBT، ۰/۷۴۵ گرم متیونین، ۰/۳۷۲ گرم EDTA و ۰/۰۰۷۵ گرم ریبوفلاوین به حجم نهایی رسانده شد. دو شاهد که هر دو بدون عصاره آنزیمی بود مورد استفاده

قرار گرفت. شاهد اول بدون دریافت نور (برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر) و شاهد دوم ۱۵ دقیقه در مقابل منبع نوری قرار گرفت. فعالیت آنزیم (بر حسب میلی گرم در دقیقه در میلی گرم پروتئین) از رابطه زیر محاسبه گردید: (معادله ۱۱)

$$\text{Activity } U_{\text{ml}} = \frac{(A_{560}(\text{control}) - A_{560}(\text{sample}))}{A_{560}(\text{control})} \times 100$$

که در آن، $A_{560}(\text{control})$ و $A_{560}(\text{sample})$ به ترتیب مقادیر جذب نور محلول شاهد و نمونه مورد بررسی در طول موج ۵۶۰ نانومتر هستند (Beauchamp and Fridovich, 1971). آزمایش به صورت فاکتوریل (فاکتور اول سطوح تنش در چهار سطح و فاکتور دوم محلول پاشی با براسینواستروئید در سه سطح) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. سپس تجزیه واریانس صفات با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۴ و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش چند دامنه‌ای دانکن با سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج و بحث

وزن خشک اندام‌های مختلف و ارتفاع گیاه: تیمارهای مورد مطالعه بر صفات وزن خشک برگ، ریشه، ساقه و ارتفاع نهال اثر معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد داشت. تیمار خشکی سبب کاهش وزن خشک شد و تیمارهای براسینواستروئید تا حدود زیادی این کاهش وزن را جبران کردند. با افزایش شدت تنش ارتفاع نهال کاهش پیدا کرد و کمترین وزن خشک برگ، ریشه و ساقه و ارتفاع در تیمار ۲۵ درصد ظرفیت زراعی و عدم محلول پاشی مشاهده گردید (جدول ۱). تیمارهای براسینواستروئید سبب افزایش طول ساقه شدند و بالاترین طول ساقه نهال در تیمار ظرفیت زراعی و محلول پاشی ۱۰ میلی مولار براسینواستروئید دیده شد. مطالعات نشان می‌دهد براسینواستروئید سبب افزایش بیان ژن‌های مربوط به پرآوری و افزایش طول شاخساره کلزا شدند (Sahni et al., 2016).

درصد محتوای رطوبت نسبی: برهمکنش سطوح تنش و غلظت‌های مختلف محلول پاشی استروئید در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد. درصد محتوای رطوبت نسبی با افزایش

سطوح تنش کاهش نشان داد. محلول پاشی گیاهان تحت تنش با براسینواستروئید سبب بهبود محتوای آب برگ شد. کمترین (۶۱/۸) و بیشترین (۹۵) درصد محتوای رطوبت به ترتیب در تیمارهای ۲۵ درصد ظرفیت زراعی و بدون محلول پاشی و ظرفیت زراعی با ۱۰ میلی مولار محلول پاشی براسینواستروئید دیده شد (جدول ۲). مشابه این نتایج در خردل وحشی نیز گزارش شده است (Fariduddin et al., 2009). کم آبی در گیاه توازن آب در گیاه را بر هم می‌زند. براسینواستروئیدها کمک به تجمع آب‌سازیک اسید در گیاه می‌کنند و این هورمون با کم کردن هدایت روزنه‌ای و افزایش بازدهی و نگهداری آب نقش مهمی در افزایش تحمل گیاه به خشکی دارد (Xia et al., 2009).

درصد نشت الکترولیت‌ها: برهمکنش اثر تیمار خشکی و محلول پاشی براسینواستروئید بر درصد نشت الکترولیت‌ها اثر معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد داشت. با افزایش سطح تنش از ۷۵ درصد به ۲۵ درصد ظرفیت زراعی، درصد نشت الکترولیت‌ها بالا رفت. بالاترین نشت (۷۵/۶ درصد) در تیمار ۲۵ درصد ظرفیت زراعی و بدون محلول پاشی مشاهده شد (جدول ۲). کاربرد براسینواستروئید به ویژه در غلظت ۱۰ میلی مولار سبب کاهش درصد نشت یون‌ها گردید. مشابه این نتایج در خردل (Li et al., 2012) و گوجه‌فرنگی (Behnamnia et al., 2015) گزارش شده است. براسینواستروئیدها با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی، سبب کاهش آسیب و پراکسیداسیون غشاهای پلاسمایی و درصد نشت الکترولیت‌ها می‌شوند (Mazorra et al., 2011).

کلروفیل a, b و کاروتنوئیدها: نتایج نشان داد برهمکنش سطوح خشکی و محلول پاشی براسینواستروئید تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد بر میزان کلروفیل a, b و کاروتنوئیدها دارا بودند (جدول ۲). با افزایش تنش خشکی میزان کلروفیل a, b و کاروتنوئیدها کاهش یافت. استفاده از براسینواستروئید در تمام سطوح خشکی سبب افزایش و تجمع کلروفیل a, b و کاروتنوئیدها در برگ گل‌ابی وحشی گردید و تا حدودی این کاهش را طی تنش جبران کرد. کاروتنوئیدها رنگدانه‌هایی هستند که از تخریب کلروفیل‌ها در تنش‌های

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف تیمارهای خشکی و غلظت‌های مختلف براسینواستروئید بر وزن خشک و ارتفاع گلایی وحشی

ارتفاع گیاه (سانتی متر)	وزن خشک ساقه	وزن خشک ریشه	وزن خشک برگ	براسینواستروئید	تیمارهای آبیاری
	(گرم در بوته)				
۱۳/۴۵ ^c	۲۰/۶۰ ^c	۱۹/۵۷ ^c	۸/۳۵ ^c	عدم محلول پاشی	(شاهد)
۱۶/۲۶ ^b	۲۲/۳۳ ^b	۲۰/۴۳ ^b	۸/۶۲ ^b	3mM	
۱۷/۶۱ ^a	۳۷/۲۵ ^a	۲۲/۴۳ ^a	۸/۹۲ ^a	10mM	
۱۰/۶۴ ^f	۱۳/۴۳ ^f	۱۲/۶۰ ^f	۷/۲۶ ^f	عدم محلول پاشی	تیمار ۱
۱۱/۵۰ ^e	۱۶/۴۷ ^e	۱۵/۳۳ ^e	۷/۸۲ ^e	3mM	
۱۲/۶۹ ^d	۱۹/۳۰ ^d	۱۸/۶۰ ^d	۸/۰۲ ^d	10mM	
۷/۳۵ ⁱ	۸/۹۱ ⁱ	۸/۵۹ ⁱ	۶/۵۳ ⁱ	عدم محلول پاشی	تیمار ۲
۸/۲۰ ^h	۱۰/۱۳ ^h	۹/۲۳ ^h	۶/۸۸ ^h	3mM	
۸/۴۵ ^g	۱۲/۵۶ ^g	۱۱/۶۳ ^g	۶/۹۹ ^g	10mM	
۶/۳۱ ^l	۷/۶۸ ^k	۴/۷۹ ^l	۴/۵۳ ^l	عدم محلول پاشی	تیمار ۳
۶/۷۹ ^k	۸/۴۴ ^j	۶/۸۲ ^k	۵/۶۴ ^k	3mM	
۷/۱۳ ^j	۸/۵۰ ^j	۷/۳۳ ^j	۶/۱۲ ^j	10mM	

حروف مشابه در هر ستون و گروه تیماری نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن است. شاهد: ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی؛ تیمار ۱: ۷۵ درصد ظرفیت زراعی؛ تیمار ۲: ۵۰ درصد ظرفیت زراعی؛ ۲۵ درصد ظرفیت زراعی

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف تیمارهای خشکی و غلظت‌های مختلف براسینواستروئید بر محتوای آب نسبی، نشت الکترولیت، کلروفیل *a*، *b* و کاروتنوئید نهال‌های گلایی وحشی

تیمارهای آبیاری	براسینواستروئید	محتوای نسبی رطوبت (درصد)	نشت الکترولیت (درصد)	کلروفیل <i>a</i> (میلی گرم در گرم برگ تازه)	کلروفیل <i>b</i> (میلی گرم در گرم برگ تازه)	کاروتنوئید
شاهد	عدم محلول پاشی	۹۰/۵۷ ^c	۳۸/۷۳ ^j	۰/۷۰ ^c	۰/۶۲ ^c	۱/۷۰ ^c
	3mM	۹۲/۰۶ ^b	۳۲/۳۳ ^k	۰/۷۵ ^b	۰/۶۵ ^b	۱/۷۶ ^b
	10mM	۹۵/۰۰ ^a	۲۷/۶۳ ^l	۰/۸۲ ^a	۰/۶۸ ^a	۱/۸۱ ^a
تیمار ۱	عدم محلول پاشی	۸۱/۵۷ ^f	۵۲/۸۰ ^g	۰/۵۲ ^f	۰/۵۲ ^f	۱/۵۴ ^f
	3mM	۸۵/۵۰ ^e	۴۸/۷۷ ^h	۰/۵۶ ^e	۰/۵۵ ^e	۱/۵۹ ^e
	10mM	۸۷/۳۳ ^d	۴۵/۳۰ ⁱ	۰/۶۶ ^d	۰/۵۹ ^d	۱/۶۴ ^d
تیمار ۲	عدم محلول پاشی	۷۲/۲۳ ⁱ	۶۵/۴۰ ^d	۰/۳۸ ⁱ	۰/۳۲ ⁱ	۱/۴۲ ^h
	3mM	۷۶/۲۳ ^h	۶۲/۱۳ ^e	۰/۴۱ ^h	۰/۳۹ ^h	۱/۴۷ ^g
	10mM	۷۸/۵۰ ^g	۵۹/۶۳ ^f	۰/۴۶ ^g	۰/۴۲ ^g	۱/۵۵ ^f
تیمار ۳	عدم محلول پاشی	۶۱/۸۰ ^l	۷۵/۶۰ ^a	۰/۲۹ ^l	۰/۲۳ ^l	۱/۲۴ ^j
	3mM	۶۴/۲۰ ^k	۷۱/۴۳ ^b	۰/۳۲ ^k	۰/۲۵ ^k	۱/۳۷ ⁱ
	10mM	۶۶/۸۶ ^j	۶۸/۲۶ ^c	۰/۳۵ ^j	۰/۲۸ ^j	۱/۴۷ ^g

حروف مشابه در هر ستون و گروه تیماری نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن است. شاهد: ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی؛ تیمار ۱: ۷۵ درصد ظرفیت زراعی؛ تیمار ۲: ۵۰ درصد ظرفیت زراعی؛ ۲۵ درصد ظرفیت زراعی

برگ دانه‌های گوجه‌فرنگی تحت تنش خشکی، با تیمار براسینواستروئید افزایش یافت (Behnamnia et al., 2015).

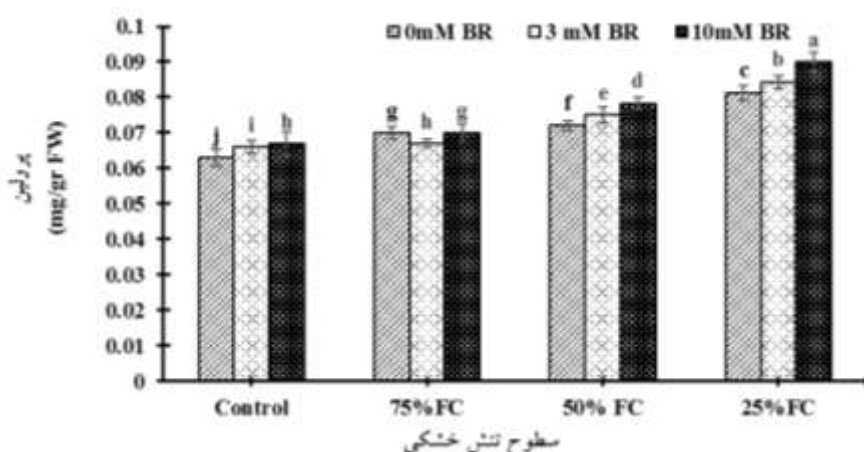
مالون دآلدئید: برهمکنش سطوح تنش کمبود آب و براسینواستروئید در سطح احتمال پنج درصد بر میزان مالون دآلدئید برگ معنی‌دار شد. بالاترین میزان مالون دآلدئید (۰/۳۲۳ میلی‌مول بر گرم وزن تر) در تنش ۲۵ درصد ظرفیت زراعی بدون محلول‌پاشی براسینواستروئید به دست آمد. تنش ظرفیت زراعی در تمام غلظت‌های براسینواستروئید از نظر میزان مالون دآلدئید اختلاف معنی‌داری نداشتند. در زمان تنش خشکی به ویژه در ۲۵ درصد ظرفیت زراعی، کم شدن غلظت مالون دآلدئید و در نتیجه کاهش پراکسیداسیون غشا در تیمارهای براسینواستروئید کاملاً قابل مشاهده است (شکل ۳). محلول‌پاشی براسینواستروئید غلظت مالون دآلدئید برگ را در سوبا (Zhang et al., 2008) و گوجه‌فرنگی (Yuan et al., 2010) کاهش داد. به نظر می‌رسد براسینواستروئیدها به عنوان پیغام‌بر ثانویه، القای سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان‌ها و از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن و جلوگیری از پراکسیداسیون غشاهای پلاسمایی در زمان تنش را به عهده دارند (Mazorra et al., 2011).

پراکسید هیدروژن: برهمکنش اثر سطوح تنش خشکی و براسینواستروئید بر میزان پراکسید هیدروژن برگ در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. بیشترین (۳/۵۳ میلی‌مول بر گرم وزن تر) و کمترین (۲/۱ میلی‌مول بر گرم وزن تر) میزان پراکسید هیدروژن به ترتیب در تیمار ۲۵ درصد ظرفیت زراعی و محلول‌پاشی ۱۰ میلی‌مولار براسینواستروئید و تیمار شاهد بدون محلول‌پاشی مشاهده گردید (شکل ۴). در واقع براسینواستروئید در زمان تنش خشکی تجمع پراکسید هیدروژن را افزایش داده است. تیمار تنش خشکی شدید با محلول‌پاشی ۳ میلی‌مولار براسینواستروئید با تیمار تنش خشکی متوسط با محلول‌پاشی ۱۰ میلی‌مولار براسینواستروئید بدون اختلاف معنی‌دار بود. فرآیند عمل براسینواستروئیدها در افزایش تحمل به تنش هنوز به طور کامل شناخته نشده است. مطالعات نشان داده‌اند که براسینواستروئیدها با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن، کمک به فعال

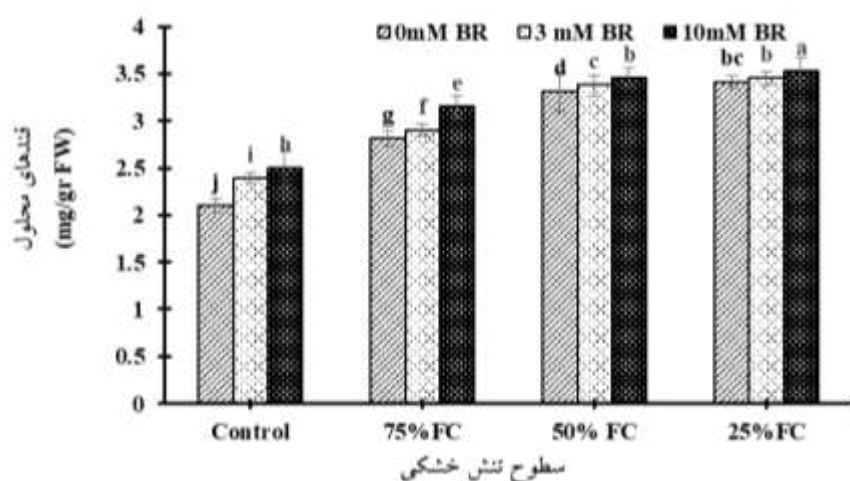
اکسیداتیو جلوگیری می‌کنند. براسینواستروئیدها سبب افزایش میزان کاروتنوئیدها و به دنبال آن جلوگیری از تخریب کلروفیل‌ها در خردل (Fariduddin et al., 2009) و نخود (Ali et al., 2007) شده‌اند.

پرویلین: برهمکنش اثر سطوح تنش و براسینواستروئید بر میزان پرویلین برگ در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. با اعمال تنش شدید میزان پرویلین افزایش و محلول‌پاشی براسینواستروئید سبب افزایش پرویلین توسط گیاه شد. بیشترین میزان پرویلین (۰/۰۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در تنش ۲۵ درصد ظرفیت زراعی و محلول‌پاشی غلظت ۱۰ میلی‌مولار براسینواستروئید مشاهده شد (شکل ۱). تنش خشکی از طریق افزایش بیان آنزیم‌های سنتز کننده پرویلین و کاهش فعالیت آنزیم‌های تخریب پرویلین باعث افزایش میزان این اسید آمینه در گیاه می‌شود (Verslues and Sharma, 2010). کاربرد بیرونی براسینواستروئید در ذرت مقاومت به خشکی را با افزایش پرویلین و محتوای آب نسبی برگ افزایش داد (Anjum et al., 2011).

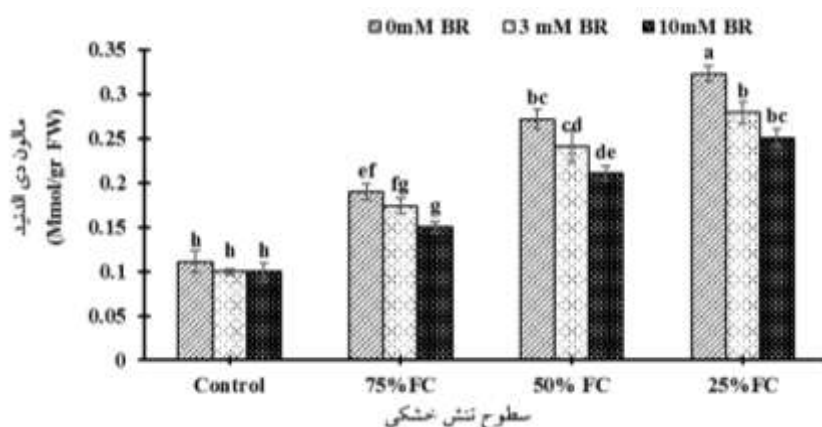
قندهای محلول: برهمکنش تنش خشکی و محلول‌پاشی غلظت‌های مختلف براسینواستروئید اثر معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر تجمع قندهای محلول موجود در برگ گلابی وحشی دارد. تجمع قندهای محلول با افزایش شدت تنش خشکی افزایش یافت (شکل ۲). در تیمار تنش شدید (۲۵ درصد ظرفیت زراعی) و بالاترین غلظت براسینواستروئید کاربردی (۱۰ میلی‌مولار) بالاترین میزان تجمع قندهای محلول (۵۱/۲۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) به دست آمد. بعد از آن تیمار ۳ میلی‌مولار براسینواستروئید در همین سطح تنش بالاترین تجمع قندهای محلول را داشت که با تنش متوسط (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) و تیمار ۱۰ میلی‌مولار براسینواستروئید اختلاف معنی‌داری نداشت. کاربرد براسینواستروئید با افزایش اسمولیت‌هایی مانند پرویلین و قندهای محلول سبب افزایش ویژگی اسمزی برگ و افزایش مقاومت به خشکی می‌گردد. این موضوع در دانه‌های پرورش یافته در شرایط تنش خشکی در افاقیای سیاه (*Robinia pseudoacacia*) گزارش شده است (Li et al., 2008). همچنین محتوای قندهای محلول



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای خشکی در سطوح براسینواستروئید در میزان پرولین برگ نهال گلابی وحشی، میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌داری ندارند.

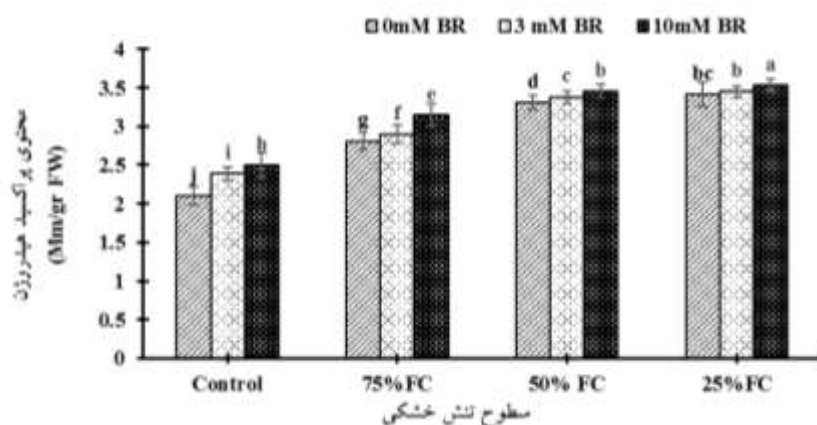


شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای خشکی در سطوح براسینواستروئید در میزان قندهای محلول برگ نهال گلابی وحشی، میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌داری ندارند.

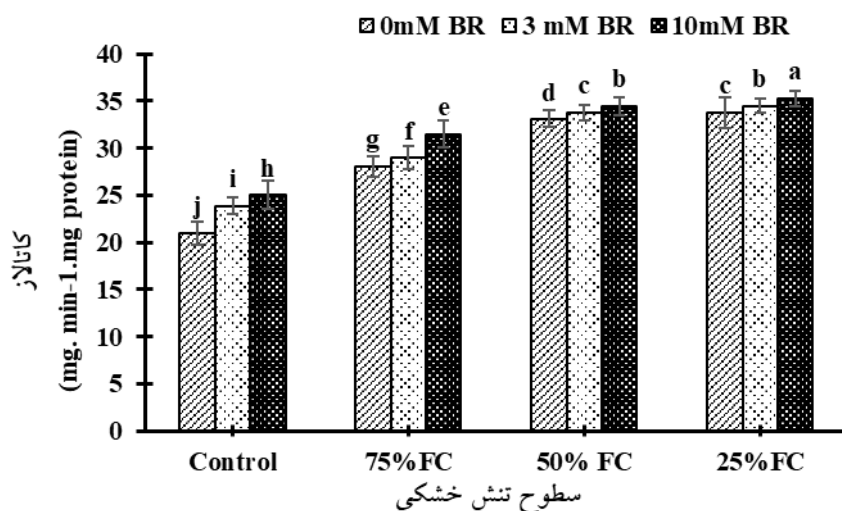


شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای خشکی در سطوح براسینواستروئید در میزان مالون دی‌آلدئید برگ نهال گلابی وحشی، میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌داری ندارند.

کردن ژن‌های مسیرهای مقابله با تنش می‌کنند و از این طریق سبب افزایش تحمل به تنش می‌شوند (Zhou et al., 2014).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای خشکی در سطوح براسینواسستروئید در میزان پراکسید هیدروژن برگ نهال گلایی وحشی، میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌داری ندارند.

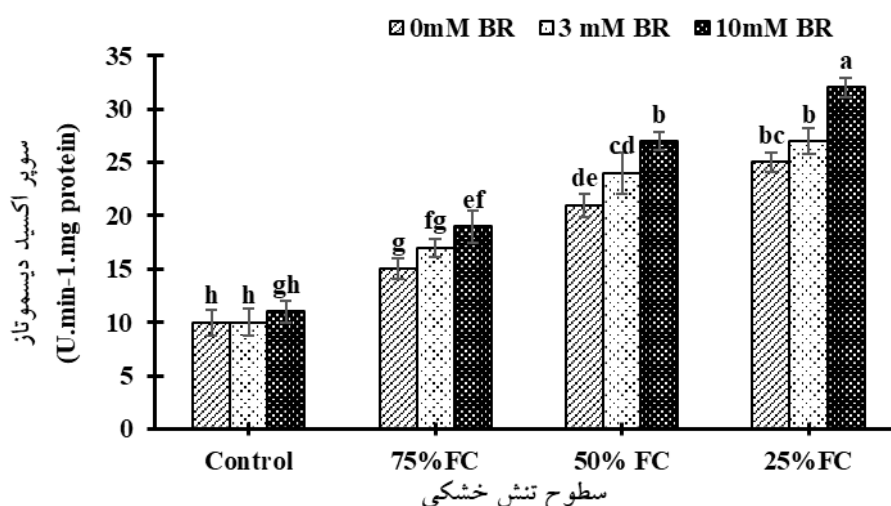


شکل ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای خشکی در سطوح براسینواسستروئید در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز برگ نهال گلایی وحشی، میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌داری ندارند.

اکسیژن، تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را افزایش می‌دهند و سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز از جمله مهم‌ترین این آنزیم‌ها هستند (Hayat et al., 2010). گزارش‌های متعددی وجود دارد که نشان‌دهنده اینست که کاربرد براسینواسستروئیدها میزان آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را در گیاهان تحت تنش افزایش داده‌اند (Fariduddin et al., 2009; Yuan et al., 2010). سوپراکسید دیسموتاز: با توجه به نتایج مقایسه میانگین در شکل ۶، برهمکنش سطوح مختلف تنش خشکی و غلظت‌های مختلف تیمار براسینواسستروئید در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد. بالاترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید

همچنین براسینواسستروئیدها، آبسزیزیک اسید را افزایش می‌دهند که این هورمون نیز کمک به تجمع آپوپلاستی پراکسید هیدروژن می‌کند (Xia et al., 2009).

کاتالاز: با توجه به نتایج مقایسه میانگین در شکل ۵، برهمکنش سطوح مختلف تنش خشکی و غلظت‌های مختلف براسینواسستروئید در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. با افزایش شدت تنش فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافت. بیشترین فعالیت این آنزیم (۳۵/۳ میلی گرم در دقیقه در میلی گرم پروتئین) در تنش ۲۵ درصد ظرفیت زراعی با محلول پاشی ۱۰ میلی مولار براسینواسستروئید بود. گیاهان در طی تنش برای فرونشاندن سمیت حاصل از تولید گونه‌های فعال



شکل ۶- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای خشکی در سطوح براسینواستروئید در میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز برگ نهال گلابی وحشی، میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌داری ندارند.

معنی‌داری کاهش پیدا کرد. در زمان تنش خشکی شدید، تیمار با غلظت بالای براسینواستروئید، صفات مهمی که در افزایش تحمل به کم آبی نقش دارند، مانند محتوای آب نسبی، قندهای محلول و پرولین را به طور مثبتی تحت تأثیر قرار داد و در کل این نهال‌ها وضعیت مساعدتری داشتند. به نظر می‌رسد براسینواستروئید از راه‌های افزایش وزن خشک اندام‌ها، ارتفاع، محتوای آب نسبی، رنگدانه‌هایی مانند کلروفیل و کاروتنوئید و تجمع قندهای محلول، پرولین و پراکسید هیدروژن و کاهش نشت یون‌ها و پراکسیداسیون غشا و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی از جمله کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز، به گیاه در زمان تنش خشکی و کمبود آب کمک می‌کند و می‌تواند به عنوان یک تنظیم کننده رشد برای افزایش تحمل به خشکی در گلابی وحشی در نظر گرفته شود.

دیسموتاز (۳۲ میکروگرم در دقیقه در میلی گرم پروتئین) در سطح ۲۵ درصد و در تیمار محلول پاشی ۱۰ میلی مولار مشاهده شد. در گوجه فرنگی کاربرد براسینواستروئید طی تنش خشکی سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز گردید (Yuan et al., 2010) و محتوای کل پروتئین‌ها و آنزیم‌هایی که در افزایش تحمل به خشکی نقش دارند را افزایش داد (Behnamnia et al., 2015). به نظر می‌رسد براسینواستروئیدها در افزایش تحمل به خشکی گلابی وحشی از طریق افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی نقش مهمی دارند.

نتیجه‌گیری

با افزایش میزان تنش خشکی وزن خشک اندام‌های نهال، ارتفاع، محتوای رطوبت، کلروفیل و کاروتنوئید گیاه به صورت

منابع

- زرافشار، م.، اکبرینیا، م.، عسکری، ح.، حسینی، س.م. و رهایی، م. (۱۳۹۴) اثر محلول پاشی نانوذرات دیاکسید تیتانیوم بر تعدیل اثرات مخرب خشکی در گیاه گلابی وحشی (*Pyrus bhosseriana buhse*). حفاظت زیست بوم گیاهان ۳: ۸۱-۹۴.
- هاشمی دزفولی، ا. و کوچکی، ع. (۱۳۷۴) افزایش عملکرد گیاهان زراعی. جهاد دانشگاهی دانشگاه مشهد. ۳۶۰ صفحه.
- Aebi, H. (1984) Catalase in Vitro. Method Enzyme 105: 121-126.
- Ali, B., Hayat, S. and Ahmad, A. (2007) 28-Homobrassinolide ameliorates the saline stress in chickpea (*Cicer arietinum* L). Environmental and Experimental Botany 59: 217-223.

- Anjum, S. A., Wang, L. C., Farooq, M., Hussain, M., Xue, L. L. and Zou, C. M. (2011) Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange. *Journal of Agronomy and Crop Science* 197: 177-185.
- Bates, L. S., Waldern, R. P. and Teare, M. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44: 276-287.
- Behnamnia, M. (2015) Protective roles of brassinolide on tomato seedlings under drought stress. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 8: 455- 462.
- Choudhary, S. P., Yu, J. Q., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. and Lam-Son, P. T. (2012) Benefits of brassinosteroid crosstalk. *Trends Plant Science* 17: 594-605.
- Couteau, C. and Coiffard, L. J. (2000) Photostability determination of arbutin, a vegetable whitening agent. *Farmaco* 55:410-3.
- Fariduddin, Q., Khanam, S., Hasan, S. A., Ali, B., Hayat, S. and Ahmad, A. (2009) Effect of 28-homobrassinolide on drought stress induced changes in photosynthesis and antioxidant system of *Brassica juncea* L. *Acta Physiology Plant* 31: 889-897.
- Fariduddin, Q., Yusuf, M., Chalkoo, S., Hayat, S. and Ahmad, A. (2011) 28-homobrassinolide improves growth and photosynthesis in *Cucumis sativus* L. through an enhanced antioxidant system in the presence of chilling stress. *Photosynthetica* 49: 55-64.
- Farooq, M., Wahid, A., Basra, S. M. A. and Din, I. U. (2009) Improving water relations and gas exchange with brassinosteroids in rice under drought stress. *Journal of Agronomy and Crop Science* 195: 262-269.
- Hayat, S., Hasan, S. A., Yusuf, M., Hayat, Q. and Ahmad, A. (2010) Effect of 28-homobrassinolide on photosynthesis, fluorescence and antioxidant system in the presence or absence of salinity and temperature in *Vigna radiata*. *Environmental and experimental Botany* 69: 105- 112.
- Heath, R. L. and Packer, L. (1969) Photoperoxidation in isolated chloroplast I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archive of Biochemistry and Biophysics* 125:189-198.
- Kagale, S., Divi, U. K., Krochko, J. E., Keller, W. A. and Krishna, P. (2007) Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. *Planta* 225: 53-364.
- Kusvuran, S. (2012) Influence of drought stress on growth, ion accumulation and antioxidative enzymes in okra genotypes. *International Journal of Agriculture and Biology* 14: 401-406.
- 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.
- Li, Y. H., Liu, Y. J., Xu, X. L., Jin, M., An, L. Z. and Zhang, H. (2012). Effect of 24 epibrassinolide on drought stress-induced changes in *Chorispora bungeana*. *Biology Plant* 56: 192-196.
- Lutts, S., Kinet, J. M. and Bouharmont, J. (1996) NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Journal of Annual Botany* 78: 389-398.
- Mazorra, L. M., Holton, N., Bishop, G. J. and Nunez, M. (2011) Response in tomato brassinosteroid mutants indicates that thermotolerance is independent of brassinosteroid homeostasis. *Plant Physiology Biochemistry* 49: 1420-1428.
- Paquin, R. and Lechasseur, P. (1979) Observations sur une methode de dosage de la praline libre dans les extraits de plants. *Canadian Journal of Botany* 57: 1851-1854.
- Porra, R. J. (2002) The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research* 73: 149-156.
- Sahni, S., Prasad, B. D., Liu, Q., Grbic, V., Sharpe, A., Singh S. P. and Krishna, P. (2016) Overexpression of the brassinosteroid biosynthetic gene *DWF4* in *Brassica napus* simultaneously increases seed yield and stress tolerance. *Scientific Reports* 6:1-4.
- Sergiev, I., Alexieva, V., Karanov, E. and Mapelli, S. (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment* 24:1337-1344.
- Turner, N. C. (1981) Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water stress. *Plant and Soil* 58: 339-366.
- Verslues P. E. and Sharma S. (2010) Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *Arabidopsis Book* 8: 140.
- Xia, X. J., Wang, Y. J., Zhou, Y. H., Tao, Y., Mao, W. H., Shi, K., Asami, T., Chen, Z. X. and Yu, J. Q. (2009) Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber. *Plant Physiology* 150: 801-814.
- Yuan, G. F., Jia, C. G., Li, Z., Sun, B., Zhang, L. P., Liu, N. and Wang, G. M. (2010) Effect of brassinosteroids on drought resistance and abscisic acid concentration in tomato under water stress. *Scientia Horticulturae* 126: 103-108.

- Zarafshar, M. Akbarinia, M. Askari, H. Hosseini, S. M., Rahaie, M. Struve, D. and Striker, G. G. (2014) Morphological, physiological and biochemical responses to soil water deficit in seedlings of three populations of wild pear tree (*Pyrus boissieriana*). *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 18: 353-366.
- Zhang, M. C., Zhai, Z. X., Tian, X. L., Duan, L. S., and Li, Z. H. (2008). Brassinolide alleviated the adverse effect of water deficits on photosynthesis and the antioxidant of soybean (*Glycine max* L.). *Plant Growth Regulars* 56: 257-264.
- Zhou, J., Wang, j. Li, X., Xia, X. J., Zhou, Y. H., Shi, K. Chen, Z. and Yu, J. Q. (2014) H₂O₂ mediates the crosstalk of brassinosteroid and abscisic acid in tomato responses to heat and oxidative stresses. *Journal of Exprimental Botany* 65: 4371-4383.