

## مطالعه تأثیر تنش خشکی القاء شده با پلی‌اتیلن گلیکول بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه

چاودار (*Secale cereale* L.) تیمار شده با ۲۴-اپی‌براسینواستروئیدسپیده حاتمی<sup>۱</sup>، سید یحیی صالحی لیسار<sup>۱\*</sup>، فاطمه رحمانی<sup>۲</sup>، لطیفه پوراکبر<sup>۲</sup> و بتول صمدانی<sup>۳</sup><sup>۱</sup> ایران، تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه علوم گیاهی<sup>۲</sup> ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی<sup>۳</sup> ایران، تهران، سازمان تحقیقات کشاورزی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۱۰

## چکیده

چاودار با نام علمی *Secale cereale* L. گیاهی از خانواده گندمیان (*Poaceae*)، بومی کشورهای آسیای مرکزی، سوریه و ایران است. تنش خشکی یکی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده رشد و تولید محصول در سراسر دنیا به شمار می‌آید. براسینواستروئیدها از طریق اثرگذاری بر فرآیندهایی مانند فتوسنتز، فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی، انباشت اسمولیت‌ها، متابولیسم نیتروژن گیاهان در شرایط طبیعی و تحت تنش، در تنظیم رشد نقش دارند. در این پژوهش، تأثیر هورمون ۲۴-اپی‌براسینولید (با غلظت ۱۰<sup>-۸</sup> مولار) بر پاسخ آنتی‌اکسیدانی یک رقم و دو جمعیت گیاه چاودار (رقم لونکورد تهیه شده از موسسه اصلاح و تولید نهال و بذر، جمعیت بذر استفاده شده توسط کشاورزان و جمعیت بذر جمع‌آوری شده از مزارع به عنوان علف هرز) در یک طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار تحت تنش خشکی ۶، ۱۲ و ۱۸٪ القاء شده با پلی‌اتیلن گلیکول (PEG 6000) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که بروز علائم فیزیولوژیک تنش خشکی بعد از اعمال ۲۴-اپی‌براسینولید تغییرات معنی‌داری را در مقایسه با شاهد در هر سه نمونه مورد مطالعه نشان داد. در هر سه نمونه مورد مطالعه در اندام‌های هوایی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز افزایش و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز کاهش نشان داد. در مجموع می‌توان گفت که کاربرد ۲۴-اپی‌براسینولید توانسته است تأثیر مثبت بر فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه چاودار داشته باشد و از طریق کاهش شدت تنش اکسیداتیو اثرات تنش خشکی را کاهش دهد و همچنین با افزایش مقادیر اسمولیت‌ها و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی موجب جاروب رادیکال‌های آزاد گردد.

واژه‌های کلیدی: ۲۴-اپی‌براسینولید، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، تنش خشکی، چاودار.

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴ ۹۰۰ ۳۲۷۲، پست الکترونیکی: [y\\_salehi@tabrizu.ac.ir](mailto:y_salehi@tabrizu.ac.ir)

## مقدمه

زیادی را برای تأمین نیازهای غذایی برای مردم جهان تحمیل خواهد کرد (۴۴). بیش از ۵۰٪ از اراضی بخش کشاورزی جهان در مناطق خشک واقع شده است و تغییرات اقلیمی ناگهانی و شدید در مقیاس جهانی به‌طور قابل توجهی الگوی بارندگی را تغییر داده است که منجر به کمبود آب شده و بر رشد و بهره‌وری محصولات زراعی

امنیت غذایی یک مسئله بسیار مهم برای توسعه پایدار جوامع است. در حال حاضر، کمبود آب شیرین مورد نیاز کشاورزی مشکلات جدی برای تولید محصولاتی با کیفیت غذایی مناسب ایجاد کرده است. علاوه بر این، با توجه به افزایش سریع جمعیت، تخمین زده می‌شود که تا سال ۲۰۵۰ جمعیت جهان به ۹/۶ میلیارد نفر برسد، که فشار

تأثیر منفی گذاشته است (۲۷ و ۳۳).

خشکی با اثر بر روی الگوهای بیان ژنی و با فعال‌سازی ژن‌های درگیر در پاسخ به آن، و همچنین تأثیر در مورفولوژی، آناتومی و فرآیندهای بیوشیمیایی گیاهان باعث ایجاد تغییرات اساسی در متابولیسم سلول‌ها و تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود و در نهایت بر روی رشد و نمو آن‌ها تأثیر می‌گذارد (۵). مطالعات نشان داده است که تنش خشکی در گیاهان منجر به تجمع گونه‌های واکنش-پذیر اکسیژن (ROS) می‌شود. این گونه‌های فعال اکسیژنی با لیپیدها، پروتئین‌ها، رنگیزه‌ها و اسیدهای نوکلئیک واکنش می‌دهند و با پراکسیداسیون لیپیدها منجر به آسیب غشایی و در نتیجه نشت الکترولیت‌ها می‌شوند (۳۵). در گیاهان سازوکارهای دفاعی برای محافظت یا به حداقل رساندن آسیب‌های ناشی از گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن تکامل یافته است تا تعادل بین تولید و تجزیه آن‌ها جهت حفظ تعادل ردوکس سلولی را فراهم سازد (۲۶). سیستم آنتی-اکسیدانی، آسیب اکسیداتیو را در گیاهان تحت شرایط تنش کاهش می‌دهد و مقاومت به تنش را که اغلب با یک سیستم آنتی‌اکسیدانی منظم مرتبط است، افزایش می‌دهد. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POD) و کاتالاز (CAT) به عنوان یک شاخص کلیدی در سازوکار دفاع آنتی‌اکسیدانی عمل می‌کنند (۲۶). علائم خشکی در گیاهان بر اساس گونه گیاهی، مرحله رشدی، شرایط رشدی و سایر فاکتورهای محیطی بسیار متفاوت است. شدت خشکی، طول دوره خشکی، شرایط فیزیکیوشیمیایی خاک و میزان مقاومت گیاه از سایر فاکتورهایی هستند که علائم خشکی در گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهند. به‌طور کلی، از علائم خشکی می‌توان به کاهش تورژسانس برگ، افتادگی، پژمردگی، اتیوله شدن، زرد شدن و ریزش زودهنگام برگ اشاره کرد (۳۴).

تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نقش مهمی در تنظیم رشد و نمو گیاهان دارند و به‌طور فعالی با راه‌اندازی آبشارهای

ترارسانی علامت در مواجهه با تنش‌های زیستی و غیرزیستی شرکت می‌کنند (۲۱). تصور بر این است که براسینواستروئیدها (BR) از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی هستند که می‌توانند اثرات ناشی از تنش خشکی در گیاهان را کاهش دهند (۲۸ و ۴۲). این ترکیبات از طریق مشارکت فعال خود در فرآیندهایی مانند فتوسنتز، فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی، انباشت اسمولیت‌ها، متابولیسم نیتروژن و روابط آب-گیاه در شرایط طبیعی و تحت تنش در تنظیم رشد نقش دارند. گزارش شده است که گیاهان دارای نقص در بیوسنتز براسینواستروئید، ناهنجاری‌هایی در فنوتیپ‌های رشدی و مسیرهای اساسی تنظیم‌کننده این فرآیندها را نشان می‌دهند (۱۲). براسینواستروئیدها با فعال کردن سیستم دفاعی از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکناز از گیاهان در برابر تنش‌های غیرزیستی محافظت می‌کنند (۳۷). استفاده برون‌زا از این ترکیبات با کاهش شدت تنش اکسیداتیو، تأثیر بر محتوای پروتئین، تجمع اسمولیت‌های سازگار و حفظ محتوای نسبی آب، تحمل گیاه به خشکی را افزایش می‌دهند (۳۹). ۲۴-اپی-براسینولید (24-EBR)، نوعی براسینواستروئید است که در تنش‌های مختلف محیطی در گیاهان نقش دارد. استفاده از ۲۴-اپی‌براسینولید در گیاهان موجب افزایش رشد، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، راندامان فتوسنتز و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود (۳۶ و ۳۷). در مطالعه‌ای که بر روی گیاه گوجه‌فرنگی انجام گرفت مشخص گردید که مصرف برون‌زای ۲۴-اپی‌براسینولید از طریق تنظیم سیستم آنتی-اکسیدانی و متابولیسم اسمولیت‌ها اثرات مخرب ناشی از تنش‌های شوری (۴) و خشکی (۸) را کاهش داد. در مطالعه‌ای دیگر، اعمال خارجی ۲۴-اپی‌براسینولید، به‌طور قابل توجهی سبب بهبود فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی و تجمع اسمولیت‌ها در ارقام ذرت تحت تأثیر تنش خشکی گردید (۴۰). 24-EBR در ترکیب با اسپرمین با کاهش تولید رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن که

استریل شدند و در نهایت با آب مقطر برای چندین بار شستشو داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت نگهداری در آب مقطر استریل، به منظور اعمال تیمار هورمون ۲۴-آپی براسینولید ( $10^{-8}$  مولار)، بذور استریل شده در آب مقطر (گروه کنترل) یا محلول ۲۴-آپی براسینولید ( $10^{-8}$  مولار) در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار داده شدند (۵). سپس در هر گروه تیمار، بذور بر روی دو ورقه کاغذ صافی (کنترل و تیمار ۲۴-آپی براسینولید) مرطوب شده با آب مقطر و یا غلظت‌های متفاوت پلی اتیلن گلیکول (PEG6000) (۰، ۶٪، ۱۲٪ و ۱۸٪) انتقال داده شدند و برای جوانه‌زنی به مدت سه روز در دمای  $27 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی قرار گرفتند (۲۹). پس از گذشت سه روز، بذورهای جوانه‌زده به بطری‌های شیشه‌ای انتقال داده شدند. برای هر تیمار ۳ بطری در نظر گرفته شد و در هر بطری ۲۰ بذر جوانه‌زده قرار گرفت. بطری‌ها به مدت ۷ روز به اتاقک کشت با شدت نور  $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ، دمای  $27 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰٪ منتقل شدند. بعد از ۷ روز دانه‌رست‌های ۱۰ روزه برداشت شده و تا زمان انجام آزمایش در فریزر  $-80$  درجه- سانتی‌گراد نگهداری شدند.

**سنجش رنگی‌های فتوسنتزی:** سنجش محتوای رنگی‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها) بر اساس روش Lichtenthaler انجام شد (۲۶). مقدار ۰/۱ گرم بافت تر برگ گیاهان در ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ همگن شدند و در ظرف‌های شیشه‌ای درب‌دار به مدت یک هفته در یخچال و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. سپس میزان جذب نوری نمونه‌ها پس از صاف کردن با کاغذ صافی، با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Analytic Jena, Specol 1500, Germany) در طول موج‌های ۶۶۲، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و با استفاده از رابطه‌های زیر، محتوای کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید بر حسب میلی‌گرم بر گرم بافت تر برگ محاسبه گردید:

$$\text{Chl. a (mg/g FW)} = 12.7 (\text{OD}_{663}) - 2.69 (\text{OD}_{645}) \times V/1000 \times W$$

منعکس‌کننده پراکسیداسیون لیپید پایین و پایداری بالاتر غشا می‌باشد، سازوکارهای دفاعی اکسیداتیو را تنظیم می‌کند (۴۰). گزارش گردیده است که استفاده از 24-EBR در گیاهان ذرت تحت تنش خشکی، سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های بیوسنتتیک و پلی‌آمین‌ها و کاهش فعالیت آنزیم‌های کاتابولیزه می‌شود و در نتیجه سبب افزایش تحمل به تنش خشکی می‌شود (۴۱). محققان گزارش کرده‌اند که ژنوتیپ‌های جو دارای نقص در سنتز براسینواستروئیدها، مقاومت کم‌تری به تنش خشکی را دارا هستند و تجمع کاستاسترون و آپی‌براسینواستروئیدها به علت تشدید خشکسالی باعث تعدیل تنش خشکی در گیاه می‌شود (۱۶).

تحقیقات در مورد اثرات آپی‌براسینواستروئیدها تحت تنش خشکی در گیاهان به‌ویژه غلات، نیاز به توجه بیشتری دارد. مطالعات چندی در مورد تأثیر 24-EBR بر فرآیندهای رشدی در گیاهان تحت تنش خشکی انجام گرفته است، با این حال، اطلاعات کمی در مورد مکانیسم ارائه تحمل تنش خشکی ناشی از 24-EBR در چاودار وجود دارد. بنابراین، این مطالعه با هدف ارزیابی نقش بالقوه 24-EBR بر صفات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی چاودار تحت تنش خشکی انجام شد.

## مواد و روشها

**کشت گیاه و اعمال تیمار:** این آزمایش در یک طرح کاملاً تصادفی با پایه فاکتوریل در سه تکرار و در هر تکرار با ۲۴ تیمار انجام گرفت. سه نمونه بذر گیاه چاودار (توده تولید شده در موسسه اصلاح بذر و نهال سازمان تحقیقات کشاورزی ایران (رقم لانکورد)، جمعیت بذر تولیدی زارعین، جمعیت جمع‌آوری شده از مزارع به عنوان علف هرز) در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند. قبل از کشت، بذورهای گیاه چاودار با استفاده از اتانول ۷۰٪ به مدت ۲ دقیقه و سدیم هیپوکلریت ۵٪ به مدت ۵ دقیقه

$$\text{Chl. b (mg/g FW)} = 12.9 (\text{OD}_{654}) - 4.68 (\text{OD}_{663}) \times V/1000 \times W$$

$$\text{Carotenoids (mg/g FW)} = \text{OD}_{480} + (0.114 \times \text{OD}_{663}) - (0.638 \times \text{OD}_{645})$$

گردیدند. هم‌زمان با عصاره گیاهی، محلول‌های استاندارد در محدوده صفر تا ۱۰۰ نانومول از ۱، ۳، ۱، ۳، ۱، ۳ ترا اتوکسی پروپان تهیه شدند. ۱، ۳، ۱، ۳، ۱، ۳ ترا اتوکسی پروپان و با کد t9889 از کمپانی سیگما آلدریچ هست و فرمول شیمیایی آن به صورت زیر است.



برای تهیه در حد نانو یک محلول مادر با غلظت میکرو تهیه و سپس از طریق رقیق‌سازی غلظت‌های نانو ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ تهیه گردید.

**اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌ها (EL):** برای اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌ها از روش Osman و Rady استفاده شد (۳۲). دو نمونه ۲ گرمی از برگ هر تیمار برداشته و به لوله آزمایش محتوای ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر منتقل گردید. لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شده و هدایت الکتریکی آن‌ها توسط دستگاه سنجش هدایت الکتریکی (HANNA مدل HI8819 ساخت کشور پرغال) اندازه گرفته شد ( $\text{EC}_1$ ). سپس لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه‌سانتی‌گراد منتقل شدند. بعد از سرد شدن لوله‌ها هدایت الکتریکی دوباره اندازه گرفته شد ( $\text{EC}_2$ ). نشت الکترولیت نمونه‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{EL (\%)} = (\text{EC}_1/\text{EC}_2) \times 100$$

**سنجش محتوای پرولین آزاد:** محتوای پرولین آزاد با استفاده از معرف نین‌هیدرین به روش Bates و همکاران اندازه‌گیری شد (۷). برای این منظور یک گرم بافت برگ با استفاده از ۳ میلی‌لیتر محلول سولفوسالیسیلیک اسید ۳٪ ساییده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ گردید. سپس به ۲ میلی‌لیتر محلول رویی ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین (برای تهیه معرف نین‌هیدرین ۱/۲۵ گرم نین-هیدرین در ۳۰ میلی‌لیتر اسید استیک و ۲۰ میلی‌لیتر اسید

**سنجش محتوای پراکسید هیدروژن ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ):** محتوای پراکسید هیدروژن، مطابق روش Harinasut اندازه‌گیری گردید (۱۹). یک گرم از بافت تر در تری‌کلرواستیک اسید ۱٪ (TCA, Merck, Germany)، همگن شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ گردید. بلافاصله ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول شناور بالایی با ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار (pH=۷) و یک میلی‌لیتر یدور پتاسیم یک مولار مخلوط شدند و در دمای ۲۵ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری گردید. غلظت پراکسید هیدروژن نمونه‌ها بر اساس منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن محاسبه و به صورت میکرومول بر گرم وزن تر بیان گردید.

**سنجش محتوای مالون دی‌آلدئید (MDA):** سنجش محتوای مالون دی‌آلدئید با استفاده از روش Boominathan و Doran انجام گردید (۹). با استفاده از محلول ۰/۱٪ (w/v) تری‌کلرواستیک اسید (TCA) نمونه‌های گیاهی همگن شدند و به مدت پنج دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ گردیدند. سپس محلول روشن‌آور، با محلول ۲۰٪ TCA حاوی ۰/۵٪ تیوباربتوریک اسید به نسبت ۱ به ۴، در لوله آزمایش با هم مخلوط شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه‌سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها به سرعت در داخل یخ سرد شدند و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ گردیدند. میزان جذب مخلوط به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-VIS در دو طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (جذب در طول موج دوم غیرخالص است که باید از جذب در طول موج اول کم شود و در محاسبه مقدار مالون دی‌آلدئید ضریب خاموشی  $156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  نیز لحاظ گردید). نمونه‌ها برحسب میکرومول بر گرم وزن تر اندام محاسبه

**فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز:** فعالیت این آنزیم بر اساس برآورد میزان اکسیداسیون آسکوربیک اسید با اندازه‌گیری کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (۹). ۳۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (pH=۷، ۵۰ میلی‌مولار)، ۲۰۰ میکرولیتر EDTA (۰/۲ میلی‌مولار)، ۲۰۰ میکرولیتر آسکوربیک اسید (۰/۵ میلی‌مولار)، ۲۰۰ میکرولیتر آلومین سرم گاوی (۵۰ میلی‌مولار) و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی با هم مخلوط شدند. واکنش آنزیمی با افزودن ۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (۰/۱ میلی‌مولار) شروع شد و تغییرات جذب به مدت سه دقیقه در طول موج ۲۹۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ثبت گردید. در نهایت فعالیت ویژه آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی آسکوربیک اسید ( $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (۲/۸) محاسبه و به صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین ( $\text{Unit/mg protein}$ ) بیان گردید. یک واحد فعالیت آنزیمی، مقدار آنزیم لازم برای احیاء یک میکرولیتر آسکوربیک اسید در دقیقه در نظر گرفته شد.

**فعالیت آنزیم پراکسیداز:** فعالیت این آنزیم بر اساس روش Chance و Maehly و با اندازه‌گیری میزان تبدیل گایاکول به تتراگایاکول در مدت زمان سه دقیقه انجام گرفت (۱۱). مخلوط واکنش (۱ میلی‌لیتر) شامل ۳۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار با pH=۷، ۳۰۰ میکرولیتر گایاکول ۴ میلی‌مولار و ۳۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۵ میلی‌مولار بود. واکنش با افزودن ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد آغاز شد و جذب نمونه‌ها به مدت سه دقیقه در طول موج ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ثبت شد. در نهایت فعالیت آنزیم بر اساس ضریب خاموشی تتراگایاکول ( $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (۲۵/۵) محاسبه شد و به صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین ( $\text{Unit/mg protein}$ ) بیان گردید. یک واحد فعالیت آنزیمی، مقدار آنزیم لازم جهت اکسیداسیون یک میکرومولار گایاکول به تتراگایاکول در نظر گرفته شد.

فسفریک ۶ مولار حل گردید) و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس لوله‌ها به داخل حمام یخ منتقل شدند. بعد از سرد شدن به هر لوله ۴ میلی‌لیتر تولون اضافه گردید و ۲۰ ثانیه خوب تکان داده شدند. در هر لوله آزمایش دو فاز تشکیل شد. از فاز صورتی رنگ بالایی جهت سنجش محتوای پرولین آزاد با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر استفاده شد و محتوای پرولین بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

**سنجش قندهای محلول:** اندازه‌گیری قندهای محلول با استفاده از روش Kochert انجام گرفت (۲۴). بدین منظور، ۰/۵ گرم بافت تر گیاه در ۳ میلی‌لیتر آب مقطر ساپیده شد و سپس با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف گردید. بر روی ۲ میلی‌لیتر محلول صاف شده، ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ و ۱ میلی‌لیتر فنل ۵٪ اضافه گردید و بعد از گذشت ۲۰ دقیقه جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۸۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. محتوای قندهای محلول نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت‌های مختلف گلوکز (۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، (۰-۲۰-۴۰-۶۰-۸۰-۱۰۰) محاسبه گردید.

#### اندازه‌گیری پروتئین‌های محلول کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت

**تهیه عصاره گیاهی:** یک گرم بافت تر گیاهی در ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم با غلظت ۵۰ میلی‌مولار و pH=۷ همگن گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در  $g$  ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. از محلول شناور رویی برای سنجش پروتئین‌های محلول کل به روش برادفورد (۱۰) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شامل کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز استفاده گردید.

بیان گردید.

**تجزیه و تحلیل آماری:** آنالیز داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) و آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ صورت گرفت و نمودارهای مربوط به میانگین پارامترهای سنجیده شده، با استفاده از نرم‌افزار Microsoft excel 2019 ترسیم گردیدند.

## نتایج

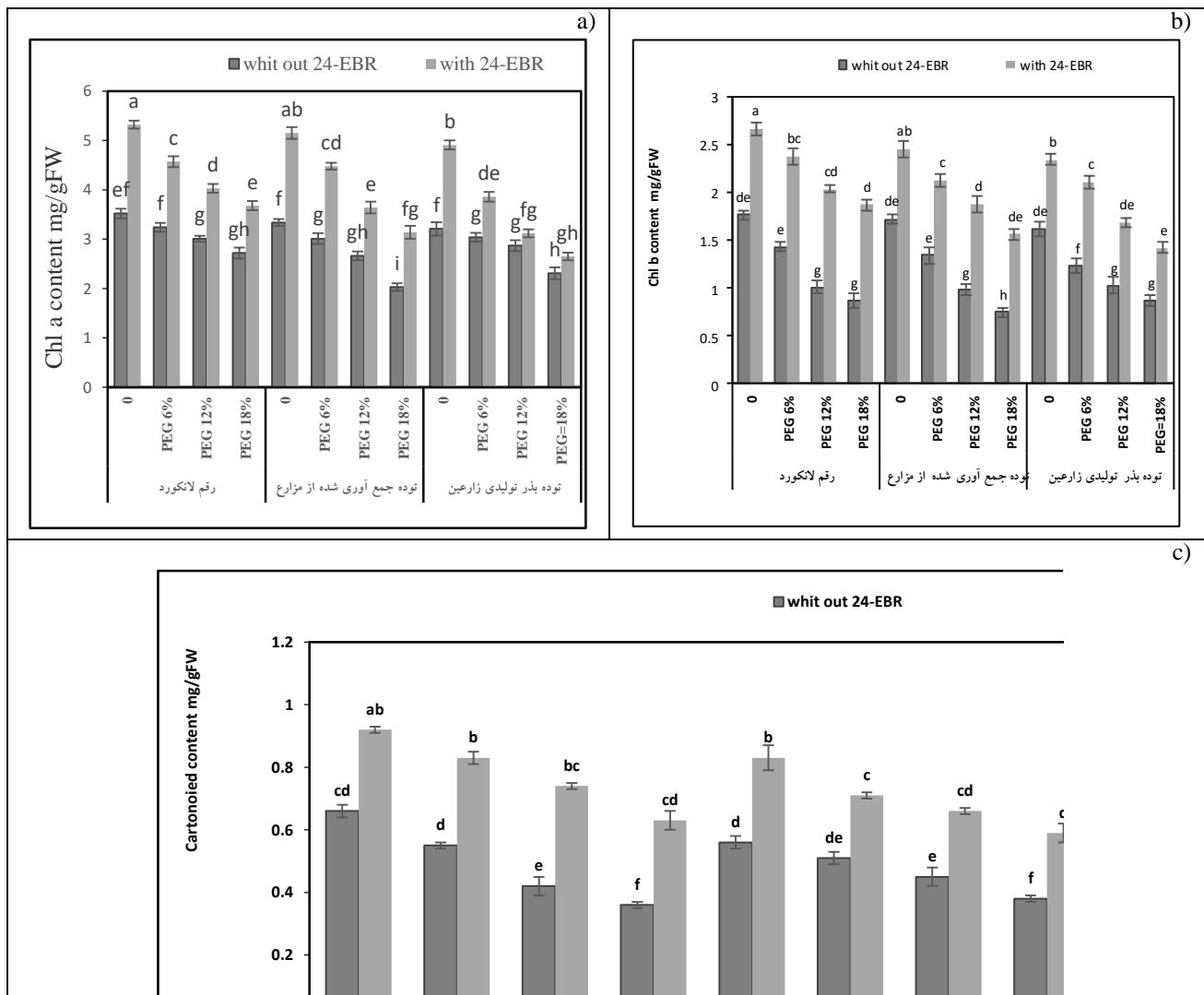
**محتوای کلروفیل a و b:** نتایج آزمایش حاکی از آن بود که تنش‌های ایجاد شده توسط غلظت‌های مختلف ۶، ۱۲ و ۱۸٪ پلی‌اتیلن گلیکول به طور جدی بر فاکتورهای مورد آزمایش اثر ممانعت‌کنندگی نشان دادند و در مقابل تیمار با ۲۴-پی‌براسینولید به صورت چشمگیری کاهش این اثرات ممانعت‌کنندگی را در بر داشت. در شرایط طبیعی و بدون استفاده از اثرات تنش‌زای پلی‌اتیلن گلیکول نیز تیمار با ۲۴-پی‌براسینولید باعث افزایش فاکتورهای مورد مطالعه شد. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، تنش خشکی محتوای کلروفیل a را در تمامی نمونه‌ها کاهش داد و تیمار با ۲۴-پی‌براسینولید باعث افزایش تولید آن در تیمارهای تحت تنش شد. محتوای کلروفیل a در تیمار کنترل بدون اعمال تنش خشکی با استفاده از ۲۴-پی‌براسینولید به بالاترین میزان خود در آزمایش رسید. بیش‌ترین و کم‌ترین محتوای کلروفیل a به ترتیب در رقم لانکورد و تیمار ۲۴-پی‌براسینولید ( $5/32 \text{ mg/g FW}$ ) کنترل و توده جمع‌آوری شده از مزارع در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪ ( $2/03 \text{ mg/g FW}$ ) مشاهده شد. خشکی در هر سه نمونه بذر موجب کاهش معنی‌دار محتوای کلروفیل a شد که بیش‌ترین کاهش در بین سه نمونه، در جمعیت بذر جمع‌آوری شده از مزارع به میزان  $39/22\%$  به دست آمد. استفاده از ۲۴-پی‌براسینولید محتوای کلروفیل a را در مقایسه با شاهد در هر سه نمونه افزایش داد و بالاترین افزایش در توده جمع‌آوری شده از مزارع ( $54/19 \text{ mg/g FW}$ ) مشاهده شد (شکل ۱-a). استفاده از ۲۴-پی-

**فعالیت سوپراکسید دیسموتاز:** فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اساس روش Winterbourn با کمی تغییر انجام گرفت (۴۴). در این روش آنیون سوپراکسید ( $O_2^-$ ) به وسیله فتولیز ربیوفلاوین تولید می‌شود و NBT (نیتروبلوتترازولیوم) را به ترکیب ارغوانی دیفرمازون احیاء می‌کند. فعالیت آنزیم بر اساس اندازه‌گیری میزان ممانعت از احیاء نوری NBT توسط عصاره آنزیمی انجام گرفت. مخلوط واکنش (۳ میلی‌لیتر) شامل ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۱۰۰ میکرولیتر NBT ۱/۵ میلی‌مولار، ۲۰۰ میکرولیتر EDTA ۰/۱ مولار حاوی سدیم سیانید ۰/۳ میلی‌مولار و ۲۶۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۶۰ میلی‌مولار با  $pH=7/8$  بود. این محلول به مدت ۸-۵ دقیقه در زیر نور لامپ (۴۰ وات) در دمای اتاق قرار داده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر ربیوفلاوین (۰/۱۲ میلی‌مولار) به محلول افزوده شد و دوباره در زیر لامپ به مدت ۱۲ دقیقه قرار گرفت. سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ثبت گردید. مخلوط واکنش شاهد فاقد عصاره آنزیمی بود. فعالیت ویژه آنزیم به صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین (Unit/mg protein) بیان گردید. یک واحد فعالیت آنزیمی، مقداری از آنزیم است که موجب ممانعت ۵۰ درصدی از احیاء نوری NBT می‌شود.

**فعالیت آنزیم کاتالاز:** فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس اندازه‌گیری میزان کاهش جذب نوری پراکسید هیدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر، مطابق روش Chance و Maehly اندازه‌گیری گردید (۱۱). به این منظور ۵۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ( $pH=7$ ، ۵۰ میلی‌مولار) و ۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن (۱۰ میلی‌مولار) افزوده شد و تغییرات جذب نوری به مدت سه دقیقه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ثبت گردید. در نهایت فعالیت ویژه آنزیم بر اساس ضریب خاموشی پراکسید هیدروژن ( $40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) محاسبه و به صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین (Unit/mg protein)

تنش خشکی موجب کاهش محتوای کلروفیل b در تمامی نمونه‌های بذری گردید و تیمار با ۲۴-اپی‌براسینولید باعث افزایش تولید آن در تیمارهای تحت تنش شد. بیش‌ترین کم‌ترین محتوای کلروفیل b به ترتیب در رقم لانکورد در تیمار با ۲۴-اپی‌براسینولید (۲/۶۶ mg/g FW) کنترل (بدون تنش خشکی) و جمعیت جمع‌آوری شده از مزارع در تیمار بدون ۲۴-اپی‌براسینولید و پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪ (mg/g) (۰/۷۵ FW) مشاهده شد.

براسینولید در گیاهان تحت تنش خشکی در هر سه نمونه مورد مطالعه، محتوای کلروفیل a را در مقایسه با گیاهان تحت تیمار خشکی به صورت معنی‌داری افزایش داد. حداکثر و حداقل افزایش بین سه نمونه به ترتیب در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪ + ۲۴-اپی‌براسینولید و جمعیت بذر جمع‌آوری شده از مزارع (۶۷/۵۹٪) و در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۲٪ + ۲۴-اپی‌براسینولید و جمعیت بذر تولیدی زارعین (۸/۷۱٪) به دست آمد (شکل ۱-a).



شکل ۱- محتوای کلروفیل a (a)، کلروفیل b (b) و کاروتنوئید کل (c) در دانه‌رست‌های ۱۰ روزه سه نمونه گیاه چاودار (رقم لانکورد، جمعیت جمع‌آوری شده از مزارع و جمعیت بذر تولیدی زارعین) تحت تنش خشکی القاء شده با پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) (۰، ۶، ۱۲ و ۱۸٪) و اعمال ۲۴-اپی-براسینولید (24-EBR). اعداد میانگین  $\pm$  SE تکرار ۳ می‌باشند و حروف مختلف بر روی ستون‌ها نشانگر تفاوت معنی‌دار بین تیمارها بر طبق آزمون دانکن می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

افزایش پلی‌اتیلن گلیکول افزایش یافت و حداکثر افزایش در ریشه بین سه رقم مورد مطالعه در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪ و توده بذر تولیدی زارعین (۱۳۵٪) و در اندام‌های هوایی در رقم لانکورد (۱۶۸/۷۸٪) در مقایسه با شاهد (بدون تنش خشکی و بدون تیمار با ۲۴-اپی-براسینولید) مشاهده شد. مصرف ۲۴-اپی-براسینولید در هر سه نمونه بذر منجر به کاهش محتوای MDA در مقایسه با شاهد (بدون تنش خشکی و بدون تیمار با ۲۴-اپی-براسینولید) شد که بیش‌ترین کاهش در ریشه و اندام‌های هوایی در رقم لانکورد (۱۸/۵٪) به دست آمد (شکل ۲-b-۲ و ۲-a-۲).

استفاده از ترکیب ۲۴-اپی-براسینولید، در گیاهان تحت تیمار خشکی، در هر سه رقم محتوای MDA ریشه را در مقایسه با گیاهان تحت تیمار خشکی کاهش داد (۱۵/۹۰ تا ۲۸/۷۳٪). بیش‌ترین کاهش در ریشه سه نمونه مورد مطالعه در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۶٪ + ۲۴-اپی-براسینولید و رقم لانکورد مشاهده شد. محتوای MDA اندام‌های هوایی در اثر مصرف ۲۴-اپی-براسینولید در گیاهان تحت تیمار خشکی به میزان ۷/۲۵ تا ۳۹/۷۸٪ کاهش یافت و بالاترین کاهش در رقم لانکورد در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۶٪ + ۲۴-اپی-براسینولید مشاهده گردید (شکل ۲-b-۲ و ۲-a-۲).

محتوای  $H_2O_2$  ریشه و اندام‌های هوایی، در هر سه نمونه با افزایش پلی‌اتیلن گلیکول افزایش یافت و بیش‌ترین افزایش بین سه نمونه در ریشه تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪ و نمونه بذر جمع‌آوری شده از مزارع (۳/۶۱ برابر) و در اندام‌های هوایی در رقم لانکورد (۱۶۹/۱۷٪) در مقایسه با شاهد (بدون تنش خشکی و بدون تیمار با ۲۴-اپی-براسینولید) به دست آمد. کاربرد ۲۴-اپی-براسینولید در هر سه رقم منجر به کاهش محتوای  $H_2O_2$  در مقایسه با شاهد (بدون تنش خشکی و بدون تیمار با ۲۴-اپی-براسینولید) گردید و بیش‌ترین کاهش در ریشه (۲۳/۵۵٪) و اندام‌های هوایی (۲۵/۰۹٪) در رقم لانکورد به دست آمد (شکل ۲-d-۲ و ۲-c-۲). اعمال ۲۴-اپی-براسینولید در گیاهان تحت تیمار

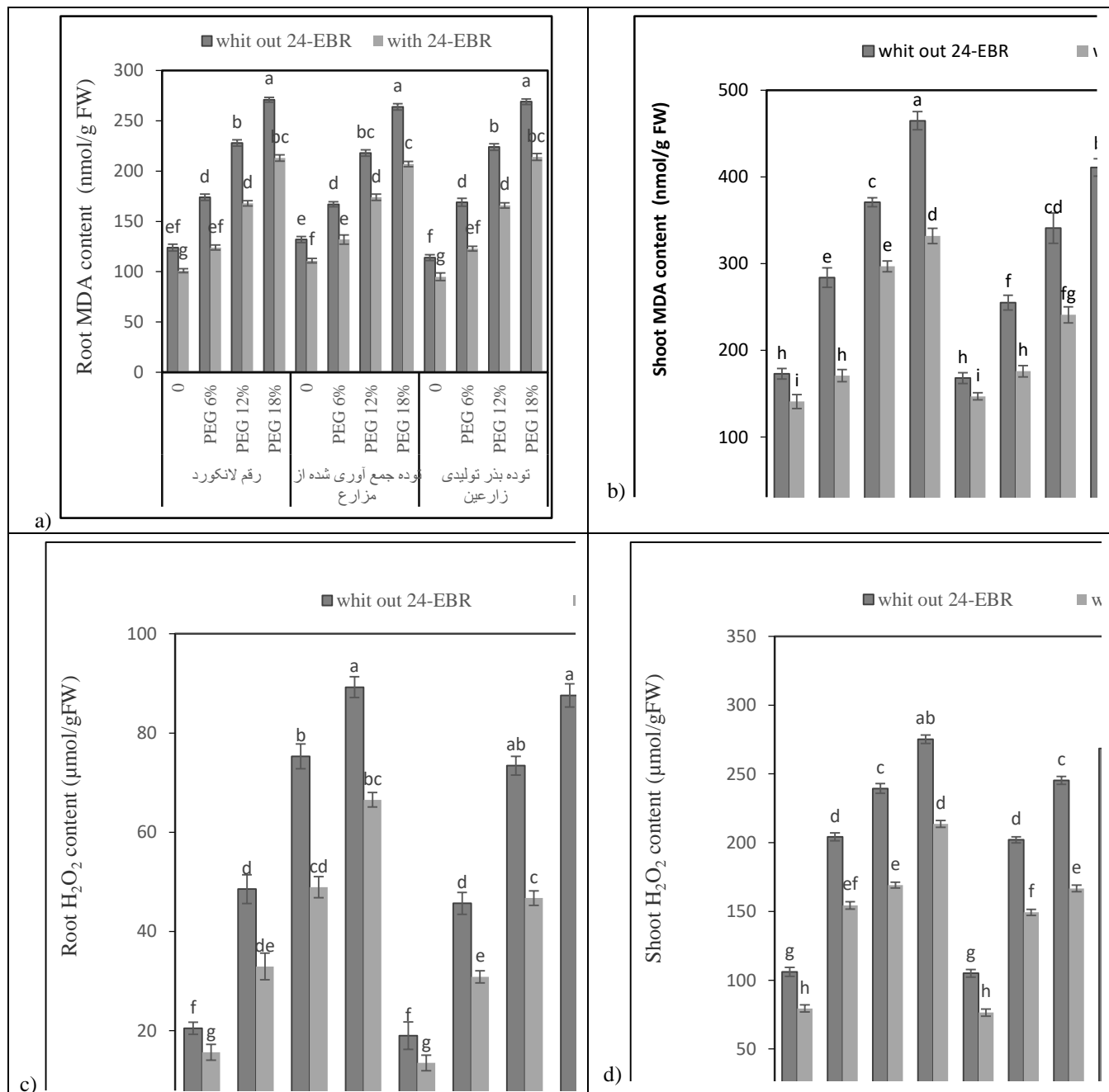
خشکی در هر سه نمونه موجب کاهش معنی‌دار محتوای کلروفیل b شد، به طوری که بیش‌ترین کاهش در بین سه نمونه، در توده جمع‌آوری شده از مزارع به میزان ۵۶/۳۹٪ مشاهده شد. اعمال ۲۴-اپی-براسینولید محتوای کلروفیل b را در مقایسه با شاهد در هر سه نمونه بذر افزایش داد و بالاترین افزایش در مقایسه با شاهد در بذر جمع‌آوری شده از مزارع (۵۱/۳۱ mg/g FW) حاصل گردید (شکل ۲-b-۱).

**محتوای کاروتنوئید:** تنش خشکی بر محتوای کاروتنوئید در سه نمونه بذری تأثیر منفی داشت و با افزایش شدت تنش میزان کاهش کاروتنوئیدها در هر سه نمونه افزایش نشان داد. مصرف ۲۴-اپی-براسینولید این تأثیر منفی را جبران کرده و باعث افزایش میزان کاروتنوئیدها در هر سه نمونه بذری و همه شدت‌های تنش خشکی شد. بیش‌ترین محتوای کاروتنوئیدها در تیمار ۲۴-اپی-براسینولید و رقم لانکورد (۹۲/۰ mg/g FW) و کم‌ترین آن در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪، رقم لانکورد و جمعیت بذر تولیدی زارعین (۳۶/۰ mg/g FW) و بدون تیمار با ۲۴-اپی-براسینولید بود. محتوای کاروتنوئیدها در هر سه نمونه با افزایش درصد پلی-اتیلن گلیکول کاهش یافت و بیش‌ترین کاهش در بین سه نمونه در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪، رقم لانکورد و توده زارعین به میزان ۳۶٪ مشاهده شد. اعمال ۲۴-اپی-براسینولید در هر سه نمونه منجر به افزایش محتوای کاروتنوئیدها شد و بیش‌ترین افزایش در توده تولیدی زارعین (۵۰٪) به دست آمد (شکل ۲-c-۱).

**محتوای مالون دی‌آلدئید (MDA) و پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ):** بیش‌ترین محتوای MDA در ریشه و اندام‌های هوایی سه نمونه چاودار در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪ و رقم لانکورد به ترتیب به میزان ۲۷۱ و ۴۶۵ nmol/g FW مشاهده شد. کم‌ترین محتوای MDA نیز در ریشه و اندام‌های هوایی در تیمار ۲۴-اپی-براسینولید و رقم لانکورد به ترتیب به میزان ۹۵ و ۱۴۱ nmol/g FW به دست آمد (شکل ۲-b-۲ و ۲-a-۲). محتوای MDA در هر سه رقم با

هوایی در اثر مصرف ۲۴-اپی براسینولید در گیاهان تحت تیمار خشکی به میزان ۱۴/۴۲ تا ۳۰/۸۹٪ نیز مشاهده شد و بیشترین کاهش در اندامهای هوایی توده جمع‌آوری شده از مزارع در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۲٪ + ۲۴-اپی-براسینولید به دست آمد (شکل ۲-c و ۲-d).

خشکی در هر سه نمونه بذر، محتوای  $H_2O_2$  ریشه را در مقایسه با گیاهان تحت تیمار خشکی کاهش داد (۲۳/۷۵ تا ۳۶/۳۵). بیشترین کاهش  $H_2O_2$  ریشه در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۲٪ + ۲۴-اپی براسینولید و نمونه بذر جمع‌آوری از مزارع مشاهده شد. کاهش محتوای  $H_2O_2$  اندامهای



شکل ۲- محتوای MDA ریشه (a) و اندامهای هوایی (b) و محتوای  $H_2O_2$  ریشه (c) و اندامهای هوایی (d) در دانه‌رست‌های ۱۰ روزه سه نمونه گیاه چاودار (رقم لانکوردر، جمعیت بذری جمع‌آوری شده از مزارع و جمعیت بذر تولیدی زارعین) تحت تنش خشکی القاء شده با پلی‌اتیلن گلیکول (۰، ۱۲ و ۱۸٪) و اعمال ۲۴-اپی براسینولید. اعداد میانگین ۳ تکرار  $\pm SE$  می‌باشند و حروف مختلف بر روی ستون‌ها نشانه تفاوت معنی‌دار بین تیمارها طبق آزمون دانکن می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

چاودار، محتوای پرولین آزاد را در مقایسه با گیاهان تحت تیمار خشکی افزایش داد (۱۲/۴۲ تا ۴۰/۲۵٪). بیش‌ترین افزایش محتوای پرولین آزاد بین سه رقم مورد مطالعه در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۶٪ + ۲۴-پی‌براسینولید و توده بذر تولیدی زارعین مشاهده شد (شکل ۳-b).

**محتوای قندهای محلول:** محتوای قندهای محلول در هر سه نمونه بذر مورد مطالعه با اعمال تنش خشکی و تیمار با ۲۴-پی‌براسینولید افزایش یافت. بیش‌ترین محتوای قندهای محلول در رقم لانکورد و در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪ + ۲۴-پی‌براسینولید (۵۲/۹۷ mg/g FW) و کم‌ترین آن در گیاهان شاهد (بدون تنش خشکی و بدون تیمار با ۲۴-پی‌براسینولید) و در نمونه جمع‌آوری شده از مزارع (۱۸/۰۱ mg/g FW) حاصل شد. محتوای قندهای محلول در هر سه رقم با افزایش پلی‌اتیلن گلیکول افزایش یافت که بیش‌ترین افزایش آن در بین سه رقم در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪ و توده جمع‌آوری شده از مزارع (۱۴۸/۸۰) در مقایسه با شاهد (بدون تنش خشکی و بدون تیمار با ۲۴-پی‌براسینولید) مشاهده شد. کاربرد ۲۴-پی‌براسینولید در هر سه رقم منجر به افزایش محتوای قندهای محلول نسبت به شاهد شد که بیش‌ترین افزایش در توده جمع‌آوری شده از مزارع (۱۷/۸۲٪) به دست آمد (شکل ۳-c). اعمال ۲۴-پی‌براسینولید بر روی گیاهان تحت تیمار خشکی در هر سه رقم چاودار، محتوای قندهای محلول را در مقایسه با گیاهان تحت تیمار خشکی افزایش داد (۱۰/۹۴ تا ۲۳/۱۴٪). بیش‌ترین محتوای قندهای محلول بین سه رقم مورد مطالعه در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۲٪ + ۲۴-پی‌براسینولید و رقم لانکورد مشاهده شد (شکل ۳-c).

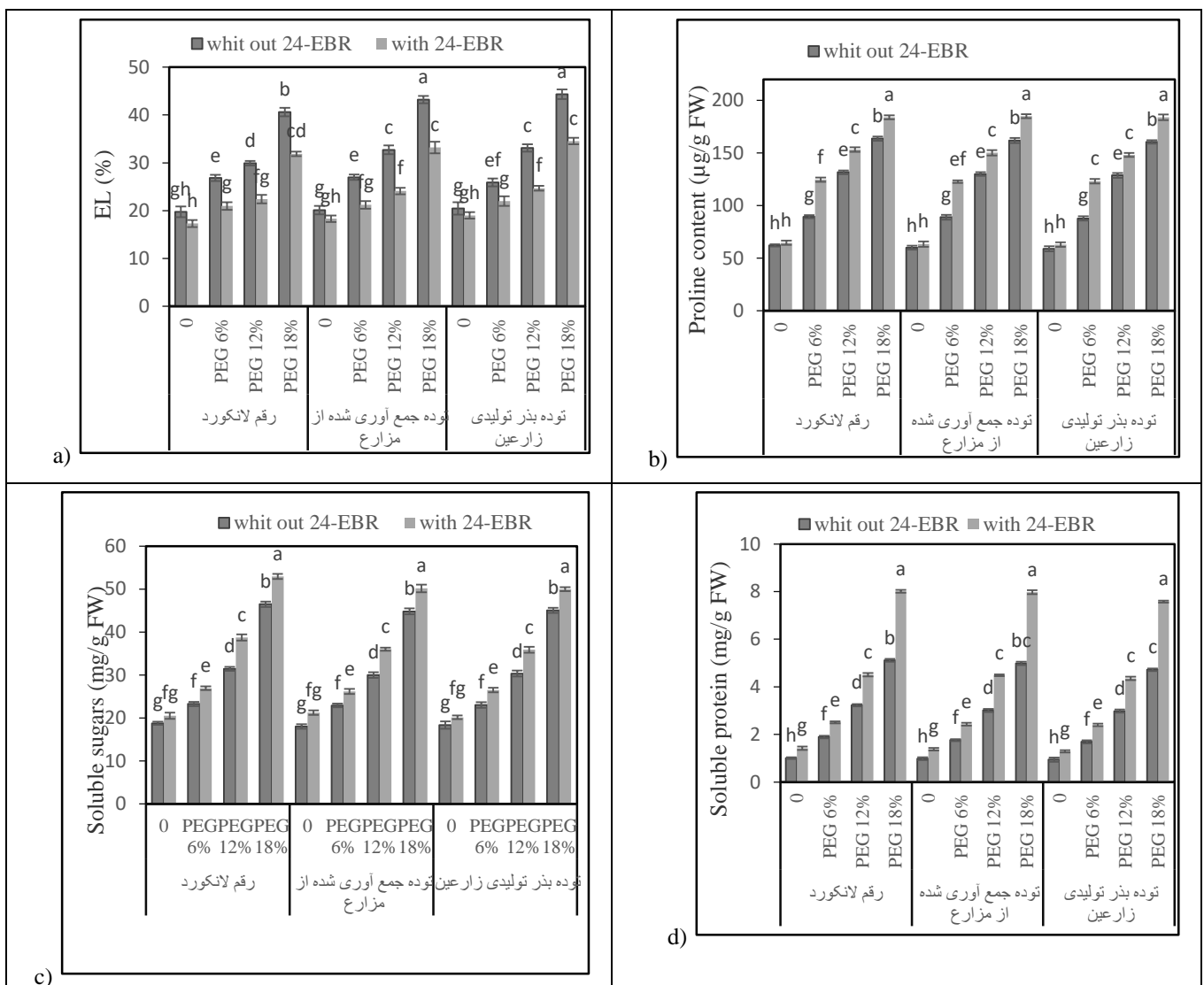
**پروتئین‌های محلول کل:** محتوای پروتئین‌های محلول در هر سه رقم با افزایش پلی‌اتیلن گلیکول افزایش یافت و بیش‌ترین افزایش در بین سه رقم در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪ و توده جمع‌آوری شده از مزارع (۴/۰۸ برابر)

**نشت الکترولیت‌ها (EL):** بیش‌ترین میزان نشت الکترولیت‌ها در توده بذر تولیدی زارعین در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪ (۴۴/۳۲٪) و کم‌ترین آن در تیمار ۲۴-پی‌براسینولید رقم لانکورد (۱۷/۳۱٪) بود. درصد نشت الکترولیت‌ها در هر سه نمونه با افزایش پلی‌اتیلن گلیکول افزایش یافت که بیش‌ترین افزایش آن در بین سه نمونه در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪ و توده بذر تولیدی زارعین (۱۷/۳۱٪) در مقایسه با شاهد (بدون تنش خشکی و بدون تیمار با ۲۴-پی‌براسینولید) مشاهده شد. استفاده از ۲۴-پی‌براسینولید در هر سه نمونه منجر به کاهش درصد نشت الکترولیت‌ها شد و بیش‌ترین کاهش در رقم لانکورد (۵/۶۱٪) به دست آمد (شکل ۳-a). مصرف ۲۴-پی‌براسینولید در گیاهان تحت تیمار خشکی در هر سه رقم چاودار، درصد نشت الکترولیت‌ها را در مقایسه با گیاهان تحت تیمار خشکی کاهش داد (۳/۹۳ تا ۱۰٪). بیش‌ترین کاهش درصد نشت الکترولیت‌ها بین سه نمونه مورد مطالعه در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۲٪ + ۲۴-پی‌براسینولید و توده جمع‌آوری شده از مزارع مشاهده گردید (شکل ۳-a).

**محتوای پرولین آزاد:** بیش‌ترین محتوای پرولین آزاد در توده جمع‌آوری شده از مزارع در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪ + ۲۴-پی‌براسینولید (۱۵۸/۰۱ μg/g FW) و کم‌ترین آن در تیمار شاهد (بدون تنش خشکی و بدون تیمار با ۲۴-پی‌براسینولید) و توده بذری تولیدی زارعین (۵۸/۹۰ μg/g FW) بود. محتوای پرولین آزاد در هر سه رقم با افزایش پلی‌اتیلن گلیکول افزایش یافت که بیش‌ترین افزایش در بین سه رقم در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪ و توده بذر تولیدی زارعین (۱۷۲/۵۶٪) در مقایسه با شاهد مشاهده شد. کاربرد ۲۴-پی‌براسینولید در هر سه رقم منجر به افزایش محتوای پرولین نسبت به شاهد شد، به طوری‌که بیش‌ترین افزایش در توده بذر تولیدی زارعین (۶/۹۱٪) به دست آمد (شکل ۳-b). هم‌چنین استفاده از ۲۴-پی‌براسینولید در گیاهان تحت تیمار خشکی در هر سه رقم

شد. مصرف ۲۴-اپی‌براسینولید در گیاهان تحت تیمار خشکی در هر سه نمونه بذر چاودار، محتوای پروتئین‌های محلول را در مقایسه با گیاهان تحت تیمار خشکی چاودار به میزان (۳۲/۸۰ تا ۶۰/۵۹٪) افزایش داد. بالاترین افزایش محتوای پروتئین‌های محلول بین سه نمونه مورد مطالعه در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪ + ۲۴-اپی‌براسینولید و بذر تولیدی زارعین مشاهده شد (شکل ۳-d).

در مقایسه با شاهد این گروه مشاهده شد. اعمال ۲۴-اپی-براسینولید در هر سه رقم منجر به افزایش محتوای پروتئین‌های محلول نسبت به شاهد شد و بیش‌ترین افزایش در توده جمع‌آوری شده از مزارع (۴۰/۸۱٪) به دست آمد (شکل ۳-d). بیش‌ترین محتوای پروتئین محلول کل در نمونه لانکورد در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪ + ۲۴-اپی‌براسینولید (۸/۰۱ mg/g FW) و کم‌ترین آن در گیاهان شاهد نمونه لانکورد (۱/۰۱ mg/g FW) حاصل



شکل ۳- درصد نشت الکترولیت‌ها (EL) (a)، محتوای پرولین آزاد (b)، محتوای قندهای محلول (c) و پروتئین‌های محلول کل (d) در دانه‌رست‌های ۱۰ روزه سه نمونه بذر گیاه چاودار (رقم لانکورد، جمعیت جمع‌آوری شده از مزارع و جمعیت بذر تولیدی زارعین) تحت تنش خشکی القاء شده با پلی‌اتیلن گلیکول (۰، ۶، ۱۲ و ۱۸٪) و اعمال ۲۴-اپی‌براسینولید. اعداد میانگین ۳ تکرار  $\pm$  SE می‌باشند و حروف مختلف بر روی ستون‌ها نشانه تفاوت معنی‌دار بین تیمارها طبق آزمون دانکن می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

## فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانسی

جمع‌آوری شده از مزارع در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۶٪ + ۲۴-پی‌براسینولید به دست آمد (شکل ۴-b و ۴-a).

**فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD):** فعالیت آنزیم POD در هر سه نمونه بذر با افزایش پلی‌اتیلن گلیکول در ریشه افزایش و در اندام‌های هوایی کاهش یافت. به طوری که بیش‌ترین افزایش در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪ و توده جمع‌آوری شده از مزارع (۳۰۱٪) و بیش‌ترین کاهش در اندام‌های هوایی در رقم لانکوردا (۸۱/۳۳٪) با پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪ در مقایسه با شاهد مشاهده گردید. اعمال ۲۴-پی‌براسینولید در هر سه رقم منجر به کاهش فعالیت POD ریشه و افزایش فعالیت آن در اندام‌های هوایی در مقایسه با شاهد شد. بیش‌ترین کاهش در ریشه در رقم لانکوردا (۲۵٪) و بیش‌ترین افزایش در اندام‌های هوایی در توده بذر جمع‌آوری شده از مزارع و توده بذر تولیدی زارعین (۱۸/۱۸٪) به دست آمد (شکل ۴-c و ۴-d).

بیش‌ترین فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه در ترکیب تیماری پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪ و بذر تولیدی زارعین (۲/۳۲ U/mg protein) و در اندام‌های هوایی در رقم لانکوردا در تیمار ۲۴-پی‌براسینولید (۱۴ U/mg protein) بود. کم‌ترین فعالیت آنزیم POD ریشه در تیمار ۲۴-پی‌براسینولید و بذر جمع‌آوری شده از مزارع (U/mg protein ۰/۴۱) و در اندام‌های هوایی در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪ و تمام نمونه‌های مورد مطالعه (U/mg protein ۲) به دست آمد (شکل ۴-c و ۴-d).

اعمال ۲۴-پی‌براسینولید در گیاهان تحت تیمار خشکی در هر سه نمونه چاودار، فعالیت آنزیم POD ریشه را در مقایسه با گیاهان تحت تیمار تنش خشکی کاهش داد (۱۲/۶۸ تا ۳۸/۶۶٪). بالاترین کاهش فعالیت این آنزیم در ریشه بین سه نمونه مورد مطالعه در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۶٪ + ۲۴-پی‌براسینولید و بذر تولیدی زارعین مشاهده شد. فعالیت آنزیم POD اندام‌های هوایی در اثر کاربرد ۲۴-پی‌براسینولید در گیاهان تحت تیمار خشکی در هر سه نمونه

## فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX): فعالیت آنزیم

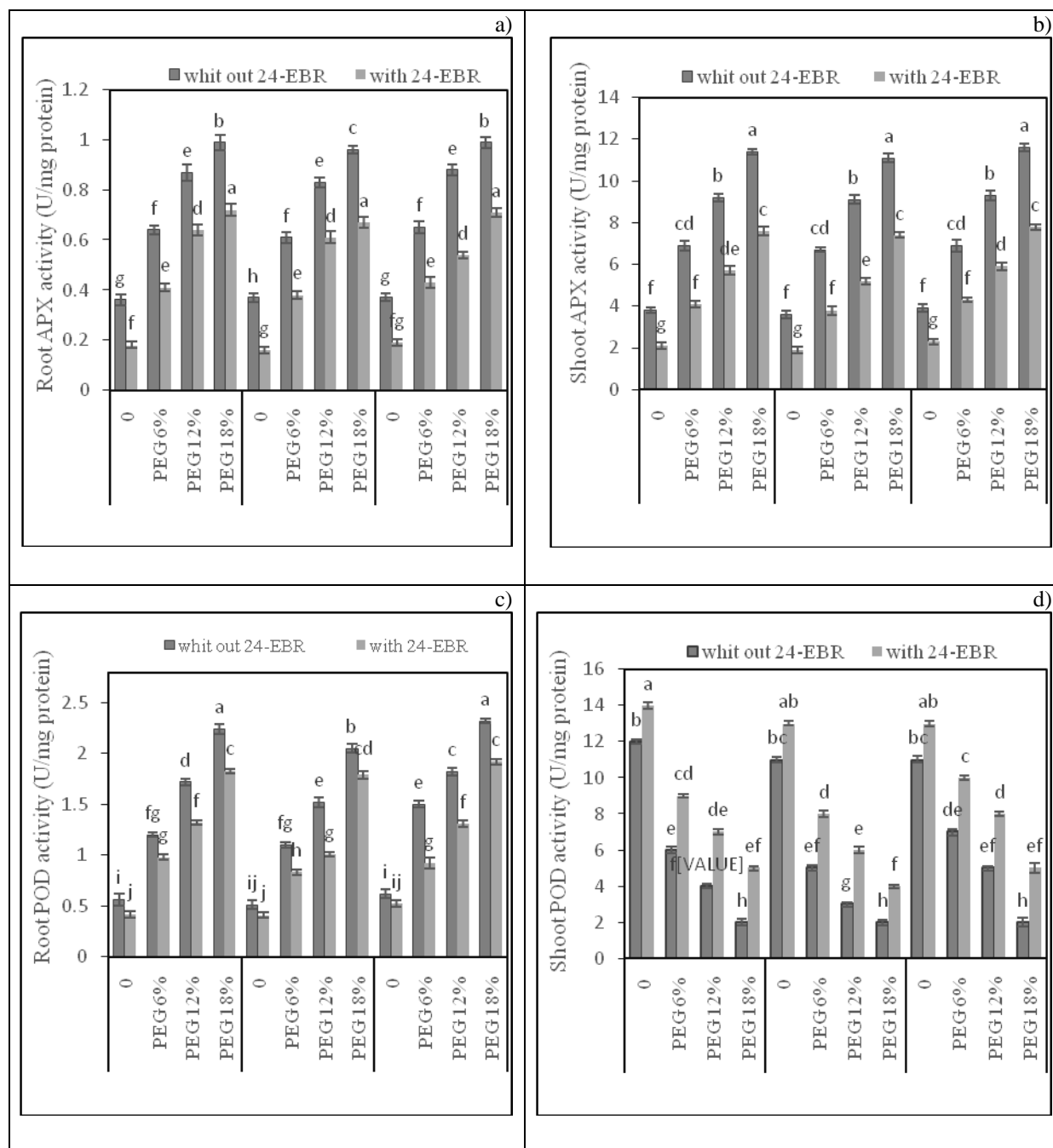
APX ریشه و اندام‌های هوایی در هر سه نمونه بذر با افزایش پلی‌اتیلن گلیکول افزایش یافت و بیش‌ترین افزایش APX ریشه بین سه نمونه در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪ و رقم لانکوردا (۱۷۵٪) و در اندام‌های هوایی در نمونه بذر جمع‌آوری شده (۲۰۸٪) در مقایسه با شاهد مشاهده شد. استفاده از ۲۴-پی‌براسینولید در هر سه رقم منجر به کاهش فعالیت APX در مقایسه با شاهد (بدون تنش خشکی و بدون تیمار با ۲۴-پی‌براسینولید) در هر سه نمونه شد و بیش‌ترین کاهش در ریشه (۵۰/۷۵٪) و اندام‌های هوایی (۴۷/۲۲٪) در توده بذر جمع‌آوری شده از مزارع در مقایسه با شاهد به دست آمد (شکل ۴-b و ۴-a).

بیش‌ترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ریشه در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪، رقم لانکوردا و بذر تولیدی زارعین (۰/۹۹ U/mg protein) و در اندام‌های هوایی در بذر تولیدی زارعین در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪ (۱۱/۶۰ U/mg protein) کم‌ترین فعالیت آنزیم APX در ریشه (۰/۱۶ U/mg protein) و اندام‌های هوایی (۱/۹ U/mg protein) در ترکیب تیماری ۲۴-پی‌براسینولید و نمونه بذر جمع‌آوری شده از مزارع به دست آمد (شکل ۴-b و ۴-a).

کاربرد ۲۴-پی‌براسینولید به گیاهان تحت تیمار خشکی در هر سه نمونه چاودار فعالیت آنزیم APX ریشه را در مقایسه با گیاهان تحت تیمار خشکی کاهش داد (۲۶/۵۰ تا ۳۷/۷۰٪). بیش‌ترین کاهش فعالیت این آنزیم در ریشه بین سه نمونه مورد مطالعه در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۶٪ + ۲۴-پی‌براسینولید و نمونه بذر جمع‌آوری از مزارع مشاهده شد. کاهش فعالیت آنزیم APX اندام‌های هوایی در اثر مصرف ۲۴-پی‌براسینولید در گیاهان تحت تیمار خشکی در هر سه نمونه مورد مطالعه به میزان ۳۲/۷۵ تا ۴۳/۲۸٪ مشاهده شد که بیش‌ترین کاهش در اندام‌های هوایی بذور

لانکورد و بذر تولیدی زارعین به دست آمد (شکل ۴-d و ۴-c).

بذر مورد مطالعه به میزان ۴۲/۸۵ تا ۱۵۰٪ افزایش یافت. بیش‌ترین افزایش فعالیت این آنزیم در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪ + ۲۴-اپی‌براسینولید اندام‌های هوایی رقم



شکل ۴- فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) ریشه (a) و اندام هوایی (b) و فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) ریشه (c) و اندام هوایی (d) در دانه‌رست‌های ۱۰ روزه سه نمونه گیاه چاودار (رقم لانکورد، جمعیت بذر جمع‌آوری شده از مزارع و جمعیت بذر تولیدی زارعین) تحت تنش خشکی القاء شده با پلی‌اتیلن گلیکول (۰، ۶، ۱۲ و ۱۸٪) و اعمال ۲۴-اپی‌براسینولید. اعداد میانگین  $\pm$  SE بوده و حروف مختلف بر روی ستون‌ها از لحاظ آماری نشانه تفاوت معنی‌دار بین تیمارها طبق آزمون دانکن می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

گلیکول ۶٪ + ۲۴-اپی‌براسینولید اندام‌های هوایی نمونه جمع‌آوری شده از مزارع به دست آمد (شکل ۵-b و ۵-a).

**فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT):** بیش‌ترین فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۲٪ و توده بذر تولیدی زارعین (۵/۴۷ U/mg protein) و در اندام‌های هوایی در گیاهان شاهد توده جمع‌آوری شده از مزارع (۱۵/۰۱ U/mg protein) کم‌ترین فعالیت آنزیم CAT ریشه در گیاهان شاهد توده جمع‌آوری شده از مزارع و در اندام‌های هوایی در گیاهان شاهد توده بذر تولیدی زارعین (۳/۹۵ U/mg protein) به دست آمد (شکل ۵-d و ۵-c).

فعالیت آنزیم CAT در هر سه نمونه با افزایش پلی‌اتیلن گلیکول در ریشه و در اندام‌های هوایی افزایش یافت که بیش‌ترین افزایش فعالیت ریشه و اندام‌های هوایی در بین سه رقم در توده جمع‌آوری شده از مزارع (به‌ترتیب ۲/۵۱ و ۲/۳۱ برابر) در مقایسه با شاهد مشاهده شد. اعمال ۲۴-اپی‌براسینولید در هر سه رقم منجر به افزایش فعالیت آنزیم CAT ریشه و اندام‌های هوایی در مقایسه با شاهد شد و بیش‌ترین افزایش در ریشه و اندام‌های هوایی در بین سه رقم مورد مطالعه در توده بذر جمع‌آوری شده از مزارع (به ترتیب ۵۳/۶۵٪ و ۴۱/۶۰٪) به دست آمد (شکل ۵-d و ۵-c).

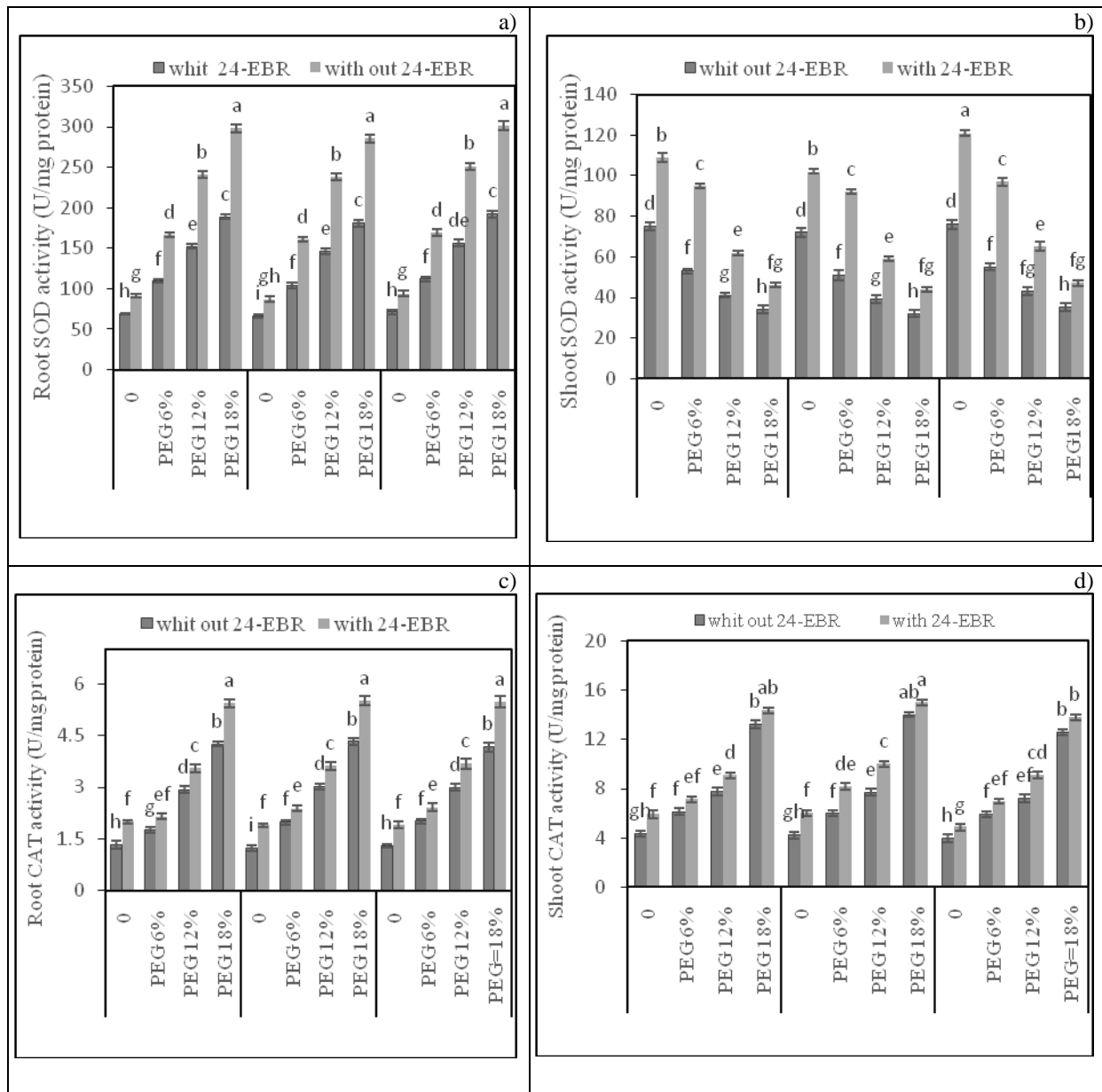
استفاده از ۲۴-اپی‌براسینولید در گیاهان تحت تیمار خشکی در هر سه رقم چاودار، فعالیت آنزیم CAT ریشه در مقایسه با گیاهان تحت تیمار خشکی را به میزان ۱۹/۹۰ تا ۳۱٪/۴۹ افزایش داد و بالاترین فعالیت این آنزیم در ریشه بین سه رقم مورد مطالعه در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۲٪ + ۲۴-اپی‌براسینولید مشاهده شد. فعالیت آنزیم CAT اندام‌های هوایی در اثر اعمال ۲۴-اپی‌براسینولید در گیاهان تحت تیمار خشکی هر سه نمونه مورد مطالعه به میزان ۷/۱۳ تا ۳۶/۷۸٪ افزایش یافت و حداکثر فعالیت این آنزیم در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۶٪ + ۲۴-اپی‌براسینولید و در

**فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD):** فعالیت آنزیم SOD در هر سه نمونه با افزایش پلی‌اتیلن گلیکول در ریشه افزایش و در اندام‌های هوایی کاهش یافت و بیش‌ترین افزایش ریشه در بین سه نمونه در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪ و توده جمع‌آوری شده از مزارع (۱/۱۷۴٪) و بیش‌ترین کاهش در اندام‌های هوایی نمونه جمع‌آوری شده از مزارع (۵۵/۵۵٪) در مقایسه با گیاهان شاهد مشاهده شد. اعمال ۲۴-اپی‌براسینولید در هر سه نمونه منجر به افزایش فعالیت SOD ریشه و اندام‌های هوایی در مقایسه با شاهد شد. در این راستا بیش‌ترین افزایش در ریشه نمونه لانکورده (۳۱٪/۸۹) و در اندام هوایی توده بذر تولیدی زارعین (۵۱٪/۲۱) به دست آمد (شکل ۵-b و ۵-a).

بیش‌ترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در ریشه در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪ + ۲۴-اپی‌براسینولید و بذر تولیدی زارعین (۳۰۱ U/mg protein) و در اندام‌های هوایی در گیاهان شاهد و بذر تولیدی زارعین (U/mg protein) به دست آمد. کم‌ترین فعالیت آنزیم SOD ریشه در گیاهان شاهد توده جمع‌آوری شده از مزارع (۶۶ U/mg protein) و در اندام‌های هوایی در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۸٪ و نمونه جمع‌آوری شده از مزارع (U/mg protein) به دست آمد (شکل ۵-b و ۵-a).

مصرف ۲۴-اپی‌براسینولید در گیاهان تحت تیمار خشکی در هر سه نمونه چاودار، فعالیت آنزیم SOD ریشه را در مقایسه با گیاهان تحت تیمار خشکی افزایش داد (۵۰/۸۹ تا ۶۳٪/۰۱). بیش‌ترین افزایش فعالیت این آنزیم در ریشه بین سه نمونه مورد مطالعه در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۱۲٪ + ۲۴-اپی‌براسینولید و توده جمع‌آوری شده از مزارع مشاهده شد. فعالیت آنزیم SOD اندام‌های هوایی در اثر اعمال ۲۴-اپی‌براسینولید در گیاهان تحت تیمار خشکی هر سه نمونه مورد مطالعه به میزان ۳۴/۲۸ تا ۸۰/۳۹٪ افزایش یافت که بیش‌ترین افزایش فعالیت این آنزیم در تیمار پلی‌اتیلن

اندام هوایی جمعیت جمع‌آوری شده از مزارع به دست آمد (شکل ۵-d و ۵-c).



شکل ۵- فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) ریشه (a) و اندام هوایی (b) و فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) ریشه (c) و اندام هوایی (d) در دانه‌رست‌های ۱۰ روزه سه نمونه گیاه چاودار (رقم لانکورد، توده جمع‌آوری شده از مزارع و جمعیت بذر تولیدی زارعین) تحت تنش خشکی القاء شده با پلی‌اتیلن گلیکول (۰، ۶، ۱۲ و ۱۸٪) و اعمال ۲۴-اِپی‌براسینولید. اعداد میانگین ۳ تکرار  $\pm$  SE بوده و حروف مختلف بر روی ستون‌ها از لحاظ آماری نشانه تفاوت معنی‌دار بین تیمارها طبق آزمون دانکن می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

بر عملکرد فیزیولوژیک بذر چاودار تحت تنش خشکی بررسی شد، نشان داد که محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل a، b و کارنتنوئید کل در هر سه نمونه بذر

## بحث

نتایج این مطالعه که در آن تأثیر هورمون ۲۴-اِپی‌براسینولید

اکسیداتیو افزایش می‌یابد. تنش خشکی می‌تواند باعث انباشت گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهان شود (۲۴) که به نوبه خود به ماکرومولکول‌هایی مانند لیپیدها، کربوهیدرات‌ها، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها آسیب می‌رساند (۴۱). پراکسیداسیون لیپیدها و افزایش غلظت مالون دی‌آلدئید در گیاهانی نظیر جو (۲۲)، هیبریدهای ذرت (۱۴) و واریته‌های گندم (۲۴) گزارش شده است. مطالعات انجام شده توسط Khan و همکاران (۲۱) نشان داده است که تنش خشکی باعث القاء تنش اکسیداتیو در دو واریته گندم می‌گردد و نفوذپذیری غشاء و نشت الکترولیت‌ها را افزایش می‌دهد، در حالی که استفاده از ۲۴-اپی‌براسینولید منجر به کاهش قابل توجهی در میزان این فاکتورها در هر دو واریته گندم تحت تنش خشکی می‌شود. این نتیجه نشان دهنده القاء مکانیسم محافظتی توسط ۲۴-اپی‌براسینولید می‌باشد که با از بین بردن ROS اضافی و بهبود ظرفیت آنتی-اکسیدانی و یا پتانسیل بیوستز آنتی‌اکسیدان‌ها باعث کاهش خسارات ناشی از تنش خشکی می‌شود. گیاهان دارای یک سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی کارآمد متشکل از آنتی-اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی هستند که برای از بین بردن ROS استفاده می‌شوند (۳). تیمار ۲۴-اپی‌براسینولید با کاهش نفوذپذیری و پراکسیداسیون لیپیدهای غشا به حفظ یکپارچگی، ثبات و فعالیت غشاهای سلولی گیاه کمک می‌کند و از این طریق مقاومت گیاه در مقابل تنش را افزایش می‌دهد. نتایج مشابه در مورد اثر ۲۴-اپی‌براسینولید در کاهش میزان MDA در شرایط تنش خشکی در گیاه ذرت (۴۰) نیز گزارش شده است که با نتایج این تحقیق هم‌خوانی دارد.

نتایج این مطالعه نشان داد که تنش خشکی موجب انباشت اسمولیت‌هایی مانند پرولین آزاد، قندها و پروتئین‌ها در گیاه چاودار می‌گردد و از طرف دیگر کاربرد ۲۴-اپی‌براسینولید تولید اسمولیت‌ها را به طور معنی‌داری در گیاهان هر سه نمونه مورد مطالعه چاودار تحت تیمار خشکی بهبود داد. محمدی خلیفه‌لوئی و همکاران اظهار داشتند که محلول-

مورد مطالعه گیاه چاودار تحت تنش خشکی در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌داری یافتند. این کاهش میزان کلروفیل تحت تنش خشکی در گیاه آنیسون نیز توسط حیدری و همکاران گزارش شده است (۱). این موضوع که تنش خشکی با انباشت گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تنش اکسیداتیو در گیاهان را القاء می‌کند، کاملاً به اثبات رسیده است. رنگیزه‌های کلروفیل نقشی اساسی در فتوسنتز دارند و آسیب به کلروفیل ممکن است متابولیسم کل گیاه را به خطر بیندازد (۴۱). کاهش کلروفیل هنگامی اتفاق می‌افتد که ساختار و عملکرد غشاهای تیلاکوئیدی به دلیل پراکسیداسیون ناشی از تنش اکسیداتیو مختل می‌شود (۱۸). تخریب بیش‌تر کلروفیل در گیاهان تحت آسیب اکسیداتیو ناشی از انباشت ROS انتظار می‌رود، زیرا ROSها از نظر ماهیت بسیار واکنش‌پذیر هستند و باعث آسیب قابل توجه به رنگیزه‌ها و سایر مولکول‌های زیستی مهم می‌شوند (۱۷ و ۳۰). با این حال، نقش اصلی کارتنوئیدها محافظت از سلول‌های گیاهی است، زیرا به عنوان یک مولکول آنتی-اکسیدانت در جلوگیری از آسیب‌های ناشی از تنش‌های اکسیداتیو حاصل از ROS عمل می‌کنند. هم‌چنین نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از ۲۴-اپی‌براسینولید در گیاه چاودار تحت تنش خشکی منجر به افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی در مقایسه با گیاهان تحت تیمار خشکی و شاهد گردید. نتایج مشابه قبلاً در گیاهان جو (۱۷) و گندم (۲۱) تحت تیمار خشکی و ۲۴-اپی‌براسینولید نشان داده شده است. در این پژوهش افزایش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهان تحت تیمار ۲۴-اپی‌براسینولید به دلیل کاهش شدت تنش اکسیداتیو می‌باشد که با کاهش محتوای MDA،  $H_2O_2$  و نشت الکترولیت‌ها نمود پیدا کرده است.

مالون دی‌آلدئید محصول جانبی پراکسیداسیون لیپیدها است و به عنوان یک شاخص مهم جهت برآورد شدت آسیب اکسیداتیو در نظر گرفته می‌شود (۶). این ترکیب شاخص فیزیولوژیکی ارزشمندی برای تعیین ثبات و نفوذ-پذیری غشاء سلولی است که مقدار آن در اثر آسیب

SOD و POD کاهش نشان داد. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز اولین خط دفاعی گیاه در برابر تنش اکسیداتیو هستند، در نتیجه در هنگام تنش اکسیداتیو فعالیت این آنزیم‌ها افزایش پیدا می‌کند (۲۱). گزارش شده است که همبستگی مثبتی بین تنش اکسیداتیو و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی وجود دارد. افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در اثر تنش خشکی در هیبریدهای ذرت (۱۴) و گندم (۲۱) گزارش شده است. SOD در گیاهان تحت تنش، نقش حیاتی به عنوان مکانیسم دفاعی در برابر خطر تشکیل رادیکال هیدروکسیل ( $\text{OH}^\cdot$ ) از طریق تبدیل رادیکال سوپراکسید ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) به  $\text{H}_2\text{O}_2$  در سیتوزول، کلروپلاست و میتوکندری بازی می‌کند (۴۳).  $\text{H}_2\text{O}_2$  نیز سمی است و باید با تبدیل شدن به آب در واکنش‌های بعدی از بین برود (۴۵). در گیاهان، تعدادی از آنزیم‌ها سطح  $\text{H}_2\text{O}_2$  داخل سلولی را تنظیم می‌کنند، اما آنزیم‌های CAT، APX و POD مهم‌ترین آنزیم‌ها در این زمینه محسوب می‌شوند (۲۷). در این بین، آنزیم CAT سرعت تبدیل بالایی دارد و می‌تواند  $\text{H}_2\text{O}_2$  را به آب و اکسیژن کاتالیز کند. به همین ترتیب APX و POD نیز از آنزیم‌های مهم آنتی‌اکسیدانی هستند که هر دو باعث تجزیه  $\text{H}_2\text{O}_2$  می‌شوند. طبق نتایج حاصل به نظر می‌رسد در ریشه گیاه چاودار که اولین محل درک تنش خشکی است آنزیم‌های POD و CAT و در اندام هوایی دو آنزیم APX و CAT نقش مهمی در تجزیه  $\text{H}_2\text{O}_2$  دارند. کاتالاز عمدتاً در پراکسی‌زوم‌ها و میتوکندری وجود دارد که اغلب پس از قرار گرفتن در معرض خشکی و کم‌آبی فعالیت آن افزایش می‌یابد (۳۸). پراکسیدازها نیز به طور عمده در کلروپلاست، سیتوزول و دیگر اندامک‌های داخل سلول تولید می‌شوند و برای حفظ حالت احیا در سلول‌ها مورد نیاز هستند.

نتایج نشان داد که استفاده از ۲۴-پی‌براسینولید تحمل گیاه چاودار را در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از خشکی افزایش داد. تیمار هر سه نمونه مورد مطالعه چاودار با ۲۴-

پاشی با ترکیب ۲۴-پی‌براسینولید سبب افزایش میزان پرولین گیاه مرزه تابستانه نسبت به شاهد گردید (۲). پرولین آزاد به عنوان یک نشانگر تنش و یک اسمولیت محافظت‌کننده در گیاهانی که تحت تنش‌های غیرزیستی هستند شناخته شده است (۲۹). نقش پرولین آزاد و قندها در کاهش خسارات ناشی از تنش خشکی و کم‌آبی با سم-زدایی از ROS از طریق خاموش کردن اکسیژن یکتایی ( $\text{O}_2^1$ ) و یا واکنش با رادیکال هیدروکسیل حیاتی است و منجر به افزایش مقاومت گیاهان در مقابل تنش می‌شود (۱۵). پرولین آزاد و اسمولیت‌های مختلف به عنوان عوامل محافظتی در تعادل آب، مواد مغذی و تثبیت ساختار غشاها نیز عمل می‌کنند (۲۰). هم‌چنین محافظت‌کننده‌های اسمزی در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک مانند تعادل اسمزی، انبساط برگ، فتوسنتز و بسیاری از واکنش‌های بیوشیمیایی دیگر نقش حیاتی دارند (۳۱). مشابه نتایج حاصل از این مطالعه، افزایش سطوح پرولین آزاد، قندهای محلول و پروتئین‌ها در گیاهان فلفل و فستوکا پس از استفاده از ۲۴-پی‌براسینولید نیز گزارش شده است (۱۳ و ۲۳).

در مطالعه حاضر، محتوای پروتئین‌های محلول کل در گیاه چاودار تحت تنش خشکی افزایش یافت. کاربرد ۲۴-پی-براسینولید نیز باعث افزایش بیش‌تر محتوای پروتئین‌های محلول کل در گیاهان چاودار شد. افزایش محتوای پروتئین‌ها ممکن است در اثر تغییرات نسبی در غلظت پروتئین‌های آنزیمی دخیل در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاهان تحت تنش خشکی باشد. مطالعات دیگر نیز افزایش پروتئین‌ها در گیاه گندم، کتان و جو تحت تنش خشکی را نشان داده‌اند (۱۲، ۲۰ و ۲۱).

طبق نتایج حاصل از این مطالعه فعالیت هر چهار آنزیم بررسی شده در ریشه هر سه نمونه چاودار مورد مطالعه افزایش نشان داد، در صورتی‌که در اندام‌های هوایی هر سه نمونه مورد مطالعه چاودار فعالیت آنزیم‌های APX و CAT در گیاهان تحت تیمار خشکی افزایش و فعالیت آنزیم‌های

افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و کاهش میزان مالون دی آلدئید در گیاهان می‌گردد (۱۴ و ۴۱) که با نتایج این مطالعه هم‌خوانی دارد.

### نتیجه‌گیری

تنش خشکی در نمونه بذرهای مورد مطالعه چاودار از طریق تغییرات فیزیولوژیکی منجر به کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی، افزایش محتوای MDA،  $H_2O_2$ ، نشت الکترولیت‌ها، پرولین آزاد، قندها و پروتئین‌های محلول شد. تیمار با ۲۴-اپی‌براسینولید باعث بهبود وضعیت پارامترهای مذکور گردید و سبب کاهش غلظت  $H_2O_2$  و نشت الکترولیت‌ها و آسیب‌های غشایی (به صورت کاهش غلظت MDA)، گردید. نتایج مثبت استفاده از ۲۴-اپی-براسینولید در سه نمونه گیاه چاودار تحت تنش خشکی القاء شده با پلی‌اتیلن گلیکول به علت تغییرات ایجاد شده در سیستم‌های محافظت‌کننده سلولی از جمله سیستم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بود. به نظر می‌رسد که در نمونه‌های مورد مطالعه چاودار در این مطالعه، همکاری بین آنزیم‌های سیستم محافظتی آنتی‌اکسیدان‌ها در گیاه چاودار اثرات سمی و مخرب گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده تحت شرایط تنش خشکی را کاهش داده است و منجر به بهبود شرایط رشد برای گیاهان گردیده است.

اپی‌براسینولید به‌طور قابل توجهی در اندام هوایی فعالیت آنزیم‌های SOD، POD و CAT و در ریشه‌ها فعالیت SOD و CAT را در مقایسه با گیاهان تحت تیمار خشکی و شاهد افزایش داد. افزایش فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی با مصرف ۲۴-اپی‌براسینولید در هیبریدهای ذرت تحت تیمار کم‌آبی نیز نشان داده شده است و ممکن است مربوط به اثر ۲۴-اپی‌براسینولید بر رونویسی و بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی باشد که می‌تواند با کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از خشکی، تجمع  $H_2O_2$  را تا حد زیادی کاهش دهند (۱۴).

میزان غلظت‌های ROS توسط سیستم دفاعی گیاه از جمله آنزیم‌های SOD، CAT و POD کنترل می‌شود. POD می‌تواند سطح ROS را به‌طور قابل توجهی از طریق مهار و مصرف  $H_2O_2$  تغییر دهد. علاوه بر این، آنزیم‌های CAT و SOD نیز می‌توانند تولید رادیکال OH را مهار و یا به حداقل برسانند (۲۵). از طرف دیگر به نظر می‌رسد کاربرد ۲۴-اپی‌براسینولید توانسته است تأثیر مثبتی بر فرآیندهای فیزیولوژیکی القاء نماید و از طریق کاهش تولید  $H_2O_2$  و نشت الکترولیت‌ها تنش اکسیداتیو القاء شده توسط خشکی را کاهش دهد و همچنین با افزایش مقادیر اسمولیت‌ها و افزایش فعالیت و یا بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی موجب جاروب رادیکال‌های آزاد گردد. طی مطالعات متعدد محققان نشان داده‌اند که کاربرد ۲۴-اپی‌براسینولید منجر به

### منابع

- ۱- حیدری، نرگس. پوریوسف، مجید. توکلی، افشین (۱۳۹۳). تأثیر تنش خشکی بر فتوسنتز، پارامترهای وابسته به آن و محتوای نسبی آب گیاه آنیسون (*Pimpinella anisum* L.). مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران). ۲۷(۵): ۸۳۹-۸۲۹
- ۲- محمدی خلیفه‌لوئی، زهرا. عباسی‌فر، احمدرضا. خدیوی، علی. اکرمیان، مرتضی (۱۳۹۸). تأثیر پرولین و ۲۴-اپی‌براسینولید بر شاخص‌های رشد و صفات بیوشیمیایی مرزه تابستانه (*Satureja hortensis* L.). مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران). ۳۲(۴): ۹۴۰-۹۲۵.
- 3- Adrees M. Khan ZS. Ali S. Hafeez M. Khalid S. Rehman MZ. Hussain A. Hussain K. Chatha SAS. Rizwan M (2020). Simultaneous mitigation of cadmium and drought stress in wheat by soil application of iron nanoparticles. *Chemosphere*. 238: 124681.
- 4- Ahmad P. Abass Ahanger M. Nasser Alyemini M. Wijaya L. Alam P. Ashraf M (2018). Mitigation of sodium chloride toxicity in *Solanum lycopersicum* L. by supplementation of jasmonic acid and nitric oxide. *J. Plant Interact*. 13: 64-72.

- 5- Aghaee P. Rahmani F (2019). Biochemical and molecular responses of flax to 24-brassinosteroids seed priming under drought stress. *J. Plant Interact.* 14(1): 242-253.
- 6- Ashraf MA. Akbar A. Parveen A. Rasheed A. Hussain I. Iqbal M (2018). Phenological application of selenium differentially improves growth, oxidative defense and ion homeostasis in maize under salinity stress. *Plant Physiol. Biochem.* 123: 268-280.
- 7- Bates LS. Waldern RP. Tear ID (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil.* 39: 207-207.
- 8- Behnamnia M (2015). Protective roles of brassinolide on tomato seedlings under drought stress. *Int. J. Agric. Crop Sci.* 8(3): 455-462.
- 9- Boominathan R. Doran PM (2002). Ni induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertoloni* L. *New Phytol.* 156: 202-205.
- 10- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- 11- Chance B. Maehly AC (1955). Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol.* 2: 764-775.
- 12- Chen E. Zhang X. Yang Z. Zhang C. Wang X. Ge X. Li F (2019). BR deficiency causes increased sensitivity to drought and yield penalty in cotton. *BMC Plant Biol.* 19(220): 1-17.
- 13- Chen Z. Wang Z. Yang Y. Li M. Xu B (2018). Abscisic acid and brassinolide combined application synergistically enhances drought tolerance and photosynthesis of tall fescue under water stress. *Sci. Hortic.* 228: 1-9.
- 14- Desoky EM. Mansour E. Ali MMA. Yasin MA. Abdul-Hamid MI. Rady MM. Ali EF (2021). Exogenously used 24-epibrassinolide promotes drought tolerance in maize hybrids by improving plant and water productivity in an arid environment. *Plants.* 10: 354.
- 15- Fariduddin Q. Khalil RR. Mir BA. Yusuf M. Ahmad A (2013). 24-Epibrassinolide regulates photosynthesis, antioxidant enzyme activities and proline content of *Cucumis sativus* under salt and/or copper stress. *Environ. Monit. Assess.* 185(9): 7845-7856.
- 16- Gruszka D. Janeczko A. Dziurka M. Pocięcha E. Oklestkova J. Szarejko I (2016). Barley brassinosteroid mutants provide an insight into phytohormonal homeostasis in plant reaction to drought stress. *Front. Plant Sci.* 7: 1824-1838.
- 17- Gill MB. Cai K. Zhang G. Zeng F (2017). Brassinolide alleviates the drought-induced adverse effects in barley by modulation of enzymatic antioxidants and ultrastructure. *Plant Growth Regul.* 82(3): 447-455.
- 18- Gill SS. Tuteja N (2011). Cadmium stress tolerance in crop plants. *Plant Signaling Behav.* 6: 215-222.
- 19- Harinasut P. Poonsopa D. Roengmongkol K. Charoensalaporn R (2003). Salinity effects on antioxidant enzymes in mulburg cultivar. *Asian J. Sci. Res.* 29: 109-113.
- 20- Hellal FA. El-Shabrawi HM. Abd El-Hady M. Khatab IA. El-Sayed SAA. Abdelly C (2018). Influence of PEG induced drought stress on molecular and biochemical constituents and seedling growth of Egyptian barley cultivars. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 16: 203-212.
- 21- Khan I. Awan SA. Ikram R. Rizwan M. Akhtar N. Yasmin H. Sayyed RZ. Ali S. Ilyas N (2021). Effect of 24-Epibrassinolide on plant growth, antioxidants defense system and endogenous hormones in two wheat varieties under drought stress. *Physiol Plant.* 172(2): 696-706.
- 22- Kartal G. Temel A. Arican E. Gozukirmizi N (2009). Effects of brassinosteroids on barley root growth, antioxidant system and cell division. *Plant Growth Regul.* 58: 261-267.
- 23- Kaya C. Ashraf M. Alyemeni MN. Ahmad P (2020). The role of nitrate reductase in brassinosteroid induced endogenous nitric oxide generation to improve cadmium stress tolerance of pepper plants by upregulating the ascorbate-glutathione cycle. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 196: 110483.
- 24- Kochert G (1978). Carbohydrate determination by the phenol sulfuric acid method. In: Hellebust JA. Craigie JS (eds), *Handbook of: Physiological and Biochemical Methods.* Cambridge University, Press Cambridge. 95-97.
- 25- Kusvuran S. Kiran S. Ellialtioglu SS (2016). Antioxidant enzyme activities and abiotic stress tolerance relationship in vegetable crops. In *Abiotic and Biotic Stress in Plants-Recent Advances and Future Perspectives*; Chapter 21, Shanker AK. Ed. Intech: London, UK. 481-506.
- 26- Lichtenthaler HK (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic

- biomembranes. *Methods Enzymol.* 148: 350-382.
- 27- Malekzadeh P. Khara J. Farshian S. Jamal-Abad AK. Rahmatzadeh S (2007). Cadmium toxicity in maize seedlings: Change in antioxidant enzyme activities and root growth. *Pak. J. Biol. Sci.* 10: 127-131.
- 28- Meena M. Divyanshu K. Kumar S. Swapnil P. Zehra A. Shukla V. Yadav M. Upadhyay RS (2019). Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. *Heliyon.* 5(12). e02952.
- 29- Mohammadi M. Tavakoli A. Pouryousef M. Fard EM (2020). Study the effect of 24-epibrassinolide application on the Cu/Zn-SOD expression and tolerance to drought stress in common bean. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 26(3): 459-474.
- 30- Nahar K. Hasanuzzaman M. Alam MM. Rahman A. Suzuki T. Fujita M (2016). Polyamine and nitric oxide crosstalk: Antagonistic effects on cadmium toxicity in mung bean plants through upregulating the metal detoxification, antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 126: 245-255.
- 31- Nath M. Bhatt D. Prasad R. Tuteja N (2017). Reactive oxygen species (ROS) metabolism and signaling in plant-mycorrhizal association under biotic and abiotic stress conditions, in: Varma A. Prasad R. Tuteja N (Eds.) *Mycorrhiza-ecophysiology, secondary metabolites, nanomaterials*, Springer International Publishing, Cham. 223-232.
- 32- Osman AS. Rady MM (2014). Ameliorative effects of sulphur and humic acid on the growth, antioxidant levels, and yields of pea (*Pisum sativum* L.) plants grown in reclaimed saline soil. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 87: 626-632.
- 33- Özdemir F. Bor M. Demiral T. Turkan I (2004). Effect of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidant system of rice (*Oryza sativa* L.) under salinity stress. *Plant Growth Regul.* 41: 1-9.
- 34- Rai PK. Lee SS. Zhang M. Tsang YF. Kim KH (2019). Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. *Environ. Int.* 125: 365-385.
- 35- Salehi-Lisar SY. Bakhshayeshan-Agdam H (2016). Drought stress in plants: causes, consequences, and tolerance. In *Drought Stress Tolerance in Plants*, 1: 1-16.
- 36- Sen A (2012). Oxidative stress studies in plant tissue culture. *Antioxid. Enzym.* 3: 59-88.
- 37- Shan Z. Luo X. Wei M. Huang T. Khan A. Zhu Y (2018). Physiological and proteomic analysis on long-term drought resistance of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Sci. Rep.* 8(1): 17982-17994.
- 38- Shim IS. Momose Y. Yamamoto A. Kim DW. Usui K (2003). Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. *Plant Growth Regul.* 39: 285-292.
- 39- Sytar O. Kumari P. Yadav S. Brestic M. Rastogi A (2019). Phytohormone priming: regulator for heavy metal stress in plants. *Plant Growth Regul.* 38(2): 739-752.
- 40- Talaat NB. Shawky BT (2016). Dual application of 24-epibrassinolide and spermine confers drought stress tolerance in maize (*Zea mays* L.) by modulating polyamine and protein metabolism. *Plant Growth Regul.* 35(2): 518-533.
- 41- Talaat NB. Shawky BT. Ibrahim AS (2015). Alleviation of drought induced oxidative stress in maize (*Zea mays* L.) plants by dual application of 24-epibrassinolide and spermine. *Environ. Exp. Bot.* 113: 47-58.
- 42- Upadhyay RAK. Singh DP (2018). Regulation of oxidative stress and mineral nutrient status by selenium in arsenic treated crop plant *Oryza sativa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 148: 105-113.
- 43- Wang Y. Branicky R. Noe A. Hekimi S (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J. Cell Biol.* 217(6): 1915-1928.
- 44- Winterbourn CC. Hawkins RE. Mcgrath BM. Carrell RW (1977). Reactions involving superoxide, normal and unstable hemoglobins. *Biochem. J.* 155: 493-502.
- 45- Yu L. Zhao X. Gao X. Siddique KH (2020). Improving/maintaining water-use efficiency and yield of wheat by deficit irrigation: A global meta-analysis. *Agric. Water Manag.* 228: 105906.

## Study the effect of drought stress induced by polyethylene glycol on antioxidant activity of winter Rye (*Secale cereale L.*) treated with 24-epibrassinosteroids

Hatami S.<sup>1</sup>, Salehilisar S.Y.<sup>1</sup>, Rahmani F.<sup>2</sup>, Porakbar L.<sup>2</sup> and Samadani B.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Plant Sciences. Faculty of Natural Sciences. University of Tabriz. Tabriz. I.R. of Iran

<sup>2</sup> Dept. of Biology. Science Faculty. University of Uremia, Urmia. I.R. of Iran

<sup>3</sup> Agriculture and Natural Resource Research organization of Iran, Plant protection Institute. Tehran. I.R. of Iran

### Abstract

Winter Rye (*Secale cereale L.*), belong to Gramineae (*Poaceae*) family, is native of Syria, Iran and central Asia. Drought stress is one of the most important restricted factors in crop production system in the world. Brassinosteroids effect on some phenomens like photosynthesis, antioxidant activity, osmolites accumulation, nitrogen metabolism in plants on normal and stress full situation and play an important role on plant growth. In this study, effect of 24-Epibrassinolide on antioxidant response of 3 trials of winter Rye plant (Lonkord Variaty (provided from seeds and plant improvement institute), farmer usage seeds and a population of winter Rye gathered as weed from different farms, were investigated in a completely random design experiment with 3 replication under drought stress in 6, 12 and 18% level induced by Polyethylene glycol (PEG 6000). According to the results of this study, antioxidant enzymes activity under drought stress on roots of all 3 winter rye seed samples increased while on shoots of 3 seed sampeles, CAT and APX activity increased with drought intensity rate. POD and SOD activity on roots decreased with drought intensity rate. Results of this study showed that 24-Epibrassinolide treatment could induced positive effects on physiological phenomena via reduce in MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and electrolytes lacking production could reduce oxidative stress induced by Drought. Additionally, increasing of osmolytes contents and antioxidants activity effect on scavenge of free radicals.

**Key words:** 24-Epibrassinolide, Antioxidant Enzymes, Drought Stress, Rye.