اثر براسینواستروئید بر عملکرد دانه، برخی از صفات فیزیولوژیکی و بیان ژن‌های مرتبط با مسیر سیگنالینگ این هورمون در گندم تحت تنش خشکی

مهرنوش رافعی[1]، محمدرضا عامریان[2,*]، بهزاد سرخی الله لو[3]، پرویز حیدری[4] و حمیدرضا اصغری[2]

١- دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود
٢- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود
٣- استادیار، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج
٤- استادیار، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود

(تاریخ دریافت: ١٣٩٨/٠٦/٢٣ – تاریخ پذیرش: ١٣٩٨/١٠/٠٣)

چکیده

به‌منظور بررسی اثر محلول‌پاشی غلظت‌های مختلف اپی‌براسینولید بر عملکرد دانه‌ای، کاتالاز، محتوای کلروفیل کل، پایداری غشاء سلولی گندم و بررسی بیان برخی از ژن‌های مسیر سیگنالینگ براسینواستروئیدها (*BES1* و *BRI1*) تحت تنش خشکی انتهای فصل، آزمایشی به‌صورت کرت‌های دو بار خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج در سال زارعی ٩٨ به اجرا درآمد. عامل اصلی در دو سطح (آبیاری کامل و قطع آبیاری از مرحله ٥٠ درصد گلدهی تا پایان فصل زراعی)، عامل فرعی در چهار سطح (محلول‌پاشی اپی‌براسینولید در ٠، ٠/٢٥، ٠/٦٢٥ و ١ میلی‌گرم در لیتر) و عامل فرعی فرعی شامل هفت ژنوتیپ گندم (مهرگان، پارسی و ژنوتیپ‌های ناشناخته با کدهای ٢٨٥٣، ٣٥٠٦، ٣٧٣٧، ٤٠٥٦ و ٤٢٢٨) بود. نمونه‌برداری سی روز پس از اعمال تنش خشکی از برگ پرچم (مرحله زادوکس ٨٩) صورت گرفت. نتایج نشان داد که تنش خشکی موجب کاهش پایداری غشاء سلولی، محتوای کلروفیل کل، عملکرد و همچنین افزایش کاتالاز در همه ژنوتیپ‌ها می‌شود. ژنوتیپ ٤٢٢٨ بر اساس میزان عملکرد دانه، پایداری غشاء سلولی، محتوای کلروفیل و کاتالاز تحت تنش خشکی، متحمل‌ترین ژنوتیپ گندم در بین ارقام مورد مطالعه بود. همچنین، نتایج نشان داد که کاربرد اپی‌براسینولید از طریق افزایش صفات مذکور موجب کاهش اثرات مخرب تنش خشکی در گندم شده که نتیجه آن افزایش عملکرد دانه‌ای بیشتر تحت تنش خشکی است. با افزایش غلظت اپی‌براسینولید، میزان عملکرد دانه نیز افزایش یافت. بررسی الگوی بیان ژن *TaBES1* و *TaBRI1* با استفاده از روش Real-time PCR نشان داد که اگرچه کاربرد هورمون براسینواستروئید موجب افزایش تحمل به تنش خشکی در گندم می‌شود اما مسیر سیگنالینگ آن متفاوت از مسیر سیگنالینگ شناخته شده *BRI1* است.

واژگان کلیدی: براسینواستروئید، بیان ژن، تنش خشکی، گندم، Real-time PCR

[*] نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **amerianuk@yahoo.co.uk**

مقدمه

گندم (*Triticum aestivum* L.)، جزء سه غله اصلی به شمار می‌آید که شامل اسیدهای آمینه‌های ضروری، مواد معدنی، ویتامین‌ها و ترکیبات فیبری است که برای تغذیه انسان مورد مصرف قرار می‌گیرد (Shewry, 2009). یک‌سوم جمعیت جهان، بیش از نیمی از کالری خود را از گندم تأمین می‌کنند (Dhanda *et al*., 2004). برای تأمین مواد غذایی جمعیت جهان در سال ۲۰۵۰، محصول گندم می‌بایست سالیانه ۲ درصد در واحد سطح افزایش یابد. درحالی‌که سالانه، ۲۵ درصد از محصول توسط عوامل محیطی شامل تنش‌های خشکی، شوری و سرما از دست می‌رود (Gill *et al*., 2004). تنش خشکی، مشکل اصلی محصول گندم در بسیاری از نقاط جهان و همچنین ایران است (Dhaubhadel *et al*., 1999; Mesgaran *et al*., 2016; Molaei *et al*., 2017). تنش خشکی ممکن است در هر زمان از فصل رشد (اوایل و یا اواخر فصل) رخ دهد، اما حادث شدن آن پس از گرده‌افشانی با کاهش عملکرد بیشتری همراه است (Blum, 2005). در بسیاری از مزارع کشور، کشت گندم با مشکل تنش خشکی به‌خصوص در مرحله پس از گرده‌افشانی مواجه هست و این مشکل حتی در اراضی آبی در اواخر فصل نیز مشاهده می‌شود (Ehdaie, 1995; Nouri-Ganbalani *et al*., 2009). حادث شدن تنش خشکی در مرحله گلدهی و پس از آن، موجب کاهش میانگین وزن دانه گندم می‌شود و همچنین در مرحله سنبله‌دهی تا پر شدن دانه، منجر به کاهش تعداد دانه در سنبله و وزن هزار دانه می‌شود که در نهایت عملکرد را کاهش می‌یابد (Prins *et al*., 2010; Abid *et al*., 2016).

تنظیم‌کننده‌های رشد[1] که شامل هورمون‌های طبیعی و مصنوعی می‌شوند نه‌تنها در تنظیم و کنترل فرآیندهای رشدی و فیزیولوژی دخیل هستند، بلکه در افزایش تحمل به تنش‌های محیطی و بهبود عملکرد نیز ایفای نقش می‌کنند (Prins *et al*., 2010). تنظیم‌کننده‌های رشد شامل فیتوهورمون‌هایی نظیر اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها، جیبرلین‌ها، اسید آبسزیک و همچنین ترکیباتی چون براسینواستروئیدها، سالیسیلیک اسید و جاسمونات‌ها می‌شوند (Taiz and Zeiger, 2004). براسینواستروئیدها[2]، ترکیبات استروئیدی گیاهی هستند که اولین بار از دانه گرده گیاه کلزا (*Brassica napus*) استخراج شد (Grove *et al*., 1979). تاکنون، ۵۹ براسینواستروئید از گیاهان مختلف استخراج و ساختمان و عملکرد آن‌ها شناسایی شده است (Khripach *et al*., 1998). براسینواستروئیدها، بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی (تمایز آوندی، نر باروری، زمان پیری و توسعه برگی) را تنظیم می‌کنند (Hayat and Ahmad, 2010). علاوه بر آن، از گیاهان در برابر تنش‌های محیطی از جمله، افزایش و کاهش دما، خشکی، شوری و حمله پاتوژن‌ها محافظت می‌کنند و در نهایت منجر به افزایش عملکرد گیاهان می‌شوند (Krishna, 2003). بسیاری از مطالعات نشان می‌دهد که گیاهان تیمار شده با هورمون براسینواستروئید، اثر ضد تنشی به‌صورت برون‌زاد دارند و موجب افزایش سازگاری گیاهان در برابر شرایط نامساعد محیطی می‌شود (Hayat and Ahmad, 2010; Khripach *et al*., 1998). به‌طور مثال، نهال‌های تربچه و گوجه‌فرنگی تیمار شده با اپی‌براسینولید نسبت به نهال‌های تیمار نشده، افزایش تحمل به تنش گرما شدید از خود نشان دادند (Dhaubhadel *et al*., 1999). استفاده از اپی‌براسینولید منجر به بهبود رشد نهال‌های اکالیپتوس و بوته‌های گندم تحت تنش شوری شده است (Shahbaz and Ashraf, 2007). در مطالعه‌ای دیگر، نشان داده شده است که تنش خشکی موجب کاهش عملکرد گندم و کاربرد براسینولید تا حدودی این اثر منفی را تعدیل نموده است (Dehghan *et al*., 2017).

کاربرد هورمون براسینواستروئید موجب کاهش اثرات زیان‌بار تنش محیطی از قبیل خشکی، شوری، درجه حرارت پایین و بالا روی گیاهان می‌شود و یکی از

1- Plant growth regulators

2- Brassinosteroids

روش‌های به‌زراعی کارآمد برای مقابله به تنش‌های محیطی از قبیل خشکی محسوب می‌شود (Sedaghat and Emam, 2016). لذا هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر هورمون اپی‌براسینولید بر صفات فیزیولوژی از قبیل پایداری غشاء سلولی، محتوای کلروفیل، کاتالاز، عملکرد دانه‌ای در هفت ژنوتیپ گندم (دو ژنوتیپ شناخته شده و پنج ژنوتیپ ناشناخته) تحت شرایط آبیاری کامل و تنش خشکی آخر فصل بود. همچنین، بررسی تأثیر کاربرد هورمون براسینواستروئید بر تغییرات الگوی بیان ژن‌های مسیر سیگنالینگ این هورمون (*BRI1* و *BES1*) در ژنوتیپ‌های متحمل و حساس گندم تحت شرایط آبیاری کامل و تنش خشکی آخر فصل مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت گیاهی و تیمارها: آزمایش در سال ١٣٩٨ در مزرعه تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج به‌صورت اسپلیت اسپلیت پلات در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار به اجرا درآمد. عامل اصلی شامل تیمار آبی در دو سطح آبیاری معمولی و تنش خشکی در نظر گرفته شد که آبیاری معمولی به‌طور منظم هر سه روز یک‌بار و تنش خشکی در آخر فصل در مرحله گلدهی (مرحله ٦٠ زادوکس) به‌صورت قطع آبیاری اعمال شد. عامل فرعی شامل تیمار هورمون اپی‌براسینولید در چهار غلظت (صفر، ٠/٢٥، ٠/٦٢٥ و یک میلی‌گرم در لیتر) به‌همراه محلول توئین ٢٠ (٠/٠١ درصد) بود که جهت افزایش سورفاکتانت به‌صورت اسپری هورمون بر روی بوته‌های گندم، به‌صورت یک روز در میان با سه تکرار دو هفته قبل از اعمال تنش محلول‌پاشی شد. هفت ژنوتیپ گندم شامل ارقام مهرگان و پارسی و ژنوتیپ‌های ناشناخته با کدهای ٢٨٥٣، ٣٥٠٦، ٣٧٣٧، ٤٠٥٦ و ٤٢٢٨ تهیه شده از بانک ژن و ذخایر توارثی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر به‌عنوان عامل فرعی فرعی مورد مطالعه قرار گرفتند. خاک محل آزمایش دارای بافت رسی – شنی، هدایت الکتریکی ١/٥٣ دسی‌زیمنس بر متر و pH برابر ٧/٥ بود. بر اساس آزمون خاک، کود پتاس، اوره و فسفر به‌ترتیب ٤٥، ١٠٠ و ٢٠ کیلوگرم در هکتار به خاک داده شد. در این آزمایش، فاصله میان کرت‌های اصلی ٥ متر و فاصله کرت‌های فرعی از هم یک متر در نظر گرفته شد. همچنین فاصله کرت‌های فرعی فرعی از هم ٢٠ سانتیمتر بود و هر ژنوتیپ در یک ردیف کشت شد که حدود ٦٠ گیاه را شامل می‌شد. در پایان از ١٥ گیاه برای داده‌برداری در هر کرت استفاده شد و نمونه‌برداری از برگ پرچم ٣٠ روز پس از اعمال تنش خشکی در مرحله زادوکس ٦٩ و برای عملکرد در مرحله زادوکس ٩٤ از همه کرت‌ها صورت گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (Ver 9.1) صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) برای همه صفات به جزء فعالیت آنزیم کاتالاز که با آزمون دانکن انجام شد.

سنجش کلروفیل کل: مقدار ٠/١ گرم از برگ پرچم ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تحت تیمارهای آبی و هورمونی در سه تکرار با ٣ میلی‌لیتر استون ٨٠ درصد (v/v) در هاون چینی کاملاً سائیده شد. نمونه‌ها در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و ١٠٠٠٠ دور در دقیقه به مدت ١٠ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس ٢٥٠ میکرولیتر از مایع رویی را با ٧٥٠ میکرولیتر استون ٨٠ درصد درون کووت ریخته و در مقابل شاهد[1] که یک میلی‌لیتر استون ٨٠ درصد بود، جذب نمونه‌ها در طول‌موج‌های ٦٤٥ و ٦٦٣ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. غلظت کلروفیل کل بر اساس معادله ١ (برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تازه برگ) به‌دست آمد (Arnon, 1949):

معادله (١) کلروفیل کل = ((٢٠/٢(A645) + ٨/٠٢(A663)) × وزن تر × ١٠٠٠ ÷ حجم نهایی نمونه استخراج شده

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز[2]: برای اندازه‌گیری غلظت آنزیم کاتالاز از روش دهیندزا و همکاران (Dhindsa *et al*., 1981) استفاده شد. بر اساس این روش، ٥٠ میکرولیتر از عصاره استخراج با یک میلی‌لیتر محلول اندازه‌گیری کاتالاز که شامل ٥٠ میلی‌مول

1- Blank
2- Catalase

بافر فسفات پتاسیم و ۱۵ میلی‌مول پراکسید هیدروژن است، مخلوط گردید. سپس جذب آن در طول‌موج nm ۲٤۰ به‌مدت یک دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. یک واحد آنزیمی کاتالاز برابر با تجزیه یک میلی‌مول پراکسید هیدروژن در یک دقیقه است.

برآورد شاخص پایداری غشاء[1]: شاخص پایداری غشاء از طریق اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت[2] ارزیابی شد. برای این منظور، سه برگ پرچم به مساحت یک سانتی‌متر از هر ژنوتیپ تحت تیمارهای آبی و هورمونی در سه تکرار داخل فالکون‌های مجزا حاوی آب دو بار تقطیر با حجم ۱۵ میلی‌لیتر منتقل و به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس میزان هدایت الکتریکی[3] آب دو بار تقطیر همراه نمونه به‌عنوان نشت اولیه با دستگاه EC متر (Ino Lab Thermal level 3) بر اساس میکروزیمنس بر سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. نشت ثانویه نیز، پس از ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدن نمونه‌ها در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. شاخص پایداری غشاء از طریق معادله (۲) محاسبه شد (Lutts *et al*., 1996).

$$\text{شاخص پایداری غشاء} = (1 - \frac{\text{نشت اولیه}}{\text{نشت ثانویه}}) \times 100 \quad \text{معادله (۲)}$$

عملکرد دانه‌ای: پس از رسیدگی فیزیولوژیک، گیاهان هر کرت با حذف اثر حاشیه برداشت و عملکرد دانه اندازه‌گیری شد.

طراحی آغازگرهای[4] اختصاصی و بررسی بیان نسبی ژن[5]: ابتدا، آغازگر اختصاصی رو به جلو[6] و برگشتی[7] برای ژن‌های *Actin*، *BRI1* و *BES1*، جهت بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از نسخه هفتم نرم‌افزار Oligo (Rychlik, 2007) طراحی شد (جدول ۱). سپس، به‌منظور بررسی بیان نسبی ژن‌ها، از برگ پرچم ارقام پارسی (به‌عنوان ژنوتیپ حساس به تنش خشکی)، مهرگان و ژنوتیپ ٤۲۲۸ (به‌عنوان ژنوتیپ‌های متحمل به تنش خشکی) در سه تکرار آزمایشی در غلظت‌های صفر و یک میلی‌گرم در لیتر هورمون براسینواستروئید پس از سپری شدن چهار هفته از قطع آبیاری کامل از کرت‌های تحت تنش و آبیاری معمولی انجام گرفت. استخراج RNA کل[8] با استفاده از محلول RNX- Plus (شرکت SINACLON) طبق دستورالعمل انجام شد. کمیت و کیفیتRNA توسط دستگاه نانودراپ (شرکت Thermo مدل ND-1000) و همچنین الکتروفورز ژلی بررسی شد. جهت حذف آلودگی DNA در محلول استخراج RNA کل، از آنزیم DNase (شرکت Geneall) استفاده شد. سپس ساخت cDNA توسط کیت WizScript ™ RT Master (شرکت Wizbios) مطابق با دستورالعمل آن صورت پذیرفت. الگوی بیانی ژن‌های مورد نظر در تحمل به تنش خشکی گندم توسط PCR کمی[9] با استفاده از کیت TM q-PCR Master WizPure (شرکت Wizbios) و دستگاه Real-time PCR (شرکت Bio-rad) مطالعه شد. ژن Actin به‌عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد و میزان بیان ژن با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ با نرم‌افزار REST (Pfaffl, 2009) محاسبه گردید و در نهایت، میزان تغییرات بیان این ژن‌ها تحت تنش خشکی نسبت به شاهد (آبیاری معمولی) ژنوتیپ حساس (رقم پارسی) سنجیده شدند.

نتایج و بحث

فعالیت کاتالاز: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که همه اثرات به‌جز اثر متقابل سه‌جانبه تیمار آبی بر فعالیت کاتالاز معنی‌دار بودند (جدول ۲). با اینکه منبع تغییر اثر متقابل سه‌جانبه برای این صفت معنی‌دار نشد، اما اختلاف زیادی بین کمترین و بیشترین داده برای این اثر وجود داشت و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن برای این اثر اختلاف معنی‌داری را بین میانگین‌ها نشان داد (شکل ۱). علت آن می‌تواند به‌خاطر قرینه بودن میانگین‌های تیمارها در اطراف میانگین کل باشد که این امر موجب کوچک‌تر شدن واریانس این اثر و در نتیجه معنی‌دار نشدن آن گردیده است (Yazdi Samadi *et al*., 2008).

1- Membrane stability index
2- Electrolyte leakage
3- Electrical conductivity
4- Primers
5- Relative gene expression
6- Forward
7- Reverse
8- Total RNA
9- Quantitative polymerase chain reaction

جدول ١- مشخصات آغازگرهای اختصاصی طراحی شده با استفاده از نرم‌افزار Oligo

Table 1. Details of designed primers using Oligo7 software

نام آغازگر Primer name	شماره دستیابی Accession number		توالی (5'-3') Sequence (5'-3')	دمای ذوب (°C) Temperature melting (°C)	درصدGC GC percentage
Actin	XM_020303314	Forward	CACGAAGCGACATACAATTCCATC	61	46
		Reverse	GCTCATGCGATCAGCAATTCCAG	61	52
BRI1	DQ655711	Forward	CTGCATTCCACACATCATCC	57	50
		Reverse	CCATGCCAAAATCTGAGACC	57	50
BES1	JN400739	Forward	ACAACAACGAGGTGCTCAAG	57	50
		Reverse	TGTATCCCTTGCGGTAGGTG	57	55

جدول ٢- تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در ژنوتیپ‌های گندم در شرایط کنترل، تنش خشکی، استعمال خارجی هورمون اپی‌براسینولید تحت شرایط کنترل و تنش خشکی

Table 2. Analysis of variance for traits in wheat genotypes under control, drought stress and applied epi-brassinolide under control and drought stress conditions.

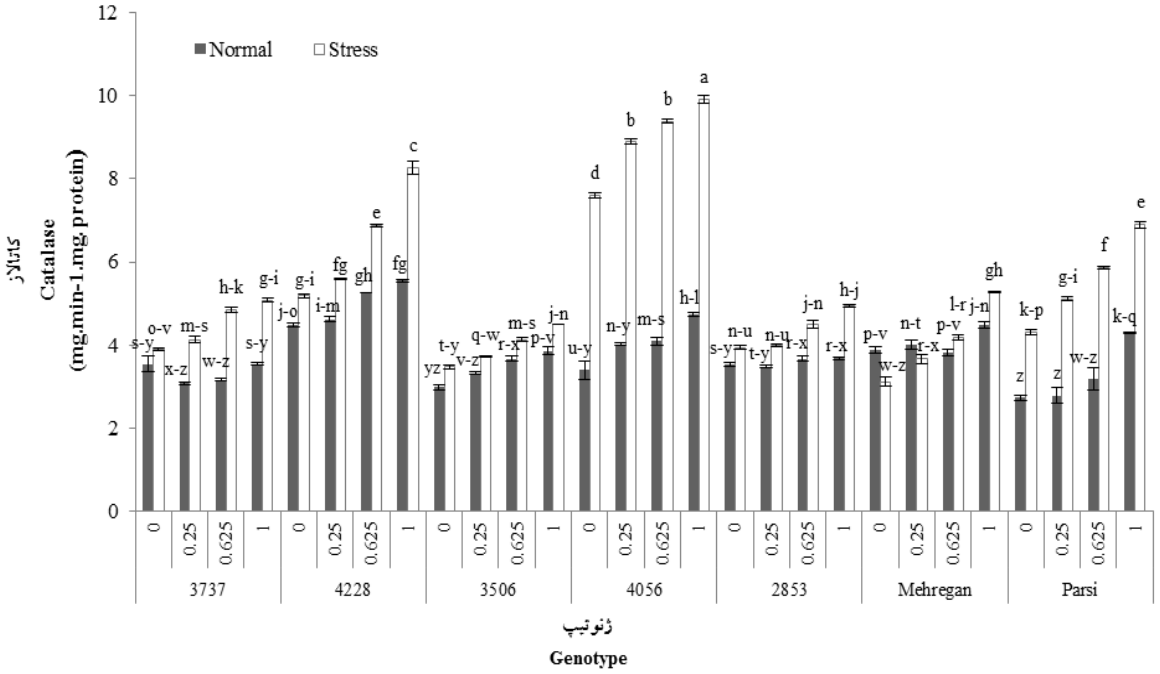
منابع تغییرات S.O.V		میانگین مربعات (MS)				
	درجه آزادی D.F	عملکرد دانه‌ای Grain yield (Kg. m^{-2})	کلروفیل کل Total chlorophyll	پایداری غشاء Membrane stability	کاتالاز Catalase ($mg.min^{-1}.mg.$ protein)
بلوک (Block)	2	0.001^{ns}	0.00000026^{ns}	49.65^{*}	0.17^{**}
تیمار آبی (Water treatment (W))	1	22.59^{**}	0.00066127^{**}	7555.01^{**}	105.14^{**}
اشتباه a (Error a)	2	0.013	0.00000214	2.75	0.0004
هورمون (Hormone (H))	3	0.18^{**}	0.00010719^{**}	2943.97^{**}	14.47^{**}
تیمار آبی × هورمون (H × W)	3	0.045^{*}	0.00000844^{*}	109.63^{**}	2.50^{**}
اشتباه b (Error b)	12	0.01	0.00000210	16.39	0.045
ژنوتیپ (Genotype (G))	6	0.33^{**}	0.00003310^{**}	1709.91^{**}	27.63^{**}
تیمار آبی × ژنوتیپ (W × G)	6	0.14^{**}	0.00005240^{**}	233.45^{**}	15.98^{**}
هورمون × ژنوتیپ (H × G)	18	0.009^{ns}	0.00000719^{**}	157.93^{**}	0.57^{**}
تیمار آبی × هورمون × ژنوتیپ (W × H × G)	18	0.016^{**}	0.00000230^{*}	75.11^{*}	0.15^{ns}
اشتباه c (Error c)	96	0.005	0.00000143	39.20	0.104

^{ns}، * و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

^{ns}, * and **: Non-significant, significant at 5% and 1% probability levels, respectively

† مشکل بزرگ‌تر بودن خطاها نسبت به‌هم ($E_c > E_b > E_a$) برای دو صفت (کاتالاز و پایداری غشا) مشاهده گردید. لذا، برای رفع این مشکل اثرات متقابل تکرار با فاکتور B و تکرار با فاکتور C به‌ترتیب از خطاهای E_b و E_c جدا شدند. برای کاتالاز، این دو منبع تغییر معنی‌دار نشدند بنابراین ادغام (pooling) آن‌ها با خطاهای مربوطه قابل استناد است؛ اما برای صفت پایداری غشاء، اثر تکرار با فاکتور B معنی‌دار شد که به‌صورت جدا در جدول تجزیه واریانس وارد شد.

† The experimental error c (Ec) was larger than Eb and also both of them were larger than Ea (Ec > Eb > Ea) for the two traits (catalase and membrane stability). To solve this problem, the interaction of replication with factor B and replication with factor C were separated from Eb and Ec errors, respectively. For Catalase, these two sources were not significant, so their pooling with relevant errors truly correct; but for the stability of the membrane, the interaction between replication and factor B was significant, so, it was considered separately in the variance analysis table.



شکل ۱- تأثیر اثر متقابل تیمارهای آبی، هورمون و ژنوتیپ بر روی کاتالاز (حروف مشابه مبین اختلاف غیرمعنی‌دار در سطح پنج درصد می‌باشد).

Figure 1. Effect of genotypes, water and hormone treatments' interaction on catalase (simillar letters indicated non-significant differences ($P < 0.05$)).

تنش خشکی در همه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه موجب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز شد و بین ارقام مورد بررسی به‌لحاظ فعالیت کاتالاز تفاوت معنی‌داری وجود داشت. کاربرد هورمون براسینواستروئید موجب افزایش کاتالاز در ژنوتیپ‌های گندم تحت هر دو شرایط آبی شد. ژنوتیپ‌های ٤٠٥٦ و ٤٢٢٨ به‌ترتیب بالاترین میزان کاتالاز تحت تنش خشکی از خود نشان دادند (شکل ۱).

تنش آبی و کاربرد هورمون براسینواستروئید به‌ترتیب موجب کاهش و افزایش میزان کلروفیل کل در ژنوتیپ‌های گندم تحت هر دو شرایط آبی شد. رقم پارسی در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها دارای بیشترین میزان کلروفیل کل تحت آبیاری معمولی بود اما با رخداد تنش خشکی میزان آن به پایین‌ترین سطح رسید. گیاهان تحت تنش برای کاهش خسارت‌های اکسیداتیو ناشی از تولید گونه‌های فعال اکسیژن، میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان خود را افزایش می‌دهند (Hayat and Ahmad, 2010; Chance and Maehly, 1955). مطالعات نشان داده‌اند که کاربرد براسینواستروئیدها موجب تغییر در میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌شوند (Fariduddin *et al*., 2009; Fariduddin *et al*., 2014). تیمار نمودن گیاهان مانند ذرت، خردل و گوجه‌فرنگی با هورمون اپی‌براسینولید منجر به افزایش میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر کاتالاز نسبت به گیاهان تیمار نشده تحت تنش خشکی گردید که موجب افزایش تحمل به تنش گردید (Fariduddin *et al*., 2009; Nie *et al*., 2019; Li *et al*., 2012; Behnamnia *et al*., 2009). این مطالعه نیز نشان می‌دهد که کاربرد اپی‌براسینولید موجب افزایش کاتالاز در هر دو سطح آبیاری شده است و بیشتر تأثیر بر میزان آن‌ها با کاربرد اپی‌براسینولید در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد.

پایداری غشاء سلولی: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل سه‌جانبه (تیمار آبی، هورمون و ژنوتیپ) روی پایداری غشاء سلولی در سطح یک درصد معنی‌دار است (جدول ۳).

جدول ٣- تجزیه واریانس صفت پایداری غشاء در ژنوتیپ‌های گندم در شرایط کنترل، تنش خشکی، استعمال خارجی هورمون اپی‌براسینولید تحت شرایط کنترل و تنش خشکی

Table 3. Analysis of variance for membrane stability trait in wheat genotypes under control, drought stress and applied epi- brassinolide under control and drought stress conditions.

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی D.F	میانگین مربعات (MS)
بلوک (Block)	2	49.65*
تیمار آبی (Water treatment (W))	1	7555.01**
اشتباه a (Error a)	2	2.75
هورمون (Hormone (H))	3	2943.97**
تیمار آبی × هورمون (H × W)	3	109.63**
اشتباه b (Error b)	6	4.01
تکرار × هورمون (R × H)	6	28.77*
ژنوتیپ (Genotype (G))	6	1709.91**
تیمار آبی × ژنوتیپ (W × G)	6	233.45**
هورمون × ژنوتیپ (H × G)	18	157.93**
تیمار آبی × هورمون × ژنوتیپ (W × H × G)	18	75.11*
اشتباه c (Error c)	96	39.20

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ٥ و ١ درصد

* and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively

†مشکل بزرگ‌تر بودن خطاها نسبت به‌هم ($E_c > E_b > E_a$) برای پایداری غشا مشاهده گردید. لذا، برای رفع این مشکل اثرات متقابل تکرار با فاکتورB و تکرار با فاکتور C به‌ترتیب از خطاهای E_b و E_c جدا شدند. اثر تکرار با فاکتور B معنی‌دار شد که به‌صورت جدا در جدول تجزیه واریانس وارد شد.

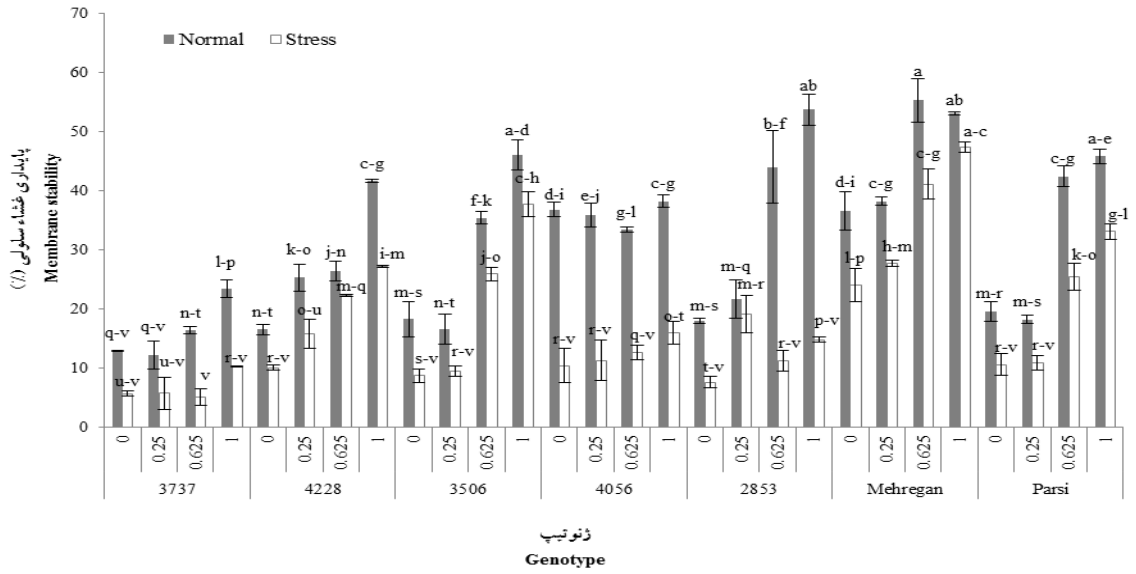
†The experimental error c (Ec) larger than Eb and also both of them were larger than Ea (Ec > Eb > Ea) for membrane stability. To solve this problem, the interaction of replication with factor B and replication with factor C were separated from Eb and Ec errors, respectively. The interaction between replication and factor B was significant, which had to be included separately in the variance analysis table.

تنش خشکی در همه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه موجب کاهش پایداری غشاء سلولی شد و بین ارقام مورد بررسی به‌لحاظ پایداری غشای سلولی تفاوت معنی‌داری وجود داشت. ژنوتیپ‌های مهرگان و ٤٢٢٨ بالاترین درصد و ژنوتیپ‌های ٤٠٥٦ و ٢٨٥٣ کمترین درصد پایداری غشاء سلولی را تحت تنش خشکی از خود نشان دادند (شکل ٢). به‌طور کلی استعمال خارجی هورمون براسینواستروئید موجب افزایش درصد پایداری غشاء سلولی در همه ژنوتیپ‌ها در هر دو سطح آبیاری شد که نشان‌دهنده تأثیر مثبت هورمون‌پاشی بر روی پایداری غشاء سلولی است (شکل ٢). غشاء سلولی از اولین اندامک‌هایی است که طی تنش خشکی آسیب می‌بیند و تراوایی انتخابی خود را از دست می‌دهد و سلول به دنبال نشت الکترولیت‌های خود تحت تنش خشکی می‌میرد (Farooq *et al*., 2009). از آنجایی‌که غشاءها نقش مهمی در فعالیت‌های سلولی بازی می‌کنند، حفظ یکپارچگی و ثبات غشاها تحت تنش مهم‌ترین جزء تحمل به تنش خشکی در گیاهان محسوب می‌شود (Chaves and Oliveira, 2004; Collado *et al*., 2010). خسارت به غشاء سلولی در گیاهانی نظیر گندم و جو تحت تنش خشکی گزارش شده است (Ahmed *et al*., 2013) و همچنین در ژنوتیپ‌های گندم متحمل به خشکی خسارت به غشاء سلولی کمتر از ژنوتیپ‌های حساس مشاهده شده است. براسینواستروئیدها از طریق کاهش پراکسیداسیون لیپیدی منجر به افزایش پایداری غشاء سلولی می‌شوند (Sairam, 1994, Li and Feng; 2011). افزایش پایداری غشاء سلولی با استفاده از

براسینواستروئیدها در برنج، گندم، ذرت، گوجه و خردل گزارش شده است (Sairam, 1994; Shen *et al*., 1990; Li *et al*., 2012; Nie *et al*., 2019). با توجه به اینکه کاربرد هورمون، موجب افزایش درصد پایداری غشاء سلولی در گندم‌های تیمار شده در مقایسه با گندم‌های تیمار نشده تحت تنش خشکی شده است درنتیجه موجبات کاهش خسارات ناشی از تنش خشکی روی پایداری غشاء سلولی را فراهم ساخته است. بهترین غلظت هورمون که منجر به حفظ بیشتر پایداری غشاء سلولی در ژنوتیپ‌ها شده است در استعمال یک میلی‌گرم براسینولید به‌دست آمد. از آنجایی که ژنوتیپ‌هایی که کمترین خسارت پایداری غشاء سلولی را در تنش از خود نشان دهند متحمل‌ترین ژنوتیپ به تنش خشکی به لحاظ این صفت محسوب می‌شوند؛ لذا ژنوتیپ‌های مهرگان و ٤٢٢٨ با کمترین و ژنوتیپ‌های ٤٠٥٦ و ٢٨٥٣ با بیشترین خسارت به‌ترتیب متحمل‌ترین و حساس‌ترین ژنوتیپ در میان ارقام مورد بررسی معرفی می‌شوند.

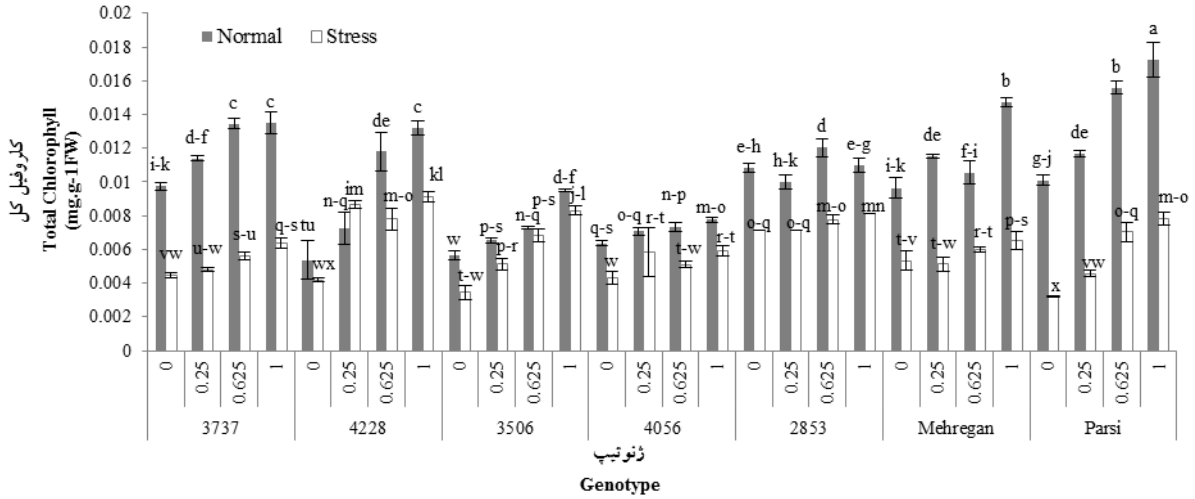
کلروفیل کل: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر متقابل سه‌جانبه بر میزان کلروفیل کل برگ در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد (جدول ٢). تنش آبی و کاربرد هورمون براسینواستروئید به‌ترتیب موجب کاهش و افزایش میزان کلروفیل کل در ژنوتیپ‌های گندم تحت هر دو شرایط آبی شد. رقم پارسی در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها دارای بیشترین میزان کلروفیل کل تحت آبیاری معمولی بود اما با رخداد تنش خشکی میزان آن به پایین‌ترین سطح در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها رسید و پایین‌ترین میزان پایداری کلروفیل (٣١ درصد) در میان ژنوتیپ‌ها را به‌خود اختصاص داد. ژنوتیپ ٤٢٢٨ بیشترین میزان کلروفیل را تحت تنش خشکی دارا بود و پایداری کلروفیل کل تحت تنش را در بالاترین میزان (٧٧ درصد) در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها داشت (شکل ٣).

مطالعات نشان داده‌اند که محتوای کلروفیل ارقام متحمل و حساس در شرایط تنش خشکی کاهش می‌یابد، اما ارقام گندم متحمل به خشکی در شرایط تنش محتوای کلروفیل بالاتری دارند (Keyvan, 2010). میزان کلروفیل در گیاهان، یکی از فاکتورهای مهم حفظ ظرفیت فتوسنتزی و یکی از مهم‌ترین شاخص‌های نشان دهنده تنش‌های محیطی وارد بر گیاهان می‌باشد (Pask *et al*., 2012). کاهش کلروفیل در شرایط تنش خشکی به علت افزایش گونه‌های اکسیژن فعال است که نتیجه آن پراکسیداسیون رنگیزه‌ها و تجزیه آن‌ها است (Schütz and Fangmeier, 2001).



شکل ٢- تأثیر اثر متقابل تیمارهای آبی، هورمون و ژنوتیپ بر روی پایداری غشاء سلولی (حروف مشابه مبین اختلاف غیرمعنی‌دار در سطح پنج درصد می‌باشد).

Figure 2. Effect of genotypes, water and hormone treatments' interaction on membrane stability (simillar letters indicated non-significant differences (P < 0.05)).



شکل ٣- تأثیر اثر متقابل تیمارهای آبی، هورمون و ژنوتیپ بر روی محتوای کلروفیل (حروف مشابه مبین اختلاف غیرمعنی‌دار در سطح پنج درصد می‌باشد).

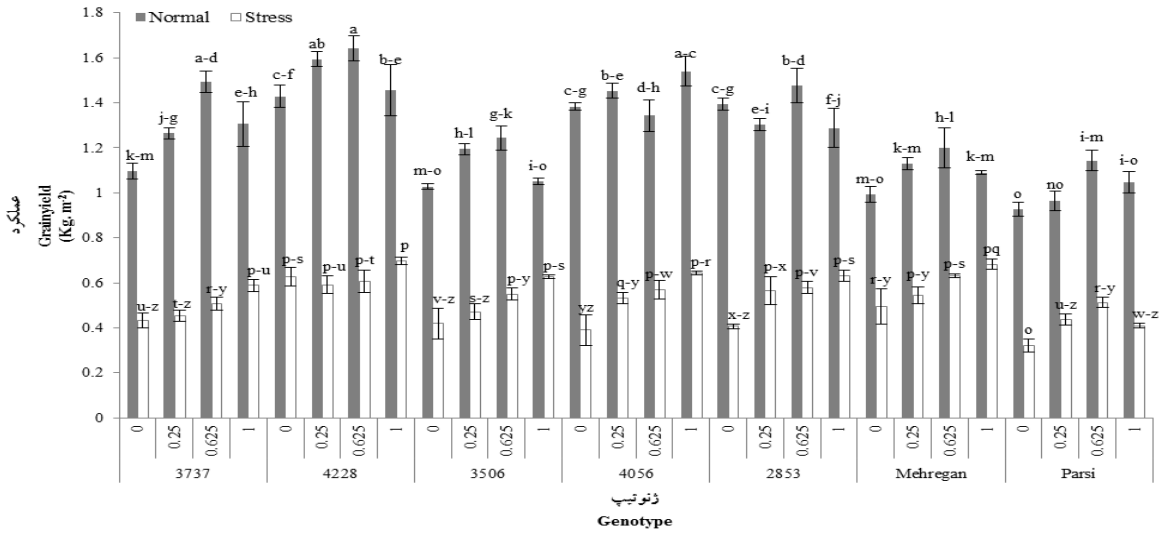
Figure 3. Effect of genotypes, water and hormone treatments' interaction on chlorophyll content (simillar letters indicated non-significant differences ($P < 0.05$)).

کاربرد هورمون براسینولید موجب افزایش محتوای کلروفیل گیاهان تحت شرایط کنترل و تنش خشکی در گندم و ذرت شده است که این امر به‌موجب تأخیر در فرآیند پیری زودرس برگ حاصل از تنش خشکی و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌ها فراهم گردیده است (Sairam, 1994; Shen *et al*., 1990). با توجه به این امر که کمترین و بیشترین پایداری میزان کلروفیل تحت تنش خشکی به‌ترتیب متعلق به ژنوتیپ‌های پارسی و ٤٢٢٨ بود، در نتیجه این دو رقم به‌عنوان حساس‌ترین و متحمل‌ترین ژنوتیپ از لحاظ سطح کلروفیل در تنش خشکی محسوب می‌شوند و هورمون پاشی اپی‌براسینولید موجب افزایش محتوای کلروفیل خصوصاً در غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر شده است که نشان‌دهنده تأثیر مثبت آن در کاهش اثرات سوء تنش خشکی است.

عملکرد دانه: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل سه‌جانبه بر عملکرد دانه‌ای در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ٢). تیمار تنش خشکی و هورمون به‌ترتیب موجب کاهش و افزایش عملکرد دانه‌ای ژنوتیپ‌ها نسبت به تیمار شاهد شد. همچنین، بیشترین و کمترین مقدار عملکرد به‌ترتیب متعلق به ژنوتیپ‌های ٤٢٢٨ و پارسی تحت شرایط آبیاری نرمال و تنش خشکی در همه سطوح تیمار هورمون اپی‌براسینولید بود (شکل ٤).

تنش خشکی با کاهش فتوسنتز، تقسیم سلولی، سطح برگ، محتوای نسبی آب برگ، میزان هدایت روزنه‌ای، تبخیر و تعرق، بیوماس کل و تسریع فرآیند پیری موجب کاهش رشد و عملکرد گیاهان می‌شود (Kamran *et al*., 2009; Ashraf, 2010; Mibei *et al*., 2017). کاهش عملکرد دانه در گندم در شرایط تنش خشکی، در بسیاری از مطالعات گزارش شده است (Ji *et al*, 2010).

بیشترین و کمترین میزان عملکرد دانه‌ای در مرحله گلدهی گندم در تیمار شاهد و تنش خشکی گزارش شده است (Paknejad *et al*., 2009). مطالعات نشان داده است که کاربرد هورمون براسینواستروئید در مرحله گرده‌افشانی و گلدهی گندم موجب افزایش عملکرد دانه‌ای در شرایط شاهد و تنش خشکی شده است (Sairam, 1994). استفاده از اپی‌براسینولید از زمان گرده‌افشانی تا رسیدگی دانه از طریق بهبود پر شدن دانه، تأخیر در پیری، حفظ و ثبات سنبله، افزایش انتقال مجدد و ثبات سلول‌های غشایی منجر به افزایش عملکرد دانه‌ای می‌شود (Dhayal *et al*., 2012; Dehghan *et al*., 2017).



شکل ٤- تأثیر اثر متقابل تیمارهای آبی، هورمون و ژنوتیپ بر روی عملکرد (حروف مشابه مبین اختلاف غیرمعنی‌دار در سطح پنج درصد می‌باشد).

Figure 4. Effect of genotypes, water and hormone treatments' interaction on yield (simillar letters indicated non-significant differences (P < 0.05)).

در این مطالعه، هورمون‌پاشی موجب افزایش عملکرد دانه‌ای در همه ژنوتیپ‌های مورد بررسی در شاهد (آبیاری معمولی) و تنش خشکی شد و بیشترین تأثیر مثبت بر روی عملکرد در شرایط نرمال آبیاری و تنش خشکی، به‌ترتیب در غلظت ۰/٦۲۵ و یک میلی‌گرم در لیتر هورمون به‌دست آمد. ژنوتیپ‌های مهرگان و ٤۲۲۸، کمترین درصد کاهش عملکرد و رقم پارسی، کمترین میزان عملکرد را تحت تنش خشکی به خود اختصاص دادند (شکل ٤).

بررسی بیان ژن‌های سیگنالینگ هورمون براسینواستروئیدها: بررسی بیان ژن‌های *TaBRI1* و *TaBES1* در ارقام متحمل (مهرگان) و حساس (پارسی) و همچنین ژنوتیپ ٤۲۲۸ به‌عنوان متحمل‌ترین ژنوتیپ تحت تنش خشکی (با دارا بودن بالاترین عملکرد، پایداری غشاء سلولی، کلروفیل و آنزیم کاتالاز) در بین ژنوتیپ‌های ناشناخته صورت گرفت. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل سه‌جانبه هورمون، ژنوتیپ و آبیاری روی *TaBRI1* و *TaBES1* در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ٤). تنش خشکی موجب افزایش بیان ژن *TaBRI1* در ژنوتیپ‌های پارسی و ٤۲۲۸ شد درحالی‌که کاهش بیان این ژن در مهرگان مشاهده شد. هورمون‌پاشی اپی‌براسینولید تحت آبیاری کامل موجب افزایش معنی‌دار سطح بیان *TaBRI1* نسبت به شرایط آبیاری کامل در ژنوتیپ‌های متحمل شد اما مقایسه استفاده و عدم استفاده هورمون در تنش خشکی، موجب افزایش معنی‌دار بیان این ژن فقط در ژنوتیپ مهرگان شد. همچنین، مقایسه اثر هورمون در شرایط آبیاری و تنش خشکی نیز فقط در مهرگان افزایش معنی‌داری داشت (شکل ٥).

تنش خشکی منجر به کاهش بیان ژن *TaBES1* در هر سه ژنوتیپ شد. الگوی بیان این ژن در کاربرد هورمون تحت شرایط آبیاری کامل در ژنوتیپ‌های پارسی و مهرگان، کاهشی و در ژنوتیپ ٤۲۲۸ بدون تغییر بود. مقایسه میان استفاده و عدم استفاده از هورمون تحت تنش خشکی نشان داد که میزان بیان این ژن در رقم پارسی و ٤۲۲۸ بدون تغییر و در مهرگان افزایشی است (شکل ٥).

جدول ٤- تجزیه واریانس بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های گندم تحت شرایط کنترل، تنش خشکی، استعمال خارجی هورمون براسینولید در شرایط کنترل و تنش خشکی

Table 4. Variance analyses of relative gene expression in wheat genotypes under control condition, drought stress, and applied epi-brassinolide in control and drought conditions.

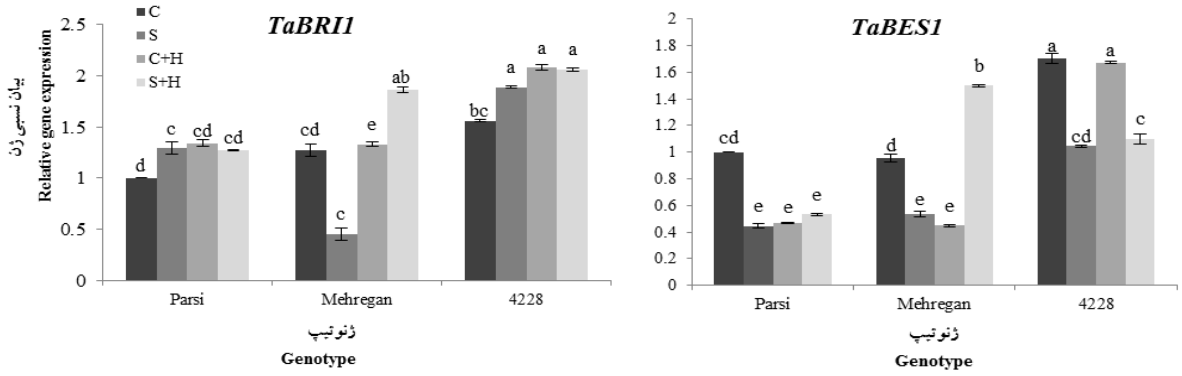
منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی D.F	میانگین مربعات (MS)	
		TaBRI1	*TaBES1*
بلوک Block	2	0.0135 ^{ns}	0.00039^{ns}
تیمار آبی Water treatment (W)	1	0.0149 ^{ns}	0.00044^{ns}
اشتباه a Error a	2	0.0054	0.00621
هورمون Hormone (H)	1	1.541**	0.29920*
تیمار آبی × هورمون W×H	1	0.1046*	1.18084**
اشتباه b Error b	4	0.0084	0.01651
ژنوتیپ Genotype (G)	4	1.7868**	1.85050**
تیمار آبی × ژنوتیپ W × G	2	0.0778*	0.15265**
هورمون × ژنوتیپ G × H	2	0.2569**	0.66077**
تیمار آبی× هورمون× ژنوتیپ W × H × G	2	0.7315**	0.36364**
اشتباه c Error c	6	0.0192	0.00311

^{ns}، * و **: به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

^{ns}, * and **: Non-significant, significant at 5% and 1% probability levels, respectively

† مشکل بزرگ‌تر بودن خطاها نسبت به‌هم ($E_c > E_b > E_a$) برای دو ژن مشاهده گردید. لذا، برای رفع این مشکل اثرات متقابل تکرار با فاکتورB و تکرار با فاکتور C به ترتیب از خطاهای E_b و E_c جدا شدند. برای این دو ژن، این دو منبع تغییر معنی‌دار نشدند بنابراین ادغام (pooling) آن‌ها با خطاهای مربوطه قابل استناد است.

† The experimental error c (Ec) was larger than Eb and also both of them were larger than Ea (Ec > Eb > Ea) for the both genes. To solve this problem, the interaction of replication with factor B and replication with factor C were separated from Eb and Ec errors, respectively. These two sources were not significant, so their pooling with relevant errors truly correct.



شکل ۵- بررسی بیان نسبی ژن‌های سیگنالینگ هورمون براسینواستروئید (*TaBRI1* و *TaBES1*) تحت تنش خشکی و محلول‌پاشی براسینولید در گندم. C: کنترل؛ C+H: کنترل به همراه محلول‌پاشی هورمون؛ S: تنش خشکی؛ S+H: تنش خشکی به همراه محلول‌پاشی هورمون (حروف مشابه مبین اختلاف غیرمعنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشد).

Figure 5. Relative gene expression of brassinosteroid hormone signaling genes (*TaBRI1* and *TaBES1*) under drought stress and applied brassinolide in wheat. C: control; C+H: control plus hormone; S: drought stress; S+H: drought plus hormone (simillar letters indicated non-significant differences (P < 0.01)).

BSU1 فعال باعث دفسفریله شدن BIN2[1] می‌شود که نتیجه آن تجمع عوامل رونویسی BZR1[2] و BES1[3] دفسفریله شده را فراهم می‌سازد تا آن‌ها وارد هسته شوند و روی ژن‌های مورد هدف براسینواستروئید تأثیر بگذارند و بیان آن‌ها را دچار تغییر نمایند (Vardhini and Anjum, 2015; Li *et al*., 2009; Anwar *et al*., 2018). موتانت‌های *bri1-301* و *bes1-D* به‌ترتیب با کاهش و افزایش بیان ژن‌های مسیر سیگنالینگ BR موجب افزایش و کاهش تحمل به تنش خشکی در آرابیدوپسیس شده‌اند (Chen *et al*., 2017, Ye *et al*., 2017). بیان ژن‌های مسیر سیگنالینگ BR مانند *BES1* در موتانت loss-of-function ژن *BRI1* براکی‌پودیوم کاهش یافت درحالی‌که بیان ژن‌های بیوسنتز این هورمون، ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش و ژن *RD26* افزایش داشت که موجب تحمل به تنش خشکی شده است (Feng *et al*., 2015). براسینواستروئیدها توسط خانواده‌های ژنی *BES1* و *BZR1* به تنش‌های محیطی نظیر خشکی پاسخ می‌دهند و بیان ژن‌های زیردست خود را تنظیم می‌کنند. فاکتور رونویسی *RD26* بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به خشکی را تنظیم می‌کند و افزایش بیان آن موجب تحمل به تنش خشکی می‌شود. این فاکتور، تداخل[4] بین مسیر سیگنالینگ تنش خشکی و براسینواستروئیدها محسوب می‌شود و تنظیم بیان ژن‌ها تحت تنش خشکی با فعالیت آنتاگونیستی *BES1* و *RD26* تنظیم می‌شوند (Ye *et al*., 2017). بسیاری از مطالعات نشان داده است که کاربرد BR موجب افزایش تحمل به تنش خشکی در گیاهان می‌شود (Krishna, 2003; Sairam, 1994; Clouse, 1996). استعمال خارجی هورمون براسینواستروئید موجب افزایش تحمل به تنش خشکی در گوجه‌فرنگی شد، در حالی‌که بیان مضاعف (Overexpression) ژن *BRI1* موجب کاهش تحمل به تنش خشکی شد. اگرچه سطح بیان *BRI1* در اثر کاربرد هورمون افزایش چندانی پیدا نکرد اما افزایش بیان ژن‌های بیوسنتز این هورمون و ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در گیاه تیمار شده بالا رفت در حالی‌که در بیان مضاعف این ژن موجب کاهش بیان ژن‌های بیوسنتز هورمون، ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش و افزایش شدت سیگنالینگ شد که منجر به افزایش حساسیت به تنش خشکی گردید. افزایش میزان محتوای BR، RWC و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و همچنین کاهش نشت یونی و سطح ABA تحت تنش خشکی در گیاهان تیمار شده با هورمون در مقایسه با شاهد مشاهده شد در حالی‌که در بیان مضاعف این ژن، میزان این صفات کاهش داشت. در نتیجه محتوای BR و شدت سیگنالینگ به‌ترتیب به‌صورت مثبت و منفی تحمل به تنش خشکی را تنظیم می‌کنند. این مطالعه نشان داد که افزایش تحمل به تنش خشکی در پاسخ به استفاده از هورمون براسینواستروئید در پایین‌دست BR قرار دارد اما مسیر سیگنالینگ متفاوتی از سیگنالینگ BRI1 دارد (Nie *et al*., 2019). کاربرد اپی‌براسینولید موجب افزایش بیان *BRI1* تحت تیمار هورمون در شرایط آبی و تنش در برنج شده و با افزایش بیان ژن‌های بیوسنتز کننده آنتی‌اکسیدان‌ها، موجب افزایش تحمل به شوری در ژنوتیپ حساس برنج شده است (Sharma *et al*., 2013).

مقایسه کاربرد اپی‌براسینولید در تنش خشکی با تنش خشکی به‌تنهایی نشان داد که الگوی بیان ژن‌های *TaBRI1* و *TaBES1* در ارقام پارسی و ٤٢٢٨ بدون تغییر است و فقط در مهرگان بیان افزایشی این دو ژن مشاهده شد. با توجه به افزایش عملکرد، محتوای کلروفیل، پایداری غشاء سلولی و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها در هر سه ژنوتیپ با استفاده از اپی‌براسینولید و همچنین عدم پیروی یک الگوی مشخص در بیان این ژن‌ها در ارقام، به نظر می‌رسد کاربرد هورمون تحت تنش در گندم نیز مانند گوجه‌فرنگی موجب افزایش تحمل به تنش خشکی می‌شود اما سیگنالینگ آن متفاوت از مسیر سیگنالینگ *BRI1* است.

نتایج این مطالعه نشان داد که کاربرد هورمون اپی‌براسینولید می‌تواند اثرات مخرب تنش خشکی در

1- Brassinosteroid insensitive2
2- Brassinazole resistant1
3- BRI1-EMS suppressor1
4- Crosstalk

گندم را از طریق افزایش محتوای کلروفیل، پایداری غشاء سلولی و کاتالاز کاهش دهد که در نهایت موجب بهبود عملکرد دانه‌ای گندم تحت تنش خشکی آخر فصل می‌شود. همچنین، ژنوتیپ ٤٢٢٨ با بالاترین میزان پایداری سلولی، محتوای کلروفیل، کاتالاز و عملکرد در میان پنج ژنوتیپ ناشناخته گندم تحت تنش خشکی به‌عنوان متحمل‌ترین ژنوتیپ معرفی می‌شود که می‌توان در برنامه‌های اصلاحی تحمل به تنش خشکی از آن استفاده کرد. با توجه به بررسی بیان ژن‌های مسیر سیگنالینگ (*TaBRI1* و *TaBES1*) در گندم، به نظر می‌رسد که کاربرد هورمون اگرچه موجب افزایش تحمل به تنش خشکی می‌شود اما مسیر سیگنالینگ استعمال خارجی این هورمون متفاوت از مسیر سیگنالینگ شناخته شده براسینواستروئیدها است.

References

Abid, M., Tian, Z., Ata-Ul-Karim, S.T., Liu, Y., Cui, Y., Zahoor, R., Dong, J. and Dai, T. (2016). Improved tolerance to post-anthesis drought stress by pre-drought priming at vegetative stages in drought-tolerant and-sensitive wheat cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, **106:** 218-227.

Ahmed, I.M., Dai, H., Zheng, W., Cao, F., Zhang, G., Sun, D. and Wu, F. (2013). Genotypic differences in physiological characteristics in the tolerance to drought and salinity combined stress between Tibetan wild and cultivated barley. *Plant Physiology and Biochemistry*, **63:** 49-60.

Anwar, A., Liu, Y., Dong, R., Bai, L., Yu, X. and Li, Y. (2018). The physiological and molecular mechanism of brassinosteroid in response to stress: a review. *Biological Research*, **51(1):** 46.

Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, **24(1):** 1-15.

Ashraf, M. (2010). Inducing drought tolerance in plants: recent advances. *Biotechnology Advances*, **28(1):** 169-183.

Behnamnia, M., Kalantari, K.M. and Ziaie, J. (2009). The effects of brassinosteroid on the induction of biochemical changes in *Lycopersicon esculentum* under drought stress. *Turkish Journal of Botany*, **33(6):** 417-428.

Blum, A. (2005). Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Australian Journal of Agricultural Research*, **56(11):** 1159-1168.

Chance, B. and Maehly, A.C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, **2:** 764-775.

Chaves, M.M. and Oliveira, M.M. (2004). Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*, **55(407):** 2365-2384.

Chen, J., Nolan, T.M., Ye, H., Zhang, M., Tong, H., Xin, P., Jinfang, C., Chengcai, C., Zhaohu, L. and Yin, Y. (2017). Arabidopsis WRKY46, WRKY54, and WRKY70 transcription factors are involved in brassinosteroid-regulated plant growth and drought responses. *The Plant Cell*, **29(6):** 1425-1439.

Clouse, S.D. (1996). Molecular genetic studies confirm the role of brassinosteroids in plant growth and development. *The Plant Journal*, **10(1):** 1-8.

Collado, M.B., Arturi, M.J., Aulicino, M.B. and Molina, M.C. (2010). Identification of salt tolerance in seedling of maize (*Zea mays* L.) with the cell membrane stability trait. *International Research Journal of Plant Science*, **1(5):** 126-132.

Dehghan, M., Balouchi, H.R., Yadavi, A.R. and Safikhani, F. (2017). Effect of foliar application of brassinolide on grain yield and yield components of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Sirvan under terminal drought stress conditions. *Iranian Journal of Crop Sciences*, **19(1):** 40-56.

Dhanda, S.S., Sethi, G.S. and Behl, R.K. (2004). Indices of drought tolerance in wheat genotypes at early stages of plant growth. *Journal of Agronomy and Crop Science*, **190(1):** 6-12.

Dhaubhadel, S., Chaudhary, S., Dobinson, K.F. and Krishna, P. (1999). Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings. *Plant molecular Biology*, **40(2):** 333-342.

Dhayal, S.S., Bagdi, D.L., Kakralya, B.L., Saharawat, Y.S. and Jat, M.L. (2012). Brassinolide induced modulation of physiology, growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under water stress condition. *Crop Research (Hisar)*, **44(1/2):** 14-19.

Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P. and Thorpe, T.A. (1981). Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, **32(1):** 93-101.

Ehdaie, B. (1995). Variation in water-use efficiency and its components in wheat: II. Pot and field experiments. *Crop Science*, **35(6):** 1617-1626.

Fariduddin, Q., Khanam, S., Hasan, S.A., Ali, B., Hayat, S. and Ahmad, A. (2009). Effect of 28-homobrassinolide on the drought stress-induced changes in photosynthesis and antioxidant system of *Brassica juncea* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, **31(5):** 889-897.

Fariduddin, Q., Yusuf, M., Ahmad, I. and Ahmad, A. (2014). Brassinosteroids and their role in response of plants to abiotic stresses. *Biologia Plantarum*, **58(1):** 9-17.

Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. and Basra, S.M.A. (2009). *Plant Drought Stress: Effects, Mechanisms and Management*. Springer, Dordrecht. Berlin, DE.

Feng, Y., Yin, Y. and Fei, S. (2015). Down-regulation of BdBRI1, a putative brassinosteroid receptor gene produces a dwarf phenotype with enhanced drought tolerance in *Brachypodium distachyon*. *Plant Science*, **234:** 163-173.

Gill, B.S., Appels, R., Botha-Oberholster, A.M., Buell, C.R., Bennetzen, J.L., Chalhoub, B., Chumley, F., Dvořák, J., Iwanaga, M., Keller, B. and Li, W. (2004). A workshop report on wheat genome sequencing: International Genome Research on Wheat Consortium. *Genetics*, **168(2):** 1087-1096.

Grove, M.D., Spencer, G.F., Rohwedder, W.K., Mandava, N., Worley, J.F., Warthen Jr, J.D., Steffens, G.L., Flippen-Anderson, J.L. and Cook Jr, J.C. (1979). Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature*, **281(5728):** 216-217.

Hayat, S. and Ahmad, A. (2010). *Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone*. Springer Netherlands, North Holland, NL.

Ji, X., Shiran, B., Wan, J., Lewis, D.C., Jenkins, C.L., Condon, A.G., Richards, R.A. and Dolferus, R. (2010). Importance of preanthesis anther sink strength for maintenance of grain number during reproductive stage water stress in wheat. *Plant, Cell & Environment*, **33(6):** 926-942.

Kamran, M., Shahbaz, M., Ashraf, M. and Akram, N.A. (2009). Alleviation of drought-induced adverse effects in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) using proline as a pre-sowing seed treatment. *Pakistan Journal of Botany*, **41(2):** 621-632.

Keyvan, S. (2010). The effects of drought stress on yield, relative water content, proline, soluble carbohydrates and chlorophyll of bread wheat cultivars. *Journal of Animal and Plant Science*, **8(3):** 1051-1060.

Khripach, V.A., Zhabinskii, V.N. and de Groot, A.E. (1998). *Brassinosteroids: A New Class of Plant Hormones.* Academic Press, Wageningen, NL.

Krishna, P. (2003). Brassinosteroid-mediated stress responses. *Journal of Plant Growth Regulation*, **22(4):** 289-297.

Li, K.R. and Feng, C.H. (2011). Effects of brassinolide on drought resistance of *Xanthoceras sorbifolia* seedlings under water stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, **33(4):** 1293-1300.

Li, L., Yu, X., Thompson, A., Guo, M., Yoshida, S., Asami, T., Chory, J. and Yin, Y. (2009). Arabidopsis MYB30 is a direct target of BES1 and cooperates with BES1 to regulate brassinosteroid induced gene expression. *The Plant Journal*, **58(2):** 275-286.

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*. *Biologia Plantarum*, **56(1):** 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. *Annals of Botany*, **78(3):** 389-398.

Mesgaran, M., Madani, K., Hashemi, H. and Azadi, P. (2016). *Stanford Iran 2040 Project: Evaluation of Land and Precipitation for Agriculture in Iran*. Stanford University Press, California, USA.

Mibei, E.K., Ambuko, J., Giovannoni, J.J., Onyango, A.N. and Owino, W.O. (2017). Carotenoid profiling of the leaves of selected African eggplant accessions subjected to drought stress. *Food Science & Nutrition*, **5(1):**113-122.

Molaei, B., Moghaddam, M., Alvaikia, S.S. and Bandeh-Hagh, A. (2017). Generation mean analysis for several agronomic and physiologic traits in bread wheat under normal and water deficit stress conditions. *Plant Genetic Researches*, **3(2):** 1-10 (In Persian).

Nie, S., Huang, S., Wang, S., Mao, Y., Liu, J., Ma, R. and Wang, X. (2019). Enhanced brassinosteroid signaling intensity via SlBRI1 overexpression negatively regulates drought

resistance in a manner opposite of that via exogenous BR application in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, **138:** 36-47.

Nouri-Ganbalani, A., Nouri-Ganbalani, G. and Hassanpanah, D. (2009). Effects of drought stress condition on the yield and yield components of advanced wheat genotypes in Ardabil, Iran. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, **7(3/4):** 228-234.

Paknejad, F., Jamiami, A.M., Vazan, S. and Ardakani, M.R. (2009). Effects of water stress at different growth stages on yield and water use efficiency of some wheat cultivars. *Jounal of Crop Production*, **2:** 17-36.

Pask, A.J.D., Pietragalla, J., Mullan, D.M. and Reynolds, M.P. (2012). *Physiological Breeding II: A Field Guide To Wheat Phenotyping.* CIMMYT, Mexico City, MX.

Pfaffl, M. (2009). *Rest 2009 Software User Guide.* Qiagen, Hilden, DE.

Prins, C.L., Vieira, I.J. and Freitas, S.P. (2010). Growth regulators and essential oil production. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **22(2):** 91-102.

Rychlik, W. (2007). *OLIGO 7 Primer Analysis Software. PCR Primer Design*. Humana Press, New Jersey, USA.

Sairam, R.K. (1994). Effects of homobrassinolide application on plant metabolism and grain yield under irrigated and moisture-stress conditions of two wheat varieties. *Plant Growth Regulation*, **14(2):** 173-181.

Schütz, M. and Fangmeier, A. (2001). Growth and yield responses of spring wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Minaret) to elevated CO_2 and water limitation. *Environmental Pollution*, **114(2):** 187-194.

Sedaghat, M. and Emam, Y. (2016). Effect of three growth regulators on grain yield of wheat cultivars under different moisture regimes. *Journal of Crop Production and Processing*, **6(21):** 15-33.

Shahbaz, M. and Ashraf, M. (2007). Influence of exogenous application of brassinosteroid on growth and mineral nutrients of wheat (*Triticum aestivum* L.) under saline conditions. *Pakistan Journal of Botany*, **39(2):** 513-522.

Sharma, I., Ching, E., Saini, S., Bhardwaj, R. and Pati, P.K. (2013). Exogenous application of brassinosteroid offers tolerance to salinity by altering stress responses in rice variety Pusa Basmati-1. *Plant Physiology and Biochemistry*, **69:** 17-26.

Shen, X.Y., Dai, J.Y., Hu, A.C., Gu, W.L., He, R.Y. and Zheng, B. (1990). Studies on physiological effects of brassinolide on drought resistance in maize. *Journal of Shenyang Agricultural University*, **21(3):** 191-195.

Shewry, P.R. (2009). Wheat. *Journal of Experimental Botany*, **60(6):** 1537-1553.

Taiz, L. and Zeiger, E. (2004). *Fisiologia Vegetal, 3^{ed}*. Editora UFV, Ponte Nova, BR.

Vardhini, B.V. and Anjum, N.A. (2015). Brassinosteroids make plant life easier under abiotic stresses mainly by modulating major components of antioxidant defense system. *Frontiers in Environmental Science*, **2**, 67.

Yazdi Samadi, B., Rezaei, A. M., and Valizadeh, M. (2008). *Statistical Designs in Agricultural Research*. University of Tehran Press, Tehran, IR (In Persian).

Ye, H., Liu, S., Tang, B., Chen, J., Xie, Z., Nolan, T.M., Jiang, H., Guo, H., Lin, H.Y., Li, L. and Wang, Y. (2017). RD26 mediates crosstalk between drought and brassinosteroid signalling pathways. *Nature Communications*, **8:** 14573.

Effect of Exogenous Brassinosteroid Application on Grain Yield, some Physiological Traits and Expression of Genes Related to This Hormone Signaling Pathway in Wheat under Drought Stress

Mehrnoosh Rafeie[1], Mohammad Reza Amerian[2,*], Behzad Sorkhi[3], Parviz Heidari[4] and Hamid Reza Asghari[2]

1- Ph.D. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran
2- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran
3- Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
4- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran

(Received: September 14, 2019 – Accepted: December 24, 2019)

Abstract

To investigate the effect of exogenous brassinosteroid application on grain yield, catalase, chlorophyll content, membrane mtability index and gene expression of some genes involving in brassinosteroid signaling pathway (*BES1* and *BRI1*) under drought stress, a split-split plot on randomized complete block design with three replications was conducted at the experimental field of Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran in 2019. The main factor was two irrigation treatments (normal irrigation and water holding after 50% flowering stage), the subplots were four concentrations of brassinosteroid (0, 0.25, 0.625 and 1 mg/l) and seven genotypes (Mehregan, Paris, 2858, 3505, 3737, 4228 and 4056) were considered as sub-sub plots. Samples were taken at 30 days after 50% flowering stage (zadoks 89) from flag leaves. The results showed that drought stress significantly reduced grain yield, chlorophyll content, membrane stability index and increased catalase in all genotypes. Genotype 4228 was identified as the most tolerant genotype among unknown wheat genotypes based on grian yield, chlorophyll content, membrane stability index and catalase. Also, the result revealed that applied epibrassinolide could reduce the destructive effects of drought stress on wheat thus grain yield was enhanced under drought stress in all genotypes by increasing the aforementioned traits. Forethermore, grain yield was increased by rising the epibrasinolide concentration. Gene expression pattern of *TaBES1* and *TaBRI1* using real-time PCR showed that although brassinosteroid enhances drought tolerance in wheat but its signaling pathway is different from the *BRI1* signaling pathway.

Keywords: Brassinosteroid, Gene expression, Drought stress, Wheat, Real-time PCR

[*] **Corresponding Author, E-mail: amerianuk@yahoo.co.uk**