جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

اثر ۲۴-اپی براسینولید بر جوانه زنی بذر، رشد گیاهچه و پارامترهای بیوشیمیایی کلزا (*Brassica napus* L.) تحت تنش کم آبی

عفت السادات احمدی موسوی* و خسرو منوچهری کلانتری**

* مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی(ICST)

** گروه زیست شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان

چکیده

براسینواستروئیدها گروهی از هورمونهای گیاهی با اثرات ضد تنشی قابل توجهی هستند. اثر ۲۴-اپی براسینولید روی جوانه زنی بذر، رشد گیاهچه، پراکسیداسیون لیپید، مقدار پرولین، پروتئین و قندهای احیا کننده در گیاهچه‌های کلزا (*Brassica napus* L. cv. Fusia) تحت تنش کم آبی مورد بررسی قرار گرفت، الگوهای پلی پپتیدهای قسمت هوایی نیز از طریق تکنیک SDS-PAGE جدا شد. بذرها و گیاهچه‌های مورد نظر در ظروف پتری حاوی آب مقطر، محلولهای 10^{-8} مولار ۲۴-اپی براسینولید، پلی اتیلن گلیکول و پلی اتیلن توام با۲۴-اپی براسینولید کاشته شدند. اپی براسینولید اثر مهار کنندگی تنش کم آبی بر روی جوانه زنی بذرهای کلزا را کاهش داد. اپی براسینولید منجر به افزایش معنی دار رشد محور زیر لپه و ریشه چه گیاهچه‌های کلزا تحت شرایط شاهد و تنش کم آبی شد. کاربرد اپی براسینولید در شرایط تنش موجب افزایش مقدار پروتئین گردید. افزایش پراکسیداسیون لیپید و پرولین که تحت تنش کم آبی مشهود بود در تیمار با اپی براسینولید کاهش معنی داری نشان داد. مقدار قند در گیاهچه هایی که تحت تنش کم آبی بوده و با اپی براسینولید تیمار شدند، بیشتر از گیاهچه هایی بود که تحت تنش کم آبی قرار داشتند. در گیاهچه‌های تحت تنش کم آبی در مقایسه با شاهد میزان پلی پپتیدهای ۱۰۲ و ۸۲، ۳۵، ۳۱، ۲۱، ۱۹ کیلودالتونی و در گیاهانی که با اپی براسینولید تیمار شده بودند باند پلی پپتیدهای ۵۰ و ۳۱، ۲۱ کیلودالتونی بیشتر بود. تیمار گیاهان با اپی براسینولید خسارت اکسیداتیو ناشی از تنش کم آبی را کاهش داد، همچنین موجب افزایش رشد گیاهچه و جوانه زنی بذر تحت تنش شد.

واژه‌های کلیدی: ۲۴-اپی براسینولید، تنش کم آبی، جوانه زنی و کلزا (*Brassica napus* L.)

مقدمه

براسینواستروئیدها برای اولین بار در سال ۱۹۷۹ توسط Grove و همکارانش از دانه گرده گیاه Rape (*Brassica napus*) استخراج شدند و به عنوان یک گروه جدید از تنظیم کننده‌های رشد با اثرات زیستی قابل توجه در نظر گرفته شدند(۱۶). از آن زمان تاکنون

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

۵۹ عدد براسینواستروئید (۵۴ تا به صورت آزاد و ۵ تا به صورت همیوغ با اسیدهای چرب و قندها) از گونه‌های مختلف گیاهان استخراج و شناسایی شدند(۲۳).

براسینواستروئیدها از مشتقات ۵α-cholestan اند و از مسیر موالونات در گیاه سنتز می شوند. این ترکیبات تقریبا در تمام قسمتهای گیاه یافت می شوند و بیشترین مقدار آنها در اندامهای زایشی (دانه گرده و بذر نارس) مشاهده شده است(۱۰ و ۳۰). این ترکیبات دارای اثرات فیزیولوژیکی مختلف در رشد و نمو گیاهان می باشند، موجب تحریک رشد و تقسیم سلولی شده، روی جوانه زنی بذرهای گیاهان اثر گذاشته، بر خصوصیات الکتریکی، نفوذپذیری، ساختمان، پایداری و فعالیت آنزیمهای غشا نیز اثر می گذارند(۳۰)، همچنین در سطح مولکولی براسینواستروئیدها موجب تغییر بیان ژن و تغییر متابولیسم و بیوسنتز اسیدهای نوکلئیک و پروتئینها می گردند(۵). مطالعات انجام شده بر روی موتانهای مختلف براسینواستروئیدها نشان داده که این ترکیبات برای رشد و نمو گیاهان ضروری هستند(۲۴).

همچنین مشخص شده که این ترکیبات موجب افزایش سازگاری گیاهان در برابر شرایط نامساعد محیطی می شوند (۵، ۲۲ و ۳۰). برای مثال گزارش شده که براسینواستروئیدها موجب کاهش خسارت ناشی از تنش سرما، دمای زیاد، فلزات سنگین، شوری(۳۰) و تنش کم آبی(۲۲) شده اند. تنش کم آبی موجب تغییرات آناتومیکی، مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان می گردد و تنشهایی مانند تنش شوری، سرمازدگی و یخ زدگی چون همراه با از دست رفتن آب بافت می باشند منجر به تنش کم آبی در گیاهان می شوند(۱). در شرایط کم آبی تولید انواع گونه‌های فعال اکسیژن منجر به خسارت اکسیداتیو و در نتیجه اختلال در اعمال فیزیولوژیکی سلولها می گردد، همچنین در شرایط تنش فرآیندهای مخرب غشاء فعال شده و منجر به اکسیداسیون لیپیدهای غشاء می شوند(۲۱، ۲۷ و ۳۸). براسینواستروئیدها میزان تجمع مالون دآلدئید حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء را کاهش می دهند و روی ترکیب اسیدهای چرب و نفوذپذیری غشاء اثر گذاشته و همچنین گزارش شده که روی تجمع مواد محلول اثر دارند(۲۳).

با توجه به اینکه تنش کم آبی از عوامل محدود کننده در تولید محصولات کشاورزی محسوب می شود بنابراین تحقیق روی مکانیسم مقاومت گیاهان به کم آبی حائز اهمیت است در این میان استفاده از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در بهبود و رفع آثار کم آبی در گیاهان بسیار سودمند است. در این پژوهش برای روشن شدن اینکه آیا براسینواستروئیدها روی فرآیندهای سلولی اثر گذارده و باعث افزایش مقاومت به تنش کم آبی می شوند، ترکیب ۲۴-اپی براسینولید به صورت برون زا روی بذرها و گیاهچه‌های کلزای تحت تنش کم آبی بکار برده شد. همچنین برای مشخص شدن نقش حفاظتی این ترکیب در شرایط تنش کم آبی، پارامترهایی مانند مقدار قند، پرولین، پروتئین، مالون دآلدئید مورد سنجش قرار گرفت و پروتئینهای گیاهچه به روش SDS الکتروفورز و الگوهای الکتروفورز پروتئینهای حاصل در تیمارهای کم آبی و ۲۴-اپی براسینولید با هم مقایسه شدند. طول ریشه چه و محور زیر لپه و درصد جوانه زنی بذرهای کلزا نیز تحت تنشهای مذکور مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

در این تحقیق از گیاه کلزا (*Brassica napus* L. cv. Fusia) استفاده شد. بذرهای این گیاه از مرکز تحقیقات

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

کشاورزی کرمان تهیه گردید.

کشت گیاه در ظروف پتری

کشت بذرهای گیاه کلزا (*Brassica napus* L.) واریته فوزیا در ظروف پتری به دو منظور متفاوت انجام گرفت: ۱- محاسبه درصد جوانه زنی ۲- بررسی اثر ۲۴-اپی براسینولید و تنش کم آبی بر گیاهچه کلزا.

کشت بذر برای محاسبه درصد جوانه زنی

در این مرحله، ابتدا ظروف پتری به همراه کاغذهای جوانه زنی در اتوکلاو با دمای ۱۸۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت سترون شدند، بذرهای یکسان از نظر اندازه، با سدیم هیپوکلریت ۰/۱ درصد ضد عفونی گردیدند و پس از شستشو با آب مقطر سترون شده، به پتری‌های حاوی ۵ میلی لیتر از محلول مربوط به هر یک از تیمارها منتقل شدند. برای هر تیمار تعداد ۳ پتری به عنوان ۳ تکرار در نظر گرفته شد و در هر پتری ۲۵ بذر قرار داده شد.

پس از کاشت بذرها، ظروف پتری در اتاق جوانه زنی در دمای ۲±۱۶/ ۲±۲۳ درجه سانتیگراد (تاریکی/نور) تحت شرایط متناوب نوری ۸/ ۱۶ ساعت (تاریکی/نور) قرار گرفتند. تعداد بذرهای جوانه زده در هر پتری ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت پس از کشت شمارش و درصد جوانه زنی بذرها در هر پتری با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید.

۱۰۰× (تعداد کل بذرها / تعداد بذر جوانه زده) = درصد جوانه زنی

کشت بذر برای بررسی اثر ۲۴-اپی براسینولید و تنش کم آبی

بعد از ۹۶ ساعت گیاهچه‌های رشد کرده در شرایط مذکور به پتری‌های جدید شامل کاغذ جوانه زنی مرطوب شده با ۵ میلی لیتر از محلول‌های مربوط به هر تیمار منتقل گردیدند و در اتاق جوانه زنی قرار گرفتند. ریشه چه و قسمت هوایی گیاهچه‌های ۷ روزه از هم جدا و قسمت هوایی گیاهچه برای اندازه گیری پارامترهای بیوشیمیای مورد نظر استفاده شد.

تیمارهای مورد استفاده عبارت بودند از:

۱. **شاهد:** پتریها حاوی محلول توین-۲۰ (۰/۰۱درصد)
۲. **WS1** (تنش کم آبی ملایم): پتریها حاوی PEG (درصد وزنی ۱۳/۳ گرم، OP= -۰/۲ MP)
۳. **WS2** (تنش کم آبی شدید): پتریها حاوی PEG (درصد وزنی ۱۷ گرم، OP= -۰/۴ MP)
۴. **Bs:** پتریها حاوی محلول ۲۴-اپی براسینولید با غلظت 10^{-8} مول و توین-۲۰ (۰/۰۱درصد)
۵. **WS1+Bs**: پتریها حاوی PEG (درصد وزنی ۱۳/۳ گرم، OP= -۰/۲ MP) و محلول ۲۴-اپی براسینولید
۶. **WS2+Bs**: پتریها حاوی PEG (درصد وزنی ۱۷ گرم، OP= -۰/۴ MP) و محلول ۲۴-اپی براسینولید

۱۰ میلی گرم ۲۴-اپی براسینولید (mW=۴۸۰/۷) از Sigma (USA) خریداری و ۱۰ میلی لیتر محلول پایه (Stock) آن (با غلظت 10^{-3}×۰/۲۰۸۳ مول) با استفاده از اتانول ساخته شد و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد، سپس از محلول پایه به مقدار مناسب برداشته و محلول 10^{-8} مول ۲۴-اپی براسینولید با استفاده از آب تهیه گردید و مورد استفاده قرار گرفت. همه محلولها حاوی توین-۲۰ (۰/۰۱درصد) بود، این ترکیب بعنوان یک روکنشگر(Surfactant) برای افزایش جذب

سطحی ۲۴-اپی براسینولید استفاده گردید.

پتانسیل اسمزی محلول PEG 6000 از معادله ارائه شده توسط Money استفاده گردید(۲۸).

، فشار اسمزی (مگا پاسکال)=(OP) $OP=a.C + b.C^2$

(b= ۹۸۰ و a= -۱۲/۱، مولاریته پلی اتیلن گلیکول =C

مطالعات مورفولوژیک (اندازه گیری طول ریشه چه و محور زیر لپه گیاهچه)

برای محاسبه طول ریشه‌چه و محور زیر لپه از گیاهچه‌های ۷ روزه‌ای که در محلول‌های مورد نظر رشد کرده بودند استفاده شد و از هر پتری ۷ نمونه برداشته شد سپس قسمت هوایی و ریشه چه از هم جدا گردیدند. طول ریشه چه و محور زیر لپه با استفاده از خط کش اندازه گیری شد. در هر تکرار میانگین طول ریشه‌چه و محور زیر لپه در ۷ نمونه محاسبه گردید و براساس واحد سانتی متر گزارش شد.

مطالعات بیوشیمیایی

سنجش غلظت پروتئین به روش برادفورد

یک گرم بافت تر با ۵ میلی لیتر بافر تریس-HCl ۰/۰۵ مولار با pH=۷/۵ در دمای ۴-۰ درجه سانتیگراد بخوبی ساییده شد. محلول حاصل به مدت ۲۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g ، با استفاده از سانتریفیوژ یخچالدار در دمای ۴ درجه سانتیگراد ، سانتریفیوژ گردید. به منظور سنجش غلظت پروتئین، به لوله‌های آزمایش مقدار ۰/۱ میلی لیتر عصاره پروتئینی و ۵ میلی لیتر معرف بیوره طبق روش برادفورد (۸) استفاده و سریعا ورتکس شد. پس از ۲۵ دقیقه، جذب آنها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و مقدار پروتئین در هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد (محلول استاندارد آلبومین گاوی) تعیین گردید و بر حسب mg/g FW بیان شد.

سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدها

مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشائی بر اساس تشکیل کمپلکس مالون‌دآلدئید ایجاد شده با تیوباربیتوریک اسید (TBA)سنجش شد. غلظت مالون دآلدئید با استفاده از روش Packer & Heath (۱۸) در طول موج ۵۵۰ نانومتر با استفاده ازاسپکتروفتومتر صورت گرفت. جذب سایر رنگیزه‌های غیر اختصاصی در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این مقادیر کسر شد. برای محاسبه غلظت مالون دآلدئید از فرمول A= ε bcبا ضریب خاموشی(ε) معادل ۱۵۵mM استفاده گردید.

اندازه گیری مقدار پرولین

۰/۰۱ گرم بافت تر در ۱۰ میلی لیتر محلول ۳ درصد اسید سولفوسالیسیلیک سائیده و مخلوط یکنواختی تهیه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شد و از معرف نین هیدرین طبق روش Bates و همکاران (۶) استفاده شد. جذب فاز رنگی فوقانی که حاوی تولوئن و پرولین بود در ۵۲۰ نانومتر خوانده شد و مقدار پرولین در هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد تعیین گردید و بر حسب mM/g FW بیان شد.

اندازه‌گیری مقدار قندهای احیا کننده

مقدار قندهای احیا کننده در گیاهچه با استفاده از روش سوموگی اندازه گیری شد(۳۸). ۰/۰۲ گرم بافت تر با ۱۵ میلی لیتر آب مقطر سائیده شد، سپس مقدار قندهای احیا کننده در برگ‌ها با استفاده از روش سوموگی اندازه‌گیری

شد(۳۹). شدت جذب محلولها در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت قندهای احیاکننده بر حسب mg/lit محاسبه شد.

انجام الکتروفورز با تکنیک SDS-PAGE

جهت انجام الکتروفورز پروتئین‌های گیاهچه‌های مورد آزمایش، از تکنیک SDS-PAGE به روش(۱۹۷۰) Laemmli استفاده گردید(۲۶). ژل بالایی الکتروفورز (متراکم کننده) دارای غلظت ۴ درصد و ژل پایینی (تفکیک کننده) دارای غلظت ۱۲/۵ درصد بود، برای تعیین تقریبی وزن مولکولی هر باند پلی پپتیدی روی ژل، تحرک نسبی باند پروتئین‌های مارکر #SMO 661 ساخت شرکت فرمانتس با تحرک نسبی پروتئین‌های به دست آورده تطبیق داده شد. دستگاه الکتروفورز عمودی ژل بزرگ مورد استفاده در این پژوهش، ساخت شرکت Consort N. V. انگلیس بوده و منبع تغذیه از نوع Consort E 802 بوده که ولتاژ ۱۰۰ ولت را در داخل ژل فوقانی و ۱۲۰ ولت را در داخل ژل جدا کننده تامین کرد.

استخراج پروتئین از بافت گیاهچه کلزا و آماده سازی نمونه (۴)

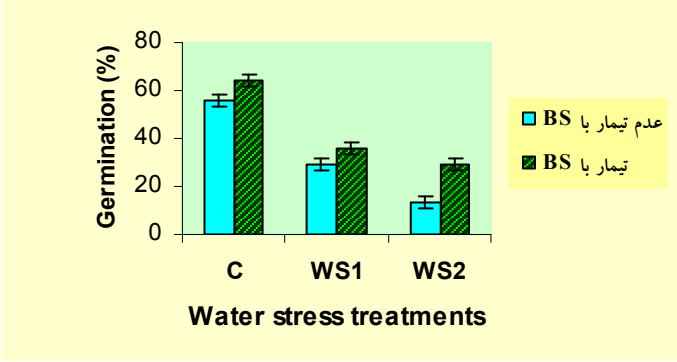
یک گرم بافت تازه با ۲/۵ میلی لیتر بافر استخراج تریس-ساکارز (شامل ۱/۲۲ گرم تریس+۴/۸ گرم ساکارز+۴ میلی گرم PEG+۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر با pH=7.5) در دمای ۴-۰ درجه سانتیگراد بخوبی ساییده شد و محلول حاصل با استفاده از سانتریفیوژ مدل Napco ۲۰۲۸R به مدت ۱۰ دقیقه در g ۵۰۰۰ و دمای صفر درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد و از محلول رویی ۲۵ میکرولیتر برداشته و با حجم مساوی از بافر نمونه (شامل ۲/۵ میلی لیتر بافر ژل فوقانی+۴ میلی لیتر SDS ده درصد+۲ میلی لیتر گلیسرول+ ۰/۵ میلی لیتر ۲مرکاپتواتانول+یک میلی لیتر آب مقطر و ۲ میلی لیتر برموفنل بلو ۰/۱ درصد pH=6.8) مخلوط گردید و نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند، پس از سرد شدن نمونه‌ها را به مدت ۵ دقیقه در g ۱۲۰۰ میکروفیوژگردیدند و از محلول رویی جهت تزریق در ژل استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

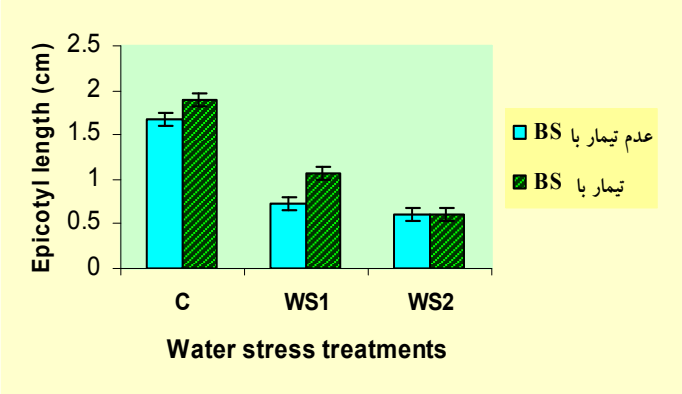
همه تجزیه و تحلیل‌های آماری طبق طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت. برای ارزیابی اثر دو تیمار روی صفت اندازه‌گیری شده همه داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS و Excel تحت آنالیز واریانس دو طرفه (ANOVA) قرار گرفتند و اختلاف میانگین‌ها با روش LSD ($P_{Value}\leq 0.05$) مقایسه شدند.

نتایج

نتایج حاصل از تاثیر تنش کم آبی، تیمار ۲۴-اپی براسینولید و تنش کم آبی توام با تیمار ۲۴-اپی براسینولید بر جوانه زنی بذرهای گیاه کلزا نشان داد که درصد جوانه زنی در بذور شاهد به طور چشمگیری بیشتر از تیمارهای کم آبی بوده و بیشترین کاهش درصد جوانه زنی (۱۳درصد) مربوط به تیمار کم آبی شدید (MP ۰/۴-) می باشد. همانطوری که در نمودار ۱ مشاهده می شود، درصد جوانه زنی در محلول حاوی ۲۴-اپی براسینولید با غلظت 10^{-8} مولار افزایش قابل ملاحظه ای نسبت به شاهد داشته است. همچنین در محلولهای حاوی پلی اتیلن گلیکول و ۲۴-اپی براسینولید افزایش معنی داری در جوانه زنی بذرها، نسبت به



نمودار ۱ : تغییرات درصد جوانه زنی در تیمارهای مختلف تنش آبی (تیمار با ۲۴-اپی براسینولید و عدم تیمار با ۲۴-اپی براسینولید)، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار.
C: شاهد WS1: تنش کم آبی ملایم WS2: تنش کم آبی شدید

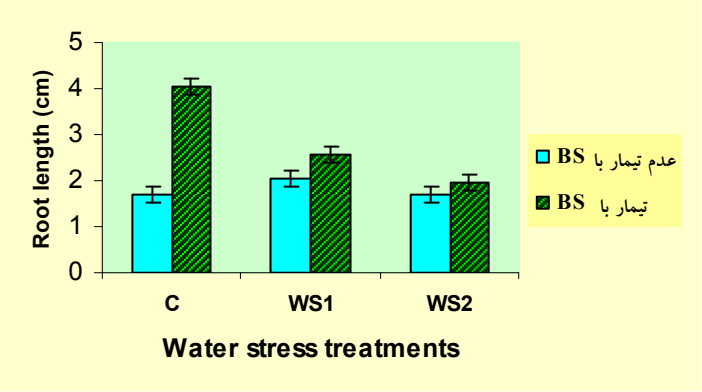


نمودار ۲ : تغییرات طول محور زیر لپه در تیمارهای مختلف تنش آبی (تیمار با ۲۴-اپی براسینولید و عدم تیمار با ۲۴-اپی براسینولید)، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار.
C: شاهد WS1: تنش کم آبی ملایم WS2: تنش کم آبی شدید

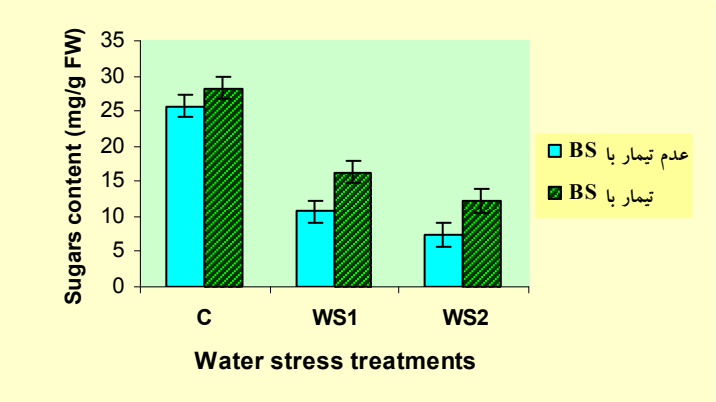
محلول‌های حاوی پلی اتیلن گلیکول به تنهایی مشاهده می شود.

با توجه به نتایج به دست آمده در این آزمایش، طول محور زیر لپه تحت تنش کم آبی کاهش چشمگیری یافته است (نمودار ۲). و همانطوریکه در شکل ۲ مشاهده می‌شود کاربرد ۲۴-اپی براسینولید موجب افزایش معنی دار طول محور زیر لپه گیاهچه‌ها شده است. بررسی نتایج نشان داد که تیمارهای کم آبی ملایم و شدید باعث افزایش معنی دار طول ریشه گیاهچه‌ها نسبت به شاهد شده است(نمودار ۳). همچنین افزایش طول ریشه چه‌ها در گیاهچه‌های تیمار شده با ۲۴-اپی براسینولید نسبت به گیاهچه هایی که با ۲۴-اپی براسینولید تیمار نشده‌اند مشاهده شده است (شکل ۲) .

نتایج حاصل از تیمارهای کم آبی، ۲۴-اپی براسینولید و کم آبی-۲۴-اپی براسینولید بر مقدار قندهای احیا کننده در برگهای گیاهچه کلزا در نمودار ۴ نشان داده شده است. تنش کم آبی در گیاهچه‌های کلزا، منجر به کاهش معنی دار مقدار قند گردیده ولی کاربرد محلول ۲۴-اپی



نمودار ۳: تغییرات طول ریشه چه در تیمارهای مختلف تنش آبی (تیمار با ۲۴-اپی براسینولید و عدم تیمار با ۲۴-اپی براسینولید)، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار.
C: شاهد WS1: تنش کم آبی ملایم WS2: تنش کم آبی شدید

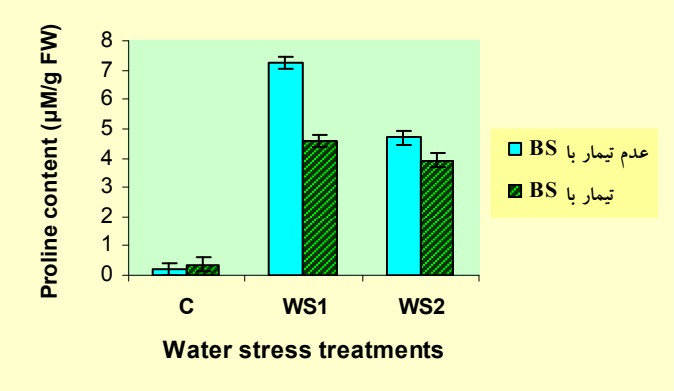


نمودار ۴ : تغییرات مقدار قند برگها در تیمارهای مختلف تنش آبی (تیمار با ۲۴-اپی براسینولید و عدم تیمار با ۲۴-اپی براسینولید)، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار.
C: شاهد WS1: تنش کم آبی ملایم WS2: تنش کم آبی شدید

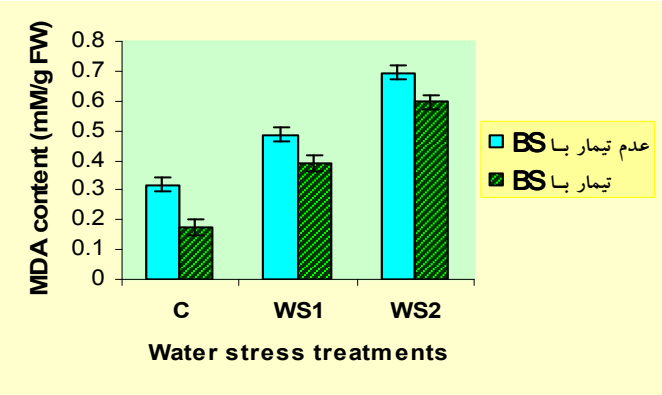
براسینولید با غلظت 10^{-8} مولار موجب افزایش معنی دار مقدار قند شده است. تیمار نمودن گیاهچه هایی که تحت تنش کم آبی بوده‌اند با ۲۴-اپی براسینولید باعث افزایش معنی دار مقدار قند نسبت به گیاهچه‌های تحت تنش کم آبی به تنهایی نیز شده است(نمودار ۴).

نتایج حاصل از سنجش پرولین نشان داد که مقدار پرولین گیاهچه‌های تحت تاثیر تیمارهای فوق تغییر قابل توجهی پیدا کرده است. تیمار کم آبی سبب افزایش معنی دار پرولین در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد شده، در حالی که در تیمارهای کم آبی توام با ۲۴-اپی براسینولید کاهش معنی دار مقدار پرولین در مقایسه با تیمارهای کم آبی شده است (نمودار ۵).

نتایج حاصل از تاثیر تیمارهای ۲۴-اپی براسینولید در شرایط کنترل، کم آبی ملایم و شدید بر مقدار مالون دآلدئید گیاهچه‌های کلزا در نمودار ۶ نشان داده شده است. مالون دآلدئید شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدها در



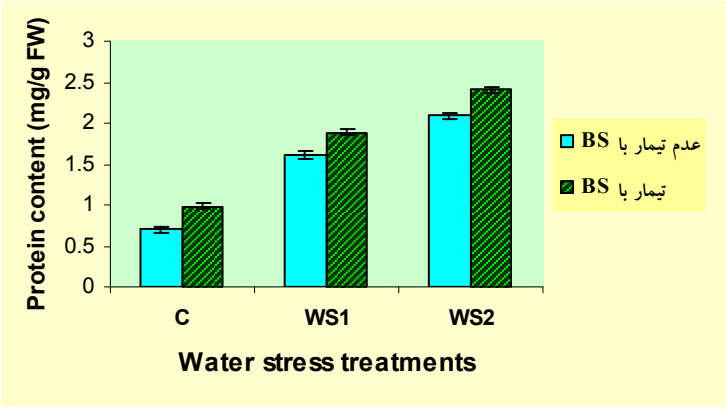
نمودار ۵ : تغییرات مقدار پرولین برگها در تیمارهای مختلف تنش آبی (تیمار با ۲۴-اپی براسینولید و عدم تیمار با ۲۴-اپی براسینولید)، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار.
C: شاهد WS1: تنش کم آبی ملایم WS2: تنش کم آبی شدید



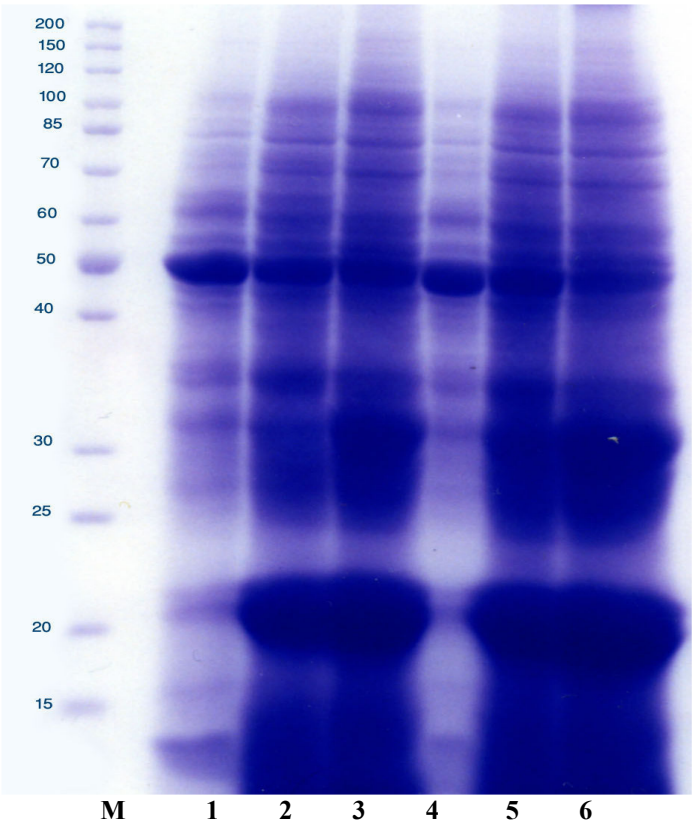
نمودار ۶ : تغییرات مقدار مالون دآلدئید برگها در تیمارهای مختلف تنش آبی (تیمار با ۲۴-اپی براسینولید و عدم تیمار با ۲۴-اپی براسینولید)، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار.
C: شاهد WS1: تنش کم آبی ملایم WS2: تنش کم آبی شدید

نظر گرفته شده است. در این آزمایش مقدار مالون دآلدئید تحت تنش کم آبی افزایش معنی داری یافت و بیشترین مقدار در گیاهانی مشاهده گردید که تحت تنش کم آبی شدید قرار داشتند و کاربرد ۲۴-اپی براسینولید موجب کاهش چشمگیر مقدار پراکسیداسیون لیپیدها و در نتیجه کاهش معنی دار مقدار مالون دآلدئید در گیاهان تحت تیمارهای کم آبی در مقایسه با همان تیمارها بدون ۲۴-اپی براسینولید شده است، که نشان می دهد خسارت اکسیداتیو به مقدار کمتر در گیاهان تیمار شده با ۲۴-اپی براسینولید رخ داده است.

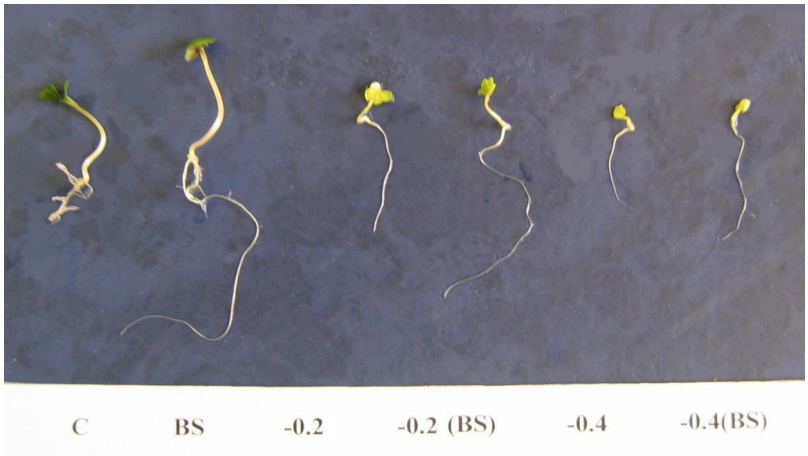
در نمودار ۷ مشاهده می شود که در اثر تیمار کم آبی، مقدار پروتئین گیاهچه‌های کلزا به طور چشمگیری افزایش یافته است ، به طوریکه در گیاهچه هایی که تحت تنش کم آبی شدید قرار داشتند مقدار افزایش پروتئین بیشتر از گیاهچه‌های شاهد و گیاهچه هایی می باشد که تحت تنش کم آبی ملایم قرار گرفتند. با توجه به نمودار مذکور مقدار پروتئین موجود در عصاره نمونه هایی که با ۲۴-اپی براسینولید تیمار شدند نسبت به گیاهچه هایی که با



نمودار ۷ : تغییرات مقدار پروتئین برگها در تیمارهای مختلف تنش آبی (تیمار با ۲۴-اپی براسینولید و عدم تیمار با ۲۴-اپی براسینولید)، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار.
C: شاهد WS1: تنش کم آبی ملایم WS2: تنش کم آبی شدید



شکل ۱ : تاثیر تیمارهای مختلف تنش آبی و براسینولید بر باندهای الکتروفورزی پروتئینهای برگ
M= مارکر (مخلوطی از پروتئین با وزنهای مولکولی ۱۵-۲۰۰ کیلودالتون)
۱= شاهد ۲: تنش کم آبی ملایم ۳: تنش کم آبی شدید
۴= تیمار با ۲۴-اپی براسینولید ۵= تنش کم آبی ملایم همراه ۲۴-اپی براسینولید.
۶= تنش کم آبی شدید همراه ۲۴-اپی براسینولید.



شکل ۲: گیاهچه‌های کلزا تحت تیمارهای مختلف
C= کنترل BS=تیمار با براسینولید -0.2= تنش کم آبی ملایم
-0.4: تنش کم آبی شدید (BS)=تنش کم آبی توام با براسینولید

۲۴-اپی براسینولید تیمار نشدند افزایش معنی داری در سطح پنج درصد نشان می دهد. مقایسه باندهای پروتئینی حاصل از الکتروفورز پروتئین برگ‌های کلزا تحت تیمارهای کم آبی نشان داد که تفاوتهایی در باندهای الکتروفورزی نسبت به گیاهچه‌های شاهد وجود دارد. بدین معنی که چندین پروتئین با وزن مولکولی در محدوده ۱۰۲ و ۸۲، ۳۵، ۳۱، ۲۱، ۱۹ دالتونی تحت تنش کم آبی افزایش یافته اند (شکل ۱).

همچنین مشاهده باندهای پروتئینی الکتروفورز نشان می دهد که در گیاهچه‌های تیمار شده با ۲۴-اپی براسینولید نسبت به شاهد پروتئینهای ۸۲ و ۵۰ کیلو دالتونی افزایش پیدا کرده‌اند (شکل ۱). در گیاهانی که تحت تنش کم آبی و ۲۴-اپی براسینولید قرار گرفتند نسبت به گیاهانی که فقط تحت تنش کم آبی قرار داشتند نیز باندهای ۵۰ و ۳۱، ۲۱ کیلودالتونی پر رنگتر شده اند.

بحث و نتیجه‌گیری

رویش بذر گیاهان با جذب شدید آب شروع شده که قسمت اعظم آن به جنین می رود. پس از آن متابولیسم با شدت شروع می شود و متابولیت‌های لازم جهت سنتز و تقسیم یاخته‌ای را برای جنین فراهم می آورند. در مرحله بعدی ابتدا ریشه‌چه و سپس محور زیر لپه به صورت برجستگی در خارج ظاهر شده و دانه از جای خود بلند می شود(۲). مشاهده کاهش قابل ملاحظه درصد جوانه زنی در این تحقیق احتمالا به دلیل زیاد بودن فشار اسمزی ایجاد شده توسط پلی اتیلن گلیکول بوده که در جذب آب توسط بذر مشکل ایجاد می کند و مزاحم رویش بذر و کاهش معنی دار درصد جوانه زنی بذور کلزا می شود(۱۱).

در این بررسی درصد جوانه زنی بذور کلزا توسط محلول ۲۴-اپی براسینولید افزایش پیدا کرده است. Steber و Court MC در مطالعه بر روی گیاهان آرابیدوپسیس نتایج مشابهی به‌دست آوردند و بیان کردند که براسینولید نقش مشابه جیبرلین در جوانه زنی بذر داشته است و کاهش بیوسنتز و حساسیت به اسید آبسیزیک یا افزایش بیوسنتز و حساسیت به جیبرلین، دلیل افزایش جوانه زنی بذرهای خیسانده شده در محلول

حاوی ۲۴-اپی براسینولید می باشد، همچنین ممکن است تحریک جوانه زنی توسط براسینواستروئیدها به علت تحریک رشد هیپوکوتیل و توسعه جنین باشد(۴۰). نتایج مشابهی در گیاهان گندم، برنج، کلزا، بادام زمینی و اکالیپتوس به دست آمده است (نقل از مرجع ۳۳).

در این تحقیق کاهش طول محور زیر لپه تحت تنش کم آبی مشاهده شد (نمودار۲). رشد سلول حساسترین فرایند گیاه تحت تنش کم آبی است، به این علت که فشار تورگر به عنوان نیروی فیزیولوژیکی موثر برای توسعه سلول می باشد (۲۰ و ۲۵). گزارش شده که تنش کم آبی روی میزان نسبی تقسیم سلول و میزان نسبی توسعه سلول اثر می گذارد و بیان کردند که احتمالا کاهش در تقسیم سلولی به دلیل اثرات کمبود آب روی فعالیتهای سازندگی از قبیل ساخت DNA وRNA و مواد جداره سلولی می باشد(۱۵).

حساسیت رشد ریشه و ساقه به تنش کم آبی متفاوت است، دراین تحقیق کاهش رشد محور زیر لپه تحت تنش کم آبی مشاهده شد در حالی که رشد ریشه چه افزایش نشان داد (نمودارهای ۲ و ۳).

بیان شده که براسینواستروئیدها توانایی تحریک رشد را دارند که به علت تحریک تقسیم و توسعه سلولی می باشد(۴۲). در این بررسی افزایش رشد محور زیر لپه و ریشه چه در گیاهچه‌های تیمار شده با ۲۴-اپی براسینولید مشاهده شده است (نمودار ۲ و ۳). تحریک رشد میانگره دوم گیاه سویا و باقلا، محور زیر لپه نخود و لوبیا و رشد ریشه گیاهچه‌های *Pinus rediata* نیز با کاربرد ۲۴-براسینولید مشاهده شده است (۳۳).

Clouse و Zuuurek (۱۹۹۴) گزارش داده‌اند که احتمالا افزایش مقدار DNA وRNA، افزایش بیوسنتز پروتئین ها، سلولاز و میکروتوبولها و تغییر خصوصیات مکانیکی دیواره دلیل افزایش رشد در گیاهان سویا تیمار شده با براسینواستروئید می باشد (۴۳). علاوه بر این طول ریشه چه و محور زیر لپه گیاهچه‌های تیمار شده با ۲۴-اپی براسینولید تحت تنش کم آبی بیشتر از گیاهچه‌های تحت تنش به تنهایی است علت آن احتمالا کاهش اثر مهار کنندگی رشد تحت تنش است. این نتایج با افزایش رشد گیاهچه‌های گوجه و بادمجان، خیار و نخود تیمار شده با براسینولید که تحت تنش کم آبی قرار داشتند مطابقت دارد (۲۳).

در گیاهچه‌های کلزا تحت تنش کم آبی مقدار قند کاهش نشان داد، همانطوریکه در تحقیقات زیادی نشان داده شده، کاهش مقدار قند می تواند به علت کاهش فتوسنتز باشد. زیرا کاهش آب موجب کاهش تورگر شده و از دست دادن فشار تورگر منجر به بسته شدن روزنه‌ها و در نتیجه کاهش غلظت دی اکسید کربن داخلی و کاهش مقدار فتوسنتز می گردد. همچنین تنش کم آبی با ممانعت نوری موجب کاهش کربوکسیلاسیون چرخه کالوین می شود و ظاهرا انتقال الکترون یک عامل محدود کننده است، علاوه بر این کاهش غیر قابل برگشت در ظرفیت فتوسنتزی به علت صدمه غشایی در کلروپلاست، سنتز قند را کاهش می دهد (۳). در این تحقیق، در گیاهچه‌های کلزا تیمار شده با ۲۴-اپی براسینولید توام با تنش کم آبی مقدار تجمع قندهای احیا کننده افزایش یافته است، به نظر می رسد ۲۴-اپی براسینولید یک نقش حفاظتی برای گیاهچه‌های کلزا داشته که مانع می شود که در تنش کم آبی شرایط سخت برای آنها ایجاد شود و موجب حفاظت دستگاه فتوسنتزی در برابر تنش اکسیداتیو می شود. در گیاهان خیار و چغندر قند تیمار شده با ۲۴-اپی براسینولید، نیز افزایش تجمع قندهای محلول تحت تنش کم آبی مشاهده شده است (۳۲). افزایش قندها در گیاهچه‌های تیمار شده با براسینولید

موجب تنظیم اسمزی، جذب بیشتر آب و حفاظت ساختمان پروتئین و غشاها و افزایش تحمل در مقابل تنش کم آبی می شود(۱۷).

پرولین اسید آمینه کلیدی در تنظیم اسمزی است، علاوه بر این پرولین منبع نیتروژن و کربن برای رشد و ترمیم گیاهان و یک خورنده رادیکال‌های آزاد نیز محسوب می شود (۲۹ و ۳۵). در این تحقیق مقدار پرولین در گیاهان تحت کم آبی به طور معنی داری افزایش نشان داده است (نمودار۵). افزایش مقدار پرولین تحت تنش اسمتیک ناشی از محلول پلی اتیلن گلیکول در گیاه برنج نیز مشاهده شده است(۳۱). Pustovoitova و همکاران (۲۰۰۰) بیان کردند که در گیاهان خیار تحت تنش کم آبی مقدار اسید آمینه‌ها و آمیدهایی مانند گلیسین، آلانین و پرولین افزوده شدند. این مواد در تنظیم اسمزی نقش داشته و موجب افزایش مقاومت در برابر تنش می شوند. در گیاه ذرت نیز تحت تنش کم آبی افزایش مقدار پرولین گزارش شده است و بیان شده احتمالا به دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های بیوسنتز کننده پرولین (P5CR پیرولین-۵-کربوکسیلات رداکتاز) و کاهش فعالیت PDH (پرولین دهیدروژناز) بوده است (۳۲).

کاهش پرولین در گیاهچه‌های کلزا تیمار شده با ۲۴-اپی براسینولید در این تحقیق مشاهده شد (نمودار۵)، مشخص شده براسینواستروئیدها تقریبا بر اکثر واکنش‌های متابولیسمی گیاه تاثیر می گذارند و موجب تغییراتی در آنها می شوند. این تغییرات اغلب به صورت سازش هایی است که مقدار تحمل و سازگاری گیاهان را در مقابل عوامل نامساعد محیطی افزایش می دهد(۲۲). کاهش پرولین در گیاهچه‌های تیمار شده با ۲۴-اپی براسینولید ممکن است به دلیل افزایش سنتز پروتئینها (شرکت پرولین در ساختمان پروتئین ها) (۱۲) و کاهش تجزیه پروتئینها (آزاد سازی) (۱۴) در این گیاهان باشد.

تحت شرایط نامساعد محیطی مثل کمبود آب گونه‌های فعال اکسیژن تولید و تجمع می یابند، گونه‌های فعال اکسیژن در سلولهای گیاهی محلهای هدف مختلفی مانند لیپیدها، رنگدانه ها، پروتئینها و اسیدهای نوکلئیک دارند. لیپیدها از جمله ماکرومولکولهای حیاتی سلول هستند که تحت کم آبی پراکسیده می شوند و بعلت شرکت لیپیدها در ساختمان غشاهای زیستی ، تخریب این مولکولها ساختار غشایی را در بسیاری از سلولها مختل می کند(۲۱، ۳۶ و ۳۸). گزارش شده که در اثر پراکسیداسیون لیپیدها تحت تنش کم آبی، تولید مالون دالدئید در برگها و ریشه‌های گیاهان گندم افزایش یافته است (۳۷). افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در این تحقیق در تیمارهای کم آبی به وضوح مشاهده شده و میزان پراکسیداسیون لیپید القا شده بوسیله تنش کم آبی در گیاه کلزا تیمار شده با ۲۴-اپی براسینولید نسبت به گیاهچه‌های تحت تنش کم آبی به تنهایی به طور معنی داری کاهش یافته است (نمودار ۶). کاهش تجمع مالون دآلدئید در تیمار ۲۴-اپی براسینولید توام با تنش کم آبی احتمالاً نشان دهنده کاهش پراکسیداسیون لیپید و سالم ماندن بیشتر غشا تحت کم آبی می باشد. گزارشی نیز مبنی بر کاهش مالون دآلدئید وجود دارد و احتمالا افزایش مقدار و فعالیت آنزیمها و پروتئینهای دفاعی در حفاظت ساختمان کلروپلاست، دستگاه فتوسنتزی و کاهش تنش اکسیداتیو حاصل از تنش کم آبی نقش دارند (۳۰).

برای خنثی کردن اثر سمی گونه‌های فعال اکسیژن سیستمهای آنتی اکسیدان خیلی موثر نیاز است که شامل دو سیستم غیر آنزیمی و آنزیمی در سلول‌های گیاهی است. افزایش تولید آنزیمهای آنتی اکسیدان برای خاموش کردن این رادیکال‌های فعال، در تنش کم آبی

مشاهده شده است (۴۱). علاوه بر این تنش کم آبی منجر به فعالیت ژنهای حفاظتی شده که پروتئین‌های دهیدرین، LEA[1]، HSP[2]، RAB[3] و LTP[4] را کد می کنند (۹ و ۳۴).

مشاهده شده که بسیاری از LEAs بوسیله تنش اسمتیک در گیاه آرابیدوپسیس القا شده است که در سیتوپلاسم و هسته تجمع می یابند، تجمع LEAs منجر به اکتساب مقاومت در برابر از دست رفتن آب می شود (۷).

در این تحقیق افزایش در محتوی پروتئینی تحت تنش کم آبی مشاهده شد (نمودار ۷). گزارش شده است که این افزایش پروتئین‌ها تحت کم آبی احتمالا بدلیل سنتز آنزیمها و پروتئینهای دفاعی جدید می باشد(۱۹).

با توجه به باندهای الکتروفورزی بدست آمده سنتز پروتئینهای ۱۰۲ و ۸۲، ۳۵، ۳۱، ۲۱، ۱۹ کیلو دالتونی تحت تنش کم آبی افزایش یافته و به نظر می رسد نقش مهمی در افزایش مقاومت گیاه به کم آبی و پاسخ گیاه به این تنش داشته باشند (شکل ۱). در گیاه سویا نیز تنش کم آبی موجب تغییراتی در متابولیسم دیواره سلولی شده در نتیجه پروتئینهای ۸۲ و ۷۲، ۵۷، ۳۵ کیلودالتونی که از اجزا ساختاری دیواره سلولی هستند تجمع می یابند، گزارش شده است که این پروتئین‌ها در تنظیم رشد و سازگاری گیاهان تحت تنش نقش دارند(۴۱). در گیاه سیب زمینی نیز پروتئینهای ۳۲ و ۳۴ کیلو دالتونی که احتمالا در سنتز گلسین بتائین و حفاظت کلروپلاست نقش دارند افزایش یافته است(۳۷).

در این بررسی کاربرد ۲۴-اپی براسینولید منجر به افزایش مقدار پروتئین کل در همه تیمارها شده است (نمودار ۷). مشاهده باندهای پروتئینی الکتروفورز نیز نشان می دهد که در برگ گیاهان تیمار شده با ۲۴-اپی براسینولید پروتئین‌های ۵۰ و ۳۱، ۲۱ کیلو دالتونی افزایش پیدا کرده‌اند(شکل ۱).

افزایش سنتز پروتئینها در گیاهان مختلفی که توسط براسینواسترئیدها تیمار شده‌اند مشاهده شده است. Pustovoitova و همکاران(۲۰۰۰) بیان کردند که ۲۴-اپی براسینولید منجر به افزایش مقدار پروتئین‌های HSP تحت تنش کم آبی شده که مقامت گیاهان را به تنش افزایش می دهد(۳۲). Browning و Dhaubhadel (۱۹۸۳) گزارش کردند که در گیاهان کلزا تیمار شده با ۲۴-اپی براسینولید قرار گرفته در دمای بالا تعداد چهار عدد HSP که در شرایط دمای نرمال هم سنتز می شدند افزایش یافته که موجب بقا بیشتر این گیاهان در شرایط تنش می شود (نقل از مرجع ۱۳).

در مجموع ۲۴-اپی براسینولید با اثراتی که در تجمع قندهای محلول، تنظیم اسمزی و افزایش پروتئینهای دفاعی بر جای گذاشته، باعث حفظ آماس و حجم سیتوزولی شده، ساختمان غشاهای سلولی را محافظت نموده موجب ایجاد محیطی سازگار برای ماکرومولکولهای سلول می شود در نتیجه مانع قرار گرفتن گیاهان در شرایط سخت ایجاد شده بوسیله تنش می شود. بنابراین نقش حفاظتی برای آنها ایفا می نماید. بطور کلی این تحقیق نشان داد که ۲۴-اپی براسینولید می تواند مقاومت گیاهان کلزا را در برابر تنش کم آبی افزایش دهد. با تحقیق بیشتر کاربرد احتمالی این ماده در کشاورزی پایدار مشخص تر خواهد شد.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر محمد میرزایی ریاست محترم

1. Late Embryogenesis Abundant
2. Heat Shock Protein
3. Response to ABA
4. Lipid Transfer Protein

مرکز علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی بخاطر اجازه استفاده از امکانات آزمایشگاهی آن مرکز به مولف این مقاله تشکر و قدردانی می شود.

فهرست منابع

۱. علیزاده، امین. کرامر، پال جی. رابطه آب خاک و گیاه. نشر مشهد، مشهد، ۷۴۴ صفحه، ۱۳۷۴.

۲. قربانلی، م. هلر، ر. فیزیولوژی گیاهی جلد ۲. مرکز نشر دانشگاهی .تهران. ۲۶۷ صفحه، ۱۳۷۵.

۳. کافی، محمد. بسرا، آ و بسرا، ر. مکانیسمهای مقاومت به تنشهای محیطی در گیاهان. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ۳۹۰ صفحه، ۱۳۷۹.

4. H., Ahmad. Principles and reaction of protein extraction, purification and characterization . *Science.* 432 pages. (2005)

5. A., Bajgaz, Effect of brassinosteroids on nucleic acids and protein content in cultured cells of *Chorella vulgaris*. *Plant Physiology and Biochemistery*. 38: .209-215. (2000).

6. L. S., Bates, R. P. Waldern and I. D. Teare. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil.* 39: 205-207. (1973).

7. M., Black, & H.W. Pritchard. Desiccation and survival in plants drying without dying. *CABI International*. London U.K. 413 pages. (2002).

8. M.M. Bradford, A rapid & sensitive method for the quantitation of microgarm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254. (1976).

9. A., Caruso, D. Morabito & F. Delmotte**.** Dehydrin induction during drought and osmotic stress in *Populus*. *Plant Physiology and Biochemistry.* 40:1033-1042. (2002).

10. D., Clous, Steven, M., Sasse, Brassinosteroids: Essential Regulators of Plant Growth & Development. *Annual reviews.* 49: 427-451. (1998).

11. J.W., Christian, C. W. Jeffery, K. M. Aaron & J. S. Steven. Oat germination characteristics differ among genotypes, seed sizes and osmotic potentials. *Crop science.* 45:2023-20929. (2005).

12. D. A., Devitt, L. H. Stolzy & C. K. Labanauskas. Impact of potassium, sodium and salinity on protein and free amino acid content of wheat grain. *Plant Soil.* 103:101. (1987).

13. S., Dhaubhadel, K. S. Browning , D.R. Gallie , P. Krishna. Brassinosteroid functions to protect the translational machinery and heat-shock protein synthesis following thermal stress.*Plant.*29:681-691. (2002).

14. R. S. Dubey & Rani M. Salinity induced accumulation of free amino acids in germination rice seeds differing in salt tolerance. *Agron. Crop. Sci.* 163:236. (1989).

15. C. Granier and F. Tardieu. Water Deficit and spatial pattern of leaf development. *Plant Physiology.* 119:609-619. (1999).

16. M. D., Grove, G. F. Spencer, W. K. Rohwedder, N. B. Mandava, J. F. Worley and J. D. Wathen. Brassinolide a plant growth promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature.* 281:216-217. (1979).

17. P.D., Hare, W.A. Cress & J. Staden. Dissecting the

role of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell and Environment.* 21: 535-553. (1998).

18. R. L. Heath and L Packer. Photoperoxidation in isolated choloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 189-198. (1969).
19. F. A., Hoekstra, E.A. Golovina & J. Buitink. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Plant Science.* 6: 431-438. (2001).
20. T.H., Hsieh, J.T. Lee ., Y.Y. Charng & M.T. Chan. How to define resistance to water deficit stress? *Plant Physiology.* 130: 618-626. (2002).
21. I.O., Inaki, P.R. Escurede.& M.B. Ecana. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiology*. 116:173-181. (1998).
22. S. Jaisingh., Nakamura, & Y. Ota. Effect of epi-brassinolide on gram (*Cicer arientinum*) plants grow under water stress in juvenile stage. *Indian Journal of Agriculture Science.*63: 394-397. (1993).
23. V. A., Khripach, V.N. Zhabinskii, & A.E. Groot. Brassinosteroids: A New Class of Plant Hormones. *Acadamic press.* United States of America. 460 pages. (1998).
24. V.A, Khripach, V.N. Zhabinskii & A.E. Groot. Twenty years of brassinosteroidal plant hormones Warrent Better Crops for the XXI century. *Annals of Botany*. 80: 440-447. (2002)**.**
25. H., Kirnak, C. Kaya., I. TAS & D. Higgs. The influence of water deficit on vegetative growth, physiology, fruit yield & quality in egg plants. *Plant Physiology*. 27: 34-46. (2001).
26. U. K. Laemmli, Cleavage of structural protein during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.*227:680-685. (1970).
27. B., Loggini, Scartazza, A., Brugnoli, E., Navari – Izzo, F., Antioxidative defense system pigment composition and photosynthetic effiency in two wheat cultivars subjected to Drought. *Plant Physiology*.119: 1091-1100. (1999).
28. N.P. Money, Osmotic pressure of aqueous polyethylene glycols by plants and their effects on plant molecular weight and vapor pressure deficit . *Plant Physiogyl.* 91:766-769. (1989).
29. H., Nayyar, Accumulation of osmolytes &osmotic adjustment in water-stressed wheat and maize as affected by calcium and its antagonists. *Environmental & Experimental Botany.* 50:253-264. (2003).
30. F., Ozdamir, M. Bor, T. Demiral, & I. Turkan. Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and ant oxidative system of rice (*Oriza sativa* L.) under salinity stress. *Plant growth Regulation*. 42: .203-211. (2004).
31. R. Pandey, & R. M. Agarwal. Water stress-induced change in proline contents and nitrate reductase Activity in Rice under light and dark condition. *Physiology and Moecular Biology of Plants.* 4:53-57. (1998).
32. T.N., Pustovoitova, N.E. Zhdonova & V.N. Zholkevich. Epibrassinolide increase plant drought resistance. *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 376: 36-38. (2000).
33. S., Ram Rao, B. Vidya Vardhini., E. Sujatha & S. Anuradha. Brassinosteroids- a new class of phytohormones. *Current science.* 82:1239-1245. (2002).

34. S. Ramo, & E. Labrador. Water stress-regulated gene expression in *Cicer arietinum* seedlings and plants. *Plant Physiology and Biochemistry.* 39:1017-1026. (2001).

35. , F. J., Sanchez J.L. Tenorio & L. Ayerbe. Growth and epicotyls and turger maintenance and osmotic adjustment in pea plant (*Pisum sativum L.*) subjected to water stress. *Field Crops Research.* 86:81-90. (2003).

36. H., Saneoka, R.E.A., Moghaieb, G.S., Premachandra, K., Fujita, Nitrogen nutrition and water stress effects on cell membrane stability and leaf water relations in Agrostis palustris Huds. *Environmental and Experimental Botany*. 52:131-138. (2004).

37. D.S., Selote, S. Bharti., R. Khanna-Chorpa. Drought acclimation reduces O_2^*-accumulation and lipid peroxidation in Wheat seedlings. *Biochemtry Biophysics Research Community.*13:724-729. (2004).

38. A., Sofo, B., Dichio, C., Xiloyannis, A., Masia, Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. *Plant Science.* 166:. 293-300. (2004).

39. M. Somogy Notes on sugar determination. *Botanical Chemistery.* 195: 19-29. (1952).

40. C. M Steber, & P. McCourt. A role for brassinosteroids in germination in Arabidopsis. *Plant Physiology.* 125: 763-769. (2001).

41. M., Tausz, A. Sorger & D. Grill. Complex interactive effects of drought and ozone stress on antioxidant defense systems of two wheat cultivars. *Plant Physiology and Biochemistery.* 40: 691-695. (2002).

42. B.V. Vardhini, & S.S. Ram Rao. Effects of brassinosteroids on growth, metabolic content and yield of *Arachis hypogaea*. *Phytochemistery.* 48: 927-930. (1998).

43. D.M., Zurek, S.D. Clouse. Molecular cloning and characterization of a Brassinosteroid-Regulated gene from elongating Soybean (*Glycine max L.*) epicotyls. *Plant Physiology.*104:161-170. (1994).