

تأثیر هورمون‌پاشی براسینواستروئید و سیتوکنین بر میزان فعالیت و بیان ژن کاتالاز و پرولین در دو رقم کلزا تحت تنش خشکی

Influence of brassinosteroid and cytokinin hormones spray on activity and gene expression of catalase and proline in two cultivars of canola under drought stress

مرتضی صفاری^۱، جعفر احمدی^۱، نیراعظم خوش خلق سیما^{۲*}، زهراسادات شبر^۲

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)
۲- استادیاران، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

Saffari M¹, Ahmadi J¹, Khosh Kholgh Sima NA^{*2}, Shobbar Z²

1. MSc student and Associate Professor, University of International Imam Khomeini
2. Assistant Professors, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII)

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ksima@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۶ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۱)

چکیده

تنش غیرزیستی عامل محدود کننده در تولیدات گیاهی محسوب می‌شود. تجمع پرولین رایج‌ترین واکنش تحت تنش خشکی و شوری بوده و به عنوان محافظت‌کننده اسمزی فعالیت می‌کند. تنش خشکی از طریق کاهش آب گیاه سبب تولید انواع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود. ROS ها با تخریب پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه، کلروفیل و DNA به سلول آسیب می‌رسانند. برای کم کردن این آسیب‌ها، گیاهان دارای سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز (CAT) هستند. یکی از روش‌های مقابله با تنش خشکی استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی است که سبب افزایش رشد و تقسیم سلولی می‌شوند، همچنین بر روی بیان ژن، تولید اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها اثر می‌گذارند. در این پژوهش تأثیر هورمون‌های سیتوکنین و براسینواستروئید بر میزان فعالیت و بیان ژن آنزیم کاتالاز و پرولین تحت شرایط تنش خشکی در دو رقم کلزا به نام‌های OKAPI و GKH بررسی شد. این تحقیق به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. در هر دو رقم کلزای پاییزه GKH2005 و OKAPI بیشترین فعالیت کاتالاز در شرایط تنش خشکی در سطح هورمونی براسینواستروئید بوده و اختلاف معنی‌داری را با شاهد (عدم هورمون‌پاشی) نشان داد. در هر دو رقم تحت تنش خشکی بیشترین بیان ژن *cat16* در سطوح هورمونی براسینواستروئید و ترکیب سیتوکنین ۱۰۰ میکرومولار + براسینواستروئید بود. نتایج مقایسه میانگین میزان بیان ژن *cat54* نیز نشان داد که بیشترین بیان متعلق به سطح هورمونی براسینواستروئید بوده و نسبت به سطح عدم هورمون‌پاشی دارای بیان بیش از سه برابر داشت. محتوای پرولین و بیان ژن *p5cs* در سطوح هورمون‌پاشی رقم GKH به صورت افزایشنده بود و در رقم OKAPI روندی کاهشی را نشان داد.

واژه‌های کلیدی

براسینواستروئید

پرولین

سیتوکنین

کلزا

کاتالاز

مقدمه

کلزا (*Brassica napus* L.) مهم‌ترین گونه زراعی جنس براسیکا است و با توجه به این‌که محصول مناسبی برای تناوب با گندم بوده و بعد از گندم می‌تواند مورد کشت قرار گیرد، در ایران از اهمیت خاصی برخوردار بوده و طی سال‌های اخیر کشت آن توسعه یافته است (Khajepour Abedi and Pakniat 2010). خصوصیات کلزا سبب شده که به عنوان یک گیاه روغنی با ارزش مورد توجه باشد. به طوری که جزء مهم‌ترین گیاهان روغنی مناطق معتدل دنیا محسوب می‌شود (Ahmadi 2000; Khajepour 2007). توسعه کشت این گیاه می‌تواند نقطه عطفی جهت کاهش وابستگی کشور به واردات روغن باشد. کلزا در مرحله جوانه‌زنی و همچنین در زمان گل‌دهی و رشد خورجین‌ها به خشکی حساس بوده و کمبود آب طی این مرحله سبب کاهش شدید تعداد گل و دانه، وزن هزار دانه و در نهایت میزان روغن دانه می‌شود (Amiri Oghan et al. 2004). (Hamed et al. 2013). در بررسی تحمل به خشکی مراحل انتهایی رشد ارقام کلزا بیان داشتند رقم GKH2005 عملکرد بیشتری را نسبت به رقم Okapi تولید می‌کند و دارای تحمل به خشکی بالاتری می‌باشد. همچنین Rashidifar et al. (2012) گزارش کردند رقم Okapi در گروه ارقام حساس به خشکی قرار دارد.

تنش خشکی یکی از عوامل محیطی مهم در کاهش تولید محصولات زراعی در سراسر دنیا است (Sivamani et al. 2000). با توجه به اینکه بخش وسیعی از زمین‌های زیر کشت دنیا و ایران در شرایط آب و هوایی نیمه خشک قرار دارند لزوم توجه به روش‌های نوین جهت کاهش خسارات ناشی از این تنش، امری ضروری به حساب می‌آید. تنش خشکی باعث ایجاد مجموعه‌ای از واکنش‌های پیچیده می‌شود، که به صورت تغییرات در سطح مولکولی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ظاهر می‌شود. البته این مجموعه واکنش‌ها به شدت تنش و دوام آن، ژنوتیپ گیاه و به مرحله رشد و نیز عوامل محیطی ایجاد کننده تنش بستگی دارد (Lisar et al. 2002; Shinozaki and Shinozaki 2007). پاسخ‌های بیوشیمیایی نیز می‌توان به تجمع متابولیت‌هایی که قابلیت انحلال داشته ولی متابولیسم طبیعی گیاه را مختل نمی‌کنند، اشاره کرد. این مواد که به اسمولیت‌ها معروف هستند شامل قندها

و متابولیت‌های دارای بار الکتریکی مثل گلیسین بتائین و اسیدهای آمینه‌ای چون پرولین است (yamchi et al. 2004). این ترکیبات به سلول کمک می‌کند که حالت آبدار خود را حفظ کرده و سپس مقاومت در مقابل خشکی و از دست رفتن آب سلول را فراهم می‌کنند (Mahajan and Tuteja 2005). تجمع پرولین در سلول به دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های دلتا-۱-پرولین-۵-کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) و پرولین-۵-کربوکسیلات ردوکتاز (P5CR) می‌باشد. در واقع در شرایط تنش خشکی فعالیت آنزیم P5CS افزایش یافته و مقدار پرولین را در داخل سلول به حدی بالا می‌برد که از خسارت زیاد کم‌آبی به گیاه جلوگیری می‌کند (yamchi et al. 2004). تنش خشکی همچنین از طریق کاهش آب گیاه سبب تولید انواع گونه‌های فعال اکسیژن^۱ (ROS) مانند سوپراکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، بنیان هیدروکسیل (OH^-) و اکسیژن منفرد می‌شود. این گونه‌های فعال اکسیژن با انجام پراکسیداسیون لیپیدی، تخریب پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه، کلروفیل و DNA به سلول آسیب می‌زنند (Neill et al. 2002). برای کم کردن این آسیب‌ها، گیاهان دارای سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی هستند که شامل ترکیب‌های غیر آنزیمی و همچنین ترکیب‌های آنزیمی مانند سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POX)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، گلوتاتیون ردوکتاز (GR) و پلی فنل اکسیداز (PPO) است (Neill et al. 2002). وظیفه عمده این آنزیم‌ها تجزیه پراکسید هیدروژن است (Parida and Das 2005).

یکی از روش‌های مقابله با دوره‌های تنش کم‌آبی استفاده از هورمون‌های رشد گیاهی است (Ahmadi Mosavi et al. 2005). هورمون‌های گیاهی حاوی پیام‌های شیمیایی در پاسخ به عوامل محیطی هستند و شاید بتوان گفت در زمان تنش خشکی، تجمع متابولیت‌هایی از قبیل پرولین و تنظیم کننده‌های اسمزی تحت تأثیر هورمون‌های گیاهی باشد (Smirnoof and Cumbe 1989; Mckersie and Leshem 1994). سیتوکنین‌ها دارای اثرات افزایشی رشدی بوده که مهم‌ترین آن تقسیم سلولی است. سیتوکنین‌ها به طور عمده در مرستم‌های انتهایی ریشه، گل آذین‌ها و میوه‌های در حال رشد ساخته می‌شوند (Miller et al.

^۱ Reactive oxygen species

صفات فیزیولوژیکی کلزا دریافتند که در زمان وقوع تنش کمبود آب و کاهش پتانسیل آب برگ در ارقام متحمل کلزا میزان ذخیره پرولین در سلول افزایش می‌یابد (Moradshahi et al. 2004). در آزمایشی افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در کنار پایداری بیان ژن‌های کد کننده این آنزیم‌ها را تحت شرایط تنش سرما بر روی ژنوتیپ‌های گیاه نخود گزارش شد (Nazari et al. 2011). در مطالعه‌ای که روی آنزیم کاتالاز در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا تحت تنش‌های مختلف صورت گرفت مشخص شد که ژن *cat1* نقش مهمی در حذف پراکسید هیدروژن داشته و فعالیت *cat2* توسط تنش سرما و خشکی تغییر نشان داد. همچنین فعالیت *cat3* توسط آبسزیک اسید و تنش اکسیداتیو تغییر یافت (Yan Yan and Wang 2008). در این پژوهش به منظور بررسی تاثیر هورمون‌های سیتوکینین و براسینواستروئید بر روی سیستم آنتی‌اکسیدانی و پرولین، میزان فعالیت و بیان ژن یکی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به نام کاتالاز و بیان ژن *p5cs* تحت شرایط تنش خشکی در گیاه کلزا مورد آزمایش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این بررسی از دو رقم کلزای پاییزه (*Brassica napus* L.) GKH2005 و OKAPI تهیه شده از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج استفاده شد (جدول ۱). این تحقیق در سال ۱۳۹۱ در گلخانه و آزمایشگاه پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی شامل سطوح هورمونی (۵ سطح)، سطوح آبیاری (۲ سطح آبیاری و قطع آبیاری) و دو رقم با سه تکرار انجام گرفت. تیمارهای هورمونی شامل سطح شاهد (محلول‌پاشی با آب مقطر و تبوولین)، Br (محلول‌پاشی با براسینواستروئید با غلظت 10^{-7} میکرومولار)، Cyt50 (محلول‌پاشی با سیتوکینین با غلظت ۵۰ میکرومولار)، Cyt100 (محلول‌پاشی با سیتوکینین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار) و Cyt100×Br (محلول‌پاشی با مخلوط سیتوکینین ۱۰۰ میکرومولار + براسینواستروئید 10^{-7} میکرومولار) بود. هر یک از سطوح هورمونی با سه تکرار در شرایط تنش و سه تکرار در شرایط نرمال آبیاری اعمال شد. بذور ابتدا در گلدان‌های

1955). سیتوکینین میزان تکثیر DNA و RNA کل و سنتز پروتئین را افزایش می‌دهد. به طور کلی هورمون‌های گیاهی بر روی بیان ژن RNA ریبوزومی (rRNA) اثر می‌گذارند که این موضوع در آزمایشات متعدد و بیشتر در رابطه با اکسین‌ها مشاهده شده است (Ananiev et al. 1987). براسینواستروئیدها در اکثر قسمت‌های گیاه یافت می‌شوند و بیشترین میزان آنها در اندام‌های زایشی قرار دارد. این دسته از هورمون‌های گیاهی سبب افزایش رشد و تقسیم سلولی می‌شوند، همچنین بر روی بیان ژن، تولید اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها اثر می‌گذارند (Ahmadi Mosavi et al. 2005).

براسینواستروئیدها تحمل گیاهان را در محدوده وسیعی از تنش‌های محیطی خشکی، شوری، سرما و گرما افزایش داده‌اند و این افزایش عموماً وابسته به تولید و افزایش رونوشت ژن‌های مسئول پاسخ به تنش برای بالا بردن تحمل به تنش در درون گیاهان تیمار شده بوسیله براسینواستروئید بوده است (Clouse et al. 1992; Eskandari et al. 2010). کاربرد خارجی براسینواستروئید می‌تواند فعالیت آنزیم‌های مقابله کننده با تنش اکسیداتیو مثل آسکوربیک اسید، پراکسیداز و کاتالاز را افزایش دهد. در این رابطه در آزمایشی استفاده از براسینواستروئید در گیاه ذرت در مرحله جوانه‌زنی توانست آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربیک پراکسیداز را فعال کند (Li et al. 1998). در آزمایشی دیگر در سورگوم استفاده از براسینواستروئید تحت تنش اسمزی توانست فعالیت کاتالاز را افزایش و به میزان کمی فعالیت پراکسیداز و آسکوربیک اسید را کاهش دهد (Vardhini and Rao 2003). همچنین براسینواستروئیدها روی تجمع مواد محلول اثر مثبت دارند و باعث افزایش سازگاری اسمزی و میزان پرولین در طی تنش می‌شوند (Ahmadi Mosavi et al. 2005). به طور کلی براسینواستروئیدها با اثر بر روی تجمع مواد محلول، تنظیم اسمزی و افزایش کارتنوئیدها، باعث حفظ تورم و حجم سیتوزولی می‌شوند. ضمن اینکه ساختمان ماکرومولکول‌ها و غشا سلولی را نیز محافظت کرده و در نهایت سبب بهبود شرایط گیاه در زمان تنش می‌شوند. از این رو براسینواستروئیدها منجر به محافظت گیاه در شرایط تنش و افزایش مقاومت می‌شوند (Ahmadi Mosavi et al. 2005). در آزمایشی با بررسی تاثیر تنش کمبود آب بر روی

گلاسیال به آن افزوده و سپس خوب مخلوط شد و در حمام آب گرم در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار داده شد. سپس جهت توقف واکنش‌ها درون حمام آب یخ قرار گرفت و بعد از سرد شدن چهار میلی‌لیتر تولوئن به محلول اضافه شد و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد. در نهایت در طول موج ۵۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت صورت گرفت و با استفاده از معادله منحنی، مقدار پرولین هر نمونه به دست آمد (Bates et al. 1973).

طراحی آغازگرها

با توجه به اینکه برای ژن کاتالاز در کلزا دو توالی گزارش شده بود، این دو توالی با استفاده نرم‌افزار Clustal W همدیف شدند و طراحی آغازگر با توجه به تفاوت در نوکلئوتیدهای دو توالی صورت گرفت. بدین ترتیب دو جفت آغازگر برای آنزیم کاتالاز طراحی شد. طراحی آغازگرها به گونه‌ای صورت گرفت که با استفاده از هر جفت آغازگر تنها ژن مورد نظر به طور اختصاصی تکثیر شود. آغازگرهای اختصاصی با استفاده از نرم‌افزار OLIGO ver. 5 طراحی شدند (جدول ۲). در این پژوهش از ژن خانه‌دار^۱ به عنوان کنترل داخلی (Chandna et al. 2012) استفاده شد. به منظور اطمینان از کارایی و عملکرد اختصاصی آغازگرها انجام PCR صورت پذیرفت و محصول آن بر روی ژل آگارز دو درصد بررسی شد.

استخراج RNA و مطالعه الگوی بیان ژن‌های کاتالاز جهت استخراج RNA کل از محلول ترایزول استفاده شد. استخراج RNA از برگ ژنوتیپ‌های مذکور انجام گرفت و بعد از غلظت سنجی نمونه‌های RNA با دستگاه نانودراپ، کیفیت نمونه‌ها با ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله بعدی RNA استخراج شده با آنزیم *DNase1* تیمار شد و جهت اطمینان از حذف آلودگی DNA از RNAهای استخراج شده واکنش PCR صورت گرفت و محصول آن بر روی ژل بررسی شد. واکنش سنتز cDNA با استفاده از کیت BIO-RAD، iScript cDNA synthesis kit صورت گرفت. در نهایت بررسی نسبی بیان ژن با روش Real time PCR (Relative Real time)

کوچک پاکتی حاوی پیت ماس و شن کشت شده و در شرایط گلخانه قرار گرفتند. پس از رسیدن گیاهچه‌ها به مرحله چهار برگی، گلدان‌ها به فیتوترون (دمای چهار درجه سانتی‌گراد) جهت بهاره‌سازی انتقال یافتند. پس از ۵۰ روز سرمادهی دو گیاهچه به گلدان‌های اصلی انتقال یافته و به گلخانه منتقل شدند. برگ گیاهان پس از رفتن هر بوته به گل تحت تیمار هورمون‌پاشی قرار گرفتند، به طوری که سطح آنها کاملاً مرطوب شد. در تیمارهای تنش خشکی، پس از هفت روز قطع آبیاری از زمان هورمون‌پاشی و در تیمارهای بدون تنش خشکی (آبیاری نرمال) هفت روز بعد از زمان هورمون‌پاشی نمونه‌برداری صورت گرفت.

جدول ۱- ارقام زراعی کلزای مورد مطالعه و مشخصات آنها

ژنوتیپ	مبدأ	تیپ رشد
GKH2005	مجارستان	پاییزه
Okapi	فرانسه	پاییزه

اندازه‌گیری فعالیت کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز به روش Chaoui et al. (1997) اندازه‌گیری شد. بدین منظور ابتدا ۲۵۰ میکرولیتر از بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار به همراه ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۲۵۰ میکرولیتر از پراکسید هیدروژن ۷۰ میلی‌مولار (محلول در بافر فسفات پتاسیم) درون یک کیبوت کوآرتز یک میلی‌لیتری ریخته شد و جهت هضم تدریجی، دستگاه اسپکتوفتومتری در طول موج ۲۴۰ نانومتر صفر شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از عصاره آنزیم استخراج شده از برگ هر نمونه به صورت جداگانه به کیبوت حاوی محلول بالا اضافه شده و در مدت زمان ۱۸۰ ثانیه فعالیت کاتالاز بر حسب جذب بر دقیقه ترسیم شد.

سنجش مقدار پرولین

به ۰/۵ گرم ماده تر گیاهی ضمن ساییدن داخل هاون چینی ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالسیلیک سه درصد اضافه شد. سپس با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مقدار دو میلی‌لیتر از روشناور ناشی از سانتریفیوژ درون تیوب ۱۵ میلی‌لیتر جدید ریخته شد و دو میلی‌لیتر اسید ناین هایدرین و دو میلی‌لیتر اسید استیک

^۱ House keeping

جدول ۲- فهرست و توالی جفت آغازگرهای مورد استفاده در بررسی الگوی بیان ژن‌ها

نام آغازگر	(5'-3') آغازگر رو به جلو	(5'-3') آغازگر برگشتی	Length (bp)	TM	Accession
<i>cat54</i>	ATGAGATCCGCAGCATCTGG	GAGATTGGTCTCCCTAGATG	111	60°C	U68219.2
<i>cat16</i>	AAGAGCGTTTCGTGAAGCGTT	GCCTCACGTTAAGACGGGAA	141	62°C	EU487186.1
<i>p5CS</i>	GGTCCAGTTGGAGTAGAAGG	GCACTGCCTTTGTCCTTCT	133	62°C	AF314812.1
<i>GAPDH</i>	AGAGCCGCTTCTTCAACATCATT	TGGGCACACGGAAGGACATACC	112	62°C	EF123055.1

نیز دو سطح تنش و عدم تنش نسبت به سطوح مختلف تیمارهای هورمون پاشی انجام گرفته دارد. برای میزان بیان ژن‌های کاتالاز *cat54* و *cat16* و ژن دخیل در سنتز پرولین (*p5cs*) علاوه بر فاکتورهای اصلی رقم، تنش و هورمون پاشی، تمامی اثرات متقابل دوگانه و سه گانه در سطح احتمال یک درصد معنی دار شد و عدم روند پاسخ یکنواخت هر کدام از فاکتورها را در سطوح فاکتورهای دیگر نشان داد.

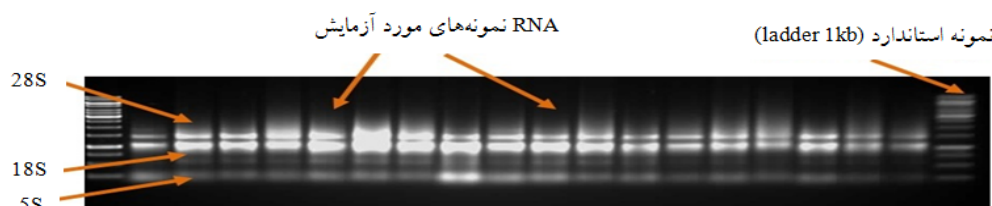
بر اساس مقایسه میانگین‌ها (شکل ۳) مشاهده شد که در رقم GKH بیشترین فعالیت کاتالاز در شرایط نرمال آبیاری (۶/۱۹) و تنش (۷/۴۴) در سطح هورمونی براسینواستروئید بوده و اختلاف معنی داری را با سایر سطوح هورمونی و سطح شاهد (عدم هورمون پاشی) (۳/۱۴) در شرایط بدون تنش و ۳/۶۸ در شرایط تنش) نشان داد. در رقم OKAPI نیز سطح هورمونی براسینواستروئید در شرایط تنش خشکی (۶/۶۰) با سطح شاهد هورمون پاشی (۲/۵۹) اختلاف معنی داری نشان داد. در هر دو رقم سطح هورمونی سیتوکینین ۵۰ میکرومولار در شرایط تنش با شاهد آبیاری نرمال خود و نیز با شاهد هورمون پاشی اختلاف معنی داری نشان داد. در شرایط آبیاری نرمال نوع پاسخ در رقم OKAPI نسبت به رقم GKH متفاوت بود و بیشترین فعالیت کاتالاز در رقم OKAPI در سطح هورمون پاشی سیتوکینین ۱۰۰ میکرومولار (۵/۰۴) دیده شد و اختلاف معنی داری را با سطح عدم هورمون پاشی (۳/۰۲) نشان داد. با توجه به اینکه در شرایط تنش در هر دو رقم بیشترین فعالیت کاتالاز مربوط به سطح هورمونی براسینواستروئید (Br) بود می‌توان گفت که کاربرد این هورمون می‌تواند منجر به افزایش فعالیت کاتالاز در شرایط تنش شود.

نتایج و بحث

PCR) با استفاده از کیت (BIO-RAD, iQ Syber Green) انجام شد. میزان بیان ژن با روش Efficiency adjusted $\Delta\Delta Ct$ (pfaifi 2001) محاسبه شد. سپس همه داده‌ها با ژن خانه دار *GAPDH* به عنوان کنترل داخلی نرمال و میزان تغییرات بیان ژن در تنش‌های مختلف نسبت به شاهد سنجیده شد.

همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود RNAهای استخراج شده از کیفیت خوبی برخوردار بوده و دارای هر سه زیر واحد 5S، 18S و 28S بودند. حذف آلودگی DNA ژنومی به وسیله تیمار نمونه‌ها با آنزیم *DNase1* انجام گرفت. انجام واکنش PCR، جهت حصول اطمینان از حذف آلودگی DNA ضروری بود و بدین منظور RNA تیمار شده با آنزیم *DNase1* در واکنش PCR به عنوان الگو قرار گرفت و همان‌گونه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود با حذف کامل DNA هیچ تکثیر در واکنش PCR انجام نشد.

تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۳) برای فعالیت آنزیم کاتالاز و محتوای پرولین اختلاف معنی داری را در سطح احتمال یک درصد در منابع تغییر تنش، هورمون پاشی، اثرات متقابل رقم $\times$ هورمون، تنش $\times$ هورمون و رقم $\times$ تنش $\times$ هورمون نشان داد. همچنین برای فعالیت کاتالاز در سطح احتمال پنج درصد اثر متقابل رقم $\times$ تنش اختلاف معنی داری را نشان داد اما برای محتوای پرولین این اثر معنی دار نبود. بین رقم‌ها نیز برای فعالیت کاتالاز و محتوای پرولین اختلاف معنی داری دیده نشد. معنی دار بودن اثر متقابل رقم $\times$ هورمون، تنش $\times$ هورمون و رقم $\times$ تنش $\times$ هورمون دلالت بر عدم پاسخ یکسان دو رقم GKH و OKAPI و



شکل ۱- تصویر الکتروفورز ژل آگاروز یک درصد جهت بررسی کیفیت RNA استخراج شده



شکل ۲- محصول واکنش PCR جهت اطمینان از حذف آلودگی DNA از RNAهای استخراج شده (با توجه به باندهای ladder 100 bp مشاهده شده در ردیفهای RNA و کنترل منفی آغازگر دایمر می باشد).

جدول ۳- تجزیه واریانس میزان بیان ژنهای *cat54*، *cat16*، *p5cs* و فعالیت آنزیم کاتالاز و محتوای پرولین در شرایط تنش خشکی و سطوح هورمون پاشی در دو رقم GKH و OKAPI

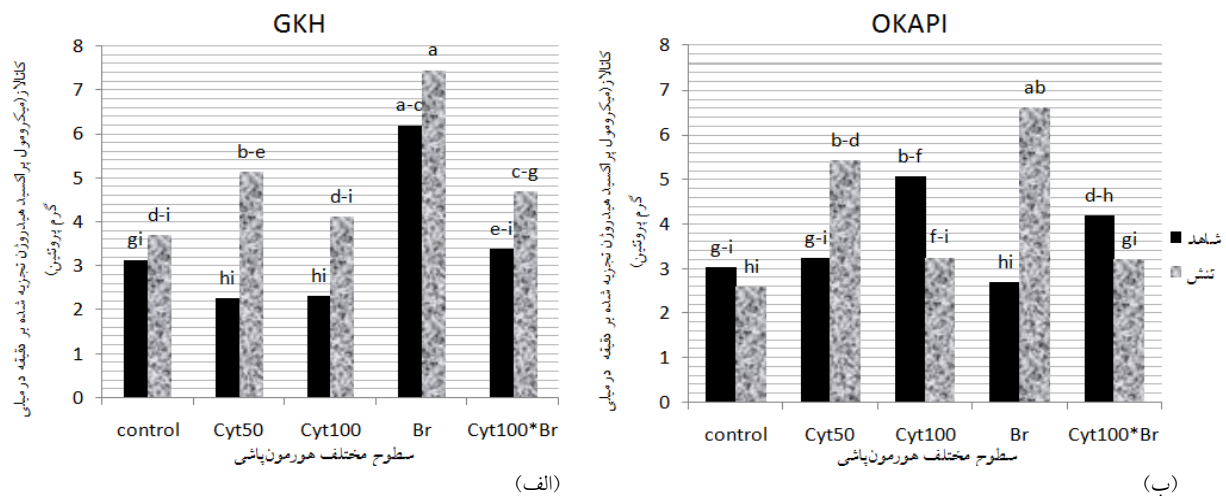
منابع تغییر						میانگین مربعات
رقم	تنش	رقم × تنش	هورمون پاشی	رقم × هورمون پاشی	تنش × هورمون پاشی	رقم × تنش × هورمون پاشی
درجه آزادی	فعالیت کاتالاز	Gene <i>cat16</i>	Gene <i>cat54</i>	محتوای پرولین	Gene <i>p5cs</i>	
۱	۱/۴۴ ^{ns}	۳/۷۹۵ ^{**}	۱۱/۵۲۸ ^{**}	۰/۱۶۶ ^{ns}	۲۷/۹۴ ^{**}	
۱	۱۶/۹۸۶ ^{**}	۴۰/۰۹۸ ^{**}	۴۳/۸۶۱ ^{**}	۵۱۱/۵۸۴ ^{**}	۵۵۴/۶۴۲ ^{**}	
۱	۳/۵۳۶ [*]	۴/۵۴۳ ^{**}	۷/۶۰۴ ^{**}	۰/۰۰۷ ^{ns}	۴۰/۸۱۱ ^{**}	
۴	۱۱/۶۴۹ ^{**}	۱۲/۳۸۹ ^{**}	۵/۴۲۸ ^{**}	۴۵/۲۵۶ ^{**}	۶۰/۶۱۵ ^{**}	
۴	۴/۴۶۲ ^{**}	۰/۵۲۷ ^{**}	۱۵/۱۸۹ ^{**}	۵۱/۸۲۵ ^{**}	۸۴/۶۶۵ ^{**}	
۴	۵/۵۵۶ ^{**}	۶/۵۱۳ ^{**}	۶/۳۶۶ ^{**}	۴۱/۹۴۱ ^{**}	۳۹/۳۴۶ ^{**}	
۴	۴/۰۷۵ ^{**}	۴/۰۲۲ ^{**}	۱/۲۲۷ ^{**}	۴۸/۰۲۷ ^{**}	۷۰/۴۸۶ ^{**}	
۴۰	۰/۵۲۷	۰/۱۳۴	۰/۲۲۶	۰/۶۰۸	۰/۵۹۸	
۱۷/۷۸	۱۸/۵۱	۱۵/۳۳	۲۱/۳۶	۱۹/۱۹		ضریب تغییرات (%)

ns، * و **: به ترتیب نشان دهنده غیر معنی داری و معنی دار بودن در سطح احتمال پنج و یک درصد

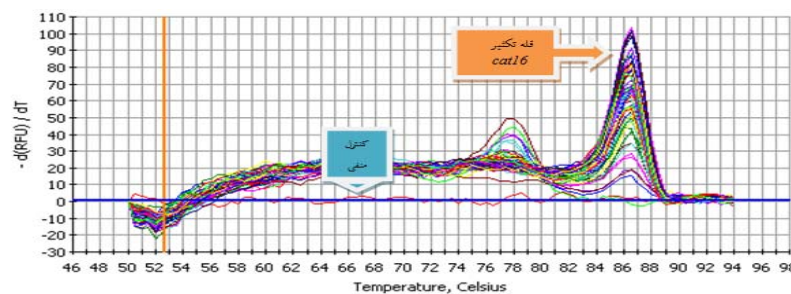
رقم OKAPI بوده و این سطوح اختلاف معنی داری را با سطح شاهد هورمون پاشی (۱/۴۷) در رقم GKH و ۱/۸۴ در رقم OKAPI نشان دادند. در واقع می توان گفت که این سطوح هورمونی اثر مثبتی در افزایش بیان این ژن داشته اند. همچنین بیان این ژن در سطح هورمونی براسینواستروئید در شرایط تنش نسبت به عدم تنش در رقم OKAPI بسیار بیشتر (حدود دو برابر) از این افزایش در رقم GKH بود. البته در تایید این میزان بیان ژن کاتالاز، همانطور که مشاهده شد سطح هورمونی براسینواستروئید توانست

واکنش Real time-PCR با استفاده از آغازگرهای ژن *cat16* انجام گرفت. شکل ۴ حدود آستانه و منحنی ذوب ژن *cat16* را نشان می دهد.

نتایج حاصل از سنجش بیان ژن *cat16* (شکل ۵) نشان داد که در هر دو رقم در تیمار تنش خشکی بیشترین بیان این ژن در سطوح هورمونی براسینواستروئید (۳/۷۷) در رقم GKH و ۷/۳۰ در رقم OKAPI و همچنین سطح هورمونی ترکیب سیتوکینین ۱۰۰ میکرومولار و براسینواستروئید (۳/۱۲) در رقم GKH و ۳/۶۰ در



شکل ۳- مقایسه فعالیت کاتالاز در (الف) رقم GKH و (ب) رقم OKAPI. (آب مقطر (control)، سیتوکنین ۵۰ میکرومولار (Cyt50)، سیتوکنین ۱۰۰ میکرومولار (Cyt100)، براسینواستروئید (Br)، ترکیب سیتوکنین ۱۰۰ میکرومولار و براسینواستروئید (Cyt100*Br)). حروف مشابه لاتین روی ستون-ها، نشان دهنده عدم اختلاف معنی داری می باشد.

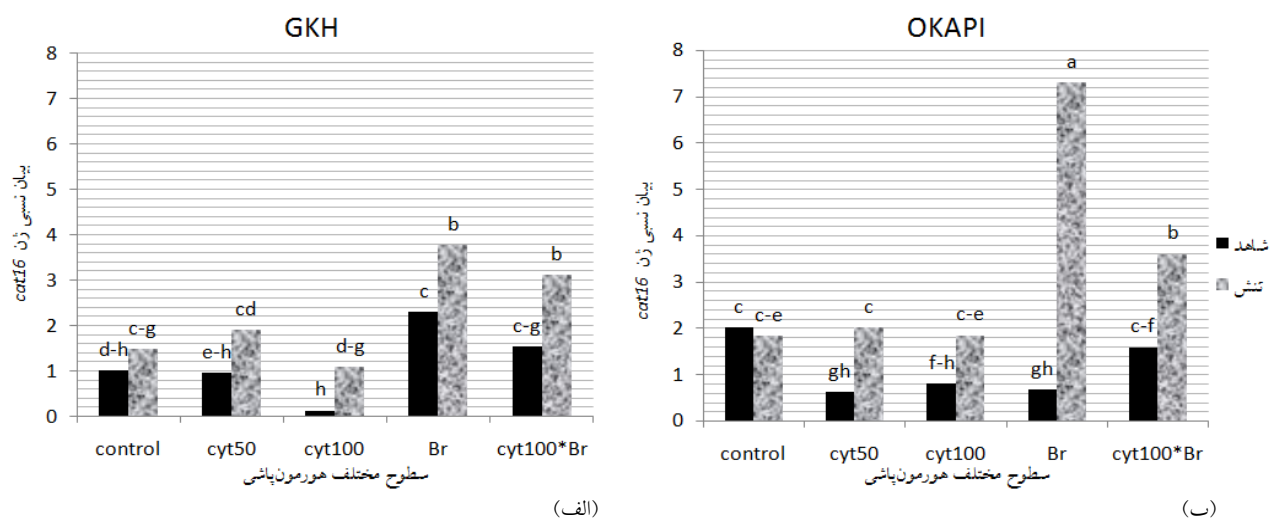


شکل ۴- نمودار منحنی ذوب مربوط به ژن cat16

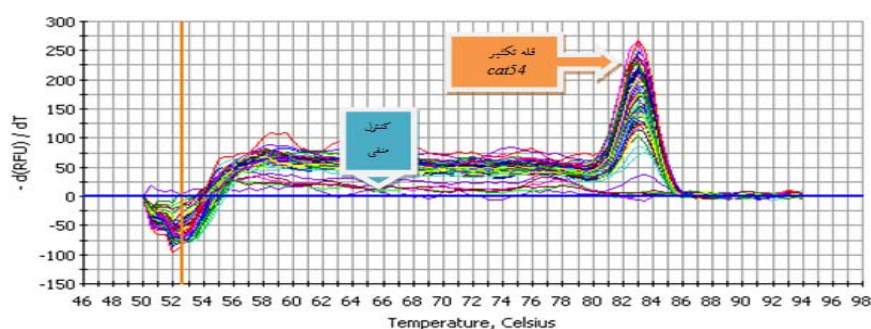
هورمون پاشی دارای بیان بیش از سه برابر نشان داد. همچنین در این رقم در شرایط آبیاری نرمال سطوح سیتوکنین ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار و ترکیب سیتوکنین ۱۰۰ میکرومولار + براسینواستروئید دارای اختلاف معنی داری با سطح شاهد عدم هورمون پاشی بودند (شکل ۷). مقایسه میانگین برای اثر متقابل آبیاری $\times$ هورمون نشان داد که در حالت تنش سطح هورمونی براسینواستروئید (۶/۱۳) از بیان بالاتری برخوردار بوده است و دارای اختلاف معنی داری با سایر سطوح هورمون پاشی و حتی عدم هورمون پاشی بود. از این رو هورمون براسینواستروئید در حالت تنش بیان نسبی ژن بالاتری را نسبت به دیگر سطوح هورمونی داشته و تأثیر این هورمون را در افزایش بیان این ژن می توان ملاحظه کرد.

منجر به افزایش فعالیت کاتالاز در هر دو رقم شود. در حالت آبیاری نرمال نیز بیشترین بیان این ژن متعلق به سطح هورمونی براسینواستروئید (۲/۳۰) در رقم GKH بود (شکل ۵). واکنش Real time-PCR با استفاده از آغازگرهای ژن cat54 برای نمونه های مورد بررسی انجام گرفت و نمودار منحنی ذوب آن در شکل ۶ ارائه شده است.

نتایج مقایسه میانگین میزان بیان ژن cat54 (شکل ۷) در رقم GKH نشان داد که در تیمار تنش خشکی بیشترین بیان نسبی این ژن در بین سطوح هورمون پاشی بوده و تمام تیمارهای سطوح هورمون پاشی اختلاف معنی داری را با سطح شاهد (عدم هورمون پاشی) نشان دادند. به طوری که بیشترین بیان متعلق به سطح هورمونی براسینواستروئید بوده و نسبت به سطح عدم



شکل ۵- مقایسه بیان ژن کاتالاز *cat16* در (الف) رقم GKH و (ب) رقم OKAPI. (آب مقطر (control)، سیتوکینین ۵۰ میکرومولار (cyt50)، سیتوکینین ۱۰۰ میکرومولار (cyt100)، براسینواستروئید (Br)، ترکیب سیتوکینین ۱۰۰ میکرومولار و براسینواستروئید (cyt100*Br)). حروف مشابه لاتین روی ستون‌های هر نمودار، نشان‌دهنده این است که سطوح اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.



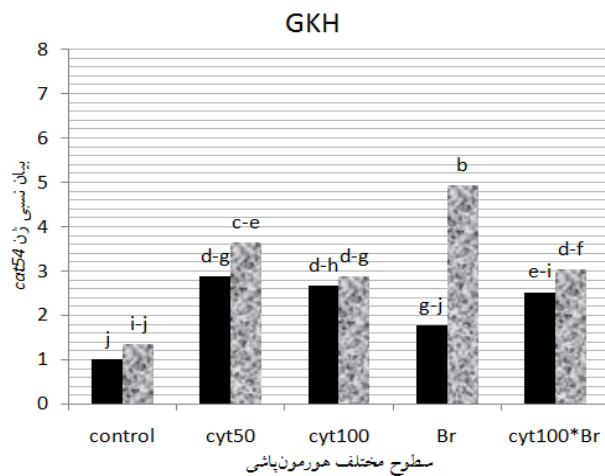
شکل ۶- نمودار منحنی ذوب مربوط به ژن *cat54*

بدون تنش بین سطوح هورمون‌پاشی از لحاظ محتوای پرولین در هر دو رقم تفاوت معنی‌داری دیده نشد. این نتایج نشان‌دهنده این است که تأثیر هورمون‌پاشی (به جز سیتوکینین ۵۰ میکرومولار) بر محتوای پرولین در رقم GKH افزایش‌دهنده و در رقم OKAPI کاهش‌دهنده بوده است.

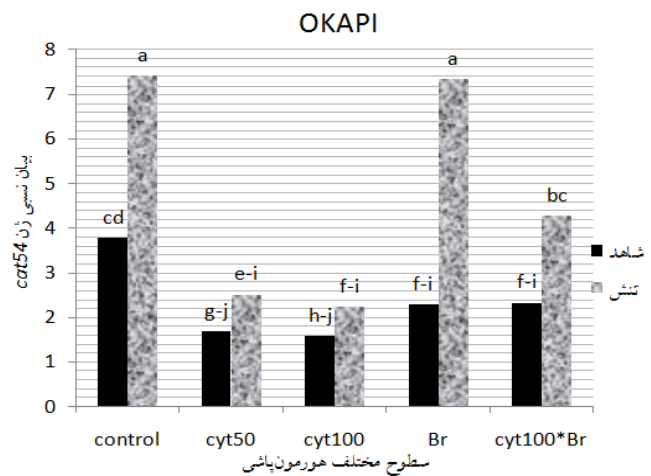
واکنش Real time-PCR با استفاده از آغازگرهای ژن *p5cs* برای نمونه‌های مورد بررسی انجام گرفت و نمودار منحنی ذوب آن در شکل ۹ ارائه شده است.

بررسی تغییرات بیان نسبی ژن *p5cs* در اثر سه جانبه سطوح مختلف هورمونی و آبیاری و دو رقم مورد مطالعه در شکل ۱۰ آورده شده است. هورمون‌پاشی در حالت تنش سبب افزایش

تغییرات محتوای پرولین در اثر سه جانبه سطوح مختلف هورمونی و آبیاری و دو رقم مورد مطالعه در شکل ۸ نشان داده شده است. بر این اساس در رقم GKH بیشترین محتوای پرولین در حالت تنش به ترتیب متعلق به سطوح هورمون‌پاشی براسینواستروئید، سیتوکینین ۱۰۰ میکرومولار و سیتوکینین ۱۰۰ میکرومولار + براسینواستروئید بود که نشان‌دهنده تأثیر این سطوح هورمون‌پاشی بر افزایش محتوای پرولین در رقم GKH است. علاوه بر این می‌توان گفت که هورمون‌پاشی بر محتوای پرولین در رقم OKAPI تأثیر بازدارنده در زمان تنش داشت، چرا که سطوح هورمونی نسبت به شاهد (عدم هورمون‌پاشی) از میزان پرولین کمتری برخوردار بودند. همچنین در این بررسی در حالت

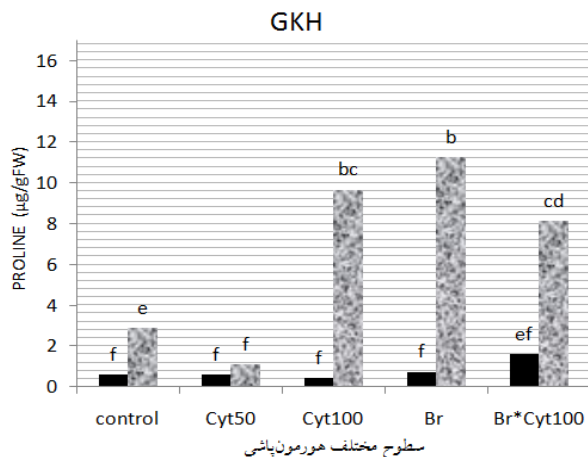


(الف)

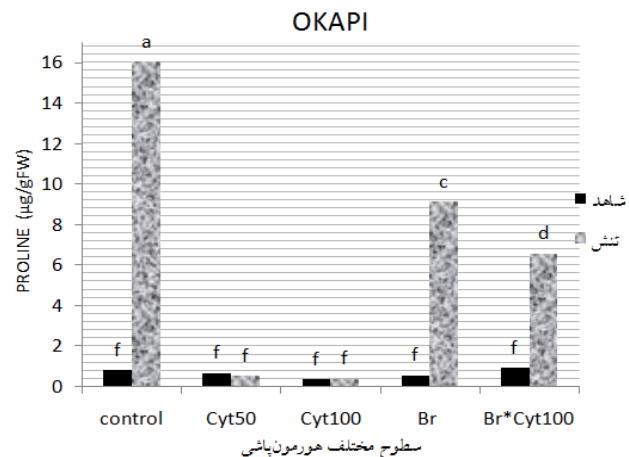


(ب)

شکل ۷- مقایسه بیان ژن کاتالاز *cat54* در (الف) رقم GKH و (ب) رقم OKAPI. (آب مقطر (control)، سیتوکینین ۵۰ میکرومولار (cyt50)، سیتوکینین ۱۰۰ میکرومولار (cyt100)، براسینواستروئید (Br)، ترکیب سیتوکینین ۱۰۰ میکرومولار و براسینواستروئید (cyt100*Br)). حروف مشابه لاتین روی ستون‌های هر نمودار، نشان‌دهنده این است که سطوح اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.



(الف)

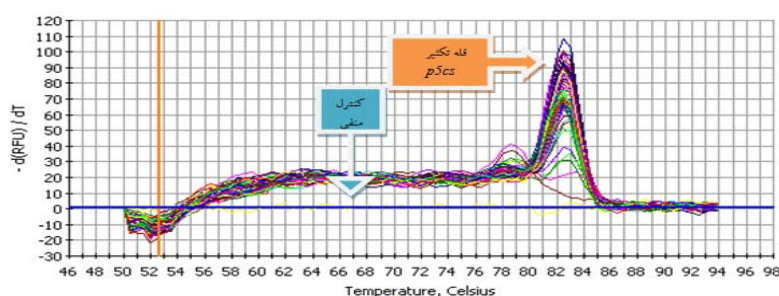


(ب)

شکل ۸- مقایسه محتوای پرولین در (الف) رقم GKH و (ب) رقم OKAPI. (آب مقطر (control)، سیتوکینین ۵۰ میکرومولار (cyt50)، سیتوکینین ۱۰۰ میکرومولار (cyt100)، براسینواستروئید (Br)، ترکیب سیتوکینین ۱۰۰ میکرومولار و براسینواستروئید (cyt100*Br)). حروف مشابه لاتین روی نمودار، نشان‌دهنده این است که سطوح اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

افزایش میزان پرولین از طریق افزایش رونویسی ژن *p5cs* بوده است و نشان‌دهنده تأثیر این سطوح هورمون‌پاشی بر افزایش پرولین در رقم GKH است. هورمون‌پاشی بر بیان ژن *p5cs* در رقم OKAPI تأثیر بازدارنده در زمان تنش داشت، چرا که سطوح هورمونی نسبت به شاهد (عدم هورمون‌پاشی) از میزان بیان ژن *p5cs* کمتری برخوردار بودند. در حالت بدون تنش نیز بین

میزان بیان ژن *p5cs* در رقم GKH شد. به طوری که سطوح هورمون‌پاشی براسینواستروئید، سیتوکینین ۱۰۰ میکرومولار + براسینواستروئید و سیتوکینین ۱۰۰ میکرومولار در رقم GKH به ترتیب بیشترین بیان نسبی ژن *p5cs* را در حالت تنش دارا بودند. با توجه به اینکه در تجزیه محتوای پرولین نیز همین سطوح هورمونی در رقم GKH سبب افزایش پرولین شده بودند، این



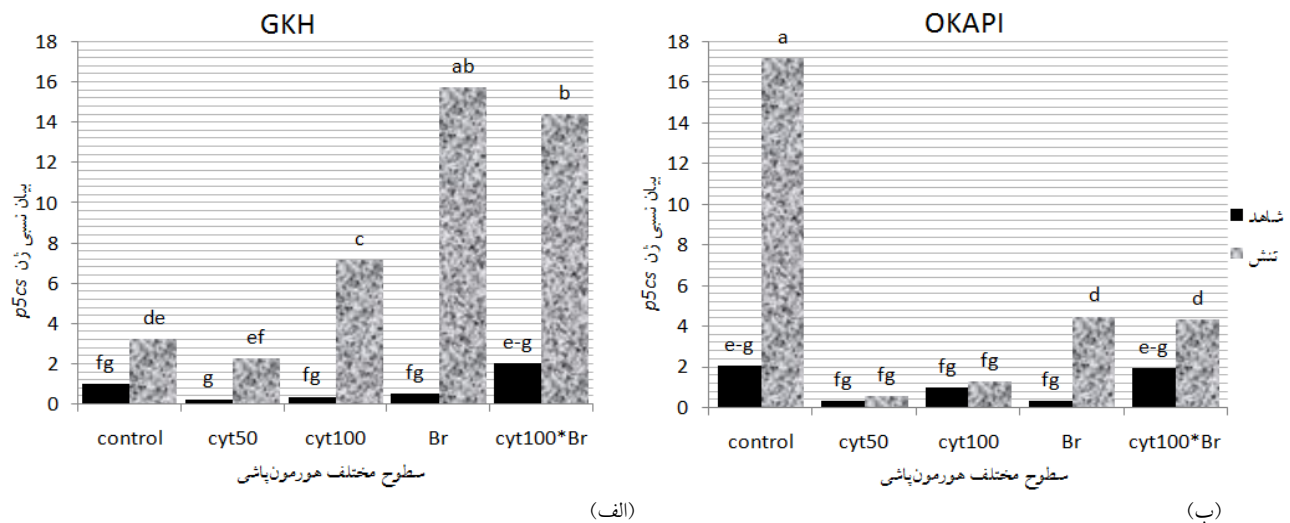
شکل ۹- نمودار منحنی ذوب مربوط به ژن *p5cs*

افزایش انواع اکسیژن فعال با تخریب نقاط کلیدی در متابولیسم منجر به خسارات فراوانی در سلول می‌شوند (Mittler 2002). یکی از راه‌های مقابله با اثرات منفی انواع اکسیژن فعال، استفاده از مکانیسم‌های دفاعی متشکل از ترکیبات آنزیمی و غیرآنزیمی است (Herbinger et al. 2002). عموماً با القای تنش‌های اکسیداتیو فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه نیز افزایش می‌یابد (Fazeli et al. 2007). آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و کاتالاز وظیفه مشابهی را در سیستم دفاعی گیاه بر عهده دارند به طوری که سم‌زدایی و تجزیه پراکسید هیدروژن وظیفه هر سه این آنزیم‌ها در سلول‌ها است (Ariano et al. 2005). این آنزیم‌ها نقش مهمی در افزایش مقاومت به تنش اکسیداتیو در شرایط طبیعی به عهده دارند (Norani Azad and Chobineh 2008). محققین گزارش کردند که تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های ضد اکسیداتیو مانند کاتالاز در گیاهانی از جمله گندم، جو، کنجد، سویا و کلزا موثر بوده و سبب افزایش فعالیت آنها می‌شود (Kendall et al. 2000; Zhang et al. 2006; Fazeli et al. 2007; Hamrahi et al. 2008). برخی محققان معتقدند افزایش میزان آنتی‌اکسیدان‌ها تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی را افزایش می‌دهند (Esfandiari et al. 2009). نتایج این پژوهش نشان داد که در زمان استفاده از هورمون براسینواستروئید در رقم GKH زمانی که بیمار تنش خشکی اعمال شد میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و بیان ژن‌های *cat16* و *cat54* افزایش داشت. در رقم دیگر نیز (OKAPI) در حالت تنش با هورمون‌پاشی براسینواستروئید، فعالیت کاتالاز و بیان ژن *cat16* افزایش یافت. ضمن اینکه این

سطوح هورمون‌پاشی از لحاظ بیان ژن *p5cs* در هر دو رقم تفاوت معنی‌داری دیده نشد. ضمن توجه به مجموع نتایج محتوای پرولین و بیان ژن *p5cs* می‌توان گفت که تأثیر هورمون‌پاشی (به جز سیتوکنین ۵۰ میکرومولار) بر روی پرولین در رقم GKH افزایشده و در رقم OKAPI کاهشده بوده است.

جدول همبستگی ساده پیرسون (جدول ۴) بین میزان فعالیت کاتالاز و بیان دو ژن متعلق به آن در دو رقم کلزا در شرایط تنش خشکی و آبیاری نرمال به طور مجزا نشان داد که بین میزان فعالیت کاتالاز و بیان ژن *cat16* در شرایط تنش خشکی و آبیاری نرمال در سطح احتمال یک درصد همبستگی معنی‌داری وجود داشت. ولیکن فعالیت کاتالاز فقط در شرایط آبیاری نرمال با ژن *cat54* همبستگی معنی‌داری نشان داد. همچنین بین محتوای پرولین و بیان ژن *p5cs* در هر دو شرایط تنش و نرمال آبیاری همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت.

تنش خشکی علاوه بر این که رشد و نمو را در گیاهان کاهش می‌دهد، باعث تغییر در مسیر برخی از فرآیندهای متابولیسمی نیز می‌شود. این تغییرات می‌تواند گیاه را در مقابل تنش مقاوم سازد (Bartels and Souer 2004). قسمت اعظمی از اختلالات مولکولی که در گیاهان سبب ایجاد آسیب‌های فیزیولوژیکی در اثر تنش خشکی می‌شوند را می‌توان در اثر تولید گونه‌های فعال اکسیژن دانست (Hamrahi et al. 2008). رادیکال هیدروکسیل خطرناک‌ترین فرم اکسیژن فعال بوده و با هدف قرار دادن تمامی بیومولکول‌ها، اختلالات متابولیسمی شدیدی را سبب می‌شود.



شکل ۱۰- مقایسه بیان ژن پرولین (*p5cs*) در رقم (الف) GKH و (ب) رقم OKAPI. آب مقطر (control)، سیتوکنین ۵۰ میکرومولار (cyt50)، سیتوکنین ۱۰۰ میکرومولار (cyt100)، براسینواستروئید (Br)، ترکیب سیتوکنین ۱۰۰ میکرومولار و براسینواستروئید (cyt100*Br). حروف مشابه لاتین روی نمودار، نشان دهنده این است که سطوح اختلاف معنی داری با هم ندارند.

جدول ۴- همبستگی ساده پیرسونی بین فعالیت کاتالاز، دو ژن *cat16* و *cat54*، محتوای پرولین و ژن *p5cs* در (الف) حالت آبیاری نرمال و (ب) در حالت تنش خشکی

الف					ب				
فعالیت کاتالاز	ژن <i>cat16</i>	ژن <i>cat54</i>	محتوای پرولین	ژن <i>p5cs</i>	فعالیت کاتالاز	ژن <i>cat16</i>	ژن <i>cat54</i>	محتوای پرولین	ژن <i>p5cs</i>
فعالیت کاتالاز	۱				۱				
ژن <i>cat16</i>	۰/۴۸۸**	۱			۰/۵۲۱**	۱			
ژن <i>cat54</i>	۰/۴۰۴*	۰/۲۲۵ ^{ns}	۱		۰/۱۶۶ ^{ns}	۰/۶۰۰**	۱		
محتوای پرولین	۰/۰۹۲ ^{ns}	۰/۴۱۵*	۰/۲۱ ^{ns}	۱	-۰/۰۰۱ ^{ns}	۰/۲۴۱ ^{ns}	۰/۷۳۰**	۱	
ژن <i>p5cs</i>	۰/۱۵ ^{ns}	۰/۵۰۷**	۰/۳۲ ^{ns}	۰/۶۷۹**	۰/۰۵۸ ^{ns}	۰/۰۶۶ ^{ns}	۰/۴۸۰**	۰/۸۳۹**	۱

^{ns} و ** به ترتیب نشان دهنده غیر معنی داری و معنی دار بودن در سطوح احتمال پنج و یک درصد

همان گروه از گیاهان بدون تیمار بطور مناسب تری رادیکالهای آزاد اکسیژن را از بین می‌برند. در توافق با نتایج این تحقیق Zhang Ozdemir et al. (2004) and et al. (2008) گزارش کردند که تیمار با براسینواستروئید در سویا و برنج تحت تنش خشکی فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان را افزایش داد. در پژوهش حاضر نیز کلزاهای تحت تنش خشکی تیمار شده با هورمون براسینواستروئید، فعالیت کاتالاز و بیان ژن کاتالاز بیشتری در مقایسه با گیاهان شاهد (عدم هورمون پاشی) دارا بودند.

هورمون در حالت آبیاری نرمال نیز در رقم GKH سبب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز و بیان ژن *cat16* شد. این امر نشان دهنده این است که این هورمون در افزایش فعالیت و بیان ژن آنزیم کاتالاز موثر است. Ahmadi Mosavi et al. (2005) نیز گزارش کردند که ایجاد تنش اکسیداتیو در سلولها در حضور براسینواستروئید کاهش یافته و در نتیجه مقاومت سلول به این تنش بیشتر شد. به عبارتی می‌توان گفت گیاهان کلزا تیمار شده با براسینواستروئید زمانی که در معرض تنش خشکی قرار می‌گیرند در مقایسه با

مقاومت ایجاد کند چرا که طبق بررسی دیگر، هر دو رقم توانستند عملکرد مطلوبی ارائه دهد (Saffari et al. 2013). در توافق با نتایج این تحقیق (Ahmadi Mosavi et al. 2005) نیز با انجام هورمون پاشی براسینواستروئید و اعمال تیمار تنش خشکی بر روی کلزا افزایش معنی دار میزان پرولین را نسبت به حالت عدم هورمون پاشی مشاهده کردند. همچنین گزارش شده است که تیمار کردن با براسینواستروئید منجر به افزایش بیان ژن پرولین می شود (Ozdemir et al. 2004). در جمع بندی کلی می توان گفت که هورمون پاشی (خصوصاً سطح هورمونی براسینواستروئید) در افزایش فعالیت کاتالاز و محتوای پرولین موثر بوده و می تواند تحمل کلزا را در برابر تنش خشکی افزایش داده و از قرار گرفتن در شرایط بحرانی نجات دهد.

منابع

- Abedi T, Pakniat H (2010) Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Genetics Plant Breeding* 46: 27-34.
- Ahmadi Mosavi E, Kalantari KH, Torkzade M (2005) Effects of 24-epibrassinolide on lipid peroxidation, proline, sugar and photosynthesis pigments content of canola (*Brassica napus* L.) under water stress. *Physiology* 18: 295-306 (In Farsi).
- Ahmadi MR (2000) A look at growth stages of canola and turnip oil budding to reach. *Olive* 28: 21-141. (In Farsi).
- Amiri Oghan H, Moghaddam M, Ahmadi MR, Davari SJ (2004) Gene action and heritability of drought stress tolerance indices in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Journal of Agriculture Science* 35: 73-83 (In Farsi).
- Ananiev ED, Karagyozev LK, Karanov EN (1987) Effect of cytokinins on ribosomal RNA gene expression in excised cotyledons of *Cucurbita pepo* L. *Planta* 170:370-378.
- Ariano S, Bartolomeo D, Cristos X, Andras M (2005) Antioxidant defenses in Olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. *Functional Plant Biology* 32: 45-53.
- Bajguz A, Hayat S (2009) Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* 47:1-8.
- Bartels D, Souer E (2004) Molecular responses of higher plants to dehydration. Springer Verlag press, Berlin, Heidelberg 9-38.
- Bates L, Waldren R, Teare I (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and soil* 39: 205-207.
- Cechin I, Rossi S, Oliveira V, Fumis T (2006) Photosynthetic responses and proline content of mature and young leaves of sunflower plants under water deficit. *Photosynthetica* 44: 143-146.

(Norani Azad and Chobineh 2008) گزارش کردند با افزایش تنش آبی در آفتابگردان، میزان فعالیت کاتالاز افزایش می یابد. همچنین (Haddad and Salek Jalali 2009) افزایش معنی دار فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان از جمله کاتالاز را در گیاهان جو تحت تنش کمبود آب مشاهده کردند. در این تحقیق سایر سطوح هورمونی نیز بر روی کاتالاز موثر بودند. به طوری که سیتوکنین ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار در ژنوتیپ GKH در حالت آبیاری نرمال و همچنین در زمان تنش سبب افزایش بیان ژن *cat54* نسبت به گیاهان با تیمار عدم هورمون پاشی گردیدند. در رقم OKAPI نیز سیتوکنین ۵۰ میکرومولار در شرایط تنش خشکی سبب افزایش فعالیت کاتالاز شد. ترکیب سیتوکنین و براسینواستروئید نیز بر روی کاتالاز موثر بوده و سبب افزایش بیان هر دو ژن کاتالاز مورد بررسی در حالت تنش خشکی در رقم GKH شد و در رقم OKAPI نیز بر بیان یکی از ژن ها (*cat16*) موثر بود. افزایش فعالیت این آنزیم در سطوح هورمون پاشی نشان دهنده این است که سطوح مورد مطالعه از مکانیسم دفاعی آنتی اکسیدانی به منظور مقاومت در برابر تنش ناشی از کمبود آب سود برده است.

نقش مفید پرولین در کاهش فشار اسمزی توسط محققین، در گیاهان مختلفی مثل گندم (Vendruscolo et al. 2007)، گلرنگ (Cechin et al. 2006) و کلزا (Moradshahi et al. 2004) گزارش شده است. در بررسی تحمل گیاهان به تنش های محیطی و نقش جذب آمینواسیدها در تنظیم اسمزی طی شرایط تنش کمبود آب نتیجه گرفتند که در زمان وقوع تنش کمبود آب، گیاه با جذب ذخیره اسیدهای آمینه ای مثل پرولین در سلول، باعث حفظ فشار آماس و ادامه رشد سلول می شود. Patakas et al. (2002). با توجه به نتایج بدست آمده این بررسی به نظر می رسد کاربرد هورمون (تمام سطوح هورمونی به جز سیتوکنین ۵۰ میکرومولار) در رقم GKH باعث افزایش سازگاری اسمزی در طی تنش شده، به دلیل اینکه سطوح هورمونی سبب افزایش پرولین شده بودند. با وجود اینکه در رقم دیگر که نسبتاً حساس بود و نتوانسته بود افزایش پرولین را منجر شود، احتمالاً هورمون از طریق سازوکارهای دیگری توانسته در برابر تنش خشکی

- Chandna R, Augustine R, Naveen C (2012) Evaluation of candidate reference genes for gene expression normalization in *Brassica juncea* using Real-Time quantitative RT-PCR. Plos One 7:1-10.
- Chaoui A, Mazhoudi S, Ghorbal MH, Ferjani E (1997) Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Science 127: 139-147.
- Clouse SD, Zurek DM, McMorris TC, Baker ME (1992) Effect of brassinolide on gene expression in elongating soybean epicotyls. Plant Physiology 100: 1377-1383.
- Esfandiari A, Mahbob S, Shakiba MR, Aliari H (2009) The role of the volume of treasury water soluble antioxidants and proline in protect from cell membranes in drought stress. Agricultural Science 19: 139-147 (In Farsi).
- Eskandari M, Tadaion S, Ebrahimi HR (2010) Effect of 28-hemobrassinolid to reduce the effects of drought stress on the medicinal herb savory. Dissertation, University of Arsanjan, Iran (In Farsi).
- Fazeli F, Ghorbanli M, Niknam V (2007) Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars. Biologia Plantarum 51: 98-103.
- Haddad R, Salek Jalali M (2009) Protein changes and antioxidant enzymes activity on barley inbred lines under water shortage. Plant Production Technology 9: 1-10 (In Farsi).
- Hamed A, Akbari GH, Khoshkholghsima NA, Shiranirad AH (2013) Evaluation of drought tolerance in Canola (*Brassica napus* L.) varieties on the basis of physiologic and agronomic characteristics. Dissertation, University of Tehran, College of Abureyhan, Iran (In Farsi).
- Hamrahi S, Habibi D, Madani H, Mashhadi M (2008) The effect of cycocel and elements micronutrients on the amount of antioxidant enzymes as indicators of resistance to drought stress in canola. Journal the Findings Modern of the Agriculture 3: 316-329 (In Farsi).
- Herbinger K, Tausz M, Wonisch A, Soja G, Sorger A, Grill D (2002) Complex interactive effects of drought and ozone stress on the antioxidant defense systems of two wheat cultivar. Plant Physiology Journal 40: 691-696.
- Kendall EJ, Murnaghan BD, Jonesand J, Bowley SR (2000) Iron superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increase winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance. Plant Physiology 22: 1427-1836.
- Khajepour MR (2007) Industrial plants. Jahad University Press. Esfahan, Iran. (In Farsi).
- Li L, Van Staden J, Jager AK (1998) Effects of plant growth regulators on the anti-oxidant system in seedlings of two maize cultivars subjected to water stress. Plant Growth Regulation 25: 81-87.
- Lisar SYS, Motafakkerazad R, Hossain MM, Rahman IMM (2002) Water Stress in Plants: Causes, Effects and Responses.
- Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses. Archives of Biochemistry and Biophysics 444:139-158.
- Mckersie BD, Leshem YY (1994) Stress and stress coping in cultivated plants. Klumer Academic Publishers, Netherland.
- Miller CO, Skoog F, Saltza MH, Strong FM (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. American Chemistry Journal 77:1392-1401.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Plant Science 7: 405-410.
- Moradshahi A, Eskandari BS, Kholdebarin B (2004) Some physiological responses of canola (*Brassica napus* L.) to water deficit stress under laboratory conditions. Iranian Journal of Science and Technology 28:43-50.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. Experimental Botany 53: 1230-1237.
- Nazari MR, Maali Amiri R, Ramezanpour SS (2011) The relative gene expression of enzymatic responses of catalase and peroxidase Quantitative assessment of gene expression pattern of Catalase and peroxidase under cold stress condition in chickpea. Genetics in the Third Millennium 9: 2290-2299 (In Farsi).
- Norani Azad H, Chobineh D (2008) study of water stress on soluble sugars, proline, biomass, enzymes and ion in the sunflower plant. Journal research on biological knowledge Iran 3: 19-26. (In Farsi).
- Ozdemir 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 Regulation 41: 1-9.
- Parida AK, Das AB (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants. Ecotoxicology and Environmental Safety 60: 324-349.
- Patakas A, Nikolaou N, Zioziou E, Radoglou K, Noitsakis B (2002) The role of organic solute and ion accumulation in osmotic adjustment in drought-stressed grapevines. Plant Science 163: 361-367.
- Pfaffi MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research 29: 2002-2007.
- Rashidfar J, Dehghani H, Alizadeh B (2012) Evaluation of drought tolerance in varieties *Brassica napus* L. Iranian Field Crops Research 10: 456-467.
- Saffari M, Ahmadi J, Khoshkholgh Sima NA, Shobbar Z, Naghavi MR (2013) The Evaluation of Cytokinins and Brassinosteroid Hormones spray effects on drought tolerance gene expression profile in tolerant and susceptible canola cultivars. Dissertation, University of International Imam Khomeini, Iran. (In Farsi).
- Shinozaki K, Shinozaki KY (2007) Gene networks involved in drought stress and Tolerance. Experimental Botany 58: 221-227.
- Sivamani E, Bahieldin A, Wraith JM, Al Niemi T, Dyer WE, Ho THD, Qu R (2000) Improved biomass productivity and water use efficiency under drought conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley *HVA1* gene. Plant Science 155:1-9.

Smirnoof N, Cumbes GJ (1989) Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28:1057-1060.

Vardhini BV, Rao SSR (2003) Amelioration of osmotic stress by brassinosteroids on seed germination and seedling growth of three varieties of sorghum. *Plant Growth Regulation* 41:25-31.

Vendruscolo ECG, Schuster I, Pileggi M, Scapim CA, Molinari HBC, Marur CJ, Vieira LGE (2007) Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *Plant Physiology* 164: 1367-1376.

Yamchi A, Rastegari jazi F, Ghobadi S, Mosavi A, Karkhanehie AA (2004) Abundant expression of *p5cs* gene with the aim of increasing resistance to osmotic

stresses in in transgenic tobacco plants. *Science and Technology of Agriculture and Natural Resources* 4: 31-39 (In Farsi).

Yan Yan DU, Wang PC (2008) Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 1318-1326.

Zhang G, Tanakamaru K, Abe J, Morita S (2006) Influence of water logging on some anti-oxidative enzymatic activities of two barley genotypes differing in anoxia tolerance. *Acta Physiologia Plantarum* 29: 171-176.

Zhang M, Zhai Z, Tian X, Duan L, Li Z (2008) Brassinolide alleviated the adverse effect of water deficits on photosynthesis and the antioxidant of soybean (*Glycine max* L.). *Plant Growth Regulation* 1007-9305.