ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳
صفحه ۳۴۲- ۳۲۹

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

Influence of brassinosteroied 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 خوش‌خلق سیما*[۲]، زهراسادات شبر[۲]

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

Saffari M[1], Ahmadi J[1], Khosh Kholgh Sima NA[*2], Shobbar Z[2]

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 تنظیم کننده‌های 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 تاثیر هورمون‌های سیتوکنین و براسینواستروئید بر میزان فعالیت و بیان ژن آنزیم کاتالاز و پرولین تحت شرایط تنش خشکی در دو رقم کلزا به نام‌های GKH و OKAPI بررسی شد. این تحقیق به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا 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 افزاینده بود و در رقم OKAPI روندی کاهشی را نشان داد.

واژه‌های کلیدی
براسینواستروئید
پرولین
سیتوکنین
کلزا
کاتالاز

Archive of SID

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; 2007). 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). از پاسخ‌های بیوشمیایی 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 گلایسین 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[1] (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 تاثیر هورمون‌های گیاهی باشد (Smirnoof and Cumbes 1989; Mckersie and Leshem 1994). سیتوکنین‌ها دارای اثرات افزایشی رشدی بوده که مهم‌ترین آن تقسیم سلولی است. سیتوکنین‌ها به طور عمده در مریستم‌های انتهایی ریشه، گل آذین‌ها و میوه‌های در حال رشد ساخته می‌شوند (Miller et al.

[1] Reactive oxygen species

Archive of SID
www.SID.ir

1955). سیتوکنین 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 محدوه وسیعی از تنش‌های محیطی خشکی، شوری، سرما و گرما افزایش داده‌اند و این افزایش عموما 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 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 آبسیزیک اسید و تنش اکسیداتیو تغییر یافت (Yan Yan and Wang 2008). در این پژوهش به منظور بررسی تاثیر هورمون‌های سیتوکنین 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 (جدول۱). این تحقیق در سال ۱۳۹۱ در گلخانه و آزمایشگاه پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا 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 توبولین)، Br (محلول‌پاشی با براسینواستروئید با غلظت 10^{-7} میکرومولار)، Cyt50 (محلول‌پاشی با سیتوکنین با غلظت ۵۰ میکرومولار)، Cyt100 (محلول‌پاشی با سیتوکنین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار) و Cyt100×Br (محلول‌پاشی با مخلوط سیتوکنین 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

Archive of SID
www.SID.ir

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 کاملا 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.

جدول۱- 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 کیووت کوارتز 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 کیووت 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 سولفوسالیسیلیک 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 نین هایدرین و دو میلی‌لیتر اسید استیک 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 همردیف 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 (جدول۲). در این پژوهش از ژن خانه‌دار[1] 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)

[1] House keeping

Archive of SID
www.SID.ir

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

نام آغازگر	(′3-′5) آغازگر رو به جلو	(′3-′5) آغازگر برگشتی	Length (bp)	TM	Accession
cat54	ATGAGATCCGCAGCATCTGG	GAGATTGGTCTCCCTAGATG	111	60˚C	U68219.2
cat16	AAGAGCGTTTCGTGAAGCGTT	GCCTCACGTTAAGACGGGAA	141	62˚C	EU487186.1
p5CS	GGTCCAGTTGGAGTAGAAGG	GCACTGCCTTTGTCCTTTCT	133	62˚C	AF314812.1
GAPDH	AGAGCCGCTTCCTTCAACATCATT	TGGGCACACGGAAGGACATACC	112	62˚C	EF123055.1

PCR) با استفاده از کیت BIO–RAD (BIO-RAD, iQ Syber Supermix (Green انجام شد. میزان بیان ژن با روش Efficiency (pfaffi 2001) adjusted ΔΔCt محاسبه شد. سپس همه داده‌ها با ژن خانه‌دار *GAPDH* به عنوان کنترل داخلی نرمال و میزان تغییرات بیان ژن در تنش‌های مختلف نسبت به شاهد سنجیده شد.

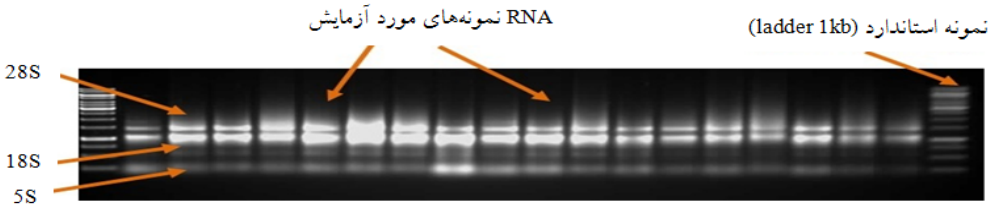
نتایج و بحث

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 تکثیری در واکنش PCR انجام نشد.

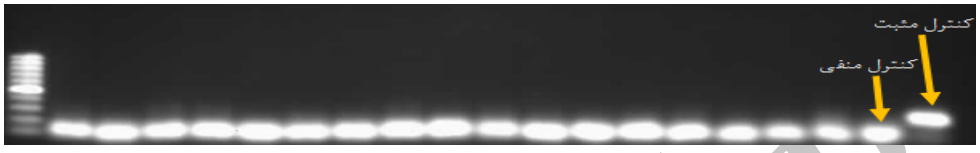
تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۳) برای فعالیت آنزیم کاتالاز و محتوای پرولین اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال یک درصد در منابع تغییر تنش، هورمون‌پاشی، اثرات متقابل رقم × هورمون، تنش × هورمون و رقم × تنش × هورمون نشان داد. همچنین برای فعالیت کاتالاز در سطح احتمال پنج درصد اثر متقابل رقم × تنش اختلاف معنی‌داری را نشان داد اما برای محتوای پرولین این اثر معنی‌دار نبود. بین رقم‌ها نیز برای فعالیت کاتالاز و محتوای پرولین اختلاف معنی‌داری دیده نشد. معنی‌دار بودن اثر متقابل رقم × هورمون، تنش × هورمون و رقم × تنش × هورمون دلالت بر عدم پاسخ یکسان دو رقم GKH و OKAPI و نیز دو سطح تنش و عدم تنش نسبت به سطوح مختلف تیمارهای هورمون‌پاشی انجام گرفته دارد. برای میزان بیان ژن‌های کاتالاز *cat16* و *cat54* و ژن دخیل در سنتز پرولین (*p5cs*) علاوه بر فاکتورهای اصلی رقم، تنش و هورمون‌پاشی، تمامی اثرات متقابل دوگانه و سه‌گانه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد و عدم روند پاسخ یکنواخت هر کدام از فاکتورها را در سطوح فاکتورهای دیگر نشان داد.

بر اساس مقایسه میانگین‌ها (شکل۳) 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 معنی‌داری را با سایر سطوح هورمونی و سطح شاهد (عدم هورمون‌پاشی) (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 هورمون‌پاشی (۲/۵۹) اختلاف معنی‌داری نشان داد. در هر دو رقم سطح هورمونی سیتوکنین ۵۰ میکرومولار در شرایط تنش با شاهد آبیاری نرمال خود و نیز با شاهد هورمون‌پاشی اختلاف معنی‌داری 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 هورمون‌پاشی سیتوکنین ۱۰۰ میکرومولار (۵/۰۴) دیده شد و اختلاف معنی‌داری را با سطح عدم هورمون‌پاشی (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.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۱- تصویر الکتروفورز ژل آگاروز یک درصد جهت بررسی کیفیت RNA استخراج شده



شکل۲- محصول واکنش PCR جهت اطمینان از حذف آلودگی DNA از RNAهای استخراج شده (با توجه به باندهای ladder 100 bp باندهای مشاهده شده در ردیف‌های RNA و کنترل منفی آغازگر دایمر می‌باشد).

جدول۳- 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

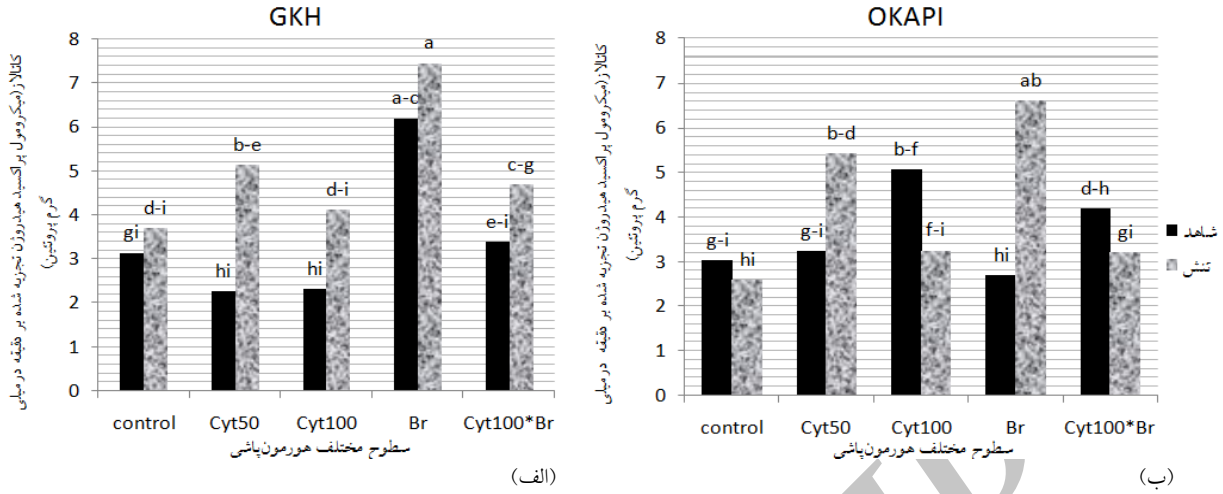
منابع تغییر		میانگین مربعات				
	درجه آزادی	فعالیت کاتالاز	Gene *cat16*	Gene *cat54*	محتوای پرولین	Gene *p5cs*
رقم	۱	۱/۴۴^{ns}	۳/۷۹۵**	۱۱/۵۲۸**	۰/۱۶۶^{ns}	۲۷/۹۴**
تنش	۱	۱۶/۹۸۶**	۴۰/۰۹۸**	۴۳/۸۶۱**	۵۱۱/۵۸۴**	۵۵۴/۶۴۲**
رقم × تنش	۱	۳/۵۳۶*	۴/۵۴۳**	۷/۶۰۴**	۰/۰۰۷^{ns}	۴۰/۸۱۱**
هورمون‌پاشی	۴	۱۱/۶۴۹**	۱۲/۳۸۹**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

ns، * و **: به ترتیب نشان‌دهنده غیر معنی‌داری و معنی‌دار بودن در سطح احتمال پنج و یک درصد

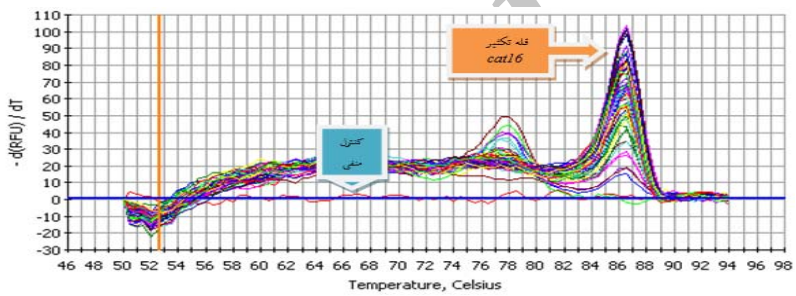
واکنش Real time-PCR با استفاده از آغازگرهای ژن *cat16* انجام گرفت. شکل ۴ حدود آستانه و منحنی ذوب ژن *cat16* را نشان می‌دهد.

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 سیتوکنین ۱۰۰ میکرومولار و براسینواستروئید (۳/۱۲ در رقم GKH و ۳/۶۰ در رقم OKAPI) بوده و این سطوح اختلاف معنی‌داری را با سطح شاهد هورمون‌پاشی (۱/۴۷ در رقم GKH و ۱/۸۴ در رقم OKAPI) نشان دادند. در واقع می‌توان گفت که این سطوح هورمونی اثر مثبتی در افزایش بیان این ژن داشته‌اند. 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

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۳- 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، نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌داری می‌باشد.



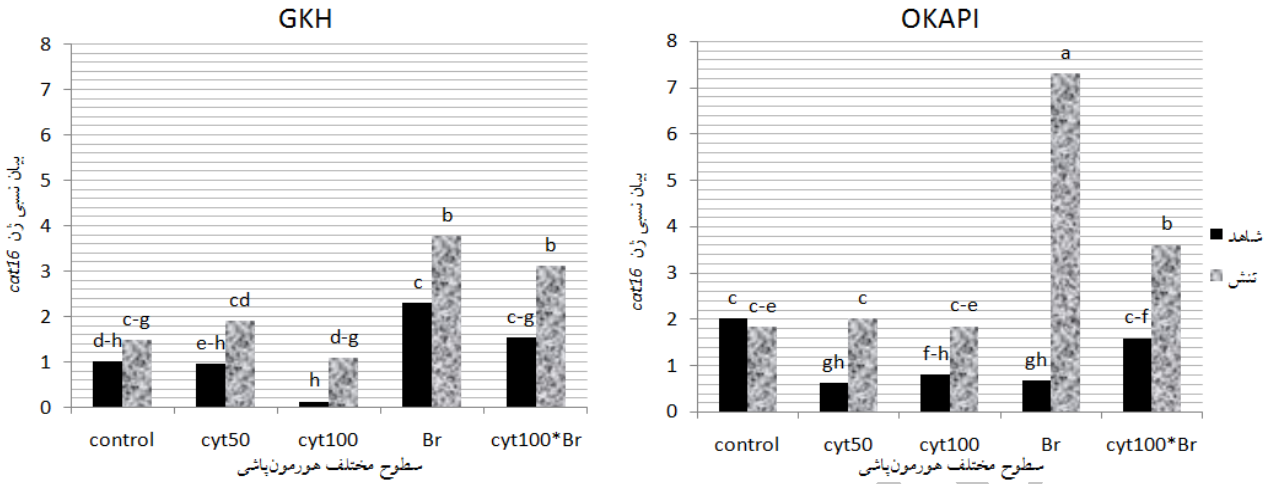
شکل ۴- نمودار منحنی ذوب مربوط به ژن *cat16*

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 (شکل۵).

واکنش Real time-PCR با استفاده از آغازگرهای ژن *cat54* برای نمونه‌های مورد بررسی انجام گرفت و نمودار منحنی ذوب آن در شکل ۶ ارائه شده است.

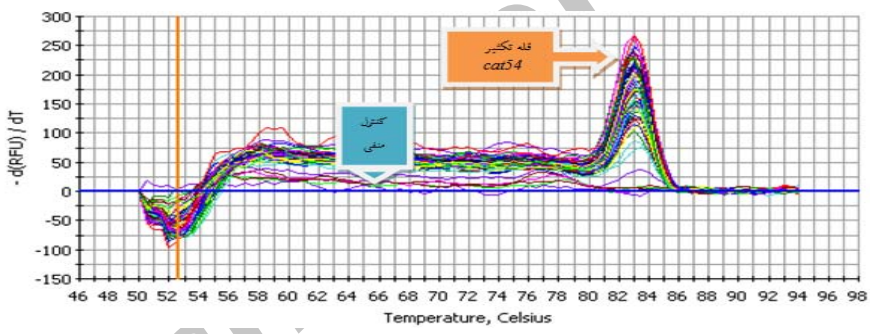
نتایج مقایسه میانگین میزان بیان ژن *cat54* (شکل ۷) در رقم GKH نشان داد که در تیمار تنش خشکی بیشترین بیان نسبی این ژن در بین سطوح هورمون‌پاشی بوده و تمام تیمارهای سطوح هورمون‌پاشی اختلاف معنی‌داری را با سطح شاهد (عدم هورمون‌پاشی) نشان دادند. به طوری که بیشترین بیان متعلق به سطح هورمونی براسینواستروئید بوده و نسبت به سطح عدم هورمون‌پاشی 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 معنی‌داری با سطح شاهد عدم هورمون‌پاشی بودند (شکل ۷). مقایسه میانگین برای اثر متقابل آبیاری × هورمون نشان داد که در حالت تنش سطح هورمونی براسینواستروئید (۶/۱۳) از بیان بالاتری برخوردار بوده است و دارای اختلاف معنی‌داری با سایر سطوح هورمون‌پاشی و حتی عدم هورمون‌پاشی بود. از این رو هورمون براسینواستروئید در حالت تنش بیان نسبی ژن بالاتری را نسبت به دیگر سطوح هورمونی داشته و تاثیر این هورمون را در افزایش بیان این ژن می‌توان ملاحظه کرد.

Archive of SID
www.SID.ir



(الف) (ب)

شکل۵- مقایسه بیان ژن کاتالاز *cat16* 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 ستون‌های هر نمودار، نشان‌دهنده این است که سطوح اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

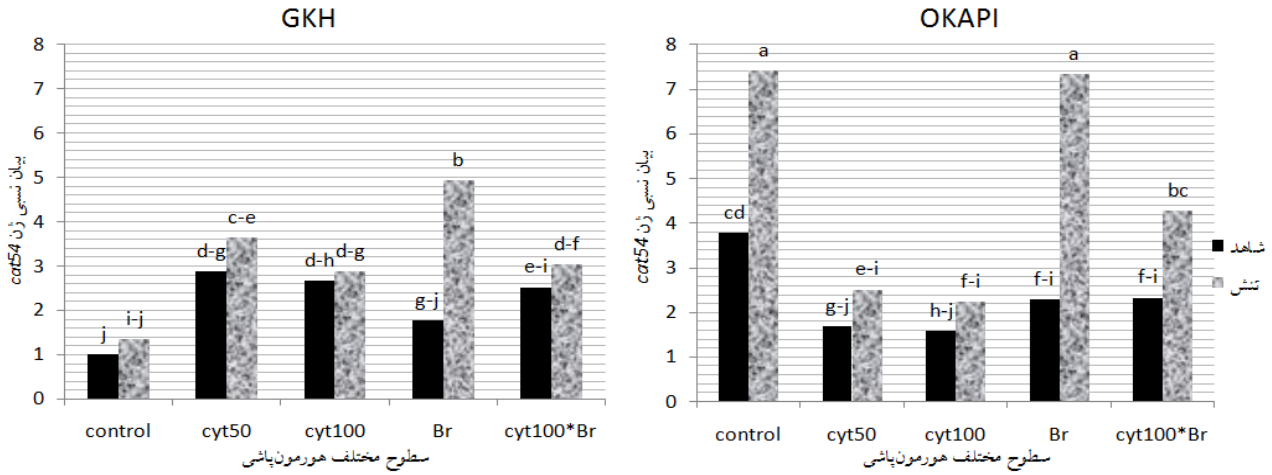


شکل۶- نمودار منحنی ذوب مربوط به ژن *cat54*

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، سیتوکنین ۱۰۰ میکرومولار و سیتوکنین ۱۰۰ میکرومولار + براسینواستروئید بود که نشان‌دهنده‌ی تاثیر این سطوح هورمون‌پاشی بر افزایش محتوای پرولین در رقم GKH است. علاوه بر این می‌توان گفت که هورمون‌پاشی بر محتوای پرولین در رقم OKAPI تاثیر 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 بدون تنش بین سطوح هورمون‌پاشی از لحاظ محتوای پرولین در هر دو رقم تفاوت معنی‌داری دیده نشد. این نتایج نشان دهنده این است که تاثیر هورمون‌پاشی (به جز سیتوکنین ۵۰ میکرومولار) بر محتوای پرولین در رقم GKH افزاینده و در رقم OKAPI کاهنده بوده است.

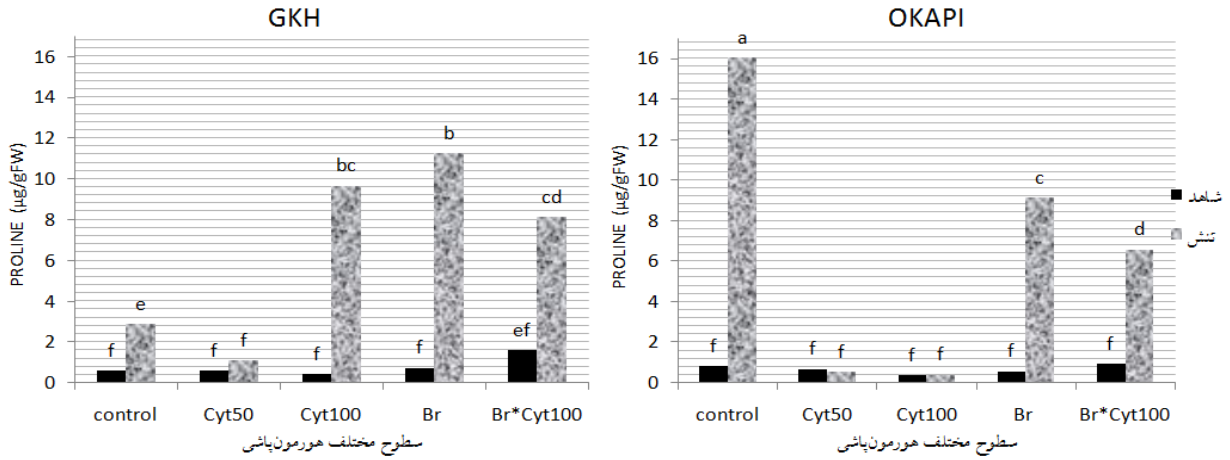
واکنش Real time-PCR با استفاده از آغازگرهای ژن *p5cs* برای نمونه‌های مورد بررسی انجام گرفت و نمودار منحنی ذوب آن در شکل ۹ ارائه شده است.

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



(الف) (ب)

شکل۷- مقایسه بیان ژن کاتالاز *cat54* 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 ستون‌های هر نمودار، نشان‌دهنده این است که سطوح اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

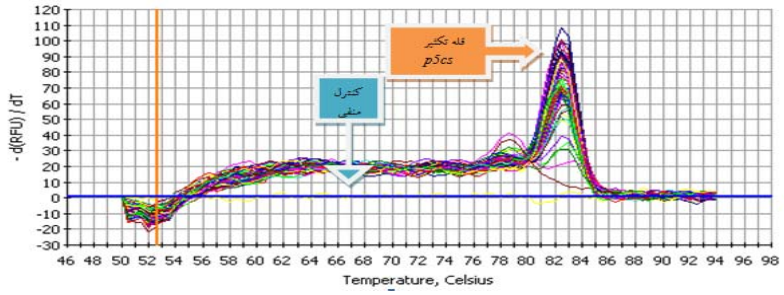


(الف) (ب)

شکل۸- مقایسه محتوای پرولین 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 نمودار، نشان دهنده این است که سطوح اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

میزان بیان ژن *p5cs* در رقم GKH شد. به طوری که سطوح هورمون‌پاشی براسینواستروئید، سیتوکنین ۱۰۰ میکرومولار + براسینواستروئید و سیتوکنین 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 افزایش میزان پرولین از طریق افزایش رونویسی ژن *p5cs* بوده است و نشان‌دهنده تاثیر این سطوح هورمون‌پاشی بر افزایش پرولین در رقم GKH است. هورمون‌پاشی بر بیان ژن *p5cs* در رقم OKAPI تاثیر 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

www.SID.ir



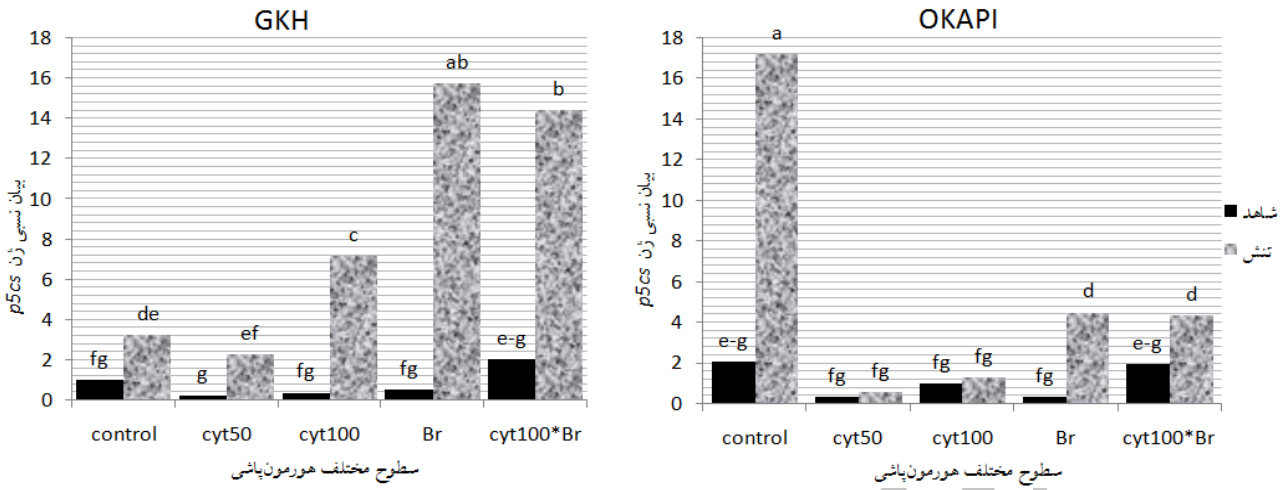
شکل ۹- نمودار منحنی ذوب مربوط به ژن *p5cs*

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 تاثیر هورمون‌پاشی (به جز سیتوکینین ۵۰ میکرومولار) بر روی پرولین در رقم GKH افزاینده و در رقم OKAPI کاهنده بوده است.

جدول همبستگی ساده پیرسون (جدول۴) 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 Sourer 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. 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). عموما 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 تیمار تنش خشکی اعمال شد میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و بیان ژن‌های *cat54* و *cat16* افزایش داشت. در رقم دیگر نیز (OKAPI) در حالت تنش با هورمون‌پاشی براسینواستروئید، فعالیت کاتالاز و بیان ژن *cat16* افزایش یافت. ضمن اینکه این

Archive of SID
www.SID.ir



(الف) (ب)

شکل ۱۰- مقایسه بیان ژن پرولین (*p5cs*) در (الف) رقم GKH و (ب) رقم OKAPI. {آب مقطر (control)، سیتوکنین ۵۰ میکرومولار (cyt50)، سیتوکنین ۱۰۰میکرومولار (cyt100)، براسینواستروئید (Br)، ترکیب سیتوکنین ۱۰۰میکرومولار و براسینواستروئید (cyt100*Br)}. حروف مشابه لاتین روی نمودار، نشان دهنده این است که سطوح اختلاف معنی‌داری 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 *cat16*	ژن *cat54*	محتوای پرولین	ژن *p5cs*	فعالیت کاتالاز	ژن *cat16*	ژن *cat54*	محتوای پرولین	ژن *p5cs*
فعالیت کاتالاز	۱					۱				
ژن *cat16*	۰/۴۸۸**	۱				۰/۵۲۱**	۱			
ژن *cat54*	۰/۴۰۴*	۰/۲۲۵ns	۱			۰/۱۶۶ns	۰/۶۰۰**	۱		
محتوای پرولین	۰/۰۹۳ns	۰/۴۱۵*	۰/۲۱ns	۱		-۰/۰۰۱ns	۰/۲۴۱ns	۰/۷۳۰**	۱	
ژن *p5cs*	۰/۱۵ns	۰/۵۰۷**	۰/۳۲ns	۰/۶۷۹**	۱	۰/۰۵۸ns	۰/۰۶۶ns	۰/۴۸۰**	۰/۸۳۹**	۱

ns، * و ** به ترتیب نشان دهنده غیر معنی‌داری و معنی‌دار بودن در سطوح احتمال پنج و یک درصد

هورمون در حالت آبیاری نرمال نیز در رقم GKH سبب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز و بیان ژن *cat16* شد. این امر نشان‌دهنده 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 همان گروه از گیاهان بدون تیمار بطور مناسب‌تری 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 آنتی‌اکسیدان 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 هورمون‌پاشی) دارا بودند.

Archive of SID
www.SID.ir

Norani Azad and Chobineh (2008) گزارش کردند با افزایش تنش آبی در آفتابگردان، میزان فعالیت کاتالاز افزایش می‌یابد. همچنین Haddad and Salek Jalali (2009) افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان 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 هورمون‌پاشی 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 ژن‌ها (*cat16*) موثر بود. افزایش فعالیت این آنزیم در سطوح هورمون‌پاشی نشان‌دهنده این است که سطوح مورد مطالعه از مکانیسم دفاعی آنتی‌اکسیدانی 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 تنش‌های 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 و ذخیره اسیدهای آمینه‌ای مثل پرولین در سلول، باعث حفظ فشار آماس و ادامه رشد سلول می‌شود Patakas et al. (2002). با توجه به نتایج بدست آمده این بررسی به نظر می‌رسد 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 نسبتا حساس بود و نتوانسته بود افزایش پرولین را منجر شود، احتمالا هورمون از طریق سازوکارهای دیگری توانسته در برابر تنش خشکی 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 هورمون‌پاشی براسینواستروئید و اعمال تیمار تنش خشکی بر روی کلزا افزایش معنی‌دار میزان پرولین را نسبت به حالت عدم هورمون‌پاشی مشاهده کردند. همچنین گزارش شده است که تیمار کردن با براسینواستروئید منجر به افزایش بیان ژن پرولین می‌شود (Ozdemir et al. 2004). در جمع‌بندی کلی می‌توان گفت که هورمون‌پاشی (خصوصا سطح هورمونی براسینواستروئید) در افزایش فعالیت کاتالاز و محتوای پرولین موثر بوده و می‌تواند 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 , prolin, 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, Karagyozov 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, Sourer E (2004) Molecular responses of higher plants to dehydration. Springer Verlag press, Berlin, Heildelberg 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.

Archive of SID
www.SID.ir

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, Tadaiun 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 dismotase expression in transgenic alfalfa increase winter survivial 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.

Archive of SID

www.SID.ir

Smirnoof N, Cumbes GJ (1989) Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. Phytocheemistry 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.

Archive of SID

www.SID.ir