ژنتیک نوین
دوره پانزدهم ، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹
صفحه ۲۱٤ - ۲۰۳

اثر شوری بر فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی اکسیدان و بیان ژن‌های کدکننده پروتئین کیناز وابسته به کلسیم به‌عنوان عوامل کلیدی تحمل شوری در کلزا

The effect of salinity stress on activity of some antioxidant enzymes and expression of genes coding calcium-dependent protein kinase as the key determinants of salt tolerance in canola

حسین احمدی[۱]، علیرضا عباسی[۱]، علیرضا طالعی*[۱]، ولی‌اله محمدی[۱]

۱- به‌ترتیب دکترای، دانشیار، دانشیار، استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

Ahmadi H[1], Abbasi A[1], Taleei A[*1], Mohammadi V[1]

1- PhD, Associate Professor, Associate Professor, Professor, Plant Breeding, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Science and Agricultural Engineering, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ataleei@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۷/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰٦/۰۲)

چکیده

تنش شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی می‌باشد که عملکرد کلزا را تحت تاثیر قرار می‌دهد. به‌منظور مطالعه پاسخ های فیزیولوژیکی کلزا و تغییرات بیان ژن‌های *BnaCDPK*$_6$ و *BnaCDPK*$_{10}$ در شرایط تنش شوری، دو رقم متحمل (Slm046 و زرفام) و دو رقم حساس (اکاپی و ساریگل) در اتاقک رشد کشت شدند و تنش شوری از طریق آبیاری با ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک (NaCl) اعمال شد. محتوای نسبی آب برگ، مالون‌دی‌آلدهید، آنزیم آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز، آنزیم آنتی‌اکسیدان کاتالاز و بیان ژن‌های رمزگذار پروتئین کیناز وابسته به کلسیم ٦ و ۱۰ کلزا اندازه‌گیری شدند. در شرایط شوری شدید (۲۰۰ میلی‌مولار نمک سدیم کلراید) محتوای نسبی آب کاهش و مقدار مالون‌دی‌آلدهید افزایش یافت. محتوای آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، آنزیم کاتالاز و بیان ژن‌های *BnaCDPK*$_6$ و *BnaCDPK*$_{10}$ با بالارفتن شدت تنش شوری افزایش یافت که مقدار این افزایش در ارقام متحمل بیشتر از ارقام حساس بود. این نتایج نشان می‌دهد که افزایش گونه‌های اکسیژن فعال ناشی از تنش شوری نقش مهمی در آسیب به غشای سلول در کلزا دارد و گیاه برای مقابله با آن مکانیسم‌های حفاظتی خود را در برابر تولید گونه‌های اکسیژن فعال افزایش می‌دهد که می‌توان به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و افزایش بیان ژن‌های پروتئین کیناز وابسته به کلسیم اشاره کرد.

واژه‌های کلیدی

آنزیم آنتی اکسیدان
بیان ژن
تنش شوری
صفات فیزیولوژیکی
کلزا

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.2.7]

مقدمه

عملکرد بالقوه گیاهان زراعی بر اثر تنش‌های محیطی کاهش می‌یابد و گیاهان به‌وسیله فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی به تنش‌های زیستی و غیرزیستی واکنش نشان می‌دهند و با آن‌ها سازگار می‌شوند و پاسخ گیاهان و سازگاری آن‌ها به محرک‌های محیطی زیستی و غیرزیستی به الگوهای انتقال پیام وابسته است که توسط مکانیسم‌های متنوع بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی کنترل می‌شود (Ludwig et al. 2004; Arzani 2008). از میان تنش‌های محیطی، تنش خشکی و شوری در سطح جهان گسترده‌تر بوده و به‌همین جهت بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، اگرچه در طبیعت اصولاً چند تنش با هم رخ می‌دهند و تفکیک آن‌ها از یکدیگر مشکل است (Zamani et al. 2010). کلزا (*Brassica napus* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات زراعی روغنی در سراسر جهان است که اثرات نامطلوب زیست محیطی تا حد زیادی بر تولید و کیفیت آن اثر می‌گذارند در صورتی‌که مقدار شوری آب و خاک معادل ۱۰ و ۱۱ دسی‌زیمنس بر متر، واحد آستانه کاهش رشد رویشی و عملکرد بذر کلزا می‌باشد (Francois 1994; FAO 2017). گیاهان از طریق فعال کردن آبشارهای انتقال پیام، پاسخ‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی ضروری برای مقابله و سازگاری با تنش‌های محیطی می‌دهند. مسیر کلی انتقال پیام با درک پیام و به‌دنبال آن فعال شدن پیغامبرهای ثانویه از جمله گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، اینوزیتول فسفاتازها و کلسیم شروع می‌شود. این پیغامبرهای ثانویه سطح کلسیم درون سلولی را نیز تنظیم می‌کنند (Huang et al. 2012). تنش شوری منجر به تولید گونه‌های اکسیژن فعال در گیاهان می‌شود (Mittler 2002). بیشترین خسارت ناشی از تنش‌های مختلف در ارتباط با خسارت اکسیداتیو در سطوح مختلف سلولی است و گونه‌های اکسیژن فعال، فوق‌العاده فعال هستند و می‌توانند متابولیسم نرمال سلولی را از طریق آسیب‌های اکسیداتیو به ماکرومولکول‌های ضروری مثل لیپیدها، نوکلئیک اسیدها و پروتئین‌ها و رنگدانه‌های فتوسنتزی تحت تاثیر قرار دهند (Bolkhia et al. 2003; Gambarova and Gins 2008). گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو ایجاد شده دارای سیستم دفاعی با کارائی بالا هستند که می‌تواند رادیکال‌های آزاد را از بین برده و یا خنثی کنند. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز یکی از مهم‌ترین سدهای دفاعی گیاه در برابر تنش اکسیداتیو می‌باشد و نقش اساسی در مقابله با گونه‌های اکسیژن فعال دارد و با غیرفعال کردن سوپر اکسید، علاوه بر کاهش خسارت‌های آن مانع تشکیل رادیکال مخرب هیدروکسیل از طریق واکنش هابر- ویز (Haber-Weiss) می‌شود و می‌توان گفت این آنزیم یک نقش محوری در مقابله با تنش اکسیداتیو دارد (Hekimi et al. 2018). آنزیم کاتالاز هم به‌عنوان آنزیم آنتی‌اکسیدان مهم در سمیت‌زدایی پراکسید هیدروژن تولیدشده به‌وسیله فرآیندهایی همچون بتا-اکسیداسیون اسیدهای چرب، اکسیداسیون در حین تنفس نوری و انتقال الکترون در زنجیره تنفسی میتوکندری‌ها ایفای نقش می‌کند (Noctor et al. 2010). بیشتر تنش‌های زنده و غیر زنده باعث افزایش در غلظت کلسیم سیتوپلاسمی می‌شود و پاسخ‌های اختصاصی به محرک‌های مختلف می‌تواند از طریق تنوع در دامنه، مدت، موقعیت و فراوانی یون کلسیم ایجاد شود. در گیاهان این تغییرات مقطعی یون کلسیم در سیتوپلاسم توسط مجموعه‌ای از حسگرهای کلسیم نظیر کالمودلین‌ها[1]، پروتئین‌های متصل به کالمودلین[2]، پروتئین‌های مشابه کلسی‌نئورین B[3] و پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم[4] (*CDPK*) دریافت شده و سپس این پروتئین‌های حسی با پروتئین‌های دیگر که غالباً آغاز کننده آبشار فسفریلاسیون هستند، وارد واکنش می‌شوند و ژن‌های اصلی پاسخ به تنش یا عامل‌های رونویسی کنترل کننده این ژن‌ها را مورد هدف قرار می‌دهند و محصول این ژن‌ها در نهایت منجر به سازگاری گیاه شده و به زنده‌مانی گیاه و پشت سر گذاشتن شرایط نامطلوب کمک می‌کند (Sanders et al. 2002; Hepler 2005; Huang et al. 2012).

*CDPK*ها به‌طور وسیع در ریشه‌ها، ساقه‌ها، برگ‌ها، گل‌ها، میوه‌ها و بذرهای گیاهان وجود دارند و نقش مهمی در انتقال پیام کلسیم ایفا می‌کنند و شواهد نشان می دهد که *CDPK*ها در متابولیسم کربن و نیتروژن، نقل و انتقال آب و یون‌ها از غشا، تنظیم اسکلت سلولی، حرکت روزنه‌ای و تنظیم رشد و نمو نقش دارند، ضمناً این خانواده ژنی نقش مهمی در پاسخ‌های دفاعی نسبت به

[1] Calmodulins
[2] Calmodulin-binding proteins
[3] Calcineurin B-like proteins
[4] Calcium-dependent protein kinases

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.2.7]

تنش‌های غیرزنده و زنده دارند (Ohsugi et al. 2011; Coca and Bundó 2017). بیان ژن‌های *CDPK* از طریق تنش‌های فیزیکی و شیمیایی از قبیل دمای پایین، خشکی، زخم شدگی، شوری، فقدان مواد غذایی و هورمون‌ها افزایش می‌یابند. بنابراین تحقیق درباره ژن‌های *CDPK* مفاهیم مهمی را پیرامون رشد گیاه، نمو و افزایش مقاومت گیاه در تنش‌های محیطی نشان می‌دهد (Tai et al. 2009).

Yao et al. (2010) جهت روشن شدن نقش ژن پروتئین کیناز وابسته به کلسیم ٦ آرابیدوپسیس (*AtCDPK*$_6$)، گیاهان آرابیدوپسیس تراریخت تحت کنترل پروموتور ویروس موزائیک گل کلم 35S تولید کردند. مقایسه بین گیاه موتانت از این ژن با گیاهی که تشدید بیان این ژن در آن انجام شده بود نشان داد که ژن *AtCDPK*$_6$ در تحمل به شوری و خشکی نقش دارد که این آزمایش با قراردادن گیاهان شاهد، موتانت و تراریخت در معرض مقادیر ١٥ درصد پلی اتیلن گلیکول ٦٠٠٠ و ٢٥٠ میلی‌مولار نمک بررسی شد و نشان داده که در شرایط نرمال تفاوتی بین هیچ یک از گیاهان ذکر شده وجود ندارد و تحت تنش شوری و خشکی تفاوت معنی‌داری بین گیاهان تراریخت با گیاهان موتانت و شاهد وجود داشت و میزان بیان این ژن در آن‌ها افزایش یافت. Li et al. (2015) یکی از ژن‌های پروتئین کیناز وابسته به کلسیم القایی توسط نمک (*CDPKs*) با طول کامل cDNA ٢٢٤١ جفت‌باز (KF437909) از بادام زمینی (*Arachis hypogeae* L.) توسط روش تکثیر سریع انتهای cDNA (RACE)[1] جدا کردند. تجزیه و تحلیل توالی اسید آمینه این ژن نشان داد که دارای بیشترین تشابه و همولوگ با سویا است و این ژن *AhCDPK* موجب بیان یک پروتئین هیدروفیلی در شبکه آندوپلاسمی می‌شود. این ژن *AhCDPK* به‌شدت توسط یون کلسیم و نمک القا می‌شود و هنگامی‌که گیاه در معرض استرس نمک قرار می‌گیرد، موجب بهبود شرایط فیزیولوژیکی مانند کاهش تجمع گونه‌های اکسیژن فعال، بهبود عملکرد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و بهبود انباشت ماده تنظیمی اسمزی در گیاه می‌شود و می‌تواند نقش مهمی برای بادام زمینی برای مقاومت در برابر تنش شوری بازی کند. *CDPK* در کلزا یک خانواده چند ژنی شامل ٢٥ ژن است که منجر به پاسخ‌های اختصاصی در گیاه می‌شود (Zhang et al. 2014). هدف از این تحقیق، مطالعه میزان تحمل تنش شوری در بعضی ارقام مقاوم و حساس کلزا بود. نظر به این‌که، کشت کلزا به‌عنوان یک محصول با ارزش در سال‌های اخیر در مناطق شور اغلب کشورها و حتی ایران بسیار گسترش یافته‌است لذا در این آزمایش سطوح مختلف تنش شوری استفاده شده است، بنابراین به‌دلیل پیچیدگی فرایند سازگاری در سلول‌های گیاهی و تنوع پاسخ‌ها که بسته به مدت و شدت تنش تغییر می‌کند، بررسی دینامیکی پاسخ‌های بیوشیمیایی و مولکولی سلول تحت تنش شوری ضروری به‌نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور مطالعه پاسخ‌های فیزیولوژیکی کلزا به تنش شوری، دو ژنوتیپ متحمل (زرفام و Slm046) و دو ژنوتیپ حساس به تنش شوری (ساری‌گل و اکاپی) انتخاب شدند (Zahedi and Tohidi Moghadam 2011; Moieni et al. 2013). ارقام مورد مطالعه به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار و در سه سطح شاهد، شوری ١٠٠ و ٢٠٠ میلی‌مولار نمک سدیم کلراید (NaCl) در اتاقک رشد مورد ارزیابی قرار گرفتند. بذور در ابتدا توسط هیپوکلریت سدیم ١ درصد به‌مدت پنج دقیقه ضدعفونی و سپس در داخل گلدان‌هایی (٢ کیلویی) که حاوی مخلوطی از پرلیت، کوکوپیت و ورمیکولیت (به نسبت ١:٣:٣) بودند، تحت شرایط دمایی ٢٢ °C در روز و ١٨ °C در شب، ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی، ٤٠ تا ٦٥ درصد رطوبت و شدت نور ٨٠٠٠ لوکس کشت شدند. تا مرحله چهار برگی همه‌ی گلدان‌ها، محلول غذایی هوگلند دریافت نموده و از مرحله چهار برگی تیمار شوری به‌مدت یک‌ماه با استفاده از نمک (NaCl) اعمال و سپس نمونه‌گیری از برگ‌های میانی گیاهان انجام شد. نمونه‌های گیاه بلافاصله پس از نمونه‌گیری در فریزر ٨٠- °C تا زمان آزمایش نگهداری شد (Ashraf and Ali 2008). محتوای نسبی آب برگ (RWC) با استفاده از وزن تر، وزن اشباع و وزن خشک برگ بر اساس فرمول زیر اندازه‌گیری شد (Weatherley 1950).

[1] Rapid amplification of cDNA ends

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.2.7]

$$RWC\ (\%) = [(FW - DW) / (SW - DW)] \times 100$$

در این رابطه FW وزن تازه برگ، SW وزن تورژسانس برگ و DW وزن خشک برگ می‌باشد. برای این منظور از هر برگ مربوط به هر گلدان تعدادی برش بزرگ گرفته شد، سپس با ترازویی با دقت ۰/۰۰۰۱ وزن تازه برگ اندازه‌گیری شد. سپس قطعات برگی به‌مدت ۲۲ ساعت در آب‌مقطر در دمای ۲۵ °C بر روی شیکر قرار داده شدند. برای اندازه‌گیری وزن تورژسانس برگ، قطعات برگی از آب خارج شدند و با دستمال کاغذی خشک شدند و درون پاکت‌هایی که از قبل تهیه و توزین شده بودند قرار داده و وزن برگ‌ها تعیین گردید. آن‌گاه پاکت‌های آلومینیومی به‌مدت ٤٨ ساعت در آون با دمای ۷۲ °C قرار داده شدند و بعد از گذشت مدت زمان ذکر شده وزن خشک آن‌ها توزین شد. برای تعیین غلظت مالون دی آلدهید (MDA) در برگ، ابتدا ۵۰ میلی‌گرم برگ تازه را در یک میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد روی یخ هموژن کرده و سپس سانتریفیوژ (۱٦۰۰۰ g) در دمای ٤°C به‌مدت ۲۰ دقیقه انجام شد و فاز رویی برداشته شد. سپس محلول ۲۰ درصد تیوکلرواستیک اسید[1] (TCA) که حاوی ۰/٦۵ درصد تیوباربیتوریک اسید[2] بود به فاز رویی اضافه شد و این مخلوط در حمام بن ماری به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ °C قرار گرفت. سپس این مخلوط را در حمام یخ سرد کرده و سپس سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ g) در دمای ٤ °C به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و فاز رویی برداشته شد و غلظت مالون دی آلدهید در طول موج ۵۳۲ و ٦۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد که ماده مورد نظر برای جذب در طول موج ۵۳۲، کمپلکس قرمز (TBA-MDA) است و جذب بقیه رنگیزه‌های غیراختصاصی در ٦۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کسر شد. برای محاسبه غلظت مالون دی آلدهید از ضریب خاموشی (۱۵۵ $mM^{-1}\ cm^{-1}$) و با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (Hodges et al. 1999).

$$MDA\ (\mu mol\ g^{-1}\ Fw) = [A532 - A600/155] \times 1000$$

برای استخراج عصاره آنزیمی از نمونه‌ها، ابتدا نمونه‌های برگی با ازت مایع پودر شدند و سپس بافر استخراج که حاوی تریس–هیدروکلریک اسید ۰/۱ مولار، ساکارز ۵ درصد و ۲–مرکاپتواتانول ۰/۱درصد بود به نسبت ۳:۱ (نمونه برگی پودرشده/ بافر استخراج) اضافه شد و پس از هموژن شدن، سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ g در دمای ٤ °C به‌مدت ۲۰ دقیقه انجام شد و فاز رویی برداشته شد. پس از استخراج عصاره خام از نمونه‌ها، میزان پروتئین عصاره‌های استخراج شده بر اساس روش برادفورد (Bradford 1976) اندازه‌گیری شدند. اندازه‌گیری فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) طبق روش Dhindsa et al. (1981) انجام شد. فعالیت این آنزیم به‌صورت فوتومتریک بررسی می‌شود. بافر اصلی واکنش شامل بافر فسفات (pH=۷/۸) ۱۰۰میلی‌مولار، متیونین ۱۲ میلی‌مولار، نیتروبلوتترازولیوم ۷۵ میکرومولار، EDTA ۱۰۰ میکرومولار و ترایتون X-100 ۰/۰۲۵ درصد بود. از بافر اصلی به هر چاهک به میزان ۲۹۰ میکرولیتر اضافه شد. سپس از بافر ریبوفلاوین ۲ میکرومولار به میزان ۵ میکرومولار به مخلوط واکنش اضافه شد و دستگاه در طول موج ۵٦۰ نانومتر کالیبره شد. برای سنجش هر نمونه ۱۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی استفاده شد. یک واحد آنزیم سوپراکسید دیسموتاز برابر با فعالیت آنزیم بر اساس ممانعت احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین است. فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسپکتروفتومتر و به روش Aebi (1984) اندازه‌گیری شد. برای سنجش میزان فعالیت آنزیم از دستگاه اسپکتروفتومتر ساخت کشور ژاپن در طول‌موج ۲٤۰ نانومتر استفاده شد. محلول‌ها و مواد استفاده شده شامل ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH=۷) ۵۰ میلی‌مولار، ۵ میکرولیتر H_2O_2 ۳۰ درصد و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیم بوده و فعالیت آنزیم به‌مدت ۵ دقیقه در فواصل ۲۰ ثانیه‌ای ثبت شد. یک واحد آنزیم کاتالاز برابر با فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین است. به‌منظور ارزیابی تغییرات بیان ژن تحت تنش شوری از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ریل تایم کمی (Quantitative Real-Time PCR) استفاده شد. ابتدا استخراج RNA با استفاده از کیت RNeasy plant mini (Qiagen, USA) kit از بافت برگ انجام شد. کیفیت RNAهای حاصل با بارگذاری در ژل آگارز یک درصد بررسی شد و مقدار کمی RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ (ND-1000, Thermo Scientific) تعیین شد. برای سنتز cDNA با استفاده از کیت QuantiTect

[1] Tiocloro Acetic acid
[2] Thiobarbituric acid

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.2.7]

Reverse Transcription Synthesis kit (Qiagen, USA)، از یک میکروگرم RNA که با DNase تیمار شده بود، استفاده شد. طراحی آغازگر برای ژن‌های پروتئین کیناز وابسته به کلسیم ٦ و ١٠ کلزا (*BnaCDPK$_{6,10}$*) و هم‌چنین ژن خانه‌داراکتین با استفاده از نرم‌افزار پرایمر٣ (http://primer3.ut.ee) گرفت. در جدول ١ توالی آغازگر ژن‌های اختصاصی و ژن خانه‌دار ارائه شده است. واکنش Real-time PCR با استفاده از کیت Applied Biosystemes SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, UK) و در حجم ١٥ میکرولیتر انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک مرحله واسرشته سازی در ٩٤ °C به‌مدت ٥ دقیقه، ٣٥ چرخه با واسرشته سازی در ٩٤ °C به‌مدت ١٥ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ٦٠ °C به‌مدت ٤٥ ثانیه و بسط در دمای ٧٢ °C به‌مدت ٤٥ ثانیه بود. در نهایت میزان بیان ژن با سه تکرار تکنیکی و بیولوژیکی بر اساس روش تصحیح کارایی ΔΔCt (Paffle 2001) محاسبه شد.

نتایج و بحث

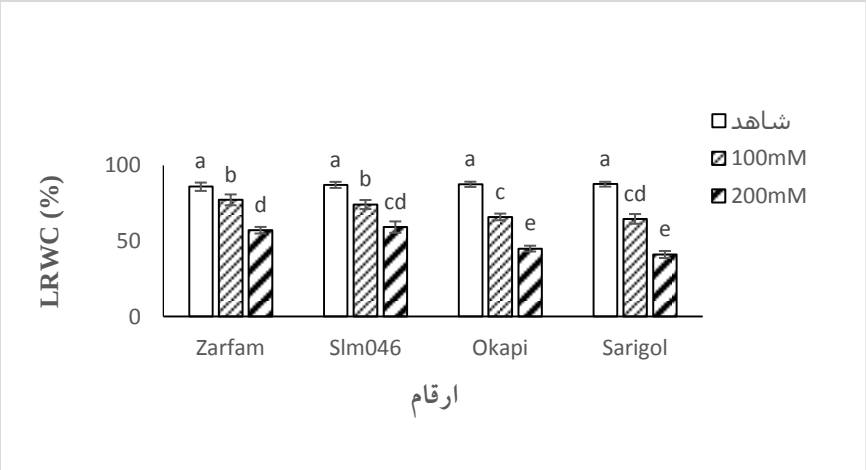
نتایج تجزیه واریانس (جدول ٢) نشان داد که محتوای نسبی آب برگ تحت تاثیر شوری، رقم و اثر متقابل شوری و رقم قرار گرفت. محتوای نسبی آب برگ تحت تاثیر تنش شوری کاهش یافت که این کاهش تا غلظت ١٠٠ میلی‌مولار نمک با روند کندی صورت پذیرفت و با افزایش غلظت تا ٢٠٠ میلی‌مولار نمک، روند آن افزایش چشمگیری داشت.

کمترین و بیشترین میزان محتوای نسبی آب در بالاترین غلظت نمک در رقم ساریگل با میانگین ٤١/٠٤ درصد و رقم Slm046 با میانگین ٥٩/١٦ درصد مشاهده شدند (شکل ١).

جدول ١- آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه.

نام ژن	شماره دسترسی	مکان ژن	توالی آغازگر	طول تکثیر (جفت‌باز)
BnaCDPK$_6$	XM_013788076.2	LOC106348352	For 5′ TCAAGGACAAAGTCTACGAGGGTAA 3′ Rev 5′ TCTTTTACAGGAACGGGATTGTTG 3′	١٣٦
BnaCDPK$_{10}$	XM_013860191.2	LOC106419410	For 5′AGTCAGATCGAGATTGAAGCAGTT 3′ Rev 5′ TTGAGTTCCGGGCAAGTTATTCTA 3′	١٦٥
Bnaactin$_7$	XM_013858992	LOC106418315	For 5′ TGGGTTTGCTGGTGACGAT 3′ Rev 5′ TGCCTAGGACGACCAACAATACT 3′	٦٣

داده‌های آزمایش به‌صورت فاکتوریل دو عاملی (رقم و تنش) با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.4 تجزیه شد و مقایسه میانگین بر اساس روش دانکن در سطح پنج درصد صورت گرفت.



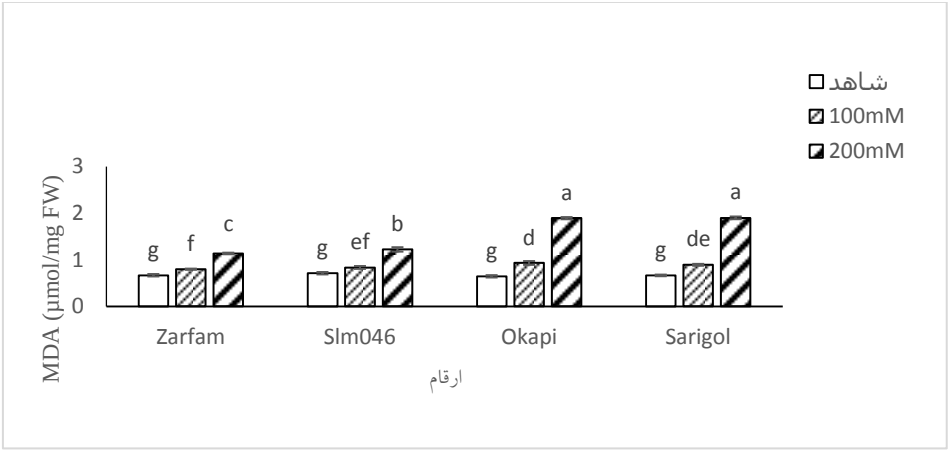
شکل ١- اثر تنش شوری بر روی محتوای نسبی آب برگ (LRWC)، بارها نشان دهنده‌ی خطای استاندارد و حروف متفاوت در بالای ستون‌ها اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد را نشان می‌دهند.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.2.7]

جدول ۲- تجزیه واریانس محتوای نسبی آب برگ (LRWC)، مالون دی‌آلدهید (MDA)، آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آنزیم کاتالاز (CAT)، بیان ژن $BnaCDPK_6$ و بیان ژن $BnaCDPK_{10}$ در کلزا تحت تنش شوری.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		LRWC	MDA	SOD	*CAT*	$BnaCDPK_6$	$BnaCDPK_{10}$
ارقام	۳	۲۰٤/۸۵**	۰/۲۰**	۲/۲۹**	۱/۳۹**	۰/۳۲**	۰/۲۱**
تنش شوری	۲	۳۹۹۲/٥٤**	۲/٤۷**	۱۰/۷٥**	۱/۷۷**	۲/۹٦**	۱/٥۷**
اثر شوری× ژنوتیپ	٦	۷٥/۰۹*	۰/۱٦**	۰/٤٦**	۰/٤۰**	۰/۱۱**	^{ns}۰/۰٦
خطا	۲۴	۲۰/٥۷	۰/۰۰۲	۰/۰۷	۰/۰۱٥	۰/۰۱٤	۰/۰۳
CV (%)		۱۲/٥٤	۱۰/۷۲	۱۰/٥٤	۱۱/۸٥	۱۱/۰۳	۱۲/۳۷

غیر معنی‌دار (ns)، معنی دار در سطح پنج درصد (*) و یک درصد(**)

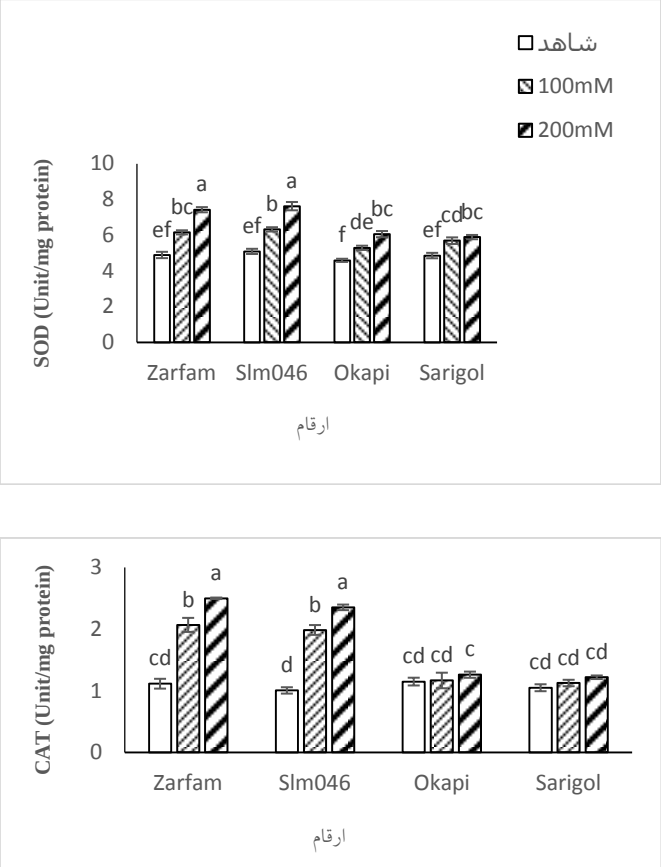


شکل ۲- اثر تنش شوری بر روی مالون دی‌آلدهید برگ، بارها نشان‌دهنده‌ی خطای استاندارد و حروف متفاوت در بالای ستون‌ها اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد را نشان می‌دهند.

محتوای نسبی آب برگ به‌عنوان فاکتوری برای تعیین سطح آب گیاه شناخته شده است که منعکس کننده فعالیت‌های متابولیکی در بافت‌هاست. شوری موجب القای تنش آبی و کاهش در محتوای نسبی آب برگ می‌شود که پیامد آن کاهش آب مورد نیاز برای فرایندهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی از قبیل طویل شدن سلولی، باز شدن روزنه‌ها و فرایندهای وابسته به فتوسنتز، اختلال در جذب مواد غذایی، تجمع متابولیت‌های سمی و گونه‌های اکسیژن فعال در گیاه است (Cicek and Cakirlar 2002; Farkhonded et al. 2012). پژوهش‌های پیشین نشان داده که تغییرات محتوای نسبی آب برگ، شاخص مهم برآورد تحمل به شوری در گیاهان محسوب می‌شود (Jiang et al. 2014). کاهش در محتوای نسبی آب برگ می‌تواند به‌علت کاهش دسترسی به آب در شرایط تنش شوری باشد یا اینکه سیستم‌های ریشه‌ای به‌دلیل کاهش سطح جذب، قادر به جبران آب از دست رفته توسط تعرق نباشند، که خود بیانگر آن است که گیاه تنش شوری را درک کرده و پاسخ‌های متعدد در سطوح مولکولی و فیزیولوژیکی را آغاز کرده است. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که غلظت مالون دی‌آلدهید برگ ارقام کلزا تحت تاثیر شوری، رقم و اثر متقابل شوری و رقم قرار گرفت (جدول ۲). مقایسه میانگین تأثیر شوری و رقم بر غلظت مالون دی آلدهید برگ (شکل ۲) ارقام کلزا نشان داد که در سطح شاهد تفاوت معنی‌داری میان ارقام کلزا از نظر غلظت مالون دی‌آلدهید برگ وجود نداشت. در تمام سطوح شوری بیشترین غلظت مالون دی‌آلدهید برگ در ارقام حساس دیده شد (شکل۲) که بیانگر

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.2.7]

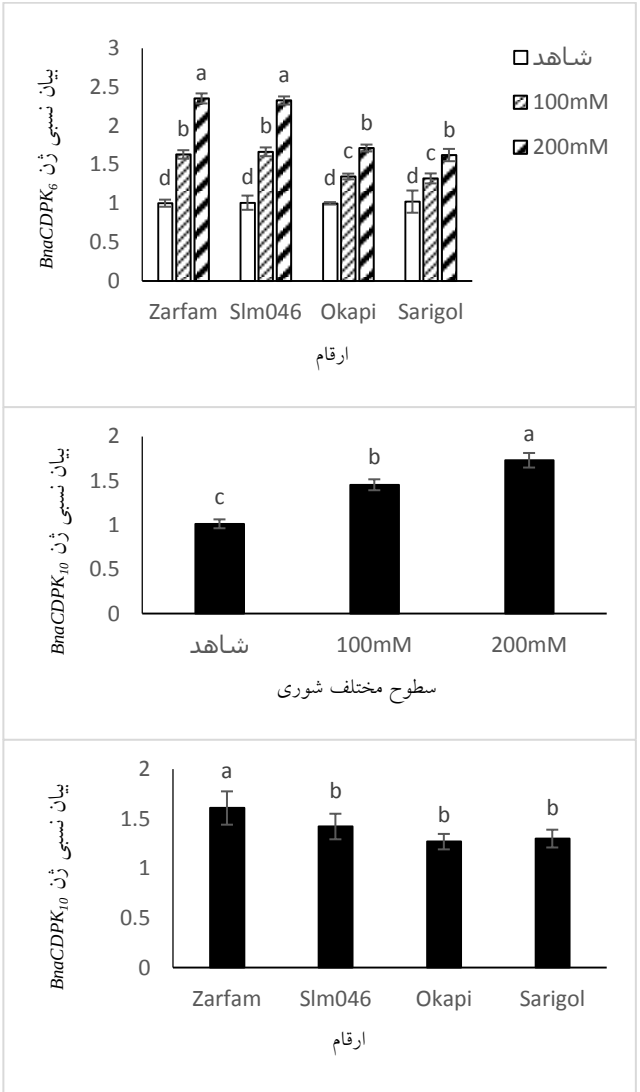
تخریب شدید غشا سلولی در این ارقام تحت تاثیر شوری است. مطالعات نشان داده است که، تخریب غشاهای سلولی تحت تاثیر تنش شوری و تولید مالون دی‌آلدهید برگ که ناشی از تخریب و تجزیه چربی‌های غشا سلولی است می‌تواند به‌عنوان یک معیار مناسب برای بررسی واکنش گیاه به تنش شوری بررسی شود (Gunes et al. 2007). بنابراین ژنوتیپ‌های با MDA کمتر، تحمل بیشتری به شرایط تنش نشان می‌دهند و افزایش MDA تحت تنش شوری در ارقام حساس در اثر کاهش فعالیت مکانیسم‌های دفاعی گیاه در اثر شدت تنش و در نتیجه افزایش میزان خسارت به سلول می‌باشد. مطالعات گذشته نشان داده که مولکول‌های فعال در ساز و کارهای سلولی، پروتئین‌ها هستند و جنبه عملکردی آن‌ها بیشتر به فعالیت پروتئین‌های آنزیمی وابسته است تا به حضور پروتئین‌ها (Pandy et al. 2007) ، بنابراین در این مطالعه میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز سنجیده شد. تجزیه واریانس نشان داد که فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در برگ ارقام کلزا تحت تاثیر معنی‌دار شوری، رقم و اثر متقابل شوری و رقم قرار گرفت (جدول ۲). با افزایش سطح شوری تا ۲۰۰ میلی‌مولار نمک، میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در همه‌ی ارقام نسبت به شاهد افزایش یافت که این افزایش در ارقام متحمل بیشتر از ارقام حساس بود که بیشترین افزایش در رقم زرفام (۵۱٪) و کمترین آن در رقم ساریگل (۲۱٪) مشاهده شد (شکل ۳- الف). مطالعات پیشین در هماهنگی با نتایج مطالعه حاکی از این است که فعالیت سوپراکسید دیسموتاز تحت شرایط تنش شوری در ژنوتیپ‌های متحمل افزایش یافته است (Hoque et al. 2007). تغییرات در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان بسته به شدت و مدت تنش، ژنوتیپ گیاه، غلظت نمک و شرایط محیطی متفاوت است (Koca et al. 2007). مطالعات گذشته در مورد کلزا نشان داد که که میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در گیاهچه کلزا تحت شرایط شوری افزایش یافته است (Dai et al. 2009) و افزایش شدت شوری بر روی ژنوتیپ‌های کلزا موجب افزایش میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز می‌شود (Ashraf and Ali 2008). روند کلی تغییر در فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تیمار شوری نشان داد که با افزایش سطح شوری تا ۲۰۰ میلی‌مولار نمک، میزان فعالیت آنزیم در همه‌ی ارقام نسبت به شاهد افزایش یافت که این افزایش در ارقام متحمل بیشتر از ارقام حساس بود و در ارقام حساس این افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز اختلاف معنی‌دار با شاهد نداشت (شکل ۳- ب). افزایش کمتر فعالیت آنزیم کاتالاز در ارقام حساس نشان می‌دهد که فرآیند انهدام H_2O_2 تولید شده در اثر تنش شوری در این ارقام از کارآمدی کمتری برخوردار است. مطالعات پیشین نشان دادند که افزایش شدت شوری بر روی ژنوتیپ‌های کلزا موجب افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز می‌شود (Ashraf and Ali 2008). بنابراین با افزایش شدت تنش شوری، افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌تواند در وضعیت توازن جدید سلولی گیاهان تحت تنش مؤثر باشد.



شکل۳- تغییر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (الف) و آنزیم کاتالاز (CAT) (ب) تحت تنش شوری، بارها نشان‌دهنده‌ی خطای استاندارد و حروف متفاوت در بالای ستون‌ها اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد را نشان می‌دهد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.2.7]

سریع‌ترین پاسخ سلولی به تنش‌ها تغییر در غلظت کلسیم سیتوپلاسمی است و یون کلسیم نقش حیاتی به‌عنوان پیغامبر ثانویه در سلول‌های گیاهی برای پاسخ به محرک‌های محیطی ایفا می‌کند و حسگر پروتئین کیناز وابسته به کلسیم تغییرات یون کلسیم در سیتوپلاسم را دریافت کرده و منجر به پاسخ اختصاصی در گیاه می‌شود. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بیان ژن $BnaCDPK_6$ تحت تاثیر معنی‌دار شوری، رقم و اثر متقابل شوری و رقم قرار گرفت و بیان ژن $BnaCDPK_{10}$ فقط تحت تاثیر معنی‌دار شوری و رقم قرار گرفت (جدول ۲).



شکل ٤- تغییر بیان ژن *BnaCDPK6* (الف)، تغییر بیان ژن *BnaCDPK10* برای سطوح مختلف شوری (ب) و ارقام متفاوت (ج) تحت تنش شوری، بارها نشان‌دهنده‌ی خطای استاندارد و حروف متفاوت در بالای ستون‌ها اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد را نشان می‌دهند.

با افزایش سطح شوری تا ۲۰۰ میلی‌مولار نمک، میزان بیان ژن $BnaCDPK_6$ در همه‌ی ارقام نسبت به شاهد افزایش یافت که این افزایش در ارقام متحمل بیشتر از ارقام حساس بود که بیشترین افزایش در رقم زرفام (۲/۳۵ برابر) و کمترین آن در رقم ساریگل (۱/۵۸ برابر) نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ٤- الف). بیان ژن $BnaCDPK_{10}$ با افزایش سطح شوری از شاهد تا ۲۰۰ میلی‌مولار نمک، افزایش یافت (شکل ٤- ب). میزان تغییرات در بیان ژن $BnaCDPK_{10}$ در ارقام مختلف نزدیک به هم بود و تنها رقم زرفام اختلاف معنی‌دار با سایر ارقام داشت (شکل ٤- ج). با توجه به اینکه کلزا و آرابیدوپسیس هر دو متعلق به یک خانواده (براسیسکاسه) می‌باشند و ژن‌های رمزگذار پروتئین کیناز وابسته به کلسیم در کلزا، یک خانواده چند ژنی شامل ۲۵ ژن است، بر اساس مطالعات قبلی در آرابیدوپسیس که دو ژن $AtCDPK_6$ و $AtCDPK_{10}$ نقش مهمی در پاسخ به تنش‌های خشکی و شوری داشت (Wu et al. 2010; Yao et al. 2010)، در این مطالعه دو ژن $BnaCDPK_6$ و $BnaCDPK_{10}$ در کلزا انتخاب شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه میزان بیان دو ژن $BnaCDPK_6$ و $BnaCDPK_{10}$ با افزایش سطح شوری از شاهد تا ۲۰۰ میلی‌مولار نمک افزایش داشت اما بر خلاف ژن $BnaCDPK_6$، تغییر بیان ژن $BnaCDPK_{10}$ برای ارقام استفاده شده در این پژوهش اختلاف معنی‌داری بین رقم متحمل Slm046 با ارقام حساس نداشت که می‌تواند ناشی از اثر متقابل بیان ژن‌های دیگر این خانواده ژنی (مانند $BnaCDPK_6$) با این ژن برای سازگاری گیاه در پاسخ به تنش شوری باشد. عوامل رونویسی با اتصال به پروموتور ژن‌های هدف سبب تنظیم فعالیت (القاء یا سرکوب) آن‌ها می‌شوند به‌همین جهت نقش مهمی روی میزان بیان ژن‌ها و تنظیم مسیرهای پیام‌رسانی سلولی در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی بر عهده دارند (Lindemose et al. 2013). با توجه به نقش مهم عوامل رونویسی روی بیان ژن‌ها، آنالیز پروموتور ژن‌های $BnaCDPK_6$ و $BnaCDPK_{10}$ صورت گرفت. برای آنالیز پروموتور، توالی ۲۰۰۰ جفت‌بازی بالا دست ناحیه شروع رونویسی ژن‌های $BnaCDPK_6$ و $BnaCDPK_{10}$ از پایگاه اطلاعات NCBI گرفته شد و فاکتورهای رونویسی از طریق بانک اطلاعاتی PLACE (Higo et al. 1999) مشخص شدند (جدول

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.2.7]

۳). در این مطالعه فاکتورهای رونویسی متعددی شناسایی شدند که می‌توان bZIP، WRKY و MYB که جزء بزرگ‌ترین خانواده فاکتور رونویسی در تنظیمات مسیرهای متابولیک در گیاهان در پاسخ به تنش‌های غیرزنده هستند (Simon et al. 2016) را نام برد که نتایج آنالیز پروموتور و فاکتورهای رونویسی مهم در پاسخ به تنش شوری را در جدول (۳) مشاهده می‌کنید. ABRE، GBox، WBox و موتیف ACGT مکان‌های مورد علاقه اتصال فاکتور رونویسی bZIP هستند که موجب پاسخ اختصاصی تحمل به تنش‌های زنده و غیرزنده می‌شود (Llorca et al. 2014). فاکتور رونویسی ABRE (ABA-responsive-element) موجب تنظیم ژن در پاسخ به تنش اسمزی و پیام رسانی اسید آبسیزیک می‌شود (Chio et al. 2000). فاکتور رونویسی WRKY و RAV نیز نقش کلیدی در پیام رسانی اسید آبسیزیک دارد (Rushton et al. 2012; Feng et al. 2014). فاکتور رونویسی MYB در بسیاری از فرآیندهای گیاه نظیر متابولیسم، توسعه گیاه و پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده نقش دارد (Katiyar et al. 2012). وجود این عناصر تنظیمی در ناحیه پروموتور ژن‌های *BnaCDPK*$_6$ و *BnaCDPK*$_{10}$ حاکی از آن است که بیان این ژن‌ها توسط عوامل مختلفی تحریک شده و در نتیجه از آنجایی که این عوامل رونویسی در مسیرهای پاسخی مختلفی برای پاسخ به تنش شوری درگیر هستند، موجب تفاوت در بیان این دو ژن برای ارقام استفاده شده در این مطالعه تحت تنش شوری باشد.

جدول ۳- آنالیز پروموتور ژن‌های مورد مطالعه و مشخص کردن فاکتورهای رونویسی مهم برای پاسخ به تنش شوری.

فاکتور رونویسی	توالی موتیف	تعداد تکرار موتیف *BnaCDPK*$_6$	تعداد تکرار موتیف *BnaCDPK*$_{10}$
ABRERATCAL	MACGYGB	۱	۱
ABRELATERD1	ACGTG	۱	۱
CGCGBOXAT	VCGCGB	۸	۲
WBOXNTCHN48	CTGACY	۱	۲
WBOXNTERF3	TGACY	۳	۵
WBOXHVISO1	TGACT	۲	۳
WBOXATNPR1	TTGAC	۳	۵
WBBOXPCWRKY1	TTTGACY	۱	-
RAV1AAT	CAACA	۳	۵
MYBGAHV	TAACAAA	۲	۲
MYBCORE	CNGTTR	۵	۲
MYB1AT	WAACCA	٦	۲
MYBST1	GGATA	۵	۲
MYBPLANT	MACCWAMC	۲	-
MYBCOREATCYCB1	AACGG	۱	-
MYBPZM	CCWACC	۱	۱
MYB1LEPR	GTTAGTT	-	۱

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.2.7]

مطالعات پیشین نشان دادند که افزایش و تشدید بیان ژن‌های *CDPK* موجب افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی می‌شوند مثلاً Yao et al. (2010) جهت روشن شدن نقش $AtCDPK_6$، گیاه آرابیدوپسیس تراریخت تحت کنترل پروموتر ویروس موزائیک گل کلم (35S CaMV) تولید کرد و آنان دریافتند در شرایط نرمال تفاوتی بین گیاهان شاهد و تراریخت وجود ندارد و تحت تنش شوری و خشکی تفاوت معنی‌داری بین گیاهان تراریخت و شاهد وجود دارد و افزایش بیان این ژن در تحمل به شوری و خشکی در گیاه تراریخت نقش دارد و در مطالعه‌ی دیگر Wu et al. (2010) بیان کردند که $AtCDPK_{10}$ در پاسخ به تنش خشکی نقش دارد، آن‌ها مشاهده کردند گیاه موتانت $Atcdpk_{10}$ حساسیت بیشتری به تنش خشکی در مقایسه با گیاه شاهد داشت و از طرفی تشدید بیان $AtCDPK_{10}$ موجب افزایش مقاومت به تنش خشکی می‌شود و این ژن نقش مهمی در تنظیم باز و بسته شدن روزنه‌ها ایفا می‌کند. از آنجا که تمام واکنش‌های زیستی در محیط آبی رخ می‌دهد، تنش شوری موجب کاهش آب قابل دسترس و سبب اختلال در فعالیت‌های مورد نیاز گیاه برای رشد و توسعه می‌شود، هم‌چنین پراکسیداسیون چربی‌ها موجب افزایش مالون دی آلدهید و افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن فعال می‌شود که برای مقابله با آن میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی آکسیدان و افزایش بیان ژن‌های پاسخ به تنش ضروری است. نتایج این آزمایش نشان داد که پاسخ سریع به تنش شوری و حذف گونه‌های اکسیژن فعال در گیاه کلزا می‌تواند با تغییرات غلظت یون کلسیم در سیتوپلاسم و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان پس از شروع تنش آغاز شود که از این طریق گیاه را برای مقابله با اثرات تنش آماده کند. با توجه به وجود تغییر در مکانیسم‌های متعدد پاسخ سلولی، لزوم بررسی‌های گسترده در سطوح پروتئینی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در این گیاه به موازات مطالعه ژن‌های مهم درگیر در تنش شوری بیش از پیش احساس می‌شود. در این آزمایش بررسی بیان ژن پروتئین کیناز وابسته به کلسیم تحت تنش شوری انجام گرفت که افزایش بیان این ژن موجب افزایش تحمل گیاه به تنش شد که افزایش و تشدید بیان این ژن‌ها در گیاه کلزا و بررسی پاسخ آن می‌تواند راهکاری مناسب برای کشت و رشد بهتر این گیاه ارزشمند در کشور باشد.

منابع

Aebi H (1984) Catalase in vitro. Methods Enzymol 105: 121-126.

Arzani A (2008) Improving salinity tolerance in crop plants: a biotechnological view. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant 44: 373-383.

Ashraf M, Ali Q (2008) Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.). Environmental and Experimental Botany 63: 266-273.

Bolkhia O, Virolinen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants oxidative damage and oxygen deprivation stress. Annals of Botany 91: 179-194.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Choi HI, Hong JH, Ha JO, Kang JY, Kim SY (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. Journal of Biological Chemistry 275: 1723-1730.

Cicek N, Cakirlar H (2002) The effect of salinity on some physiological parameters in two maize cultivars. Bulgican Journal Plant Physiology 28: 66-74.

Coca M, Bundó M (2017) Calcium-dependent protein kinase *Os*CPK$_{10}$ mediates both drought tolerance and blast disease resistance in rice plants. Journal of Experimental Botany 68: 2963-2975.

Dai QL, Chen C, Feng B, Liu TT, Tian X, Gong YY, Sun YK, Wang J, Du SZ (2009) Effects of different NaCl concentration on the antioxidant enzymes in oilseed rape (*Brassica napus* L.) seedlings. Plant Growth Regulation 59: 273-278.

Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA (1981) Leaf Senescence: Correlated with Increased Levels of Membrane Permeability and Lipid Peroxidation, and Decreased Levels of Superoxide Dismutase and Catalase. Journal of Experimental Botany 32: 93-101.

FAO (2017) FAOSTAT. Available online at: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC. Rapeseed production, 2014; Crops/Regions/World list/Production Quantity (pick lists) (Accessed December 22, 2017).

Farkhonded R, Nabizadeh E, Jalilnezhad N (2012) Effect of salinity stress on proline content, membrane stability and water relation in two sugar beet cultivars. International Journal of Agricultural Science 2: 385-392.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.2.7]

Feng CZ, Chen Y, Wang C, Kong YH, Wu WH, Chen YF (2014) Arabidopsis RAV1 transcription factor, phosphorylated by SnRK2 kinases, regulates the expression of ABI3, ABI4, and ABI5 during seed germination and early seedling development. Plant Journal 80: 654-668.

Francois EL (1994) Growth, seed yield and oil content of canola grown under saline conditions. Agronomy Journal 86: 233-237.

Gambarova NG, Gins MS (2008) Characteristics of oxidative stress of plants with C3 and C4 photosynthesis during salinization. Russian Agricultural Sciences 34:77-80.

Gunes A, Inal A, Alpuslan M, Fraslan F, Guneri E, Cicek N (2007) Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize grown under salinity. Journal of Plant Physiology 164: 728-736.

Hekimi S, Noë A, Branicky R, Wang Y (2018) Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. Journal of Cell Biology 217(6): 1915–1928.

Hepler PK (2005) Calcium: a central regulator of plant growth and development. Plant Cell 17: 2142-2155.

Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. Nucleic acids Research 27: 297-300.

Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK (1999) Improving the thiobarbituric acid- reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta 207: 604-611.

Hoque M, Okuma E, Banu M, NakamuraY, Shimoishi Y, Murata Y (2007) Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. Journal of Plant Physiology 164: 553-561.

Huang GT, Ma SL, Bai LP, Zhang L, Ma H, Jia P, Liu J, Zhong M, Guo ZF (2012) Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. Molecular Biology Reports 39: 969-987.

Jiang X, Qi W, Xu X, Li Y, Liao Y, Wang B (2014) Higher soil salinity causes more physiological stress in female of *Populus cathayana* cuttings. Acta Ecologica Sinica 34: 225-231.

Katiyar A, Smita S, Lenka SK, Rajwanshi R, Chinnusamy V, Bansal KC (2012) Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and Arabidopsis. BMC Genomics 13:544.

Koca H, Bor M, O¨ zdemir F, Türkan I (2007) The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. Environmental and Experimental Botany 60: 344-351.

Li XG, Li Y, Fang F, Guo F, Meng JJ, Xia GM, Wan SB (2015) Isolate on and function al characterization of CDPKs gene from *Arachis hypogeae* under salt stress. Functional Plant Biology 42: 274–283.

Lindemose S, O'Shea C, Jensen MK, Skriver K (2013) Structure, function and networks of transcription factors involved in abiotic stress responses. International Journal of Molecular Sciences 14: 5842-5878.

Llorca CM, Potschin M, Zentgraf U (2014) bZIPs and WRKYs: two large transcription factor families executing two different functional strategies. Frontiers in Plant Science 5: 169.

Ludwig AA, Romeis T, Jonesl JDG (2004) CDPK-mediated signaling pathways: specificity and cross-talk. Journal of Experimental Botany 181-188.

Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science 7: 405-410.

Moieni A, Mirzaee M, Ghanati F (2013) Effects of Drought Stress on the Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzyme Activities in Two Canola (*Brassica napus* L.) Cultivars. Journal of Agricultural Science and Technology 15: 593-602.

Noctor A, Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Van Breusegem F (2010) Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. Journal of Experimental Botany 61: 4197-4220.

Ohsugi R, Hirochika H, Ichikawa H, Komatsu S, AoKi N, Nakamura H, Hakata M, Asano T (2011) Functional characterization of *Os*CPK$_{21}$ a calcium dependent protein kinase that confers salt tolerance in rice. Plant Molecular Biology 75: 179-191.

Pandey A, Chakraborty S, Datta A, Chakraborty N (2007) Proteomics approach to identify dehydration responsive nuclear proteins from chickpea (*Cicer arietinum* L.). Molecular and Cellular Proteomics 7:88-107.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic acids research 29: e45.

Rushton DL, Tripathi P, Rabara RC, Lin J, Ringler P, Boken AK (2012) WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signaling. Plant Biotechnology Journal 10: 2-11.

Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF (2002) Calcium at the crossroads of signaling. Plant Cell 14: 401-417.

Simon B, Sheshadri SA, Nishanth MJ (2016) Stress-Mediated cis-element transcription factor interactions interconnecting primary and specialized metabolism in planta. Frontiers in Plant Science 7: 1725.

Tai S, Liu GS, Sun Y, Chen J (2009) Cloning and Expression of Calcium-Dependent Protein Kinase (CDPK) Gene Family in Common Tobacco (*Nicotiana tabacum*). Agricultural Sciences in China 12: 1448-1457.

Weatherley PE (1950) Studies in the water relations of the cotton plant: I. The field measurement of water deficits in leaves. New Phytologist 49: 81-97.

Wu WH, Liu WX, Ratnasekera D, Wu JJ, Wang C, Wei FJ, Zou JJ (2010) Arabidopsis calcium dependent protein kinase CPK10 functions in abscisic acid and Ca^{2+} mediated stomatal regulation in response to drought stress. Plant physiology 154: 1232-1243.

Yao QH, Hou XL, Fu XY, Gao F, Jin XF, Zho B, Xiong A, Peng RH, Tian Y, Xu J (2010) AtCPK6, a functionally redundant and positive regulator involved in salt/drought stress tolerance in Arabidopsis. Planta 231: 1251-1260.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.2.7]

Zahedi H, Tohidi Moghadam HR (2011) Effect of drought stress on antioxidant enzymes activities with zeolite and selenium application in canola cultivars. Research on Crops 12: 388-392.

Zamani S, Nezami MT, Habibi D, Khorshidi MB (2010) Effect of quantitative and qualitative performance of four canola cultivars (*Brassica napus* L.) to salinity conditions. Advances in Environmental Biology 4: 422-427.

Zhang H, Liu WZ, Zhang Y, Deng M, Niu F, Yang B, Wang X, Wang B, Liang W, Deyholos MK, Jiang YQ (2014) Identification, expression and interaction analyses of calcium-dependent protein kinase (CPK) genes in canola (*Brassica napus* L.). BMC Genomics 15: 211.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.2.7]