

اثر شوری بر فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان 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 H¹, Abbasi A¹, Taleei A^{*1}, Mohammadi V¹

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: ۹۹/۰۶/۰۲)

چکیده

تنش شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی می‌باشد که عملکرد کلزا را تحت تاثیر قرار می‌دهد. به‌منظور مطالعه پاسخ‌های فیزیولوژیکی کلزا و تغییرات بیان ژن‌های *BnaCDPK₆* و *BnaCDPK₁₀* 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، مالون‌دی‌آلدئید، آنزیم آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز، آنزیم آنتی‌اکسیدان کاتالاز و بیان ژن‌های رمزگذار پروتئین کیناز وابسته به کلسیم ۶ و ۱۰ کلزا اندازه‌گیری شدند. در شرایط شوری شدید (۲۰۰ میلی‌مولار نمک سدیم کلراید) محتوای نسبی آب کاهش و مقدار مالون‌دی‌آلدئید افزایش یافت. محتوای آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، آنزیم کاتالاز و بیان ژن‌های *BnaCDPK₁₀* و *BnaCDPK₆* 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 آنتی‌اکسیدان و افزایش بیان ژن‌های پروتئین کیناز وابسته به کلسیم اشاره کرد.

واژه‌های کلیدی

آنزیم آنتی‌اکسیدان
بیان ژن
تنش شوری
صفات فیزیولوژیکی
کلزا

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 کالمودولین‌ها^۱، پروتئین‌های متصل به کالمودولین^۲، پروتئین‌های مشابه کلسی‌نئورین^۳ B^۲ و پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم^۴ (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).

CDPKها 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 می‌دهد که CDPKها 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

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 می‌گذارد 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 (Bolckhia et al. 2003; Gambarova and Gins 2008). گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو ایجاد شده دارای سیستم دفاعی با کارایی بالا هستند که می‌تواند رادیکال‌های آزاد را از بین برده و یا خنثی کند. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز یکی از مهم‌ترین

¹ Calmodulins

² Calmodulin-binding proteins

³ Calcineurin B-like proteins

⁴ Calcium-dependent protein kinases

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 (زرغام و Slm046) و دو ژنوتیپ حساس به تنش شوری (ساری‌گل و اکاپی) انتخاب شدند (Zahedi and Tohidi 2013; Moieni et al. 2011; Moghadam). ارقام مورد مطالعه به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار و در سه سطح شاهد، شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک سدیم کلراید (NaCl) در اتافک رشد مورد ارزیابی قرار گرفتند. بذور در ابتدا توسط هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به‌مدت پنج دقیقه ضدعفونی و سپس در داخل گلدان‌هایی (۲ کیلویی) که حاوی مخلوطی از پرلیت، کوکوپیت و ورمیکولیت (به نسبت ۳:۳:۱) بودند، تحت شرایط دمایی ۲۲ °C در روز و ۱۸ °C در شب، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، ۴۰ تا ۶۵ درصد رطوبت و شدت نور ۸۰۰۰ 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 ۸۰ °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).

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 ۶ آرآیدوپسیس (*AtCDPK6*)، گیاهان آرآیدوپسیس 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 *AtCDPK6* در تحمل به شوری و خشکی نقش دارد که این آزمایش با قراردادن گیاهان شاهد، موتانت و تراریخت در معرض مقادیر ۱۵ درصد پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ و ۲۵۰ 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 ۲۲۴۱ جفت‌باز (KF437909) از بادام زمینی (*Arachis hypogaea* L.) توسط روش تکثیر سریع انتهای cDNA (RACE) 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 هنگامی که 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 ۲۵ ژن است که

¹ Rapid amplification of cDNA ends

استخراج) اضافه شد و پس از هموژن شدن، سانتریفیوژ با سرعت 10000 g در دمای 4 °C به مدت 20 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 به صورت فوتومتریک بررسی می‌شود. بافر اصلی واکنش شامل بافر فسفات (pH=7/8) 100 میلی‌مولار، متیونین 12 میلی‌مولار، نیتروبلوترازولیوم 75 میکرومولار، EDTA 100 میکرومولار و تریتون X-100 0/25 درصد بود. از بافر اصلی به هر چاهک به میزان 290 میکرولیتر اضافه شد. سپس از بافر ریوفلاوین 2 میکرومولار به میزان 5 میکرومولار به مخلوط واکنش اضافه شد و دستگاه در طول موج 560 نانومتر کالیبره شد. برای سنجش هر نمونه 10 میکرولیتر عصاره پروتئینی استفاده شد. یک واحد آنزیم سوپراکسید دیسموتاز برابر با فعالیت آنزیم بر اساس ممانعت احیای نوری نیتروبلوترازولیوم در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین است. فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در دمای 25 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 طول موج 240 نانومتر استفاده شد. محلول‌ها و مواد استفاده شده شامل 3000 میکرولیتر بافر فسفات (pH=7) 50 میلی‌مولار، 5 میکرولیتر H₂O₂ 30 درصد و 50 میکرولیتر عصاره آنزیم بوده و فعالیت آنزیم به مدت 5 دقیقه در فواصل 20 ثانیه‌ای ثبت شد. یک واحد آنزیم کاتالاز برابر با فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین است. به منظور ارزیابی تغییرات بیان ژن تحت تنش شوری از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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

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

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 0/0001 وزن تازه برگ اندازه‌گیری شد. سپس قطعات برگ به مدت 22 ساعت در آب مقطر در دمای 25 °C بر روی شیکر قرار داده شدند. برای اندازه‌گیری وزن تورژسانس برگ، قطعات برگ 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 به مدت 48 ساعت در آن با دمای 72 °C قرار داده شدند و بعد از گذشت مدت زمان ذکر شده وزن خشک آن‌ها توزین شد. برای تعیین غلظت مالون دی‌آلدهید (MDA) در برگ، ابتدا 50 میلی‌گرم برگ تازه را در یک میلی‌لیتر اتانول 80 درصد روی یخ هموژن کرده و سپس سانتریفیوژ (16000 g) در دمای 4 °C به مدت 20 دقیقه انجام شد و فاز رویی برداشته شد. سپس محلول 20 درصد تیوکلرواستیک اسید¹ (TCA) که حاوی 0/65 درصد تیوباربیتوریک اسید² بود به فاز رویی اضافه شد و این مخلوط در حمام بن ماری به مدت 30 دقیقه در دمای 95 °C قرار گرفت. سپس این مخلوط را در حمام یخ سرد کرده و سپس سانتریفیوژ (10000 g) در دمای 4 °C به مدت 10 دقیقه انجام شد و فاز رویی برداشته شد و غلظت مالون دی‌آلدهید در طول موج 532 و 600 نانومتر اندازه‌گیری شد که ماده مورد نظر برای جذب در طول موج 532، کمپلکس قرمز (TBA-MDA) است و جذب بقیه رنگیزه‌های غیراختصاصی در 600 نانومتر تعیین و از این مقدار کسر شد. برای محاسبه غلظت مالون دی‌آلدهید از ضریب خاموشی (155 mm⁻¹ cm⁻¹) و با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (Hodges et al. 1999).

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

برای استخراج عصاره آنزیمی از نمونه‌ها، ابتدا نمونه‌های برگ با ازت مایع پودر شدند و سپس بافر استخراج که حاوی تریس-هیدروکلریک اسید 0/1 مولار، ساکارز 5 درصد و 2-مرکاپتواتانول 0/1 درصد بود به نسبت 3:1 (نمونه برگ پودر شده/ بافر

¹ Thiocloro Acetic acid

² Thiobarbituric acid

سه تکرار تکنیکی و بیولوژیکی بر اساس روش تصحیح کارایی $\Delta\Delta Ct$ (Paffle 2001) محاسبه شد.

نتایج و بحث

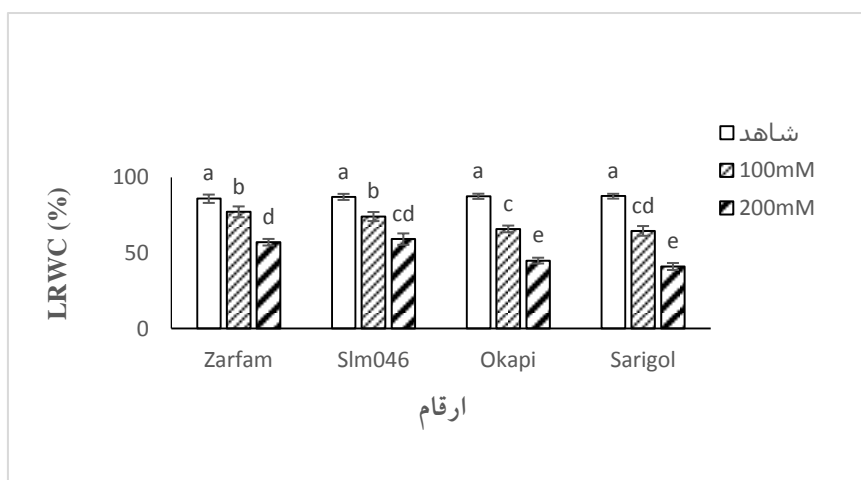
نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که محتوای نسبی آب برگ تحت تاثیر شوری، رقم و اثر متقابل شوری و رقم قرار گرفت. محتوای نسبی آب برگ تحت تاثیر تنش شوری کاهش یافت که این کاهش تا غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار نمک با روند کندی صورت پذیرفت و با افزایش غلظت تا ۲۰۰ میلی‌مولار نمک، روند آن افزایش چشمگیری داشت. کمترین و بیشترین میزان محتوای نسبی آب در بالاترین غلظت نمک در رقم ساریگل با میانگین ۴۱/۰۴ درصد و رقم SIm046 با میانگین ۵۹/۱۶ درصد مشاهده شدند (شکل ۱).

از نرم‌افزار پرایمر ۳ (http://primer3.ut.ee) گرفت. در جدول ۱ توالی آغازگر ژن‌های اختصاصی و ژن‌خانه‌دار ارائه شده است. واکنش Real-time PCR با استفاده از کیت Applied Biosystems SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, UK) و در حجم ۱۵ میکرولیتر انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک مرحله واسرشته سازی در 94°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه با واسرشته سازی در 94°C به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای 60°C به مدت ۴۵ ثانیه و بسط در دمای 72°C به مدت ۴۵ ثانیه بود. در نهایت میزان بیان ژن با

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه.

نام ژن	شماره دسترسی	مکان ژن	توالی آغازگر	طول تکثیر (جفت‌باز)
<i>BnaCDPK₆</i>	XM_013788076.2	LOC106348352	For 5' TCAAGGACAAAAGTCTACGAGGGTAA 3' Rev 5' TCTTTTACAGGAACGGGATTGTTG 3'	۱۳۶
<i>BnaCDPK₁₀</i>	XM_013860191.2	LOC106419410	For 5' AGTCAGATCGAGATTGAAGCAGTT 3' Rev 5' TTGAGTTCCGGGCAAGTTATTCTA 3'	۱۶۵
<i>Bnaactin₇</i>	XM_013858992	LOC106418315	For 5' TGGGTTTGCTGGTGACGAT 3' Rev 5' TGCCTAGGACGACCAACAATACT 3'	۶۳

داده‌های آزمایش به صورت 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.

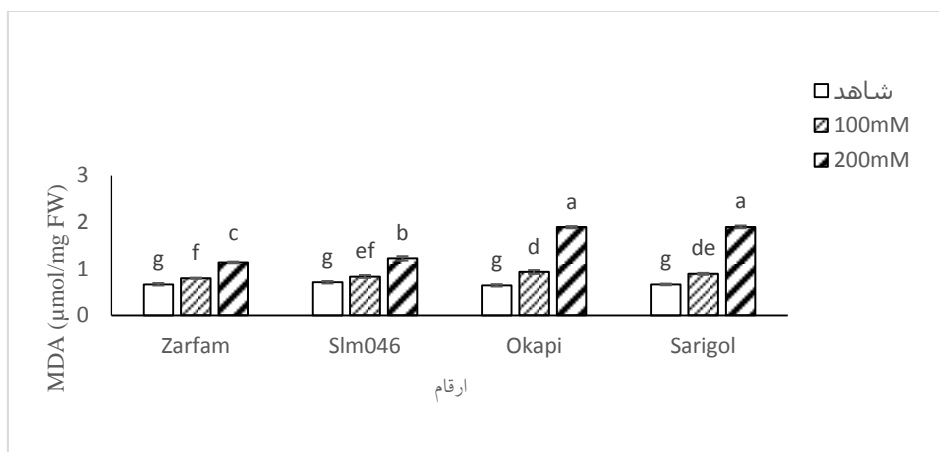


شکل ۱- اثر تنش شوری بر روی محتوای نسبی آب برگ (LRWC)، بارها نشان دهنده‌ی خطای استاندارد و حروف متفاوت در بالای ستون‌ها اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد را نشان می‌دهند.

جدول ۲- تجزیه واریانس محتوای نسبی آب برگ (LRWC)، مالون دی‌آلدهید (MDA)، آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آنزیم کاتالاز (CAT)، بیان ژن *BnaCDPK₆* و بیان ژن *BnaCDPK₁₀* در کلزا تحت تنش شوری.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		LRWC	MDA	SOD	CAT	<i>BnaCDPK₆</i>	<i>BnaCDPK₁₀</i>
ارقام	۳	۲۰۴/۸۵ ^{oo}	۰/۲۰ ^{oo}	۲/۲۹ ^{oo}	۱/۳۹ ^{oo}	۰/۳۲ ^{oo}	۰/۲۱ ^{oo}
تنش شوری	۲	۳۹۹۲/۵۴ ^{oo}	۲/۴۷ ^{oo}	۱۰/۷۵ ^{oo}	۱/۷۷ ^{oo}	۲/۹۶ ^{oo}	۱/۵۷ ^{oo}
اثر شوری × ژنوتیپ	۶	۷۵/۰۹ ^o	۰/۱۶ ^{oo}	۰/۴۶ ^{oo}	۰/۴۰ ^{oo}	۰/۱۱ ^{oo}	ns/۰/۰۶
خطا	۲۴	۲۰/۵۷	۰/۰۰۲	۰/۰۷	۰/۰۱۵	۰/۰۱۴	۰/۰۳
CV (%)		۱۲/۵۴	۱۰/۷۲	۱۰/۵۴	۱۱/۸۵	۱۱/۰۳	۱۲/۳۷

غیر معنی دار (ns)، معنی دار در سطح پنج درصد (°) و یک درصد (oo)

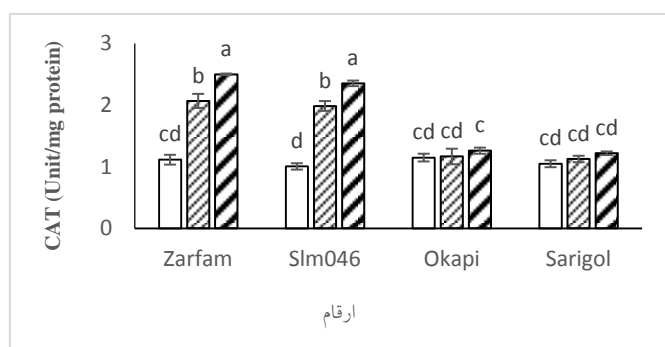
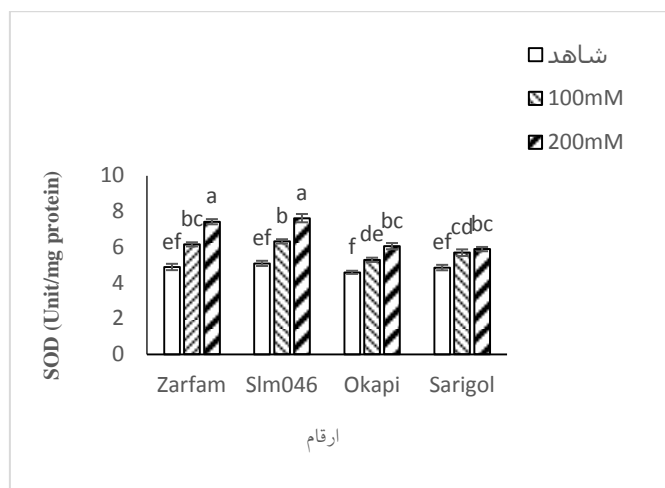


شکل ۲- اثر تنش شوری بر روی مالون دی‌آلدهید برگ، بارها نشان‌دهنده‌ی خطای استاندارد و حروف متفاوت در بالای ستون‌ها اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد را نشان می‌دهند.

آب در شرایط تنش شوری باشد یا اینکه سیستم‌های ریشه‌ای به دلیل کاهش سطح جذب، قادر به جبران آب از دست رفته توسط تعلق 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 تاثیر شوری و رقم بر غلظت مالون دی‌آلدهید 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 (شکل ۲) که بیانگر

محتوای نسبی آب برگ به‌عنوان فاکتوری برای تعیین سطح آب گیاه شناخته شده است که منعکس‌کننده 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 تولید 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

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.

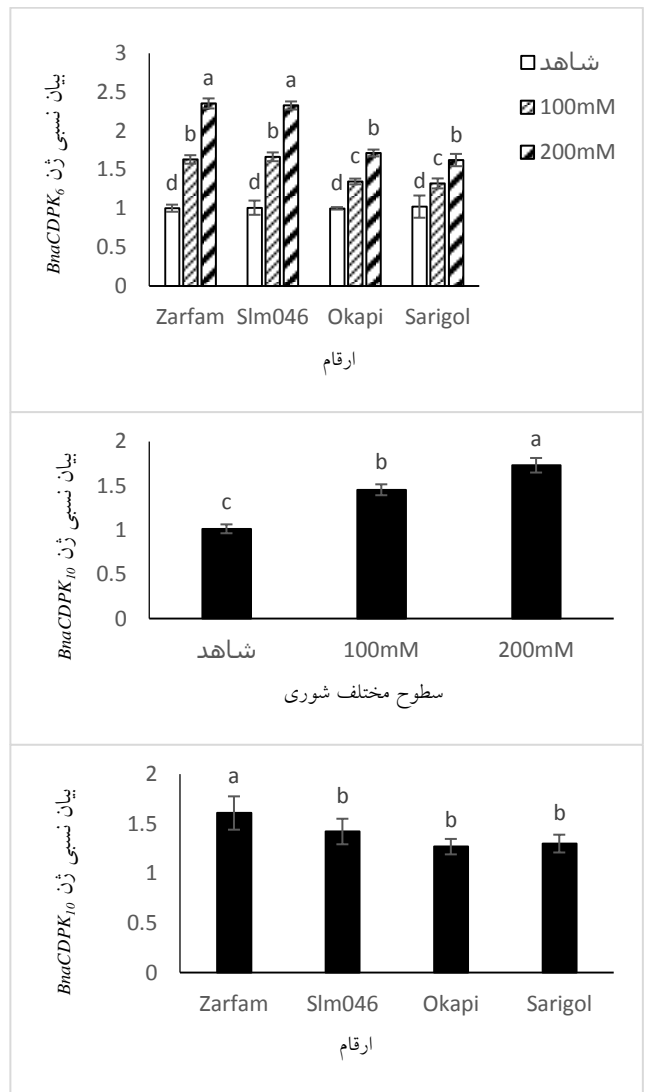


شکل ۳-ب تغییر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (الف) و آنزیم کاتالاز (CAT) (ب) تحت تنش شوری، بارها نشان‌دهنده‌ی خطای استاندارد و حروف متفاوت در بالای ستون‌ها اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد را نشان می‌دهد.

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 دی‌آلدئید 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 آنتی‌اکسیدان 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

با افزایش سطح شوری تا ۲۰۰ میلی‌مولار نمک، میزان بیان ژن *BnaCDPK6* در همه‌ی ارقام نسبت به شاهد افزایش یافت که این افزایش در ارقام متحمل بیشتر از ارقام حساس بود که بیشترین افزایش در رقم زرغام (۲/۳۵ برابر) و کمترین آن در رقم ساریگل (۱/۵۸ برابر) نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۴-الف). بیان ژن *BnaCDPK10* با افزایش سطح شوری از شاهد تا ۲۰۰ میلی‌مولار نمک، افزایش یافت (شکل ۴-ب). میزان تغییرات در بیان ژن *BnaCDPK10* در ارقام مختلف نزدیک به هم بود و تنها رقم زرغام اختلاف معنی‌دار با سایر ارقام داشت (شکل ۴-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 *AtCDPK6* و *AtCDPK10* نقش مهمی در پاسخ به تنش‌های خشکی و شوری داشت (Wu et al. 2010; Yao et al. 2010)، در این مطالعه دو ژن *BnaCDPK6* و *BnaCDPK10* در کلزا انتخاب شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه میزان بیان دو ژن *BnaCDPK6* و *BnaCDPK10* با افزایش سطح شوری از شاهد تا ۲۰۰ میلی‌مولار نمک افزایش داشت اما بر خلاف ژن *BnaCDPK6*، تغییر بیان ژن *BnaCDPK10* برای ارقام استفاده شده در این پژوهش اختلاف معنی‌داری بین رقم متحمل SIm046 با ارقام حساس نداشت که می‌تواند ناشی از اثر متقابل بیان ژن‌های دیگر این خانواده ژنی (مانند *BnaCDPK6*) 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 *BnaCDPK6* و *BnaCDPK10* صورت گرفت. برای آنالیز پروموتور، توالی ۲۰۰۰ جفت‌بازی بالا دست ناحیه شروع رونویسی ژن‌های *BnaCDPK6* و *BnaCDPK10* از پایگاه اطلاعات NCBI گرفته شد و فاکتورهای رونویسی از طریق بانک اطلاعاتی PLACE (Higo et al. 1999) مشخص شدند (جدول

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 *BnaCDPK6* تحت تاثیر معنی‌دار شوری، رقم و اثر متقابل شوری و رقم قرار گرفت و بیان ژن *BnaCDPK10* فقط تحت تاثیر معنی‌دار شوری و رقم قرار گرفت (جدول ۲).



شکل ۴- تغییر بیان ژن *BnaCDPK6* (الف)، تغییر بیان ژن *BnaCDPK10* (ب) و تغییر بیان ژن *BnaCDPK10* به *BnaCDPK6* (ج) تحت تنش شوری، بارها نشان‌دهنده‌ی خطای استاندارد و حروف متفاوت در بالای ستون‌ها اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد را نشان می‌دهند.

(Chio et al. 2000). فاکتور رونویسی WRKY و RAV نیز نقش کلیدی در پیام‌رسانی اسید آسبیزیک 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 *BnaCDPK₆* و *BnaCDPK₁₀* 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.

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. *GBox*، *ABRE*، *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 پیام‌رسانی اسید آسبیزیک می‌شود

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	
		<i>BnaCDPK₆</i>	<i>BnaCDPK₁₀</i>
ABRERATCAL	MACGYGB	۱	۱
ABRELATERD1	ACGTG	۱	۱
CGCGBOXAT	VCGCGB	۸	۲
WBOXNTCHN48	CTGACY	۱	۲
WBOXNTERF3	TGACY	۳	۵
WBOXHVIS01	TGACT	۲	۳
WBOXATNPR1	TTGAC	۳	۵
WBOXPCWRKY1	TTTGACY	۱	-
RAV1AAT	CAACA	۳	۵
MYBGAHV	TAACAAA	۲	۲
MYBCORE	CNGTTR	۵	۲
MYB1AT	WAACCA	۶	۲
MYBST1	GGATA	۵	۲
MYBPLANT	MACCWAMC	۲	-
MYBCOREATCYCB1	AACGG	۱	-
MYBPZM	CCWACC	۱	۱
MYB1LEPR	GTTAGTT	-	۱

افزایش مالون دی‌آلدئید و افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن فعال می‌شود که برای مقابله با آن میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان 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.

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 *AtCDPK6*، گیاه آراییدوپسیس تراریخت تحت کنترل پرموتر 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 *AtCDPK10* در پاسخ به تنش خشکی نقش دارد، آن‌ها مشاهده کردند گیاه موتانت *Atcdpk10* حساسیت بیشتری به تنش خشکی در مقایسه با گیاه شاهد داشت و از طرفی تشدید بیان *AtCDPK10* 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

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 *OsCPK10* 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.

- 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, Nakamura Y, 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, Özdemir 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 hypogaeae* 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 *OsCPK₂₁* 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 Ca²⁺ 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.

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.