Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Differential responses of three spring rapeseed (*Brassica napus*) cultivars to salt stress: Analysis morphological and biochemical traits, enzymatic activity and expression of the genes related to tolerance

Maryam Abdoli Nasab
*Corresponding author. Associate Professor, Department of Biotechnology, Institute of Science and high technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. E-mail: m.abdolinasab@kgut.ac.ir

Abstract

Objective

Salinity stress is one of the major abiotic factors limiting agricultural productivity worldwide, negatively affecting plant growth, development, and yield. Rapeseed (*Brassica napus*) is the second most important oilseed crop after soybean and is recognized as an economically important agricultural crop. This study was conducted to investigate the effects of salinity stress on growth, physiological, biochemical, enzymatic, and molecular parameters of three spring rapeseed cultivars (Agamex, Trapper, and Hyola61) under controlled conditions.

Materials and methods

A factorial experiment was conducted in a completely randomized design with three replications at three salinity stress levels: zero (normal irrigation conditions), moderate (irrigated with EC 6.5), and severe salinity (irrigated with EC 12.7). Various morphological parameters (root length, stem height, root fresh and dry weight, pod number and 1000-seed weight), physiological and biochemical parameters (photosynthetic pigment concentration, proline content, soluble sugar content, protein and seed oil content) and antioxidant enzyme activities (catalase, polyphenol oxidase, guaiacol peroxidase and ascorbate peroxidase) were investigated to evaluate the response to salinity. Molecular analysis included RNA extraction from leaves, cDNA synthesis and Real time PCR to examine the expression changes in two genes related to the activity of late embryonic accumulation protein (LEA) and mitogen-activated protein kinase (Mapk) involved in stress resistance.

Results

The results showed that with increasing salinity, a significant decrease in growth and reproductive performance was observed, the highest rate of which was observed in the Agamex cultivar. Photosynthetic pigments decreased, while proline and soluble sugars accumulated, indicating osmo-protective adaptation. Antioxidant enzyme activities were generally increased under moderate salinity, indicating enhanced defense against oxidative stress, mainly in Trapper and Hyola61 cultivars. Gene expression analysis revealed down-regulation of *LEA* gene expression and specific up-regulation of *Mapk* under salt stress, indicating transcriptional regulation to salinity.

Conclusions

In this study, Trapper showed greater tolerance to salinity than the other two studied cultivars with better growth, higher yield, higher osmolyte and photosynthetic pigment accumulation, high

antioxidant enzyme activity and gene expression patterns under salt stress. The Agamex cultivar showed greater sensitivity, while the Hyola61 cultivar showed moderate responses with specific strengths such as pigment retention and enzymatic antioxidant capacity.

Keywords: Antioxidant activity, LEA genes, Mapk genes, Stress
Paper Type: Research Paper.
Citation: Abdoli Nasab, M. (2026). Differential responses of three spring rapeseed (*Brassica napus*) cultivars to salt stress: Analysis morphological and biochemical traits, enzymatic activity and expression of the genes related to tolerance. *Agricultural Biotechnology Journal,* 18(4), 111-130.

Agricultural Biotechnology Journal, 18(4), 111-130. DOI: 10.22103/jab.2026.25620.1739
Received: May 23, 2026. Received in revised form: August 04, 2026.
Accepted: August 05, 2026. Published online: August 30, 2026.
Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.
© the authors

Introduction

Salinity stress is among the most challenging abiotic factors impeding global agricultural productivity, markedly reducing plant growth, development, and yield. Rapeseed (Brassica napus) is globally recognized as the second most important oilseed crop after soybean. Its significance extends beyond nutritional value, encompassing animal feed production and serving as a substantial source for biofuel and various industries. However, salt stress disrupts cellular integrity by inducing osmotic imbalance, ionic toxicity, and oxidative damage, thus impairing several physiological and biochemical pathways vital for plant survival. In rapeseed, the molecular landscape of salt tolerance involves a suite of adaptation mechanisms. Recent studies have underscored the central roles of late embryogenesis abundant (LEA) proteins and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in orchestrating stress responses. LEA proteins, hydrophilic and structurally disordered, accumulate during seed maturation and in response to various abiotic challenges, acting as molecular chaperones to stabilize proteins and protect cellular membranes. The MAPK cascade, a highly conserved signal transduction pathway, transduces external stress cues into intracellular signals that activate downstream stress-responsive genes, thereby regulating antioxidant defenses. The functional interplay between these genes and hormone signaling, particularly abscisic acid (ABA) and jasmonic acid (JA), has been highlighted as critical for optimizing energy use and coordinating robust stress adaptation. Addressing the molecular and physiological networks underpinning salt tolerance in rapeseed not only enhances our mechanistic understanding but also offers strategic targets for breeding programs aimed at yield stability and resilience under saline conditions.

Materials and methods

A factorial experiment was conducted utilizing three spring rapeseed cultivars (Trapper, Agamex, and Hyola 61) under controlled greenhouse conditions. A completely randomized design was conducted with three replications. The primary experimental factors included three levels of salinity: control (normal irrigation), moderate stress (irrigation with EC 6.5) and severe stress (irrigation with EC 12.7). Germinated seeds were sown in pots and grown in growth chamber with 16 h light/ 8 h dark at 25ºC. Salinity treatments commenced at the four-leaf stage

and continued until flowering, with irrigation volumes set to 75% field capacity using NaCl solutions to achieve the desired salinity. Leaf samples were promptly harvested and stored at -80°C for subsequent analyses. Morphological traits (root length, stem height, pod length, fresh and dry root weights, number of branches, pods per plant, seeds per pod, and 1,000-seed weight) were measured. Also, Physiological and biochemical parameters (total protein (Bradford assay), free proline (Bates method), photosynthetic pigments (Lichtenthaler protocol), soluble sugars (Thimmaiah method), seed protein and oil contents (Finnie and Bligh & Dyer methods, respectively) and Antioxidant Enzyme Activity were evaluated. Enzyme extracts were prepared from fresh leaf tissue and used to assay. Catalase (CAT) activity was monitored by measuring H_2O_2 decomposition at 240nm. Polyphenol oxidase (PPO) was measured based on pyrogallol oxidation, monitoring absorbance at 420nm. Guaiacol peroxidase (GPX) enzyme was assayed using guaiacol substrate, absorbance at 470nm and Ascorbate peroxidase (ASPX) was assayed as loss of ascorbate at 290nm. For molecular Analysis, total RNA was extracted 6 hours post-treatment and its quality and quantity were evaluated by gel electrophoresis and spectrophotometry. After *DNase*I treatment, reverse transcription was performed, and gene expression patterns of *LEA* and *MAPK* were quantified using RT-PCR and real-time PCR. The β-actin gene applied as reference, with relative expression calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. For Statistical Analysis, data were analyzed using SPSS v20. Means were compared using Duncan's Multiple Range Test at 1% and 5% significance levels.

Results

For most traits significant genotype × salinity interactions were observed. In evaluating the root trait, the Agamex variety showed the longest roots under control, but root length markedly decreased with salinity, especially at EC 12.7. In studying the physiological and biochemical traits, notably, Agamex consistently retained greater root length across treatments compared to others. The Trapper variety showed the highest plant height and maintained superior shoot length under both moderate and high salinity conditions compared to Agamex, which suffered the most pronounced reductions. Also, Trapper exhibited the highest root dry and fresh weight at moderate salinity (EC 6.5), whereas Agamex recorded the lowest values under severe salinity. Number of pods, seeds per pod, and 1,000-seed weight all declined as salinity increased. Trapper led in pod number under optimal irrigation, while Hyola 61 had the highest seeds per pod. The lowest yield values were typically found in Agamex under high salinity. Levels of chlorophyll a, b, and total chlorophyll declined significantly with salinity. Highest pigment retention at control was seen in Hyola61 and Agamex varieties. All cultivars exhibited declines under stress, evidencing impaired photosynthetic machinery. Trapper showed highest levels of carotenoids at control, minimum at high salinity. Levels of proline rose sharply with increasing salinity, peaking in Trapper at EC 12.7, reflecting activated osmoprotective pathways. Maximum of Soluble sugars was measured in Agamex under moderate salinity, hinting at carbohydrate-mediated osmoregulation. Trapper exhibited highest seed protein content at control. Under stress, seed oil content dropped, with lowest values in Hyola61 at severe salinity. Salinity and genotype markedly influenced antioxidant enzyme responses. Maximum activity of polyphenol oxidase (PPO) enzyme was assayed in Hyola61 at moderate salinity; lowest in Trapper under control. The catalase (CAT) activity was measured highest in Trapper at severe salinity. The guaiacol peroxidase (GPX), and ascorbate peroxidase (ASPX) activity assays peaked in Hyola at EC 6.5, but were lowest in Trapper under optimal irrigation. The results showed that moderate to severe salinity stimulated the antioxidant system, especially in tolerant genotypes, consistent with enhanced ROS detoxification capacity. Gene expression of *LEA* declined with rising salinity in all cultivars.

Agamex variety displayed a substantial drop from control (10.4) to severe (1.25) and moderate (0.14) stress. Similar downward trends were seen for Hyola61 and Trapper varieties, though at lower baseline expression levels. *Mapk* gene expression pattern showed variable induction; increased expression at EC 6.5 in Agamex, and upregulated in both stress treatments in Hyola61, while downregulated in Trapper. The highest *Mapk* expression occurred in Agamex variety at EC 6.5 and lowest in Agamex at EC 12.7. These results reveal genotype- and stress-level-specific transcriptional adjustments indicative of distinct regulatory pathways.

Conclusions

Among the studied genotypes, Trapper emerged as the most salt-tolerant, maintaining yield, growth, photosynthetic capacity, and strong antioxidant and osmoprotective responses under salinity stress. Agamex was sensitive to salt, while Hyola exhibited intermediate adaptation, notably in pigment retention and enzyme activity. Future research should advance multi-omics approaches to dissect regulatory networks governing osmolyte metabolism, antioxidant pathways, and hormonal integration. Marker-assisted and genomic selection for *LEA*, *Mapk* and key enzyme-coding genes could accelerate breeding efforts. Critically, field validations are needed to assess the translatability of controlled-environment results to diverse saline agricultural settings.

Author contributions

MAB: Project administration, conceived and supervised the experiments, writing the final version of the manuscript.

Data availability statement

Data available on request from the authors.

Acknowledgements

This research has been supported by Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology (Kerman-Iran) under grant number of 02. 3752.

Ethical considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct

Funding

This research has been supported by Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology (Kerman-Iran) under grant number of 02. 3752.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸
دانشگاه شهید باهنر کرمان
انجمن بیوتکنولوژی ایران

پاسخ‌های افتراقی سه رقم کلزای (*Brassica napus*) بهاره به تنش شوری: تجزیه و تحلیل صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، فعالیت آنزیمی و بیان ژن های دخیل در تحمل تنش

مریم عبدلی نسب

* نویسنده مسئول: دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. رایانامه: m.abdolinasab@kgut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۳/۰۲ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۵/۰۵/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۵/۱۳

چکیده

هدف: تنش شوری یکی از عوامل اصلی محدودکننده بهره‌وری کشاورزی در سراسر جهان است که بر رشد، نمو و عملکرد گیاه تأثیر منفی می‌گذارد. کلزا (*Brassica napus*) دومین محصول مهم از دانه های روغنی پس از سویا است و به عنوان یک محصول کشاورزی با اهمیت اقتصادی شناخته می شود. این مطالعه به منظور بررسی تنش شوری بر پارامترهای رشدی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، آنزیمی و مولکولی سه رقم کلزای بهاره (آگامکس، تراپر و هایولا۶۱) در شرایط گلخانه صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: آزمایشی به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار با سه سطح تنش شوری صفر (شرایط نرمال آبیاری)، شوری متوسط (آبیاری با EC 6.5) و شوری شدید (آبیاری با EC 12.7) اجرا گردید. پارامترهای مختلف مورفولوژیکی (طول ریشه، ارتفاع ساقه، وزن تر و خشک ریشه، طول غلاف، تعداد غلاف در بوته، تعداد بذر در غلاف و وزن هزاردانه)، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی (غلظت رنگدانه‌های فتوسنتزی، محتوای پرولین، قند محلول، محتوای پروتئین محلول کل، محتوای پروتئین بذر و روغن بذر) و فعالیت‌آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، پلی‌فنل اکسیداز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز) برای ارزیابی پاسخ به شوری بررسی شدند. تجزیه و تحلیل مولکولی شامل استخراج RNA از برگ ، سنتز cDNA و انجام Real time PCR برای بررسی تغییرات بیان در دو ژن مرتبط با فعالیت پروتئین تجمع کننده در انتهای دوره جنینی(LEA) و پروتئین کینازی فعال شده با میتوژن (Mapk) دخیل در مقاومت به تنش بود.

نتایج: نتایج نشان داد که با افزایش شوری، کاهش قابل توجهی در رشد و عملکرد تولیدمثلی مشاهده می‌شود که بیشترین میزان آن در رقم آگامکس مشاهده شد. رنگدانه‌های فتوسنتزی کاهش یافتند، در حالی که پرولین و قندهای محلول تجمع یافتند که نشان‌دهنده سازگاری اسمزی-محافظتی است. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی عموماً تحت شوری متوسط افزایش یافت که نشان‌دهنده افزایش دفاع در برابر تنش اکسیداتیو، عمدتاً در ارقام تراپر و هایولا۶۱ می باشد. تجزیه و تحلیل بیان ژن، کاهش بیان ژن LEA و تعدیل اختصاصی *Mapk* را تحت تنش شوری نشان داد که نشان‌دهنده تنظیمات رونویسی نسبت به شوری است.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه رقم تراپر با رشد بهتر، عملکردبالاتر، تجمع اسمولیت و رنگدانه های فتوسنتزی بیشتر، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و الگوهای بیان ژن مطلوب تحت تنش شوری نسبت به دو رقم دیگر تحمل بیشتری به شوری نشان داد. رقم آگامکس

حساسیت بیشتری نشان داد، در حالی که رقم هایولا۶۱ پاسخ‌های متوسطی با نقاط قوت خاصی مانند حفظ رنگدانه و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آنزیمی نشان داد .

کلیدواژه‌ها: تنش، ژن های LEA، ژن های Mapk، فعالیت آنتی‌اکسیدان

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: عبدلی نسب مریم (۱۴۰۵) پاسخ‌های افتراقی سه رقم کلزای (*Brassica napus*) بهاره به تنش شوری: تجزیه و تحلیل صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، فعالیت آنزیمی و بیان ژن های دخیل در تحمل تنش. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۸(۴)، ۱۳۰-۱۱۱.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

تنش شوری یک عامل غیرزیستی اصلی محدودکننده بهره‌وری کشاورزی در سراسر جهان است که بر رشد، نمو و عملکرد گیاه تأثیر منفی می‌گذارد (Channaoui et al., 2019). کلزا (Brassica napus) دومین محصول مهم از دانه های روغنی پس از سویا است که علاوه بر ارزش تغذیه ای برای انسان، به دلیل کنجاله غنی از پروتئین آن برای مصرف دام و منبع تجدیدپذیر برای بیودیزل و صنعت به عنوان یک محصول کشاورزی با اهمیت اقتصادی شناخته می شود (Zhi et al., 2024). تنش شوری با القای تنش اسمزی، سمیت یونی و آسیب اکسیداتیو، هموستاز سلولی را مختل می‌کند و در نتیجه فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ضروری برای بقای گیاه را مختل می‌کند (Zhao et al., 2011; Fang et al., 2022). درک مکانیسم‌های مولکولی زیربنایی تحمل به شوری در کلزا برای ایجاد ارقام مقاوم که قادر به حفظ بهره‌وری در شرایط شور هستند، بسیار مهم است (Liang et al., 2016). از جمله عوامل کلیدی مولکولی دخیل در سازگاری با تنش شوری، پروتئین‌های تجمع کننده در انتهای دوره جنینی (LEA)[1] و پروتئین کینازهای فعال‌شده با میتوژن (MAPK)[2] هستند (Jia et al., 2014; Sinha et al., 2011). پروتئین‌های LEA، پروتئین‌های آبدوست با ساختار بی‌نظم هستند که در طول بلوغ بذر و در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی، از جمله شوری، تجمع می‌یابند (Chen et al., 2019). آن‌ها به عنوان چاپرون‌های مولکولی عمل می‌کنند و با تثبیت پروتئین‌ها و غشاها، از ساختارهای سلولی در برابر آسیب ناشی از استرس های محیطی محافظت می‌کنند (Jao et al. 2011). این پروتئین‌ها بر اساس شباهت‌های توالی اسیدآمینه و تفاوت‌های دامنه حفاظت‌شده، به هشت زیرگروه LEA1، LEA2، LEA3، LEA4، LEA5، LEA6، پروتئین‌های بلوغ بذر۳ (SMPs) و دهیدرین‌ها طبقه‌بندی می‌شوند (Battaglia and Covarrubias, 2013; Chen et al., 2019). آبشارهای MAPK از سه کیناز با عملکرد متوالی تشکیل شده‌اند: MAPK کیناز کینازها (MAPKKKs)، MAPK کینازها (MAPKKs) و MAPKها. این آبشارها مسیرهای انتقال سیگنالی حفاظت‌شده در یوکاریوت‌ها بوده و نقش

[1] Late embryogenesis abundant proteins
[2] Mitogen-activated protein kinase
[3] Seed maturation proteins

کلیدی در پیام رسانی تنش ایفا می کنند (Lu et al., 2015; Wang et al., 2021; Piao et al., 2018). آبشارهای MAPK، به عنوان یک کیناز مرکزی، سیگنال‌های استرس خارج سلولی را به پاسخ‌های درون سلولی تبدیل می‌کنند، ژن‌های پاسخ‌دهنده به استرس را فعال کرده و دفاع آنتی‌اکسیدانی را تعدیل می‌کنند (Wang et al., 2021; Jiang et al., 2022). مطالعات اخیر رونویسی و پروتئوم در کلزا نشان داده است که تنش شوری به طور قابل توجهی بیان ژن‌های LEA و MAPK را القا می‌کند (Wang et al., 2021; Liang et al., 2016). این تغییرات بیان ژن با تنظیمات فیزیولوژیکی مانند بهبود جوانه‌زنی بذر، رشد ریشه و ساقه و کارایی فتوسنتز در ژنوتیپ‌های متحمل در مقایسه با ژنوتیپ‌های حساس همراه است (Channaoui et al., 2019; Fang et al., 2022). تنش شوری همچنین باعث تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود که می‌تواند باعث آسیب اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک شود (Velikova et al., 2000). گیاهان از طریق یک سیستم آنتی‌اکسیدانی قوی شامل آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POD) با این امر مقابله می‌کنند (Fang et al., 2022). مطالعات حاکی از آن است که لاین‌های کلزای مقاوم به شوری، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بالایی را نشان می‌دهند که با سطوح بالاتر بیان ژن های LEA و MAPK مرتبط است (Fang et al., 2022). این ظرفیت افزایش‌یافته‌ی جمع‌آوری ROS برای حفظ تعادل ردوکس سلولی و جلوگیری از آسیب اکسیداتیو تحت تنش شوری بسیار مهم است. تجزیه و تحلیل‌های ژنومی عملکردی همچنین نشان می‌دهد که مسیرهای هورمونی، به ویژه اسید آبسیزیک (ABA) و اسید جاسمونیک (JA)، با سیگنال‌دهی LEA و MAPK برای هماهنگ کردن پاسخ‌های تنش تعامل دارند (Fang et al., 2022). پروفایل ترانسکریپتومی نشان می‌دهد که تنش شوری، بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به ABA و JA، از جمله سرکوب‌کننده‌های JAZ را القا می‌کند که سیگنال‌دهی هورمون را برای بهینه‌سازی مصرف انرژی در طول سازگاری با تنش تنظیم می‌کنند (Fang et al., 2022). داده‌های پروتئومیک همچنین پروتئین‌های مرتبط با تنش مانند پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP90) و آنزیم‌های دخیل در سم‌زدایی ROS را به عنوان اجزای حیاتی شبکه پاسخ به تنش شوری شناسایی می‌کنند (Wang et al., 2022). در مجموع، این یافته‌ها نقش یکپارچه ژن‌های LEA4 و MAPK1 را در ایجاد تحمل به شوری در گیاه کلزا با تعدیل دفاع آنتی‌اکسیدانی، صفات فیزیولوژیکی و مسیرهای سیگنالینگ وابسته به هورمون برجسته می‌کنند. الگوهای بیان ژن در یوکاریوت‌ها مختص بافت هستند. علاوه بر این، سطوح محصولات ژنی سنتز شده در یک بافت معین، و همچنین آن‌هایی که توسط بافت‌های دیگر تأمین می‌شوند، به‌طور جمعی بیان ژن را تنظیم می‌کنند. پیشرفت‌ها در رویکردهای چند–اومیکس، درک ما از این شبکه‌های تنظیمی پیچیده را عمیق‌تر کرده و اهداف ارزشمندی را برای مهندسی ژنتیک و برنامه‌های اصلاح نژاد با هدف بهبود مقاومت کلزا در برابر شوری فراهم می‌کند (Wang et al., 2014; Liang et al., 2016). فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهان وابسته به میزان آب بوده و به‌طور غیرمستقیم تحت تأثیر تنش شوری قرار می‌گیرند (Chaparzadeh et al., 2003). تنظیم اسمزی با افزایش املاح در سلول‌ها موجب حفظ تورم و ادامه فعالیت‌ها در پتانسیل‌های آب پایین می‌شود (Cuin et al., 2009). تنش شوری باعث کاهش ارتفاع گیاه، سطح برگ، ماده خشک کل و در نهایت عملکرد محصول می‌گردد. سطح برگ و ارتفاع گیاه سریع‌تر از سایر شاخص‌های مورفولوژیکی کاهش می‌یابند زیرا به فتوسنتز خالص وابسته‌اند. تغییرات بیوشیمیایی شامل کاهش یا افزایش پروتئین‌ها، قندهای محلول و پرولین است.(Paleg & Aspinall, 1989) . پرولین به‌عنوان یک اسمولیت، ساختار دیواره سلولی و پروتئین‌ها را پایدار کرده و رادیکال‌های آزاد را حذف می‌کند. تجمع پرولین در شرایط تنش متوسط یا شدید افزایش یافته و به‌عنوان مخزن نیتروژن و تنظیم‌کننده اسمزی عمل می‌کند (Saadia et al., 2012). مطالعات روی کلزا نشان می دهد که تنش شوری موجب

کاهش معنی دار صفات رشدی و فیزیولوژیکی و افزایش اسمولیت‌ها به‌ویژه پرولین در ارقام می‌شود (Su et al., 2013; He & Cramer, 1993). با توجه به اهمیت موضوع، در این مطالعه الگوی بیان ژن‌های MAPK و LEA به‌عنوان عوامل کلیدی در پاسخ به تنش و حفاظت سلولی در سه رقم کلزا ارزیابی شد. همچنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برای تعیین نقش آن‌ها در کاهش آسیب اکسیداتیو ناشی از تجمع ROS اندازه‌گیری گردید. علاوه بر این، خصوصیات رشدی، عملکرد و فیزیکوشیمیایی مانند شاخص کلروفیل، میزان پرولین، پروتیین و قند بررسی گردید تا ارتباط آن‌ها با سازگاری ژنوتیپ‌های مختلف کلزا تحت شرایط تنش شوری مشخص و جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی اجرا شود.

مواد و روش ها

کشت بذور و اعمال تیمار: به منظور مطالعه اثر تنش شوری در کلزا، آزمایشی به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. فاکتور اول شامل سطوح مختلف تنش شوری (شوری صفر (شرایط نرمال آبیاری)، شوری متوسط (آبیاری با EC 6.5) و شوری شدید (آبیاری با EC 12.7) و فاکتور دوم سه رقم کلزای بهاره (تراپر، آگامکس و هایولا۶۱) می باشد. به منظور ضدعفونی بذور، ابتدا آنها در الکل ۷۰٪ به مدت ۱۰ ثانیه و سپس در محلول هیپوکلرید سدیم ۱٪ به مدت ۳۰ ثانیه قرار داده شدند. سپس شستشو با آب مقطر انجام گردید. پس از ضدعفونی، بذور به گلدان های حاوی ۷۰٪ خاک لوم رسی، ۱۵٪ خاک برگ و ۱۵٪ پرلیت منتقل شده و در گلخانه در شرایط هشت ساعت نور و شانزده ساعت تاریکی قرار گرفتند. در مرحله چهاربرگی عمل تنک کردن بوته ها صورت گرفت به طوری که در هر گلدان چهار بوته باقی ماند. تا مرحله شش برگی همه گلدان ها با آب مقطر آبیاری شدند. سپس اعمال تنش شوری از مرحله شش برگی به مدت سه هفته صورت گرفت. بدین منظور از نمک NaCl و دستگاه هدایت سنج استفاده گردید. افزایش نمک به تدریج تا رسیدن به سطح تیمار موردنظر انجام گرفت. ۴۸ ساعت پس از قطع تنش از هر گلدان تعدادی برگ برداشت و بعد از قرار دادن در ازت مایع جهت آنالیزهای مربوطه در فریز ۸۰- نگه‌داری گردید.

اندازه‌گیری صفات رشدی و فیزیولوژیک: پس از رشد گیاهان و اتمام مرحله بذردهی، صفات طول ریشه، ارتفاع ساقه، طول غلاف با استفاده از خط کش میلیمتری، وزن تر، وزن خشک ریشه (پس از خشک شدن در آون در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت) و وزن هزاردانه با ترازوی دیجیتال مدل HR200 اندازه گیری شد. تعداد شاخه فرعی در بوته، تعداد غلاف در بوته و تعداد بذر در غلاف با شمارش مشخص گردید. مقدار پروتئین کل برگ به روش Bradford (1976) با رسم منحنی استاندارد با استفاده از معرف بیوره درطول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر Carry 50 اندازه گیری گردید. همچنین استخراج پروتئین از بذر طبق روش Finnie et al., (2002) انجام گردید. مقداراسید امینه پرولین براساس روش Bates et al., (1973) در طول موج ۵۲۰ نانومتر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی به روش Lichtenthaler (1978) از برگ تازه انجام گرفت. جذب نوری در طول موج‌های ۶۶۳/۲ ،۶۴۶/۸ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد و غلظت رنگیزه‌ها با استفاده از رابطه‌های مربوطه بر حسب میکروگرم برگرم وزن تر محاسبه‌گردید. محتوای قندهای محلول با استفاده ازمعرف آنترون و بر اساس روش Thimmaiah (2004) در طول موج ۶۲۵ نانومتر تعیین گردید. استخراج پروتئین از بذر طبق روش Finnie et al., (2002) انجام گردید. استخراج روغن از بذر بر طبق پروتکل استخراجی Bligh & Dyer (1959) انجام شد. بذور پودر شده با کمک

اولتراسونیک مدل UP200S در آب همگن و پس از افزودن حلال با کمک هموژنیزر التراسونیک همگن و سپس استخراج روغن صورت گرفت.

استخراج عصاره آنزیمی و سنجش آنزیم های آنتی اکسیدان: برای تهیه عصاره ۰/۵ گرم از بافت تازه برگ گیاه در ۵ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=5/7) که حاوی پلی وینیل پیرولیدین (PVP) یک درصد و EDTA یک میلی‌مولار بود سائیده شد. تمام مراحل استخراج در یخ انجام گرفت. عصاره‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۵۰۰۰×g و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. ازمحلول شفاف رویی برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس کاهش جذب آب اکسیژنه در طول موج ۲۴۰ نانومتر بر اساس روش Velikova et al., (2000) انجام گرفت. مخلوط واکنش (سه میلی لیتر) شامل بافرپتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=7)، آب اکسیژنه ۱۵ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. میزان فعالیت آنزیم بر اساس غلظت آب اکسیژنه تجزیه شده محاسبه شد، غلظت آب اکسیژنه مصرف شده با استفاده از ضریب خاموشی معادل 40Mm-1 cm-1 و فرمول A=εbc محاسبه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز: سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) طبق روش Kar (1981) and Mishra انجام گردید. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۲۰۰ میلی مولار با pH=۷/۶ و پیروگالول۰/۰۲ مولار تهیه گردید. واکنش با افزودن۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی شروع شد. در حضور آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز، پیروگالول موجود در مخلوط واکنش، به پورپوروگالین تبدیل می‌شود. کاهش در جذب پیروگالول در۴۲۰ نانومتر، پس از از۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نسبت به زمان شروع واکنش، محاسبه گردید و تغییرات جذب در دقیقه محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز: سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با استفاده از روش Urbanek et al., (1991) از پیش ماده گایاکول اندازه‌گیری شد. سه میلی‌لیتر مخلوط واکنش، حاوی ۲/۷۷ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=7)، ۱۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه یک درصد، ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول ۴ درصد و ۳۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی تهیه گردید. افزایش جذب به دلیل اکسیداسیون گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه اندازه‌گیری شد.

سنجش فعالیت آنزیم اسکوربات پراکسیداز: به منظور سنجش فعالیت آنزیم اسکوربات پراکسیداز کمپلکس واکنشی (یک میلی‌لیتر) شامل ۲۵۰ میکرولیتر از محلول بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=7)، ۲۵۰ میکرولیتر از آسکوربات یک میلی‌مولار، ۲۵۰ میکرولیتر از EDTA ۰/۴ میلی‌مولار، ۱۹۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۱۰ میکرولیتر از پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شده بود. جذب واکنش آنزیمی در طول موج ۲۹۰ نانومتر در زمان شروع و پس از یک دقیقه از شروع واکنش قرائت گشت. واحد فعالیت آنزیم بر حسب میکرومول آسکوربات اکسید شده بر دقیقه محاسبه شد (Yoshimura et al. 2000).

استخراج RNA و سنتز cDNA: جهت استخراج RNA از نمونه‌های برگ برداشت شده در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار استفاده شد، مراحل استخراج RNA طبق دستورالعمل کیت RNXplus ساخت شرکت سیناژن صورت پذیرفت. ارزیابی کیفیت و کمیت RNA با اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگاروز صورت گرفت. با استفاده از آنزیم *DNAase* I آلودگی احتمالی DNA از RNA استخراج شده حذف و به ۸ میکرولیتر از RNA تیمار شده با *DNase* I مقدار ۱ میکرولیتر oligo dt ، ۱

میکرولیتر dNTP و ۱ میکرولیتر آب‌مقطر اضافه و به مدت ده دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. بعد از این مرحله مقدار ۳ میکرولیتر بافرx ۵ و مقدار ۱ میکرولیتر از آنزیم نسخه‌بردار معکوس به تیوپ اضافه کرده و به مدت ۵۵ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. واکنش RT-PCR، با آغازگرهای اختصاصی ژن های LEA و Mapk درگیر در مقاومت به تنش و آغازگر ژن مرجع بتا اکتین (جدول ۱) در ۳۵ سیکل دمایی شامل دمای واسرشت سازی ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، دمای بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام گردید. همچنین پنج دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد به عنوان پیش دما و پنج دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد به عنوان بسط نهایی اعمال شد.

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای اختصاصی و کنترل داخلی مورد استفاده برای آنالیز qPCR

Table 1. Characteristics of the specific primers and internal control used for qPCR analysis

نام آغازگر Primer name	توالی پرایمر (۵' به ۳') Primer sequence (5' to 3')	دمای اتصال Annealing temperature (ºC)	طول قطعه تکثیر شده Amplified fragment (bp)
LEA F	GAGGAGAAGGCTGAGAAGATGA	58	106
LEAR	CTCCACTGGCTTCTTTCATGAC	58	106
MapkF	ACGCTCTAACCAACCCTTAACTGA	58	110
MapkR	TCCCCAAGCTTTAGATCACAGTTTG	58	110
βActin F	TGGGTTTGCTGGTGACGAT	60	93
βActin R	TGCCTAGGACGACCAACAATACT	60	93

بیان ژن با Real time PCR: برای انجام واکنش Real time PCR، میزان ۳۰ نانوگرم cDNA سنتز شده به عنوان الگو در واکنش تکثیر به همراه رنگ فلورسنت سایبرگرین (Invitrogen) که به‌طوراختصاصی به DNA دو رشته‌ای متصل می‌شود، استفاده شد. این رنگ امکان پایش لحظه‌ای تجمع محصول PCR را در طول چرخه‌های تکثیر فراهم می‌سازد. واکنش با دستگاه Rotor GeneTM 3000 انجام شد. برای نرمال‌سازی داده‌ها و حذف خطاهای ناشی از تفاوت در مقدار اولیه RNA ، از ژن βActin به عنوان مرجع در این واکنش استفاده شد. مقادیر آستانه CT که نشان‌دهنده چرخه‌ای است که در آن سیگنال فلورسانس از آستانه پس‌زمینه عبور می‌کند، برای هر نمونه ثبت شد. سپس طبق روش استاندارد Livak et al. (2001)، میزان تغییر بیان ژن‌ها با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید. این روش امکان مقایسه نسبی سطح بیان ژن هدف در شرایط تیمار (مانند تنش شوری) نسبت به شرایط کنترل را فراهم می‌کند.

آنالیز آماری: برای انجام آنالیزهای آماری از نرم افزار SPSS V. 20 استفاده گردید. مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس روش دانکن در سطح احتمال ۱ ٪ و ۵ ٪ انجام شد .

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) نشان داد که اثر متقابل رقم در تنش شوری در کلیه صفات بجز صفت ارتفاع ساقه در سطح آماری یک درصد معنی‌دار می باشد.

صفات مورفولوژیکی: نتایج مقایسه میانگین (جدول ۳) نشان داد که رقم و تیمارهای شوری تأثیر قابل توجهی بر عملکرد گیاه دارند. رقم تراپر بیشترین میزان طول ریشه را در آبیاری معمولی نشان داد. با افزایش میزان شوری این صفت کاهش تدریجی نشان داد. حداقل طول ریشه در رقم تراپر در سطح شوری با EC 6.5 مشاهده شد که نشان‌دهنده اثر بازدارنده تنش شوری بر طول ریشه است. نکته قابل توجه این است که آگامکس در مقایسه با سایر ارقام، به طور مداوم طول ریشه بالاتری را در بین تیمارها حفظ کرد. رقم آگامکس در شرایط نرمال آبیاری به حداکثر ارتفاع خود رسید، با این حال این صفت به طور مشابه با افزایش شوری کاهش یافت و دررقم تراپر تحت آبیاری با EC 12.7 به کمترین مقدار رسید. این نتایج نشان‌دهنده حساسیت کلی فرآیندهای طول ساقه به تنش اسمزی و یونی ناشی از نمک است (Kazemeini et al., 2016). رقم آگامکس به طور کلی طول ساقه بیشتری را نسبت به سایر ارقام، صرف نظر از تیمار، حفظ کرد. ارزیابی وزن خشک و تر ریشه نشان داد که رقم تراپر در EC 6.5 بالاترین زیست توده را برای وزن تر ریشه و در EC 12.7 برای وزن خشک ریشه داشت در مقابل، کمترین مقادیر به طور مداوم در رقم آگامکس در EC 12.7 ثبت شد. آبیاری معمولی عموماً وزن ریشه را افزایش داد، در حالی که شوری صرف نظر از ژنوتیپ، وزن ریشه را کاهش داد. پارامترهای عمکرد، از جمله تعداد غلاف در بوته و تعداد دانه در غلاف، روند منفی مداومی را با افزایش غلظت نمک نشان دادند. رقم تراپر در آبیاری معمولی بیشترین تعداد غلاف را نشان داد، در حالی که رقم هایولا۶۱ بیشترین تعداد دانه در غلاف را نشان داد. کمترین مقادیر در شوری شدید، به ویژه در رقم آگامکس در EC 12.7، مشاهده شد. وزن هزار دانه نیز نتایج مشابه نشان داد، به طوری که حداکثر در رقم آگامکس در آبیاری معمولی و حداقل در رقم تراپر در بالاترین EC 6.5 مشاهده شد (جدول ۳).

صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی: تجزیه و تحلیل محتوای رنگدانه‌ها نشان داد که میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل با افزایش شوری به طور قابل توجهی کاهش یافت. ارقام هایولا۶۱ و آگامکس تحت آبیاری معمولی بالاترین سطح رنگدانه را حفظ کردند، اما همه ارقام در شرایط شوری کلروفیل از دست دادند که نشان دهنده اختلال در یکپارچگی فتوسنتز است. به طور موازی، محتوای کاروتنوئید درآگامکس در شرایط معمولی بالاترین و در همان رقم در EC 12.7 کمترین مقدار را نشان داد، که از این ایده که سنتز یا پایداری کاروتنوئیدها توسط تنش شوری به خطر می‌افتد، پشتیبانی می‌کند (Jia et al., 2025). میزان پرولین در پاسخ به افزایش شوری به طور قابل توجهی افزایش یافت و در EC 12.7 به بالاترین مقدارخود در رقم آگامکس رسید. این تجمع، مسیرهای پاسخ به تنش فعال شده را نشان می‌دهد (Amini et al., 2015). میزان قندهای محلول در رقم تراپر در EC 6.5 بیشترین مقدار را نشان داد، در حالی که در آبیاری معمولی در همان رقم کمترین مقدار مشاهده گردید. محتوای پروتئین بذر در رقم اگامکس در شرایط نرمال آبیاری به حداکثر رسید و در همان رقم EC 12.7 به حداقل رسید نتایج نشان می دهد صرفنظر از اثر واریته بیشترین میزان این صفت در سطح تیمار EC 6 و کمترین میزان این صفت در شرایط نرمال دیده می‌شود و صرفنظر از اثر تنش بیشترین میزان پروتئین بذر در رقم آگامکس دیده می شود. به طور مشابه، محتوای روغن دانه بذر در رقم تراپر در شرایط آبیاری معمولی به حداکثر رسید و کمترین میزان آن در ارقام هایولا۶۱ در تیمار شوری EC 12.7 مشاهده شد (جدول ۳).

جدول۲. تجزیه واریانس داده‌ها برای صفات ارزیابی شده

Table 2. Analysis of variance of data for evaluated traits

کلروفیل کل Total chlorophyll	کلروفیلb Chlorophyll b	کلروفیلa Chlorophyll a	ارتفاع ساقه Stem length	وزن خشک ریشه Root dry weight	وزن تر ریشه Root fresh weigh	طول ریشه Root length	درجه آزادی degrees of freedom	منابع تغییرات Sources of variation
43.22**	12.2 **	24.58**	4432 **	0.51 **	0.31 **	1.61 **	2	رقم Variety
54.4**	10.35 **	68.65**	510.1 **	0.008 **	0.236**	11.22 **	2	تنش شوری Salt stress
40.9**	10.07**	11.53**	37.9 *	0.027**	0.904 **	2.53 **	4	رقم *تنش شوری Variety* Salt stress
2.1	0.59	1.29	6.33	0.001	0.012	0.89	18	خطا Error
19	19	17	16	15	13	13		ضریب تغییرات Coefficient of Variance

روغن بذر Seed oil	پروتئین بذر Seed protein	وزن هزاردانه 1000-seed weight	تعداد بذر در غلاف Number of seeds per pod	طول غلاف Pod length	تعداد غلاف در بوته Number of pods per plant	کارتنوئید Carotenoid	درجه آزادی degrees of freedom	منابع تغییرات Sources of variation
0.113 ns	31629**	0.44 **	92.7 **	4.007 **	27.37 **	0.84**	2	رقم Variety
2.5*	215642**	0.35 **	59.37 **	3.65 **	173.37**	4.22**	2	تنش شوری Salt stress
0.47**	158512**	0.035**	2.42 **	6.19**	24.15 **	0.99**	4	رقم *تنش شوری Variety* Salt stress
0.034	655.1	0.0001	0.63	0.113	0.44	0.109	18	خطا Error
23	12	16	17	14	10	16		ضریب تغییرات Coefficient of Variance

گایاکول Gaiacole	اسکوربات Ascorbate	کاتالاز Catalase	پلی فنل اکسیداز Poly phenol oxidase	قند Sugar	پرولین Proline	درجه آزادی degrees of freedom	منابع تغییرات Sources of variation
0.028 **	0.022**	0.001**	5.21 e-5**	0.01ns	0.038*	2	رقم Variety
0.011**	0.029**	0.002**	3.94 e-6**	0.043 ns	0.144**	2	تنش شوری Salt stress
0.009**	0.012**	0.002**	1.4 e-5**	0.029 ns	0.071**	4	رقم *تنش شوری Variety* Salt stress
0.00	0.000	0.0001	4.61 e-6	0.021	0.029	18	خطا Error
31	27	13	19	21	10		ضریب تغییرات Coefficient of Variance

**، * و ns به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و غیر معنی دار

*, ** and ns are significant at the 1%, 5% and meaningless levels, respectively

جدول۳. مقایسات میانگین داده های حاصل از اثر متقابل واریته در تنش در صفات بررسی شده به روش دانکن در سطح احتمال ۵ درصد (حروف مشابه در هر گروه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار می باشد)

Table 3. Comparisons of mean data from the interaction effect of variety on stress in the traits studied using Duncan's method at a probability level of 5% (similar letters in each group indicate no significant difference)

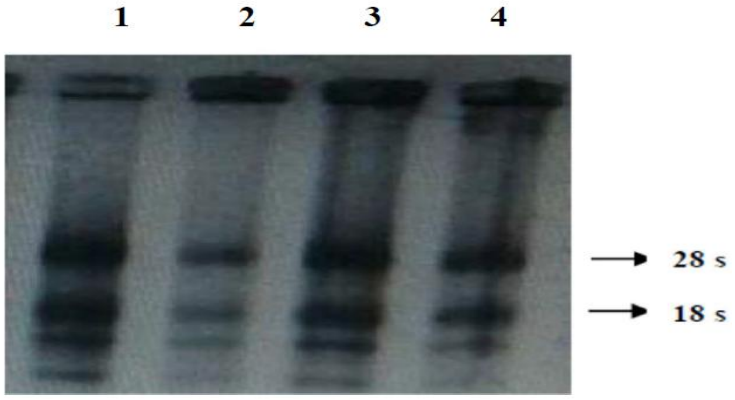
واریته Variety	تنش stress	طول ریشه Root length	طول ساقه Stem length	وزن تر ریشه Root fresh weight	وزن خشک ریشه Root dry weight	کلروفیل a Chlorophyl a	کلروفیلb Chlorophyl a	کلروفیل کل Total Chlorophyl
آگامکس Agamax	0	6.01±0.00 d	89.66±0.001 a	2.36±0.01 b	0.273±0.01 c	13±0.10 a	4.37±0. 7 ab	14.5±0. 7 b
	EC12.7	8.33±0.18 ab	78.3±0.007 c	1.5±0.02 e	0.13±0.018 d	5.5±0.5 c	1.97±0.05 e	7.52±0. 5 e
	EC.6.5	7.8±0.17 b	85.33±0.009 b	2.13±0.11 d	0.36±0.11 b	7.36±0.1 bc	3.4±0.09 bcd	10.44±0.09 cd
هایولا ٦١ Hyola61	0	6.67±0.00 c	51.33±0.00 d	2.41±0.01 b	0.42±0.01 a	13.43±0.09 a	5.64±0.07 a	19.08±07 a
	EC12.7	8±0.12 ab	40.33±0.001 f	2. 5±0.16 b	0.42±0.16 a	5.98±0. 1 bc	2.51±0.06 cde	2.88±0.06 f
	EC.6.5	6.16±0.01cd	51.66±0.02 d	2.16±0.1 cd	0.376±0.1 b	7.8b±0.7 b	3.66±0.07 bc	10.86±0.07 c
تراپر Traper	0	6.16±0.00 cd	55.3±0.00 d	1.53±0.1 e	0.246±0.01 c	6.54±0.01 bc	2.15±0.07 de	8.13±0.07 de
	EC12.7	8. 5±0.03 a	33.33±0.009 g	2.33±0.14 bc	0.41±0.14 a	5.5±0.6 c	1.25±0. 05 e	6.5±0. 05 e
	EC.6.5	5.1±0.18 e	44.66±0.001 e	2.86±0.01 a	0.37±0.01 b	6.03±0.8 bc	1.58±0.005 e	6.61±0.05 e

واریته Variety	تنش stress	کارتنوئید Carotenoid	تعداد غلاف در بوته Number of pods per plant	تعداد بذر در غلاف Number of seeds per pod	طول غلاف Pod length	وزن هزاردانه 1000-Seed weight	پروتئین بذر Seed protein	روغن بذر Seed oil
آگامکس Agamax	0	3.76±.001 a	4.66±0.00 a	8.33±0.01 de	5.16±0.01 d	0.793±.01 a	1.7±0.04 a	0.4±0.07 b
	EC12.7	1.63±0.001 c	3.3±0.18 f	5±0. 07 g	3.8±0.01 f	0.48±0.01 b	1.27±0.08 e	0.23±0.01 b
	EC.6.5	2.61±0.006 b	4.66±0.17 e	7±0. 09 ef	5.26±0.11 d	0.42±0.06 c	1.31±0.001 e	0.33±0.09 b
هایولا ٦١ Hyola61	0	2.48±0.00 b	4.66±0.00 a	16±0.01 a	5.0±0. 01 de	0.796±0.01 a	1.64±0.03 b	1.32±0.07 a
	EC12.7	1.56±0.001 c	2±0.12 e	9.66±0.01 cd	6.00±0.16 c	0. 33±0.01 cd	1.024±0.01 f	0.062±0.06 b
	EC.6.5	3.34±0.012 a	3.66±0.01b	11.66±0.02 b	7.6±0.1b	0.59±0.01 c	1.29±0.04 de	0.089±0.01 b
تراپر Traper	0	2.46±0. 01 b	8.3±0.1 c	10±0.01 c	7.83±0.01 a	0.786±0.01 a	1.33±0.04 d	1. 45±0.07 a
	EC12.7	1.63±0.09 c	4±0.03 e	4.33±0.01 g	4.5±0.14 e	0.3±0.09 cd	1.56±0.01 c	0.066±0.07 b
	EC.6.5	2.10±09 bc	7±0.18 d	6.66±0.01 f	4.6±0.01 de	0.27±0.01 d	1.33±0.03 d	0.087±0.05 b

واریته Variety	تنش stress	پرولین Proline	قند Sugar	پلی فنل اکسیداز Poly phenol oxidase	کاتالاز Catalase	گایاکول Gaiacole	اسکوربات Ascorbate
آگامکس Agamax	0	0.45±0.00 bc	0.15±0.01 ab	0.0001±.0.00 e	0.024±0.00 c	0.003±0.007 c	0.0065±0.00 c
	EC12.7	0.712±0.18 a	0.069±0.07 b	0.0005±0.00 bc	0.084±0.008 a	0.083±0.001 b	0.014±0.0002 c
	EC.6.5	0.56±0.17 ab	0.075±0.009 b	0.0012±0.00 c	0.03±0.001 c	0.005±0.009 c	0.0065±0.00 c
هایولا ٦١ Hyola61	0	0.08±0.00 f	0.111±0.00 ab	0.0003±0.00 c	0.017±0.00 c	0.0084±0.007 c	0.036±0.001 bc
	EC12.7	0.33±0.12 cde	0.1±0.001 ab	0.0046±0.001 ab	0.034±0.001c	0.21±0.002 a	0.25±0.001 a
	EC.6.5	0.22±0.01ef	0.2±0.002 ab	0.0032±0.0012 bc	0.015±0.00 c	0.023±0.00 c	0.059±0.001 b
تراپر Traper	0	0.41±0.00 bcd	0.061±0.001 b	0.001±0.0001 bc	0.013±0.00 c	0.0084±0.002 c	0.0072±0.00 c
	EC12.7	0.49±0.03 bc	0.074±0.001 b	0.0046±0.009 ab	0.034±0.001 c	0.023±0.00 c	0.059±0.002 b
	EC.6.5	0.26±0.18 de	0.36±0.001 a	0.0032±0.0002 bc	0.015±0.00 c	0.01±0.005 c	0.036±0.002 bc

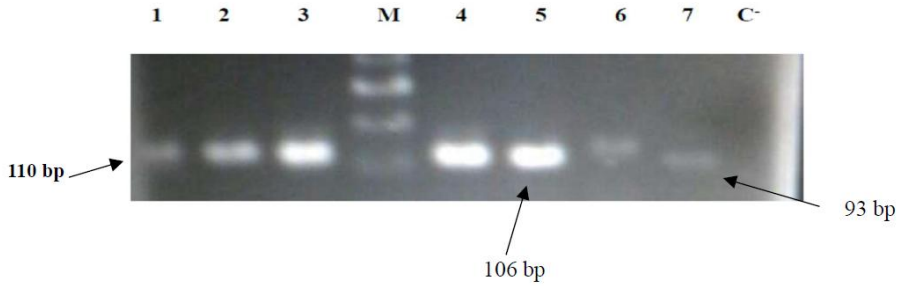
فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تأثیر معنی‌دار تیمار شوری و ژنوتیپ را نشان داد (جدول ۲). فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در رقم هایولا۶۱ و تراپر در EC 12.7 به حداکثر رسید و در رقم آگامگس در شرایط آبیاری معمولی کمترین مقدار را نشان داد. فعالیت آنزیم کاتالاز از الگوی مشابهی پیروی کرد، به طوری که در رقم آگامکس در EC 12.7 بالاترین مقدار و در شرایط آبیاری نرمال کمترین مقدار را داشت. فعالیت آنزیم های گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در رقم هایولا۶۱ در EC 12.7 به حداکثر رسید، اما در رقم تراپر در شرایط آبیاری معمولی کمترین مقدار را نشان داد. در مجموع، این نتایج نشان‌دهنده فعال شدن سیستم‌های آنتی‌اکسیدان آنزیمی تحت تنش شوری متوسط تا زیاد بسته به ژنوتیپ است (جدول ۳).

تجزیه و تحلیل‌های مولکولی: در بررسی RNA کل استخراج شده از نمونه‌ها، باندهای واضح ۱۸s و ۲۸ s مشخص شد که نشان‌دهنده کیفیت بالای RNA استخراجی است (شکل ۱). cDNA سنتز شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن ها و کنترل داخلی ارزیابی شد و اختصاصی بودن از طریق PCR تأیید شد و باندهای منفرد با اندازه مورد انتظار به دست آمد (شکل ۲).



شکل ۱. حضور باندهای واضح ۲۸ s و ۱۸ s مربوط به RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز یک درصد.

Figure 1. Presence of 28 s and 18 s bands related to extracted RNA on a 1% agarose gel.



شکل۲. محصول PCR حاصل از تکثیر ژن های LEA و Mapk و ßactin سنتز شده با آغازگرهای اختصاصی بر روی ژل آگارز دو درصد. ۱-۳: ژن Mapk، ٦-٤: ژن LEA، ۷: ژن ßactin، C-: کنترل منفی (RNA تیمار شده با DNAase به عنوان الگو)

Figure 2. PCR product resulting from amplification of *LEA*, *Mapk*, and *Bactin* genes synthesized with specific primers on a 2% agarose gel. 1-3: Mapk gene, 4-6: LEA gene, 7: *Bactin* gene, C⁻: negative control (RNA treated with *DNase*I as template)

آنالیز بیان ژن نشان داد که بیان ژن های LEA و Mapk بسته به رقم، میزان تنش شوری و اثر متقابل آنها به طور معنی داری افزایش داشته است (جدول ۴).

جدول ٤. تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بیان ژن های LEA و Mapk

Table 4. Analysis of variance of data obtained from the expression of LEA and Mapk genes

ژن Mapk Mapk gene	ژن LEA LEA gene	درجه آزادی degrees of freedom	منابع تغییرات Sources of variation
67.17 **	26.17 **	2	واریته Variety
10.79**	5.99 **	2	تنش Stress
0.321 **	3.018 **	4	واریته*تنش Variety* Stress
0.001	1.21 e^{-5}	18	خطا Error
7	**15**		**ضریب تغییرات Coefficient of Variance**

سطح بیان با افزایش شوری افزایش می‌یابد. میانگین بیان ژن *LEA* در تیمار شوری EC 12.7 و 6.5 در رقم آگامکس به ترتیب ۳/۰۳ و ۱/۱۲، در رقم هایولا۶۱ ۲/۹۶ و ۰/۹۸ و در رقم تراپر ۶/۱۶ و ۲/۳ به دست آمد. این میزان بیان ژن در شرایط نرمال آبیاری در ارقام آگامکس، هایولا۶۱ و تراپر به ترتیب ۱/۰۵، ۰/۸۱ و ۰/۶۳ برآورد شد. نتایج نشان داد با افزایش میزان تنش مقدار بیان این ژن افزایش یافته است. متوسط بیان ژن *Mapk* در تیمار EC 12.7 و EC 6.5 در رقم آگامکس به ترتیب ۸/۹۸ و ۶/۲۶ در رقم هایولا۶۱ ۱۰/۷۶ و ۷/۲۴ و در رقم تراپر ۷/۸۹ و ۵/۲۹ به دست آمد. این میزان بیان ژن در شرایط نرمال آبیاری در ارقام آگامکس، هایولا۶۱ و تراپر به ترتیب ۳/۵، ۴/۷۲ و ۳/۰۳ برآورد شد. تجزیه و تحلیل آماری تفاوت‌های بسیار معنی‌داری ($p < 0.01$) را در بیان ژن مربوط به ژنوتیپ و تیمار تأیید کرد. بیشترین میزان بیان ژن LEA در سطح تنش EC 12.7 در رقم تراپر و کمترین آن در سطح آبیاری نرمال در رقم تراپر مشاهده شد. همچنین بیشترین میزان بیان ژن *Mapk* در سطح تنش EC 12.7 در رقم هایولا ۶۱ و کمترین آن در سطح آبیاری نرمال در رقم تراپر مشاهده شد (جدول ۵).

بحث

در مطالعه حاضر پاسخ‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، آنزیمی و مولکولی سه رقم کلزای بهاره (آگامکس، ترپر و هایولا۶۱) تحت سطوح مختلف تنش شوری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج، بینش‌های مهمی در مورد مکانیسم‌های مختلف تحمل به شوری ارائه می‌دهد که عملکرد خاص هر رقم را مشخص می کند. یافته‌های ما تأثیر منفی آشکار افزایش شوری بر طول ریشه، ارتفاع گیاه و وزن تر و خشک ریشه را نشان می دهد که با مطالعات متعددی که کاهش رشد گیاه را تحت تنش شوری به دلیل سمیت اسمزی و یونی گزارش کرده‌اند، مطابقت دارد (Munns and Tester, 2008; Gupta and Huang, 2014). رقم آگامکس بیشترین طول ریشه را در آبیاری معمولی نشان داد، اما بیشتر مستعد کاهش رشد ناشی از تنش شوری، به ویژه در EC 12.7 بود. در مقابل، رقم تراپر حتی در شوری متوسط (EC 6) رشد شاخه و وزن تر و خشک نسبتاً بهتری را حفظ کرد که نشان

دهنده مکانیسم‌های تحمل برتر است. این مشاهدات به خوبی با یافته‌های Ashraf & Foolad (2007) مطابقت دارد، که ساختار سیستم ریشه را به عنوان یک عامل تعیین‌کننده مهم تحمل به شوری با تسهیل جذب آب تحت تنش اسمزی برجسته می کند.

جدول ۵. مقایسات میانگین داده های حاصل از بررسی بیان ژن با روش دانکن در سطح احتمال ۵ درصد (حروف مشابه در هر گروه بیانگر عدم اختلاف معنی دار می باشد)

Table 4. Comparisons of mean data from gene expression analysis using Duncan's method at /a probability level of 5% (similar letters in each group indicate no significant difference

Variety واریته	Stress تنش	LEA	Mapk
آگامکس Agamax	EC 12.7	3.03±0.003 b	8.98±0.01 b
	EC 6.5	1.12±0.004 e	6.26±0.02 e
	0	1.05±0.003 f	3.5±0.03 h
هایولا۶۱ Hyola61	EC 12.7	2.96±0.001 c	10.76±0.01 a
	EC 6.5	0.98±0.002 g	7.27±0.03 d
	0	0.81±0.002 h	4.72±0.01 g
تراپر Ttraper	EC 12.7	6.16±0.005 a	7.89±0.03 c
	EC 6.5	2.30±0.004 d	5.29±0.02 f
	0	0.63±0.005 i	3.03±0.04 i

علاوه بر این، صفات عملکردی مانند تعداد غلاف، تعداد دانه در هر غلاف و وزن هزار دانه با افزایش شوری، به ویژه در رقم آگامکس، به طور قابل توجهی کاهش یافت. چنین کاهش‌هایی بر عملکرد نهایی تأثیر منفی می‌گذارند و به طور گسترده در گونه‌های براسیکا تحت شرایط شوری گزارش شده‌اند (Kthiri et al., 2022). عملکرد تولید مثلی نسبتاً بهتر تراپر و هایولا۶۱ تحت شوری نشان می‌دهد که این ارقام دارای صفات ژنتیکی ذاتی هستند که در مرحله رشد تولید مثلی، انعطاف‌پذیری ایجاد می‌کنند، مشاهده‌ای که توسط گزارش‌های مشابه در کلزا و سایر محصولات تایید می‌شود (Shrestha et al., 2025,). کاهش محتوای کلروفیل (a، b، کل) و کاروتنوئید تحت تنش شوری، با یافته‌های قبلی مبنی بر اینکه شوری سنتز رنگدانه‌های فتوسنتزی را مختل می‌کند و تجزیه را تسریع می‌کند و منجر به کاهش راندمان فتوسنتز می‌شود، مطابقت دارد (Ashraf & Harris, 2013). ارقام هایولا۶۱ و آگامکس در شرایط آبیاری معمولی، احتباس کلروفیل بیشتری را نشان دادند که نشان‌دهنده پتانسیل فتوسنتزی پایه بهتر است، با این حال، همه ارقام کاهش ناشی از شوری را نشان دادند. این تخریب رنگدانه احتمالاً ناشی از افزایش آسیب اکسیداتیو ناشی از عدم تعادل یونی و تنش اسمزی است (Parida and Das, 2005). تجمع پرولین، یک محافظ اسمزی کلیدی، با افزایش شوری، به ویژه در رقم آگامکس در بالاترین سطح شوری (EC 12.7)، به طور قابل توجهی افزایش یافت که نقش آن را در تنظیم اسمزی و تجمع ROS تأیید می‌کند (Verbruggen & Hermans, 2008). افزایش قندهای محلول در آگامکس در EC 6.5، بیشتر بر محافظت اسمزی و بسیج انرژی در شرایط تنش متوسط تأکید می‌کند، که با یافته‌های کلزا و سایر گونه‌هایی که متابولیسم کربوهیدرات، مقاومت در برابر تنش را تعدیل می‌کند، مطابقت دارد (Keunen et al., 2013). به طور مشابه، محتوای پروتئین دانه بالاتر در تراپر در شرایط عادی و تنش متوسط، نشان‌دهنده برنامه‌ریزی مجدد متابولیکی احتمالی برای حفظ عملکردهای حیاتی است. افزایش فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنول اکسیداز، کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز تحت تنش شوری، به‌ویژه در

EC12.7، نشان‌دهنده‌ی دخالت سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی برای کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از نمک است (Mittova et al., 2003; Kthiri et al., 2022). رقم هایولا۶۱ بالاترین فعالیت‌آنزیمی را نشان داد که ظرفیت متفاوت این رقم برای سم‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، که برای حفظ هموستاز سلولی و حفظ رشد در شرایط تنش بسیار مهم است را برجسته می‌کند که با یافته های Hasanuzzaman et al., (2018) مطابقت می کند. توانایی ارقام تراپر و هایولا۶۱ در تنظیم افزایشی این آنزیم‌ها ممکن است زمینه‌ساز عملکرد فیزیولوژیکی برتر آنها در مقایسه با رقم آگامکس باشد. داده‌های مولکولی الگوهای بیان متمایزی از ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش LEA و *Mapk* را نشان دادند که پاسخ‌های خاص رقم را بیشتر روشن می‌کند. کاهش بیان ژن LEA با افزایش شوری در رقم آگامکس با نقش معمول گزارش‌شده آن در محافظت از تنش در تضاد است که با نتیجه Battaglia et al., (2008) مطابقت داردکه احتمالاً نشان‌دهنده تنظیم وابسته به رقم یا مهار بازخورد تحت تنش شدید است. برعکس، بیان ژن *Mapk* تحت تنش متوسط درارقام آگامکس و هایولا۶۱ القا شد اما در تراپر سرکوب شد، که نشان می‌دهد مسیرهای ژنتیکی متفاوتی ممکن است در پاسخ به تنش هر ژنوتیپ غالب باشند. بیان متفاوت قابل توجه این ژن‌ها با تحقیقات رونویسی قبلی در گونه‌های براسیکا تحت تنش‌های غیرزیستی همسو است و بر نقش آنها در ایجاد سازگاری با تنش تأکید می‌کند (Chen et al., 2019). یافته‌ها نشان می‌دهد که تلاش‌های اصلاحی با هدف تعدیل بیان ژن‌های LEA و Mapk ممکن است تحمل به شوری را افزایش دهد.

نتیجه‌گیری: به طور کلی، این مطالعه رقم تراپر را به عنوان متحمل‌ترین رقم به شوری در بین ارقام آزمایش شده شناسایی می‌کند، همانطور که با حفظ بهتر رشد، زیست توده، بازده عملکردی، رنگدانه‌های فتوسنتزی، تجمع اسمولیت، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و الگوهای بیان ژن مطلوب تحت تنش شوری نشان داده شده است. رقم آگامکس بیشترین حساسیت را نشان داد، در حالی که هایولا۶۱ پاسخ‌های متوسطی با نقاط قوت خاصی مانند حفظ رنگدانه و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آنزیمی نشان داد. در ادامه، مطالعه دقیق فیزیولوژی و مولکولی با تمرکز بر تشریح شبکه‌های تنظیمی کنترل‌کننده متابولیسم اسمولیت و دفاع آنتی‌اکسیدانی توصیه می شود. انتخاب به کمک نشانگر که ژن‌های کلیدی مانند *LEA* و *Mapk* و همچنین ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را هدف قرار می‌دهد، ممکن است توسعه ارقام کلزای مقاوم به شوری را تسریع کند. همچنین، ارزیابی های زراعی که این ارقام را در شرایط شور مزرعه، برای اعتبارسنجی نتایج محیط کنترل‌شده ضروری است.

سپاسگزاری: این پژوهش در قالب طرح پژوهشی شماره ۰۲/۳۷۵۲/ص/۷ با استفاده از اعتبارات پژوهشی پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران انجام شده است.

References

Amini, S., Ghobadi, C., & Yamchi, A. (2015). Proline accumulation and osmotic stress: an overview of P5CS gene in plants. *Journal of Plant Molecular Breeding*, *3*(2), 44-55. https://doi.org/10.22058/jpmb.2015.17022

Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, *59*(2), 206-216. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.006

Ashraf, M., & Harris, P. J. C. (2013). Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica*, *51*(2), 163-190. https://doi.org/10.1007/s11099-013-0021-6

Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, *39*, 205-207. https://doi.org/10.1007/BF00018060

Battaglia, M., & Covarrubias, A. A. (2013). Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins in legumes. *Frontiers in Plant Science, 4*, 190. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00190

Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garciarrubio, A., Campos, F., & Covarrubias, A. A. (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology*, *148*(1), 6-24. https://doi.org/10.1104/pp.108.120725

Bradford, M. M. (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. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Channaoui, S., Saghouri, I., Idrissi, E., Mazouz, H., & Nablouss, A. (2019). Reaction of some rapeseed (Brassica napus L.) genotypes to different drought stress levels during germination and seedling growth stages. *OCL*, *26*, 23. https://doi.org/10.1051/ocl/2019020

Chaparzadeh, N., Khavari-Nejad, R. A., Navari-Izzo, F., & Izzo, R. (2003). Water relations and ionic balance in *Calendula officinalis* L. under salinity conditions. *Agrochimica*, 47(1-2), 69-79. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.07.001

Chen, Y., Li, C., Zhang, B., Yi, J., Yang, Y., Kong, C., Lei, C., & Gong, M. (2019). The role of the late embryogenesis-abundant (LEA) protein family in development and the abiotic stress response: A comprehensive expression analysis of potato (Solanum tuberosum). *Genes (Basel), 10*(2), 148. https://doi.org/10.3390/genes10020148

Cuin, T. A., Tian, Y., Betts, S. A., Chalmandrier, R., & Shabala, S. (2009). Ionic relations and osmotic adjustment in durum and bread wheat under saline conditions. *Functional Plant Biology*, 36, 110-119. https://doi.org/10.1071/FP08266

Fang, S., Zhao, P., Tan, Z., Peng, Y., Xu, L., Jin, Y., Wei, F., Guo, L., & Yao, X. (2022). Combining physio-biochemical characterization and transcriptome analysis reveals the responses to varying degrees of drought stress in Brassica napus L. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(15), 8555. https://doi.org/10.3390/ijms23158555

Finnie, C., Melchior, S., Roepstorff, P., & Svensson, B. (2002). Proteome analysis of grain filling and seed maturation in barley. *Plant Physiology*, *129*(3), 1308-1319. https://doi.org/10.1104/pp.003681

Flowers, T. J. (2004). Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, *55*(396), 307-319. https://doi.org/10.1093/jxb/erh003

Gupta, B., & Huang, B. (2014). Mechanism of salinity tolerance in plants: Physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomics*, 2014, 701596. https://doi.org/10.1155/2014/701596

Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M. B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. A., & Fujita, M. (2018). Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, *7*(7), 138. https://doi.org/10.3390/antiox9080681

He, T., & Cramer, G. R. (1993). Growth and ion accumulation of two rapid-cycling *Brassica* species in response to seawater salinity. *Plant and Soil*, 153, 19-31. https://doi.org/10.1007/BF00010544

Jia, F., Qi, S., Li, H., Liu, P., Li, P., Wu, C., Zheng, C., & Huang, J. (2014). Overexpression of Late Embryogenesis Abundant 14 enhances Arabidopsis salt stress tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 454*(4), 505-511. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.10.136

Jia, J., Wang, F., Yuan, M., Wang, Z., Qin, Z., Zhang, X., & Shao, Y., Pei, H. (2025). Transcriptomic Analysis Reveals That the Photosynthesis and Carotenoid Metabolism Pathway Is Involved in the Salinity Stress Response in Brassica rapa L. ssp. Pekinensis. *Plants*, *14*, 566. https://doi.org/10.3390/plants14040566

Jiang, M., Zhang, Y., Li, P., Jian, J., Zhao, C., & Wen, G. (2022). Mitogen-Activated Protein Kinase and Substrate Identification in Plant Growth and Development. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(5), 2744. https://doi.org/10.3390/ijms23052744

Kar, M., & Mishra, D. (1976). Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, *57*, 315-319. https://doi.org/10.1104/pp.57.2.315

Kazemeini, S. A., Alborzei Hagighi, M. H., & Pirasteh-Anosheh, H. (2016). Evaluating salinity tolerance at different growth stages in rapeseed (Brassica napus) cv. Talaye. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, *9*(2), 185-193. https://doi.org/10.22077/escs.2016.364

Keunen, E., Peshev, D., Vangronsveld, J., Van Den Ende, W., & Cuypers, A. (2013). Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: Extending the traditional concept. *Plant, Cell & Environment*, *36*(7), 1242-1255. https://doi.org/10.1111/pce.12061

Kthiri, Z., Hammami, M. D. E., Marzougui, O., Jabeur, M. B., Aouadi, A., Karmous, C., & Hamada, W. (2022). Salt Stress Effects on the Growth, Photosynthesis and Antioxidant Enzyme Activities in Maize (*Zea mays* L.) Cultivars. *Environmental Sciences Proceedings*, *16*(1), 73. https://doi.org/10.3390/environsciproc2022016073

Liang, Y., Xiong, Z., Zheng, J., et al. (2016). Genome-wide identification, structural analysis and new insights into late embryogenesis abundant (LEA) gene family formation pattern in Brassica napus. *Scientific Reports*, *6*, 24265. https://doi.org/10.1038/srep24265

Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, *148*, 350-382. https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, *25*(4), 402-408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

Lu, K., Guo, W., Lu, J., Yu, H., Qu, C., Tang, Z., Li, J., Chai, Y., & Liang, Y. (2015). Genome-wide survey and expression profile analysis of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) gene family in Brassica rapa. *PLoS ONE, 10*(7), e0132051. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132051

Mittova, V., Tal, M., Volokita, M., & Guy, M. (2003). Salinity stress induces up-regulation of antioxidant systems in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species Lycopersicon pennellii. *Free Radical Biology and Medicine*, *35*(4), 453-462. https://doi.org/10.1093/jxb/erh113

Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, *59*, 651-681. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911

Paleg, L. G., & Aspinall, D. (1989). *The physiology and biochemistry of drought resistance in plants* (Chapters 1-2, pp. 1-24). Academic Press, Sydney

Parida, A. K., & Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(3), 324-349. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.010

Piao, Y., Jin, K., He, Y., Liu, J., Liu, S., Li, X., & Piao, Z. (2018). Genome-wide identification and role of MKK and MPK gene families in clubroot resistance of Brassica rapa. *PLoS ONE, 13*(2), e0191015. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191015

Saadia, M., Jamil, A., Akram, N. A., & Ashraf, M. (2012). A study of proline metabolism in canola (*Brassica napus* L.) seedlings under salt stress. *Molecules*, 17, 5803-5815. https://doi.org/10.3390/molecules17055803

Shrestha, R., Xue, Q., Soto, A. L., Ganjegunte, G., Palmate, S. S., Chaganti, V. N., Kumar, S., Ulery, A. L., & Zapata, S. (2025). Plant Traits in Spring and Winter Canola Genotypes Under Salinity. *Agronomy*, *15*(7), 1657. https://doi.org/10.3390/agronomy15071657

Sinha, A. K., Jaggi, M., Raghuram, B., & Tuteja, N. (2011). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior, 6*(2), 196-203. https://doi.org/10.4161/psb.6.2.14701

Su, J. J., Wu, S., Xu, Z. J., Qiu, S., Luo, T. T., Yang, Y. M., Chen, Q. T., Xia, Y. Y., Zou, S., Huang, B. L., & Huang, B. Q. (2013). Comparison of salt tolerance in *Brassicas* and some related species. *American Journal of Plant Sciences*, 4, 1911-1917. https://doi.org/10.4236/ajps.2013.410237

Thimmaiah, S. R. (2004). *Standard Methods for Biochemical Analysis*. Kalyani Publishers, New Delhi, 545.

Urbanek, H., Kuzniak Gebarowska, E., & Herka, K. (1991). Elicitation of defense responses in bean leaves by Botrytis cinerea polygalacturonase. *Acta Physiologiae Plantarum*, *13*, 43-50. https://api.semanticscholar.org/CorpusID:81877086

Velikova, V., Yordanov, I., & Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, *151*(1), 59-66. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.110

Verbruggen, N., & Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: A review. *Amino Acids*, *35*(4), 753-759. https://doi.org/10.1007/s00726-008-0061-6

Wang, L., Liu, F., Ju, L., Xue, B., Wang, Y., Wang, D., & Hou, D. (2022). Genome structures and evolution analysis of Hsp90 gene family in Brassica napus reveal the possible roles of members in response to salt stress and the infection of Sclerotinia sclerotiorum. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 854034. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.854034

Wang, S. W., Lu, J. X., Wan, H. F., Weng, C. M., Wang, Z., Li, J. N., Lu, K., & Liang, Y. (2014). Overexpression of BnMAPK1 enhances resistance to Sclerotinia sclerotiorum in *Brassica napus*. *Acta Agronomica Sinica*, *40*, 745-750. https://doi.org/10.1007/s13353-016-0340-y

Wang, Z., Wan, Y., Meng, X., Zhang, X., Yao, M., Miu, W., Zhu, D., Yuan, D., Lu, K., Li, J., et al. (2021). Genome-wide identification and analysis of MKK and MAPK gene families in Brassica species and response to stress in Brassica napus. *International Journal of Molecular Sciences, 22*(2), 544. https://doi.org/10.3390/ijms22020544

Wang, Z., Wan, Y., Meng, X., Zhang, X., Yao, M., Miu, W., Zhu, D., Yuan, D., Lu, K., & Li, J., et al. (2021). Genome-wide identification and analysis of MKK and MAPK gene families in Brassica species and response to stress in Brassica napus. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(2), 544. https://doi.org/10.3390/ijms22020544

Xu, Y., Tao, S., Zhu, Y., Zhang, Q., Li, P., Wang, H., Zhang, Y., Bakirov, A., Cao, H., Qin, M., Wang, K., Shi, Y., Liu, X., Zheng, L., Xu, A., & Huang, Z. (2022). Identification of alkaline salt tolerance genes in Brassica napus L. by transcriptome analysis. *Genes (Basel)*, *13*(8), 1493. https://doi.org/10.3390/genes13081493

Yoshimura, K., Yabute, Y., Ishikawa, T., & Shigeoka, S. (2000). Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology*, *123*(1), 223-233. https://doi.org/10.1104/pp.123.1.223

Zhao, P., Liu, F., Ma, M., Gong, J., Wang, Q., Jia, P., Zheng, G., & Liu, H. (2011). Overexpression of AtLEA3-3 confers resistance to cold stress in Escherichia coli and provides enhanced osmotic stress tolerance and ABA sensitivity in Arabidopsis thaliana. *Molecular Biology*, *45*, 785-796. https://doi.org/10.1134/S0026893311050165

Zhi, X., Bian, X., Yu, J., Xiao, X., Duan, B., Huang, F., Jiang, Z., Zhou, G., & Ma, N. (2024). Comparative metabolomics analysis of tolerant and sensitive genotypes of rapeseed (*Brassica napus L.*) seedlings under drought stress. *Agricultural Water Management, 296*, Article 108797. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2024.108797