

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 25°C. 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 H₂O₂ 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 *DNaseI* 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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 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 $\times$ 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.

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

مریم عبدلی نسب ^{id}

* 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 می‌شود. این مطالعه به منظور بررسی تنش شوری بر پارامترهای رشدی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، آنزیمی و مولکولی سه رقم کلزای بهاره (آگامکس، تراپر و هایولا ۶۱) 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 پروکلین، قند محلول، محتوای پروتئین محلول کل، محتوای پروتئین بذر و روغن بذر) و فعالیت آنزیم‌های 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 پروکلین 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 هایولا ۶۱ می‌باشد. 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، عملکرد بالاتر، 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 هایولا ۶۱ پاسخ های متوسطی با نقاط قوت خاصی مانند حفظ رنگدانه و ظرفیت آنتی اکسیدانی آنزیمی نشان داد.

کلیدواژه ها: تنش، ژن های LEA، ژن های Mapk، فعالیت آنتی اکسیدان

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: عبدلی نسب مریم (۱۴۰۵) پاسخ های 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)، ۱۱۱-۱۳۰.

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 کنباله غنی از پروتئین آن برای مصرف دام و منبع تجدیدپذیر برای بیودیزل و صنعت به عنوان یک محصول کشاورزی با اهمیت اقتصادی شناخته می‌شود (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 مکانیسم های 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، پروتئین های تجمع کننده در انتهای دوره جنینی (LEA) و پروتئین کینازهای فعال شده با میتوزن (MAPK) ۲ هستند (Jia et al., 2014; Sinha et al., 2011). پروتئین های LEA، پروتئین های آبدوست با ساختار بی نظم هستند که در طول بلوغ بذر و در پاسخ به تنش های غیرزیستی، از جمله شوری، تجمع می‌یابند (Chen et al., 2019). آن ها به عنوان چاپرون های مولکولی عمل می‌کنند و با تثبیت پروتئین ها و غشاها، از ساختارهای سلولی در برابر آسیب ناشی از استرس های محیطی محافظت می‌کنند (Jao et al. 2011). این پروتئین ها بر اساس شباهت های توالی اسید آمینه و تفاوت های دامنه حفاظت شده، به هشت زیرگروه LEA1، LEA2، LEA3، LEA4، LEA5، LEA6، پروتئین های بلوغ بذر ۳ (SMPs) و دهیدرین ها طبقه بندی می‌شوند (Battaglia and Covarrubias, 2013; Chen et al., 2019). آبخارهای MAPK از سه کیناز با عملکرد متوالی تشکیل شده اند: MAPK کیناز کینازها (MAPKKs)، MAPK کینازها (MAPKKs) و MAPK ها. این آبخارها مسیرهای انتقال سیگنالی حفاظت شده در یوکاریوت ها 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، سیگنال های استرس خارج سلولی را به پاسخ های درون سلولی تبدیل می کنند، ژن های پاسخ دهنده به استرس را فعال کرده و دفاع آنتی اکسیدانی را تعدیل می کنند (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 ژن های LEA و MAPK را القا می کند (Wang et al., 2021; Liang et al., 2016). این تغییرات بیان ژن با تنظیمات فیزیولوژیکی مانند بهبود جوانه زنی بذر، رشد ریشه و ساقه و کارایی فتوسنتز در ژنوتیپ های متحمل در مقایسه با ژنوتیپ های حساس همراه است (Channaoui et al., 2019; Fang et al., 2022). تنش شوری همچنین باعث تجمع گونه های فعال اکسیژن (ROS) می شود که می تواند باعث آسیب اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک شود (Velikova et al., 2000). گیاهان از طریق یک سیستم آنتی اکسیدانی قوی شامل آنزیم هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POD) با این امر مقابله می کنند (Fang et al., 2022). مطالعات حاکی از آن است که لاین های کلزای مقاوم به شوری، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی بالایی را نشان می دهند که با سطوح بالاتر بیان ژن های LEA و MAPK مرتبط است (Fang et al., 2022). این ظرفیت افزایش یافته جمع آوری ROS برای حفظ تعادل ردوکس سلولی و جلوگیری از آسیب اکسیداتیو تحت تنش شوری بسیار مهم است. تجزیه و تحلیل های ژنومی عملکردی همچنین نشان می دهد که مسیرهای هورمونی، به ویژه اسید آبسزیک (ABA) و اسید جاسمونیک (JA)، با سیگنال دهی LEA و MAPK برای هماهنگ کردن پاسخ های تنش تعامل دارند (Fang et al., 2022). پروفایل ترانسکریپتومی نشان می دهد که تنش شوری، بیان ژن های پاسخ دهنده به ABA و JA، از جمله سرکوب کننده های JAZ را القا می کند که سیگنال دهی هورمون را برای بهینه سازی مصرف انرژی در طول سازگاری با تنش تنظیم می کنند (Fang et al., 2022). داده های پروتئومیک همچنین پروتئین های مرتبط با تنش مانند پروتئین های شوک حرارتی (HSP90) و آنزیم های دخیل در سم زدایی ROS را به عنوان اجزای حیاتی شبکه پاسخ به تنش شوری شناسایی می کنند (Wang et al., 2022). در مجموع، این یافته ها نقش یکپارچه ژن های LEA4 و MAPK1 را در ایجاد تحمل به شوری در گیاه کلزا با تعدیل دفاع آنتی اکسیدانی، صفات فیزیولوژیکی و مسیرهای سیگنالینگ وابسته به هورمون برجسته می کنند. الگوهای بیان ژن در یوکاریوت ها مختص بافت هستند (Mohammadabadi & Asadollahpour Nanai, 2021; Mohammadabadi et al., 2024). علاوه بر این، سطوح محصولات ژنی سنتز شده در یک بافت معین، و همچنین آن هایی که توسط بافت های دیگر تأمین می شوند، به طور جمعی بیان ژن را تنظیم می کنند (Shokri et al., 2023). پیشرفت ها در رویکردهای چند-اومیکس، درک ما از این شبکه های تنظیمی پیچیده را عمیق تر کرده و اهداف ارزشمندی را برای مهندسی ژنتیک و برنامه های اصلاح نژاد با هدف بهبود مقاومت کلزا در برابر شوری فراهم می کند (Wang et al., 2014; Liang et al., 2016). فرایندهای فیزیولوژیکی گیاهان وابسته به میزان آب بوده و به طور غیرمستقیم تحت تأثیر تنش شوری قرار می گیرند (Chaparzadeh et al., 2003). تنظیم اسمزی با افزایش املاح در سلول ها موجب حفظ تورم و ادامه فعالیت ها در پتانسیل های آب پایین می شود (Cuin et al., 2009). تنش شوری باعث کاهش ارتفاع گیاه، سطح برگ، ماده خشک کل و در نهایت عملکرد محصول می گردد. سطح برگ و ارتفاع گیاه سریع تر از سایر شاخص های مورفولوژیکی کاهش می یابند زیرا به فتوسنتز خالص وابسته اند. تغییرات بیوشیمیایی شامل کاهش یا افزایش پروتئین ها، قندهای محلول و پرولین است (Paleg & Aspinall, 1989). پرولین به عنوان یک اسمولیت، ساختار دیواره سلولی و پروتئین ها را پایدار کرده و رادیکال های آزاد را حذف می کند. تجمع پرولین در شرایط تنش متوسط یا شدید افزایش یافته و به عنوان مخزن

نیترژن و تنظیم کننده اسمزی عمل می کند (Saadia et al., 2012). مطالعات روی کلزا نشان می دهد که تنش شوری موجب کاهش معنی دار صفات رشدی و فیزیولوژیکی و افزایش اسمولیت ها به ویژه پرولین در ارقام می شود (Su et al., 2013; He & Cramer, 1993). با توجه به اهمیت موضوع، در این مطالعه الگوی بیان ژن های MAPK و LEA به عنوان عوامل کلیدی در پاسخ به تنش و حفاظت سلولی در سه رقم کلزا ارزیابی شد. همچنین فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان برای تعیین نقش آن ها در کاهش آسیب اکسیداتیو ناشی از تجمع ROS اندازه گیری گردید. علاوه بر این، خصوصیات رشدی، عملکرد و فیزیوشیمیایی مانند شاخص کلروفیل، میزان پرولین، پروتیین و قند بررسی گردید تا ارتباط آن ها با سازگاری ژنوتیپ های مختلف کلزا تحت شرایط تنش شوری مشخص و جهت استفاده در برنامه های 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 بهار (تراپ، آگامکس و هایولا ۶۱) می باشد. به منظور ضد عفونی 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 ضد عفونی، 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 مورد نظر 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.

اندازه گیری 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 پروتیین کل برگ به روش Bradford (1976) با رسم منحنی استاندارد با استفاده از معرف بیوره در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر Carry 50 اندازه گیری گردید. همچنین استخراج پروتیین از بذر طبق روش Finnie et al., (2002) انجام گردید. مقدار اسید آمینه پرولین براساس روش Bates et al., (1973) در طول موج ۵۲۰ نانومتر مورد اندازه گیری قرار گرفت. سنجش رنگی های فتوسنتزی به روش Lichtenthaler (1978) از برگ تازه انجام گرفت. جذب نوری در طول موج های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد و غلظت رنگی ها با استفاده از رابطه های مربوطه بر حسب میکروگرم برگرم وزن تر محاسبه گردید. محتوای قندهای محلول با استفاده از معرف آنترون و بر اساس روش Thimmaiah (2004) در طول موج ۶۲۵ نانومتر تعیین گردید. استخراج پروتیین 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 ۵/۰ گرم از بافت تازه برگ گیاه در ۵ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=5/7) که حاوی پلی وینیل پیرولیدین (PVP) یک درصد و EDTA یک میلی مولار بود سائیده شد. تمام مراحل استخراج در یخ انجام گرفت. عصاره ها به مدت ۲۰ دقیقه در $500 \times g$ و در دمای چهار درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند. از محلول 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 بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=7)، آب اکسیژنه ۱۵ میلی مولار 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 $40 \text{ Mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ و فرمول $A = \epsilon bc$ محاسبه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل 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=7/۶ و پیروگالول ۰/۰۲ مولار تهیه گردید. واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی شروع شد. در حضور آنزیم پلی فنل اکسیداز، پیروگالول موجود در مخلوط واکنش، به پورپوروگالین تبدیل می شود. کاهش در جذب پیروگالول در ۴۲۰ نانومتر، پس از ۵ 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 اندازه گیری شد. سه میلی لیتر 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 اندازه گیری شد.

سنجش فعالیت آنزیم اسکوربات پراکسیداز: به منظور سنجش فعالیت آنزیم اسکوربات پراکسیداز کمپلکس واکنشی (یک میلی لیتر) شامل ۲۵۰ میکرولیتر از محلول بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار (pH=7)، ۲۵۰ میکرولیتر از اسکوربات یک میلی مولار، ۲۵۰ میکرولیتر از EDTA ۰/۴ میلی مولار، ۱۹۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۱۰ میکرولیتر از پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی مولار 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 اسکوربات اکسید شده بر دقیقه محاسبه شد (Yoshimura et al. 2000).

استخراج RNA و سنتز cDNA: جهت استخراج RNA از نمونه های 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 *DNAase I* مقدار ۱ میکرولیتر *oligo dt*، ۱

میکرولیتر dNTP و ۱ میکرولیتر آب مقطر 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 بافر X 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 ژن‌های 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 سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام گردید. همچنین پنج دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به عنوان پیش‌تابیه، دمای بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام گردید. همچنین پنج دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به عنوان پیش‌تابیه، دمای بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد 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	توالی پرایمر (۵' به ۳')	دمای اتصال	طول قطعه تکثیر شده
Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Annealing temperature (°C)	Amplified fragment (bp)
<i>LEA F</i>	GAGGAGAAGGCTGAGAAGATGA	58	106
<i>LEAR</i>	CTCCACTGGCTTCTTTTCATGAC	58	106
<i>MapkF</i>	ACGCTCTAACCAACCCCTTAAGTGA	58	110
<i>MapkR</i>	TCCCCAAGCTTTAGATCACAGTTTG	58	110
<i>βActin F</i>	TGGGTTTGCTGGTGACGAT	60	93
<i>βActin R</i>	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 به‌طور اختصاصی 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 β Actin 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 می‌باشد.

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 در رقم تراپر تحت آبیاری با EC 12.7 به کمترین مقدار رسید. این نتایج نشان‌دهنده حساسیت کلی فرآورده‌های 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 عملکرد، 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 هایولا ۶۱ 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 هایولا ۶۱ و آگامکس تحت آبیاری معمولی بالاترین سطح رنگدانه را حفظ کردند، اما همه ارقام در شرایط شوری کلروفیل از دست دادند که نشان‌دهنده اختلال در یکپارچگی فتوسنتز است. به طور موازی، محتوای کاروتنوئید در آگامکس 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 مقدار خود 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 آگامکس در شرایط نرمال آبیاری به حداکثر رسید و در همان رقم EC 12.7 به حداقل رسید نتایج نشان می‌دهد صرف نظر از اثر وارسته بیشترین میزان این صفت در سطح تیمار EC 6 و کمترین میزان این صفت در شرایط نرمال دیده می‌شود و صرف نظر از اثر تنش بیشترین میزان پروتئین بذر در رقم آگامکس دیده می‌شود. به طور مشابه، محتوای روغن دانه بذر در رقم تراپر در شرایط آبیاری معمولی به حداکثر رسید و کمترین میزان آن در ارقام هایولا ۶۱ در تیمار شوری EC 12.7 مشاهده شد (جدول ۳).

جدول ۲. تجزیه واریانس داده‌ها برای صفات ارزیابی شده

Table 2. Analysis of variance of data for evaluated traits

Table 2: Analysis of variance of data for evaluated traits								
منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی degrees of freedom	طول ریشه Root length	وزن تر ریشه Root fresh weigh	وزن خشک ریشه Root dry weight	ارتفاع ساقه Stem length	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل کل Total chlorophyll
رقم Variety	2	1.61 **	0.31 **	0.51 **	4432 **	24.58**	12.2 **	43.22**
تنش شوری Salt stress	2	11.22 **	0.236**	0.008 **	510.1 **	68.65**	10.35 **	54.4**
رقم * تنش شوری Variety* Salt stress	4	2.53 **	0.904 **	0.027**	37.9 *	11.53**	10.07**	40.9**
خطا Error	18	0.89	0.012	0.001	6.33	1.29	0.59	2.1
ضریب تغییرات Coefficient of Variance		13	13	15	16	17	19	19
منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی degrees of freedom	کارتنوئید Carotenoid	تعداد غلاف در بوته Number of pods per plant	طول غلاف Pod length	تعداد بذر در غلاف Number of seeds per pod	وزن هزارانه 1000-seed weight	پروتئین بذر Seed protein	روغن بذر Seed oil
رقم Variety	2	0.84**	27.37 **	4.007 **	92.7 **	0.44 **	31629**	0.113 ^{ns}
تنش شوری Salt stress	2	4.22**	173.37**	3.65 **	59.37 **	0.35 **	215642*	2.5*
رقم * تنش شوری Variety* Salt stress	4	0.99**	24.15 **	6.19**	2.42 **	0.035**	158512*	0.47**
خطا Error	18	0.109	0.44	0.113	0.63	0.0001	655.1	0.034
ضریب تغییرات Coefficient of Variance		16	10	14	17	16	12	23
منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی degrees of freedom	پرولین Proline	قند Sugar	پلی فنل اکسیداز Poly phenol oxidase	کاتالاز Catalase	اسکوربات Ascorbate	گایاکول Gaiacole	
رقم Variety	2	0.038*	0.01 ^{ns}	5.21 e ^{-5**}	0.001**	0.022**	0.028 **	
تنش شوری Salt stress	2	0.144**	0.043 ^{ns}	3.94 e ^{-6**}	0.002**	0.029**	0.011**	
رقم * تنش شوری Variety* Salt stress	4	0.071**	0.029 ^{ns}	1.4 e ^{-5**}	0.002**	0.012**	0.009**	
خطا Error	18	0.029	0.021	4.61 e ⁻⁶	0.0001	0.000	0.00	
ضریب تغییرات Coefficient of Variance		10	21	19	13	27	31	

***، * 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

جدول ۳. 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 معنی دار 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 Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل کل Total Chlorophyll
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 ۶۱ 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±0.7 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±0.00cd	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	کاروتنوئید Carotenoid	تعداد غلاف در بوته Number of pods per plant	تعداد بذر در غلاف Number of seeds per pod	طول غلاف Pod length	وزن هزار دانه 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 ۶۱ Hyola61	0	2.48±0.00b	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±0.09 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 ۶۱ 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±0.001 c	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	

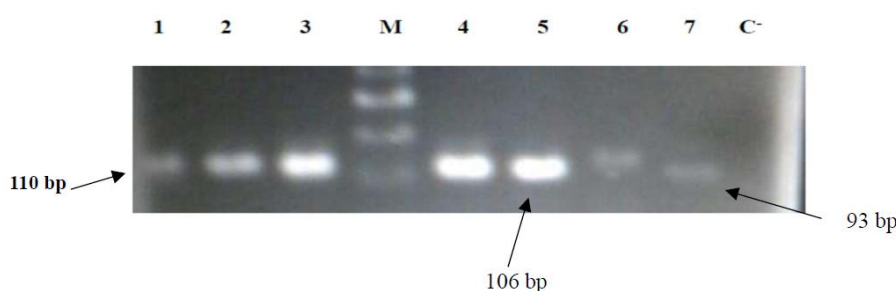
فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تأثیر معنی‌دار تیمار شوری و ژنوتیپ را نشان داد (جدول ۲). فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در رقم هایولا ۶۱ و تراپر در EC 12.7 به حداکثر رسید و در رقم آگامکس در شرایط آبیاری معمولی کمترین مقدار را نشان داد. فعالیت آنزیم کاتالاز از الگوی مشابهی پیروی کرد، به طوری که در رقم آگامکس در EC 12.7 بالاترین مقدار و در شرایط آبیاری نرمال کمترین مقدار را داشت. فعالیت آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در رقم هایولا ۶۱ 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 ۲۸S مشخص شد که نشان‌دهنده کیفیت بالای RNA استخراجی است (شکل ۱). cDNA سنتز شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌ها 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.



شکل ۲. محصول PCR حاصل از تکثیر ژن‌های LEA و Mapk و Bactin سنتز شده با آغازگرهای اختصاصی بر روی ژل آگارز دو درصد. ۱-۳: ژن Mapk، ۴-۶: ژن LEA، ۷: ژن Bactin، 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 *DNaseI* 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 ۴. 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 هایولا ۶۱ 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، هایولا ۶۱ 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 هایولا ۶۱ 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، هایولا ۶۱ 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، تراپر و هایولا ۶۱) 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 می‌کند. یافته‌های ما تأثیر منفی آشکار افزایش شوری بر طول ریشه، ارتفاع گیاه و وزن تر و خشک ریشه را نشان می‌دهد 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 تعیین کننده 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)

واریته Variety	تنش Stress	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
هایولا ۶۱ 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 غلافه تعداد دانه در هر غلاف و وزن هزار دانه با افزایش شوری، به ویژه در رقم آگامکس، به طور قابل توجهی کاهش یافت. چنین کاهش هایی بر عملکرد نهایی تأثیر منفی می گذارند و به طور گسترده در گونه های براسیکا تحت شرایط شوری گزارش شده اند (Kthiri et al., 2022). عملکرد تولید مثلی نسبتاً بهتر تراپر و هایولا ۶۱ تحت شوری نشان می دهد که این ارقام دارای صفات ژنتیکی ذاتی هستند که در مرحله رشد تولید مثلی، انعطاف پذیری ایجاد می کنند، مشاهداتی که توسط گزارش های مشابه در کلزا و سایر محصولات تایید می شود (Shrestha et al., 2025). کاهش محتوای کلروفیل (a, b, کل) و کاروتنوئید تحت تنش شوری، با یافته های قبلی مبنی بر اینکه شوری سنتز رنگدانه های فتوسنتزی را مختل می کند و تجزیه را تسریع می کند و منجر به کاهش راندمان فتوسنتز می شود، مطابقت دارد (Ashraf & Harris, 2013). ارقام هایولا ۶۱ و آگامکس در شرایط آبیاری معمولی، احتباس کلروفیل بیشتری را نشان دادند که نشان دهنده 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 می کند (Verbruggen & Hermans, 2008). افزایش قندهای محلول در آگامکس در EC 6.5، بیشتر بر محافظت اسمزی و بسیج انرژی در شرایط تنش متوسط تأکید می کند، که با یافته های کلزا و سایر گونه هایی که متابولیسم کربوهیدرات، مقاومت در برابر تنش را تعدیل می کند، مطابقت دارد (Keunen et al., 2013). به طور مشابه، محتوای پروتئین دانه بالاتر در تراپر در شرایط عادی و تنش متوسط، نشان دهنده برنامه ریزی مجدد متابولیسمی 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 هایولا ۶۱ بالاترین فعالیت آنزیمی 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 یافته‌های Hasanuzzaman et al., (2018) مطابقت می‌کند. توانایی ارقام تراپر و هایولا ۶۱ 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 دارد که احتمالاً نشان‌دهنده تنظیم وابسته به رقم یا مهار بازخورد تحت تنش شدید است. برعکس، بیان ژن *Mapk* تحت تنش متوسط در ارقام آگامکس و هایولا ۶۱ 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 هایولا ۶۱ 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 می‌شود. 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، ارزیابی‌های زراعی که این ارقام را در شرایط شور مزرعه، برای اعتبارسنجی نتایج محیط کنترل‌شده ضروری است.

سپاسگزاری: این پژوهش در قالب طرح پژوهشی شماره ۷/۰۲/۳۷۵۲/ص 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., Garcarrubio, 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](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Channaoui, S., Saghoui, 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/envirosci.2022016073>
- 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](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>
- Mohammadabadi, M., & Asadollahpour Nanaei, H. (2021). Leptin gene expression in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. *Agricultural Biotechnology Journal*, 13(1), 197-214. <https://doi.org/10.22103/jab.2021.17334.1305>
- Mohammadabadi, M., Babenko, I., Borshch, O., Kalashnyk, O., Ievstafieva, Y., & Buchkovska, V. (2024). Measuring the relative expression pattern of the UCP2 gene in different tissues of the Raini Cashmere goat. *Agricultural Biotechnology Journal*, 16(3), 317-332. <https://doi.org/10.22103/jab.2024.24337.1627>
- 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>
- Shokri, S., Khezri, A., Mohammadabadi, M., & Kheyrodin, H. (2023). The expression of MYH7 gene in femur, humeral muscle and back muscle tissues of fattening lambs of the Kemani breed. *Agricultural Biotechnology Journal*, 15(2), 217-236. <https://doi.org/10.22103/jab.2023.21524.1486>

- 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>