



## تغییرات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و بیان ژن پروتئین کیناز وابسته به کلسیم در کلزا (*Brassica napus* L.) تحت تنش شوری

حسین احمدی<sup>۱</sup>، علیرضا عباسی<sup>۲\*</sup>، علیرضا طالعی<sup>۳</sup>، ولی‌اله محمدی<sup>۲</sup>

۱. دانشجو دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۲. دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۳. استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۲/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۴/۰۶

### چکیده

تنش شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که عملکرد کلزا را تحت تأثیر قرار می‌دهد. به منظور مطالعه برخی از پاسخ‌های فیزیولوژیکی کلزا و تغییرات بیان ژن *BnaCDPK14* در شرایط تنش شوری، دو رقم متحمل (*Slm046* و زرفام) و دو رقم حساس (اکایی و ساریگل) در اتاقک رشد کشت شدند و تنش شوری از طریق آبیاری با آب حاوی ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک (NaCl) اعمال شد. محتوای نسبی آب برگ، نشت یونی، آنزیم گایاکول پراکسیداز، آنزیم کاتالاز و بیان ژن پروتئین کیناز وابسته به کلسیم ۱۴ کلزا اندازه‌گیری شدند. در شرایط شوری بالاتر (۲۰۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم) محتوای نسبی آب کاهش و نشت یونی افزایش یافت. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز، آنزیم کاتالاز و بیان ژن *BnaCDPK14* نیز تحت تنش افزایش یافت که مقدار این افزایش در ارقام متحمل بیشتر از ارقام حساس بود. همبستگی بالای منفی بین صفات محتوای نسبی آب برگ و نشت یونی مشاهده شد. همبستگی بالا مثبت بین صفات گایاکول پراکسیداز، آنزیم کاتالاز و بیان ژن *BnaCDPK14* وجود داشت که نشان می‌دهد با افزایش گونه‌های فعال اکسیژن، گیاه برای مقابله با آن سیستم آنتی‌اکسیدان خود را بکار می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: کلزا، تنش شوری، صفات فیزیولوژیکی، آنزیم آنتی‌اکسیدان، بیان ژن

### مقدمه

آب و خاک شور از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید محصول در مناطق خشک و نیمه‌خشک محسوب می‌شوند (Homae et al., 2002). شور شدن تدریجی خاک از مسائل مهم در بسیاری از مناطق جهان به خصوص در کشور ما محسوب می‌شود. شور شدن خاک پدیده‌ای پیش‌رونده محسوب می‌شود که در حدود ۱۱ درصد از اراضی فاریاب دنیا را تحت تأثیر درجات مختلفی از این عامل تنش‌زا قرار داده است (FAO, 2012; Shrivastava and Kumar, 2015). همچنین شوری ثانویه ایجاد شده توسط آبیاری با آب شور، حدود ۲۰ درصد از اراضی آبی جهان (۱۴۷۴ میلیون هکتار) را آلوده نموده است (Chinnusamy et al., 2005). در حدود ۲۰ درصد از کل مساحت کشور متأثر از شوری است که از سطح کل اراضی فاریاب ایران، سطح اراضی زراعی مبتلا به درجات مختلف شوری خاک، آب و یا هردو، ۶/۸ میلیون هکتار برآورد شده است (Moameni et al., 2011). کلزا (*Brassica napus* L.) متعلق به تیره براسیکاسه، با دارا بودن ۴۴-۴۰ درصد روغن یکی از مهم‌ترین دانه‌های روغنی محسوب شده و پس از سویا و نخل روغنی سومین گیاه روغنی یک‌ساله جهان است که به خاطر روغن خوراکی آن کشت می‌شود (FAO, 2017). شوری پتانسیل اسمزی

آب و خاک شور از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید محصول در مناطق خشک و نیمه‌خشک محسوب می‌شوند (Homae et al., 2002). شور شدن تدریجی خاک از مسائل مهم در بسیاری از مناطق جهان به خصوص در کشور ما محسوب می‌شود. شور شدن خاک پدیده‌ای پیش‌رونده محسوب می‌شود که در حدود ۱۱ درصد از اراضی فاریاب دنیا را تحت تأثیر درجات مختلفی از این عامل تنش‌زا قرار داده است (FAO, 2012; Shrivastava and Kumar, 2015). همچنین شوری ثانویه ایجاد شده توسط آبیاری با آب شور، حدود ۲۰ درصد از اراضی آبی جهان (۱۴۷۴ میلیون هکتار)

اسیدهای چرب، اکسیداسیون در حین تنفس نوری و انتقال الکترون در زنجیره تنفسی میتوکندری‌ها ایفای نقش می‌کند (Noctor et al., 2010).

سریع‌ترین پاسخ‌های سلولی به تنش‌ها، تغییر در غلظت کلسیم سیتوپلاسمی است و یون‌های کلسیم به‌عنوان پیامبر ثانویه در سلول‌های گیاهی برای پاسخ به محرک‌های محیطی نقش حیاتی ایفا می‌کنند. در گیاهان، تغییرات مقطعی یون کلسیم در سیتوپلاسم توسط مجموعه‌ای از حسگرهای کلسیم نظیر کالمودولین‌ها<sup>۴</sup>، پروتئین‌های مشابه کلسی‌نئورین B<sup>۵</sup> و پروتئین‌های وابسته به کلسیم<sup>۶</sup> (CDPK) دریافت شده و منجر به ایجاد پاسخ‌های اختصاصی می‌شوند (Sanders et al., 2002; Hepler, 2005). شواهد نشان می‌دهد که CDPK‌ها در متابولیسم کربن و نیتروژن، نقل‌وانتقال آب و یون‌ها از غشا، تنظیم اسکلت سلولی، حرکت روزنه‌ای و تنظیم رشد و نمو نقش دارند. ضمناً ژن‌های CDPK نقش مهمی در پاسخ‌های دفاعی نسبت به تنش‌های غیرزنده، زخم‌ها و قارچ‌ها دارند. بیان ژن‌های رمزکننده CDPK از طریق تنش‌های فیزیکی و شیمیایی از قبیل دمای پایین، خشکی، زخم، شوری، فقدان مواد غذایی و هورمون‌ها افزایش می‌یابد (Tai et al., 2009). ژانگ و همکاران (Zhang et al., 2007) نشان دادند که اسید آبسزیک بیان دو همولوگ CPK<sub>4</sub> و CPK<sub>11</sub> در آراییدوپسیس را القا می‌نماید، موتانت‌های cpk<sub>4</sub> و cpk<sub>11</sub> باعث ایجاد فنوتیپ‌های حساس به اسید آبسزیک در مرحله جوانه‌زنی بذور، رشد گیاهچه، حرکت روزنه‌ها شده و منجر به بروز حساسیت به شوری در جوانه‌زنی بذور و کاهش مقاومت گیاهچه‌ها به تنش شوری می‌شود. اوسوجی و همکاران (Ohsugi et al., 2011) نشان دادند CDPK در برنج از یک خانواده چندژنی بزرگ متشکل از ۲۹ ژن تشکیل شده است و OsCPK<sub>21</sub> نقش مثبتی در تنظیم انتقال پیام در پاسخ به اسید آبسزیک و تنش شوری دارد. CDPK در کلزا یک خانواده چندژنی شامل ۲۵ ژن است که منجر به پاسخ‌های اختصاصی در گیاه می‌شود (Zhang et al., 2014).

با توجه به اینکه در حدود ۲۰ درصد از کل مساحت کشور متأثر از شوری است و تولید کلزا یکی از مهم‌ترین محصولات

محلول خاک را کاهش می‌دهد و موجب تغییرات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در گیاهان می‌گردد و غلظت بالای نمک باعث به وجود آمدن تنش آبی، سمیت شدید یونی، تنش اکسایشی و درنهایت کاهش عملکرد محصولات زراعی می‌شود (Wang et al., 2014). کلزا بسیار حساس و آسیب‌پذیر به تنش آبی ناشی از شوری بالا در انتهای دوره رشد است و این عمل باعث کاهش درصد روغن، تعداد دانه در غلاف و وزن هزار دانه می‌گردد (Bybordi and Tabatabaei, 2009). افزایش سطح شوری موجب افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و موجب کاهش عملکرد در کلزا می‌گردد (Zare and Abili, 2014). پایداری غشای سلول و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نقش تعیین‌کننده‌ای در مقاومت به تنش شوری در کلزا دارند (Ashraf and Ali, 2008).

تنش‌های غیرزنده مانند شوری موجب افزایش فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شوند که با پروتئین‌ها، چربی‌ها و دئوکسی‌ریبونوکلیک‌اسید واکنش داده و موجب آسیب اکسایشی و ایجاد تداخل در عملکرد طبیعی سلول‌ها می‌شوند (Miller, 2010). گیاهان به‌وسیله فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی به تنش‌های زیستی و غیرزیستی واکنش می‌دهند و با آن‌ها سازگار می‌شوند که آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی کارآمدترین مکانیسم در برابر تنش اکسایشی هستند (Chrysargyris et al., 2018). پراکسیدازها گروه بزرگی از آنزیم‌های دفاعی گیاهان هستند که در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی تولید می‌شوند که از این بین گایاکول پراکسیداز<sup>۱</sup> (GPOX) گلیکوپروتئین‌هایی هستند که در سیتوسول، دیواره سلولی و واکوئل قرار دارند و از اکسیداسیون ترکیبات فنلی مانند گایاکول برای سم‌زدایی و تجزیه پراکسید هیدروژن (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) استفاده می‌کنند. ترکیبات فنلی مانند گایاکول به‌عنوان دهنده الکترون به H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> عمل می‌کنند (Asada, 1992). این آنزیم علاوه بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در چوبی شدن دیواره سلولی و تنظیم رشد نیز نقش دارد (Morales et al., 2012). آنزیم کاتالاز<sup>۲</sup> (CAT) هم به‌عنوان آنزیم آنتی‌اکسیدان مهم در سمیت‌زدایی پراکسید هیدروژن تولیدشده به‌وسیله فرآیندهایی همچون بتا-اکسیداسیون

<sup>۴</sup>. Calmodulin-binding proteins

<sup>۵</sup>. Calcineurin B-like proteins

<sup>۶</sup>. Calcium-dependent protein kinases

<sup>۱</sup>. Guaiacol peroxidase (GPOX)

<sup>۲</sup>. Catalase

<sup>۳</sup>. Calmodulins

۲۵ بر روی شیکر قرار داده شدند. پس از مدت ذکر شده، قطعات برگگی از آب خارج شده و با دستمال کاغذی خشک گردیدند و درون پاکت‌هایی که از قبل تهیه و توزین شده بودند قرار گرفتند وزن تورژانس برگ آن‌ها تعیین گردید. آنگاه پاکت‌های آلومینیومی به مدت ۴۸ ساعت در آن با دمای °C ۷۲ قرار داده شدند و بعد از گذشت مدت‌زمان ذکر شده وزن خشک آن‌ها توزین شد.

#### اندازه‌گیری میزان نشت یونی<sup>۴</sup> (EL)

اندازه‌گیری نشت یونی بر اساس پروتکل (Dionisio-sese and Tobita, 1998) تغییر یافته صورت پذیرفت. برای این منظور ۰/۸ گرم برگ پس از برش افقی، به لوله آزمایش حاوی ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر انتقال یافت. جهت جذب بهتر آب توسط برگ نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در داخل آب و در دمای °C ۲۵ باقی ماندند. سپس لوله‌های آزمایش به مدت ۴۵ دقیقه در دستگاه شیکر قرار گرفتند و پس از آن میزان هدایت الکترولیتی نمونه‌ها (EC<sub>1</sub>) با استفاده از دستگاه EC متر قرائت شد. سپس محتوی لوله آزمایش در حمام آب جوش (۹۵°C) به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۵ دقیقه در دستگاه شیکر قرار داده شد و میزان هدایت الکترولیتی (EC<sub>2</sub>) تعیین شد. در نهایت مقدار شاخص خسارت بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید.

$$EL (\%) = \frac{EC_1}{EC_2} \times 100$$

#### استخراج عصاره آنزیمی، اندازه‌گیری آنزیم گایاکول

##### پراکسیداز و آنزیم کاتالاز

برای استخراج عصاره آنزیمی از نمونه‌ها، ابتدا نمونه‌های برگگی با استفاده از هاون و در حضور ازت مایع پودر شدند و سپس بافر استخراج (حاوی تریس-هیدروکلریک اسید ۰/۱ مولار، ساکارز ۵ درصد و ۲-مرکاپتواتانول ۰/۱ درصد) (Abedi and Pakniyat, 2010) به نسبت ۳:۱ (نمونه برگگی پودر شده/ بافر استخراج) اضافه شد و پس از هم‌وزن شدن سانتریفیوژ (g ۱۰۰۰۰) در دمای °C ۴ به مدت ۲۰ دقیقه انجام گردید و محلول رویی برداشته شد و پس از استخراج عصاره خام از نمونه‌ها، میزان پروتئین عصاره‌های استخراج شده بر اساس روش برادفورد (Bradford, 1976) و میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPOX) بر اساس روش پوله و همکاران

روغنی کشور است، شناسایی مکانیسم‌های پاسخ به تنش شوری یکی از نیازهای ضروری به‌نژادی کلزا محسوب می‌شود. لذا پژوهش حاضر با هدف بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و بیان ژن پروتئین کیناز وابسته به کلسیم ۱۴ (BnaCDPK<sub>14</sub>) در کلزا صورت پذیرفت.

#### مواد و روش‌ها

##### مواد گیاهی و نحوه اجرا

در این مطالعه دو ژنوتیپ متحمل (زرغام و SIm046) و دو ژنوتیپ حساس به تنش شوری (ساری‌گل و اکاپی) انتخاب شدند (Zahedi and Tohid Moghadam, 2011; Moieni et al., 2013). ارقام مورد مطالعه و اعمال تنش در سه سطح شاهد، شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم (NaCl) به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفتند. بذور در ابتدا توسط هیپوکلرید سدیم ۱٪ به مدت پنج دقیقه ضدعفونی و سپس در داخل گلدان‌هایی (قطر ۳۵ سانتی‌متر) که حاوی مخلوطی از پرلیت، کوکوپیت و ورمیکولیت (به نسبت ۳:۳:۱) بودند، تحت شرایط دمایی °C ۲۲ در روز و °C ۱۸ در شب کشت گردید. تا مرحله چهار برگگی همه‌ی گلدان‌ها، محلول غذایی هوگلند دریافت نموده و از مرحله چهار برگگی تیمار شوری به مدت یک ماه با استفاده از نمک اعمال و سپس نمونه‌گیری از برگ‌های میانی گیاهان انجام شد. نمونه‌های گیاه بلافاصله پس از نمونه‌گیری در فریزر °C ۸۰- تا زمان آزمایش نگهداری شد (Ashraf and Ali, 2008).

##### اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ<sup>۵</sup> (LRWC)

محتوای نسبی آب برگ با استفاده از وزن تر، وزن اشباع و وزن خشک برگ بر اساس فرمول زیر اندازه‌گیری شد (Weatherley, 1950).

$$LRWC (\%) = \frac{(FW - DW)}{(SW - DW)} \times 100 \quad [1]$$

در این رابطه FW وزن تازه برگ، SW وزن تورژانس برگ و DW وزن خشک برگ است. برای این منظور از هر برگ مربوط به هر گلدان تعدادی برش بزرگ گرفته شد، سپس با ترازویی با دقت ۰/۰۰۱ وزن تازه برگ اندازه‌گیری شد. سپس قطعات برگ‌ها به مدت ۲۲ ساعت در آب مقطر در دمای °C

<sup>۴</sup>. Electrolyte leakage

<sup>۵</sup>. Leaf relative water content

از کیت ( RNeasy plant mini kit Qiagen, Valencia, CA, USA ) از بافت برگ انجام شد. کیفیت RNAهای حاصل با بارگذاری در ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد و مقدار کمی RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ ( ND-1000, Thermo Scientific ) تعیین شد. برای سنتز cDNA با استفاده از کیت ( QuantiTect Reverse Transcription Synthesis kit, Qiagen )، از یک میکروگرم RNA که با DNase تیمار شده بود، استفاده گردید. طراحی آغازگر برای ژن پروتئین کیناز وابسته به کلسیم ۱۴ کلزا (*BnaCDPK14*) با استفاده از نرم‌افزار پرایمر ۳ (<http://primer3.ut.ee>) انجام شد. در جدول ۱ توالی آغازگر ژن اختصاصی پروتئین کیناز وابسته به کلسیم ۱۴ کلزا و ژن خانه‌دار اکتین کلزا ( Zhou et al., 2017 ) ارائه شده است و واکنش Real-time PCR با استفاده از کیت ( Applied Biosystem, USA ) و در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر با استفاده از معرف SYBRGREEN انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک مرحله واسرشته سازی در  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه با واسرشته سازی در  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای  $60^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۵ ثانیه و بسط در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۵ ثانیه بود. در نهایت میزان بیان ژن بر اساس روش تصحیح کارایی  $\Delta\Delta\text{Ct}$  (Pfaffl, 2001) محاسبه شد.

آزمایش به صورت فاکتوریل دو عاملی (رقم و تنش) با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.4 تجزیه شد و مقایسه میانگین بر اساس روش دانکن در سطح پنج درصد صورت پذیرفت. ضرایب همبستگی پیرسون صفات نیز با استفاده از همین نرم‌افزار محاسبه شد.

(Polle et al., 1994) اندازه‌گیری شدند. در این روش ۱۰۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۴۶۶ میکرولیتر از آب مقطر استریل به همراه ۲۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار با اسیدیته ۷، ۲۵۰ میکرولیتر گایاکول ۱۰ میلی-مولار، ۳۴ میکرولیتر از پراکسید هیدروژن ۷۰ میلی-مولار و ۲۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. افزایش جذب به دلیل اکسیداسیون گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت پنج دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با استفاده از ضریب خاموشی (معادل  $26/6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) محاسبه گردید و یک واحد آنزیم GPOX معادل ۱ میکرومول ( $\mu\text{M}$ ) گایاکول اکسیدشده در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین است (unit  $\text{mg}^{-1} \text{ protein}$ ). فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسپکتروفتومتر و به روش ابی (Aebi, 1984) اندازه‌گیری شد. برای سنجش میزان فعالیت آنزیم از دستگاه اسپکتروفتومتر ساخت کشور ژاپن در طول موج ۲۴۰ نانومتر استفاده شد. محلول‌ها و مواد استفاده‌شده شامل ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ( $\text{pH}=7$ ) ۵۰ میلی‌مولار، ۵ میکرولیتر  $\text{H}_2\text{O}_2$  ۳۰ درصد و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیم بوده و فعالیت آنزیم به مدت ۵ دقیقه در فواصل ۲۰ ثانیه‌ای ثبت شد. یک واحد آنزیم کاتالاز برابر با فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه‌شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین است.

### بررسی بیان ژن

به منظور ارزیابی تغییرات بیان ژن تحت تنش شوری از تکنیک پی‌سی‌آر در زمان واقعی (Quantitative Real-Time PCR) استفاده شد. ابتدا استخراج RNA با استفاده

جدول ۱. آغازگرهای استفاده‌شده در این مطالعه

Gene name	Accession number	Gene Locus	Primer sequence
نام ژن	شماره دسترسی	مکان ژن	توالی آغازگر
<i>BnaCDPK14</i>	XM_013896624	LOC106454505	For 5' CGGATTGCGTAAACTAGGAATTGTTG 3' Rev 5' CTGCCCATCTTTCTGATGTGTACC 3'
<i>Bnaactin7</i>	XM_013858992	LOC106418315	For 5' TGGGTTTGCTGGTGACGAT 3' Rev 5' TGCCTAGGACGACCAACAATACT 3'

بود و اثرات متقابل بین رقم و تنش تنها در محتوای نسبی آب برگ در سطح پنج درصد و آنزیم گایاکول پراکسیداز و کاتالاز در سطح یک درصد معنی‌دار بودند.

### نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس صفات (جدول ۲) نشان داد که اثرات ساده رقم و تنش در همه‌ی صفات اندازه‌گیری شده معنی‌دار

جدول ۲. تجزیه واریانس محتوای نسبی آب برگ (LRWC)، نشت یونی (EL)، گایاکول پراکسیداز (GPOX)، کاتالاز (CAT) و بیان ژن پروتئین کیناز وابسته به کلسیم ۱۴ (BnaCDPK<sub>14</sub>) در کلزا تحت تنش شوری

Table 2. Analysis variance of Leaf relative water content (LRWC), Electrolyte leakage (EL), Guaiacol peroxidase (GPOX), Catalase (CAT) and BnaCDPK<sub>14</sub> relative expression ratio in canola cultivars under drought stress

S.O.V.	منابع تغییرات	df	Mean of square				میانگین مربعات
			محتوای نسبی آب برگ LRWC	نشت یونی EL	گایاکول پراکسیداز GPOX	کاتالاز CAT	
Cultivar	ژنوتیپ	3	204.85**	124**	1.46**	1.39**	0.09*
Salinity stress	تنش شوری	2	3992.54**	8158.09**	10.60**	1.77**	1.26**
Cultivar × salinity	اثر شوری × ژنوتیپ	6	75.09*	22.55 <sup>ns</sup>	0.37**	0.40**	0.027 <sup>ns</sup>
Error	خطا	24	20.57	25.65	0.1	0.015	0.026
C.V. (%)	ضریب تغییرات (%)		6.54	12.77	12.44	8.15	11.92

غیر معنی دار (<sup>ns</sup>)، سطح معنی داری پنج درصد (\*) و یک درصد (\*\*)

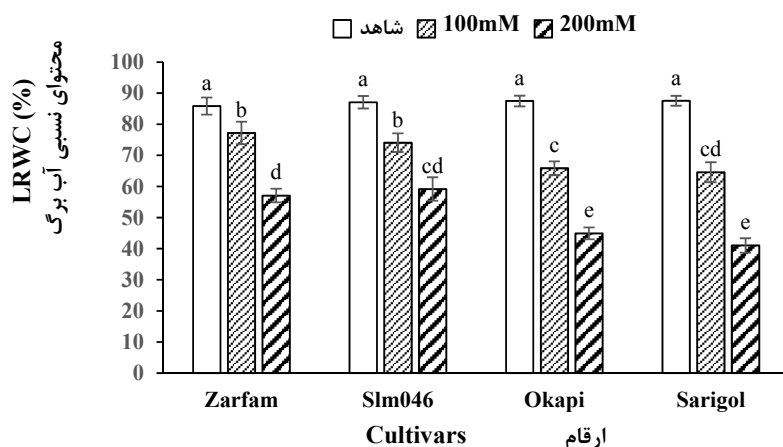
Non-significance (<sup>ns</sup>), Significance P= 0.05 (\*) and 0.01 (\*\*)

### محتوای نسبی آب برگ

**نشت یونی**  
نشت یونی و تخریب غشا نیز تحت تأثیر تنش شوری قرار گرفت و با افزایش غلظت نمک در طی تنش بر میزان نشت یونی افزوده شد. تیمار ۲۰۰ میلی مولار با میانگین ۶۵/۳۷ درصد (شکل ۲. الف) و رقم اکاپی با میانگین ۴۲/۱۵ درصد (شکل ۲. ب) بیشترین میزان خسارت را داشتند. اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد بین سطوح مختلف تنش شوری با میزان نشت یونی مشاهده شد و میزان تغییر این صفت در ارقام به گونه‌ای بود که ارقام متحمل تفاوت معنی داری با ارقام حساس داشتند (شکل ۲. الف و ب). مطالعات نشان داده که پایداری غشای سلولی تحت تنش شوری، یکی از مکانیسم‌های اصلی مقاومت است و صدمات سلولی گیاهان تحت تنش با افزایش سطح شوری موجب افزایش گونه‌های فعال اکسیژن، پراکسیداسیون چربی‌ها و در نهایت کاهش شاخص پایداری غشا سلول و افزایش نشت یونی در گیاه می‌شود (Kukreja et al., 2005; Ashraf and Ali, 2008; Hnilíčková et al., 2019). افزایش نشت الکترولیتی مواد نشان‌دهنده آسیب و کاهش پایداری غشاها است که احتمالاً نتیجه تنش اکسیداتیو ناشی از شوری است (Hasegawa et al., 2000; Besma and Denden, 2012). پژوهش‌های پیشین نشان داده، با افزایش شوری، ساختار غشای سلولی موقتاً تغییر کرده که بر قابلیت نفوذپذیری غشاء (شاخص نشت الکترولیتی) تأثیر می‌گذارد. شاید ارقام با EL کمتر، تحمل بیشتری به شرایط تنش نشان دهند. افزایش EL تحت تنش شوری در ارقام حساس در اثر کاهش فعالیت مکانیسم‌های دفاعی گیاه

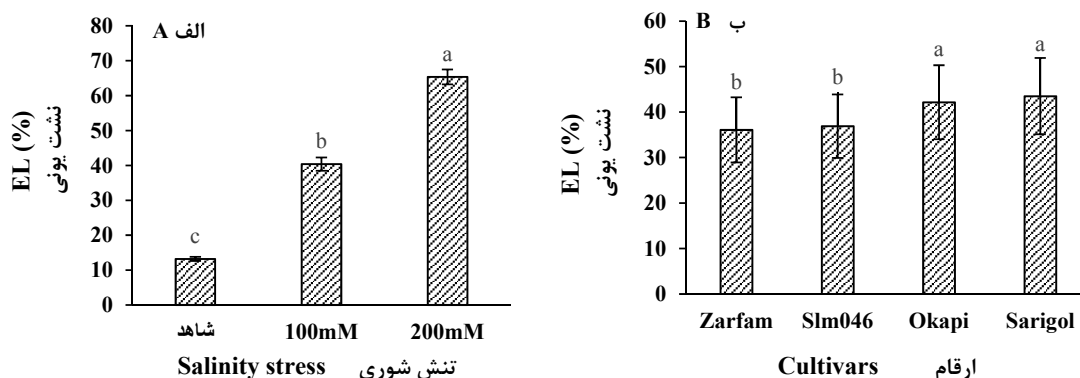
محتوای نسبی آب برگ تحت تأثیر تنش شوری قرار گرفت و میزان این صفت در طی تنش کاهش یافت. این کاهش تا غلظت ۱۰۰ میلی مولار نمک با روند کندی صورت پذیرفت و با افزایش غلظت تا ۲۰۰ میلی مولار نمک، روند آن افزایش چشمگیری داشت. کمترین و بیشترین میزان محتوای نسبی آب در بالاترین غلظت نمک در رقم ساریگل با میانگین ۴۱/۰۴ درصد و رقم SIm046 با میانگین ۵۹/۱۶ درصد مشاهده شدند (شکل ۱). شوری موجب القای تنش آبی و کاهش در محتوای نسبی آب برگ می‌شود که پیامد آن سبب کاهش آب موردنیاز برای فرایندهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی از قبیل تولید سلولی، باز شدن روزنه‌ها و فرایندهای وابسته به فتوسنتز، اختلال در جذب مواد غذایی، تجمع متابولیت‌های سمی و گونه‌های فعال اکسیژن در گیاه می‌شود (Cicek and Cakirlar, 2002; Farkhonded et al., 2012). پژوهش‌های پیشین نشان داده که تغییرات محتوای نسبی آب برگ، شاخص مهم برآورد تحمل به شوری در گیاهان محسوب می‌شود (Ashraf, 2004; Yang et al., 2009; Jiang et al., 2014). کاهش در محتوای نسبی آب برگ می‌تواند به علت کاهش دسترسی به آب در شرایط تنش شوری باشد یا اینکه سیستم‌های ریشه‌ای به دلیل کاهش سطح جذب، قادر به جبران آب از دست‌رفته توسط تعرق نباشند که خود بیانگر آن است که گیاه تنش شوری را درک کرده و پاسخ‌های متعدد در سطوح مولکولی و فیزیولوژیکی را آغاز کرده است.

در اثر شدت تنش و در نتیجه افزایش میزان خسارت به سلول است. این وضعیت از ویژگی‌های گیاهان حساس به تنش شوری بوده که معمولاً سبب مرگ گیاه می‌شود (Kaya et al., 2001; Sairam et al., 2002; Rezaei et al., 2006).



شکل ۱. اثر تنش شوری بر روی محتوای نسبی آب برگ، بارهای عمودی نشان‌دهنده خطای استاندارد بر اساس سه تکرار و حروف متفاوت در بالای ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪.

Fig. 1. Effect of salinity stress on Leaf relative water content (LRWC), Vertical bars indicate Means  $\pm$  SE based on three replicates and different letters above columns indicated significant ( $P < 0.05$ ) differences.



شکل ۲. اثر سطوح متفاوت تنش شوری و ارقام بر روی نشت یونی برگ‌های کلزا به ترتیب (الف) و (ب)، بارهای عمودی نشان‌دهنده خطای استاندارد بر اساس سه تکرار و حروف متفاوت در بالای ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪.

Fig. 2. Effect of different levels of salinity stress and cultivars on Electrolyte leakage (EL) in Canola leaves (A) and (B), respectively. Vertical bars indicate Means  $\pm$  SE based on three replicates and different letters above columns indicated significant ( $P < 0.05$ ) differences.

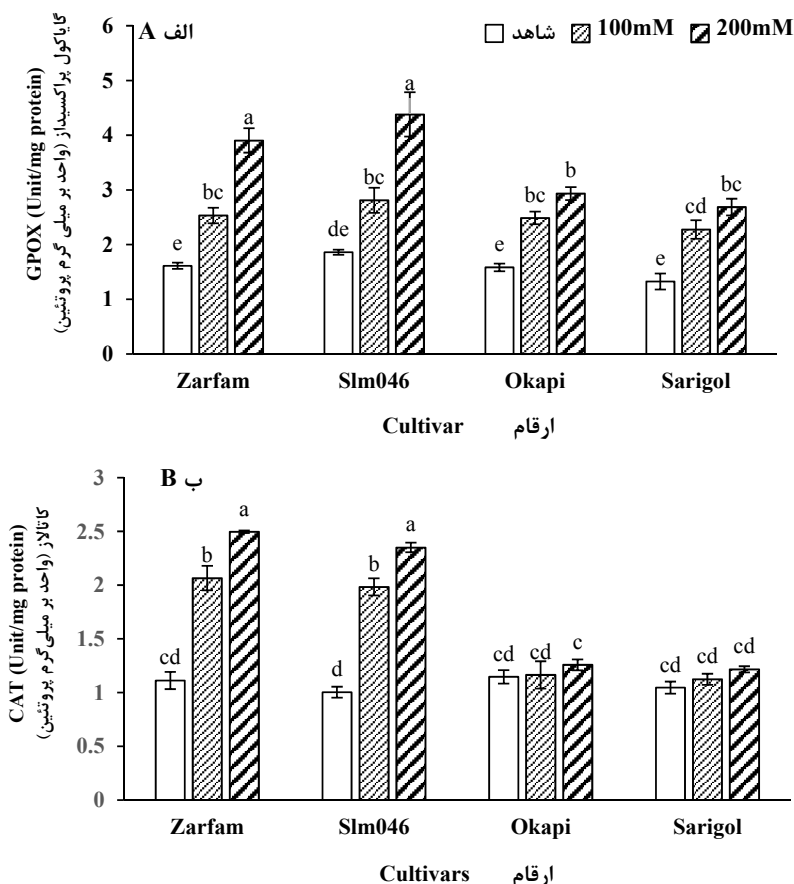
نتایج مقایسه میانگین، افزایش فعالیت این آنزیم در شرایط تنش شوری از ۱۰۰ میلی‌مولار تا ۲۰۰ میلی‌مولار در ارقام حساس اختلاف معنی‌داری نداشت ولی در ارقام مقاوم اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل ۳. الف). این روند افزایشی در میزان آنزیم آنتی‌اکسیدان با افزایش سطح شوری مشابه با مطالعات پیشین بود (Ashraf and Ali, 2008). روند کلی

### آنزیم گایاکول پراکسیداز و کاتالاز

فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان گایاکول پراکسیداز نیز تحت تأثیر تنش شوری قرار گرفت و با افزایش سطح شوری از شاهد تا ۲۰۰ میلی‌مولار نمک روند افزایشی داشت. به طوری که بیشترین فعالیت این آنزیم آنتی‌اکسیدان در سطح شوری ۲۰۰ میلی‌مولار نمک به دست آمد (شکل ۳. الف). با توجه به

پراکسیداز و کاتالاز می‌تواند در وضعیت توازن جدید سلولی گیاهان تحت تنش مؤثر باشد. با افزایش میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن در گیاه بر اثر تنش‌های زیستی و غیر زیستی، گیاه برای کاهش اثرات مخرب تنش اکسایشی مکانیسم‌های متنوعی را فعال می‌کند که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به‌عنوان سریع‌ترین واحدهای مقابله‌کننده به شمار می‌آیند و طی واکنش آنزیمی با زدودن انواع گونه‌های فعال اکسیژن و جلوگیری از تخریب دیواره سلولی به بقاء گیاه کمک می‌نماید (You and Chan, 2015). افزایش در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از مهم‌ترین مکانیسم‌های تحمل به خشکی در کلزا نیز بشمار می‌آید (Omidi, 2010).

تغییر در فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تیمار شوری با افزایش سطح شوری تا ۲۰۰ میلی‌مولار نمک، میزان فعالیت آنزیم در همه‌ی ارقام نسبت به شاهد افزایش یافت که این افزایش در ارقام متحمل بیشتر از ارقام حساس بود و در ارقام حساس این افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز اختلاف معنی‌دار با شاهد نداشت (شکل ۳. ب). افزایش کمتر فعالیت آنزیم کاتالاز در ارقام حساس نشان می‌دهد که فرآیند انهدام  $H_2O_2$  تولیدشده در اثر تنش شوری در این ارقام از کارآمدی کمتری برخوردار است. مطالعات پیشین نشان دادند که افزایش شدت شوری بر روی ژنوتیپ‌های کلزا موجب افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز می‌گردد (Ashraf and Ali, 2008) بنابراین با افزایش شدت تنش شوری، افزایش فعالیت آنزیم‌های گایاکول



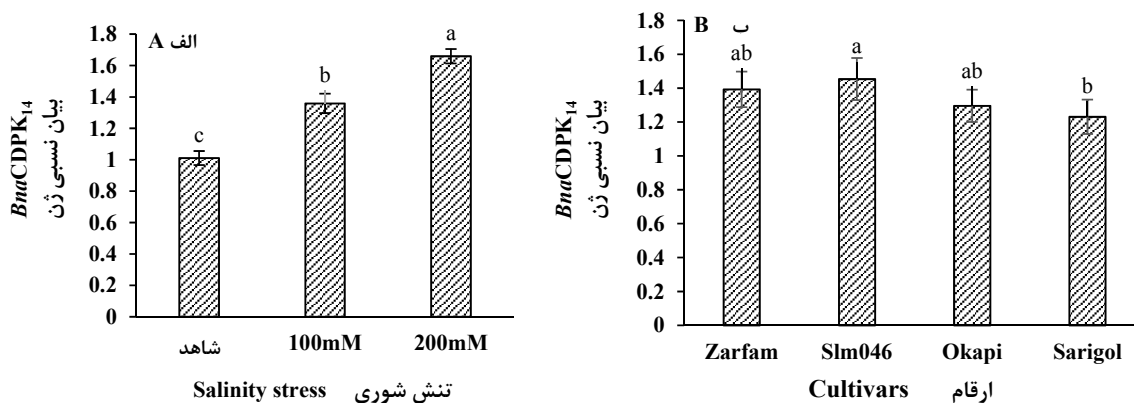
شکل ۳. اثر تنش شوری روی گایاکول پراکسیداز (الف) (GPOX) و کاتالاز (CAT) (ب) بر برگ‌های کلزا، بارهای عمودی نشان‌دهنده‌ی خطای استاندارد بر اساس سه تکرار و حروف متفاوت در بالای ستون‌ها نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در سطح ۰.۰۵٪.

Fig. 3. Effect of salinity stress on GPOX (A) and CAT (B) in canola leaves; Vertical bars indicate Means  $\pm$  SE based on three replicates and different letters above columns indicated significant ( $P < 0.05$ ) differences.

کلسیم، یک خانواده ژنی متشکل از ۲۵ ژن است. نتایج مطالعات ژانگ و همکاران (Zhang et al., 2014) در بررسی بیان ژن‌های کلسیم پروتئین کیناز وابسته به کلسیم در کلزا تحت تنش‌های غیرزنده در مدت‌زمان ۶ و ۲۴ ساعت نشان داد که تحت تنش‌های مختلف الگوی بیان ژن در این خانواده ژنی متفاوت است. تغییر بیان ژن *BnaCDPK14* برای ارقام، نحوه و طول مدت تنش شوری مورد استفاده در این مطالعه نشان می‌دهد (شکل ۴. الف و ب) که شاید ژن‌های دیگر این خانواده ژنی با توجه به الگوی بیان خود بر روی بیان ژن *BnaCDPK14* تأثیر گذاشته باشند. مطالعات نشان دادند که افزایش و تشدید بیان ژن‌های CDPK موجب افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌شوند مثلاً بیان بالا *OsCDPK21* موجب افزایش ظرفیت تحمل برنج به شوری شده است (Asano, 2011) و *OsCDPK21* باعث افزایش تحمل به شوری در برنج از طریق کاهش سطح رادیکال‌های اکسیژن فعال می‌شود که پیشنهاد شده که *OsCDPK12* کارکرد چندگانه در مسیر پیام‌رسانی به‌عنوان تنظیم‌کننده مثبت برای تحمل شوری دارد (Asano, 2012).

### بیان ژن *BnaCDPK14*

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن *BnaCDPK14* در سطوح مختلف تنش از شاهد تا ۲۰۰ میلی‌مولار نمک نشان داد که با افزایش غلظت نمک، میزان بیان ژن روند افزایشی نشان داد و اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد مشاهده شد (شکل ۴. الف). در این مطالعه تحت تنش شوری در غلظت ۲۰۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار افزایش بیان ژن ۱/۶۵ و ۱/۳ برابر نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۴. الف). در ارقام استفاده شده در این مطالعه تغییرات بیان ژن نزدیک به یکدیگر بوده و اختلاف معنی‌دار فقط بین رقم مقاوم Slm046 و رقم حساس ساریگل در سطح ۵ درصد وجود داشت (شکل ۴. ب). سریع‌ترین پاسخ سلولی به تنش‌ها تغییر در غلظت کلسیم سیتوپلاسمی است و یون کلسیم نقش حیاتی به‌عنوان پیامبر ثانویه در سلول‌های گیاهی برای پاسخ به محرک‌های محیطی ایفا می‌کند. نتایج این مطالعه بیانگر افزایش بیان ژن *BnaCDPK14* با افزایش سطوح تنش شوری از شاهد تا غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار شد (شکل ۴. الف). در کلزا ژن‌های پروتئین کیناز وابسته به



شکل ۴. اثر سطوح متفاوت تنش شوری و ارقام بر روی بیان نسبی ژن *CDPK14* کلزا به ترتیب (الف) و (ب)، بارهای عمودی نشان‌دهنده‌ی خطای استاندارد بر اساس سه تکرار و حروف متفاوت در بالای ستون‌ها نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪.

Fig. 4. Effect of drought stress on *BnaCDPK14* relative expression ratio; Vertical bars indicate Means  $\pm$  SE based on three replicates and different letters above columns indicated significant ( $P < 0.05$ ) differences.

شوری موجب القای تنش آبی و کاهش محتوای نسبی آب می‌شود و با افزایش گونه‌های فعال اکسیژن موجب تنش اکسایشی و پراکسیداسیون چربی‌ها و در نهایت کاهش شاخص پایداری غشا سلول و افزایش نشت یونی می‌گردد (Ashraf and Ali, 2008; Kukreja et al., 2005). همبستگی مثبت بالا بین صفات گایاکول پراکسیداز، کاتالاز و بیان ژن

### همبستگی بین صفات

نتایج همبستگی بین صفات (جدول ۳) نشان داد که بین شاخص‌های فیزیولوژیکی محتوای نسبی آب برگ و نشت یونی همبستگی منفی بالا وجود دارد. محتوای نسبی آب و نشت یونی به ترتیب شاخص‌های مناسبی برای منعکس کردن آب موجود و پایداری غشای سلولی در گیاه هستند، تنش



حیاتی ایفا می‌کند با افزایش سطوح تنش شوری موجب افزایش بیان ژن *BnaCDPK14* و آنزیم آنتی‌اکسیدان گایاکول پراکسیداز و کاتالاز برای پاسخ به تنش شوری می‌گردد.

*BnaCDPK14* وجود داشت که نشان می‌دهد با افزایش گونه‌های فعال اکسیژن، گیاه برای مقابله با آن سیستم آنتی‌اکسیدان خود را بکار می‌گیرد و چون سریع‌ترین پاسخ سلول به تنش‌ها، تغییر در غلظت کلسیم سیتوپلاسمی است و یون کلسیم به‌عنوان پیامبر ثانویه در سلول‌های گیاهی نقش

جدول ۳. همبستگی بین صفات اندازه‌گیری شده در چهار ژنوتیپ کلزا تحت تنش شوری. سطح معنی‌داری پنج درصد (\*) و یک درصد (\*\*)  
Table 3. Correlation coefficients (r) for trait means of four canola cultivars for several traits measured in salinity stress. Significance P= 0.05 (\*) and 0.01 (\*\*)

	محتوای نسبی		گایاکول		بیان ژن پروتئین کیناز وابسته به کلسیم ۱۴
	آب برگ	نشت یونی	پراکسیداز	کاتالاز	<i>BnaCPK14</i>
	LRWC	EL	GPOX	CAT	
LRWC	1				
EL	-0.97**	1			
GPOX	-0.67*	0.79**	1		
CAT	-0.27	0.44	0.82**	1	
<i>BnaCPK14</i>	-0.74**	0.84**	0.94**	0.81**	1

در گیاه کلزا می‌تواند سبب افزایش تحمل این گیاه به تنش شوری شود و با توجه به وجود تغییر در مکانیسم‌های متعدد پاسخ سلولی، لزوم بررسی‌های گسترده در سطوح پروتئینی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در این گیاه به‌موازات مطالعه ژن‌های دیگر این خانواده ژنی پروتئین کیناز وابسته به کلسیم درگیر در تنش شوری بیش‌ازپیش احساس می‌شود. در این آزمایش بررسی بیان ژن پروتئین کیناز وابسته به کلسیم تحت تنش شوری انجام گرفت که افزایش بیان این ژن موجب افزایش تحمل گیاه به تنش گردید که افزایش و تشدید بیان این ژن‌ها در گیاه کلزا با استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک و بررسی پاسخ آن می‌تواند راهکاری مناسب برای کشت و رشد بهتر این گیاه ارزشمند در کشور گردد.

### نتیجه‌گیری کلی

از آنجاکه تمام واکنش‌های زیستی در محیط آبی رخ می‌دهد، تنش شوری موجب کاهش آب قابل‌دسترس و سبب اختلال در فعالیت‌های موردنیاز گیاه برای رشد و توسعه می‌شود، همچنین پراکسیداسیون چربی‌ها موجب افزایش نشت یونی و افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن فعال می‌شود که برای مقابله با آن میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش بیان ژن‌های پاسخ به تنش ضروری است. نتایج به‌دست‌آمده از همبستگی مثبت بالا بین صفات گایاکول پراکسیداز، کاتالاز و بیان ژن *BnaCDPK14* برای این ارقام در سطوح مختلف شوری نشان داد افزایش بیان ژن *BnaCDPK14*، افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان گایاکول پراکسیداز و آنزیم کاتالاز

### منابع

- Abedi, T., Pakniyat, H., 2010. Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). Czech Journal of Genetics and Plant Breeding. 46(1), 27-34.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. Methods in Enzymology. 105, 121-126.
- Asada, K., 1992. Ascorbate peroxidase- a hydrogen peroxide scavenging in plant. Plant Physiology. 85, 235-241.
- Asano, T., Hayashi, N., Kobayashi, M., Aoki, N., Miyao, A., Mitsuhashi, I., Ichikawa, H., Komatsu, S., Hirochika, H., Kikuchi, S., Ohsugi, R., 2012. A rice calcium-dependent protein kinase *OsCPK12* oppositely modulates

- salt-stress tolerance and blast disease resistance. *The Plant Journal*. 69(1), 26–36.
- Asano, T., Hakata, M., Nakamura, H., Aoki, N., Komatsu, S., Ichikawa, H., Hirochika, H., Ohsugi, R., 2011. Functional characterisation of *OsCPK<sub>21</sub>*, a calcium-dependent protein kinase that confers salt tolerance in rice. *Plant Molecular Biology*. 75, 179–191.
- Ashraf, M., 2004. Salinity tolerance in Brassica Oilseeds. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 23(2), 157–174.
- Ashraf, M., Ali, Q., 2008. Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.). *Environmental and Experimental Botany*. 63, 266-273.
- Besma, B.D., Denden, M., 2012. Effect of salt stress on growth, anthocyanins, membrane permeability and chlorophyll fluorescence of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) seedlings. *American Journal of Plant Physiology*. 7, 174-183.
- 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.
- Bybordi, A., Tabatabaei, J., 2009. Effect of salinity stress on germination and seedling properties in canola cultivars (*Brassica napus* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 37(1), 71- 76.
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A., Zhu, J.K., 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*. 45, 437- 448.
- Chrysargyris, A., Michailidi, E., Tzortzakis, N., 2018. Physiological and biochemical responses of *Lavandula angustifolia* to salinity under mineral foliar application. *Frontiers in Plant Science*. 9, 489.
- Cicek, N., Cakirlar, H., 2002. The effect of salinity on some physiological parameters in two maize cultivars. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*. 28, 66-74.
- Dionisio-Sese, M.L. and S. Tobita, 1998. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science*. 135, 1-9.
- FAO, 2012. *FAO Statistical Year Book 2012*, World Food and Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome, p. 366. <http://www.fao.org/docrep/015/i2490e/i2490e00.htm>.
- FAO, 2017. FAOSTAT, Available online at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Rapeseed production, 2014; Crops/Regions/World list/Production Quantity (pick lists) (Accessed December 22, 2017).
- Farkhonded, R., Nabizadeh, E., Jalilnezhad, N., 2012. Effect of salinity stress on proline content, membrane stability and water relation in two sugar beet cultivars. *International Journal of Agricultural Science*. 2(5), 385-392.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., Bohnert, H.J., 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 51, 463–499.
- Hepler, P.K., 2005. Calcium: a central regulator of plant growth and development. *Plant and Cell*. 17, 2142–2155.
- Hniličková1, H., Hnilička, F., Orsák, M., Hejník, V., 2019. Effect of salt stress on growth, electrolyte leakage, Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> content in selected plant species. *Plant, Soil and Environment*. 65 (2), 90–96.
- Homaee, M., Feddes, R.A., Dirksen, C., 2002. A macroscopic water extraction model for non-uniform transient salinity and water stress. *American Journal of Soil Science Society*. 66, 1764-1772.
- Jiang, X., Qi, W., Xu, X., Li, Y., Liao, Y., Wang, B., 2014. Higher soil salinity causes more physiological stress in female of *Populus cathayana* cuttings. *Acta Ecologica Sinica*. 34(4), 225–231.
- Kaya, C., Higgs, D., Kirnak, H., 2001. The effects of high salinity (NaCl) and supplementary phosphorus and potassium on physiology and nutrition development of spinach. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*. 27, 47-59.
- Kukreja, S., Nandwal, A.S., Kumar, N., Sharma, S.K., Unvi, V., 2005. Plant water status, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging enzymes, ethylene evolution and membrane integrity of *Cicer arietinum* roots as affected by salinity. *Biologia Plantarum*. 49(2), 305–308.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., Mittler, R., 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment*. 33, 453-467.

- Moameni, A., 2011. Geographical distribution and salinity levels of soil resources of Iran. *Iranian Journal of Soil Research*. 24, 203- 215. [In Persian with English summary].
- Moieni, A., Mirzaee, M., Ghanati, F., 2013. Effects of drought stress on the lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in two canola (*Brassica napus* L.) cultivars. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 15, 593-602. [In Persian with English summary].
- Ohsugi, R., Hirochika, H., Ichikawa, H., Komatsu, S., AoKi, N., Nakamura, H., Hakata, M., Asano, T., 2011. Functional characterization of *OsCPK<sub>21</sub>* a calcium dependent protein kinase that confers salt tolerance in rice. *Plant Molecular Biology*. 75, 179-191.
- Morales, J.M.L., Rodríguez-Monroy, M., Sepúlveda-Jiménez, G., 2012. Betacyanin accumulation and guaiacol peroxidase activity in *Beta vulgaris* L. leaves following copper stress. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 81(3).
- Noctor, A., Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., 2010. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*. 61(15), 4197-4220.
- Omidi, H., 2010. Changes of proline content and activity of antioxidative enzymes in two canola genotype under drought stress. *American Journal of Plant Physiology*. 5(6), 338-349.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 29(9), 45.
- Polle, A., Otter, T., Seifert, F., 1994. Apoplastic Peroxidases and Lignification in Needles of Norway Spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiology*. 106(1), 53-60.
- Rezaei, H., Khosh, S.K., Malakouti, M.J., Pessarakli, M., 2006. Salt tolerance of canola in relation to accumulation and xylem transportation of cations. *Journal of Plant Nutrition*. 29, 1903-1917.
- Sairam, R.K., Rao, K.V., Srivastava, G.C., 2002. Differential response of wheat genotypes to long-term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*. 163, 1037-1046.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., Harper, J.F., 2002. Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell*. 14, 401-417.
- Shrivastava, P., Kumar, R., 2015. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 22, 123-131.
- Tai, S.h., Liu, G.S., Sun, Y.h., Chen, J., 2009. Cloning and Expression of Calcium-Dependent Protein Kinase (CDPK) Gene Family in Common Tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Agricultural Sciences in China*. 12, 1448-1457.
- Wang, H.M., Xiao, X.R., Yang, M.Y., Gao, Z.L., Zang, J., Fu, X.M., Chen, Y.H., 2014. Effects of salt stress on Antioxidant Defense System in the Root of *Kandelia candel*. *Botanical Studies*. 55- 57.
- Weatherley, P.E., 1950. Studies in the water relations of the cotton plant: I. The field measurement of water deficits in leaves. *New Phytologist*. 49, 81-97.
- Yang, F., Xiao, X., Zhang, S., Korpelainen, H., Li, C., 2009. Salt stress responses in *Populus cathayana* Rehder. *Plant Science*. 176(5), 669-677.
- You, J., Chan, Z., 2015. ROS Regulation during Abiotic Stress Responses in Crop Plants. *Frontiers in Plant Science*. 6(1092). doi: 10.3389/fpls.2015.01092
- Zahedi, H., Tohidi Moghadam, H.R., 2011. Effect of drought stress on antioxidant enzymes activities with zeolite and selenium application in canola cultivars. *Research on Crops*. 12(2), 388-392.
- Zare, S., Abili, J., 2014. Evaluation of antioxidant enzymes activity in canola under salt stress. *International Journal of Farming and Allied Sciences*. 3(7), 767-771.
- Zhang, D.P., Zhang, X.Z., Xu, Y.H., Wu, F.Q., Wang, X.F., Du, S.Y., Shang, Y., Fan, R.C., Li, Y., Zho, R., Wang, X.J., Yu, X.C., Zhu, S.Y., 2007. Two calcium dependent protein kinase CPK4 and CPK11 regulate abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell*. 19, 3019-3036.
- Zhang, H., Liu, W. Z., Zhang, Y., Deng, M., Niu, F., Yang, B., Wang, X., Wang, B., Liang, W., Deyholos, M.K., Jiang, Y.Q., 2014. Identification, expression and interaction analyses of calcium-dependent protein kinase

- (CPK) genes in canola (*Brassica napus* L.). BMC Genomics. 15, 211.
- Zhou, Y., Xu, D., Jia, L., Huang, X., Ma, G., Wang, S., Zhu, M., Zhang, A., Guan, M., Lu, K. and Xu, X., 2017. Genome-wide identification and structural analysis of bZIP transcription factor genes in *Brassica napus*. Genes. 8(10), 288.
- Zhu, J.K., 2001. Plant salt tolerance. Trends in Plant Science. 6(2), 66–72.