

Study of the role of Zinc Finger transcription factor of *Arabidopsis thaliana* 6 (ZAT6) in forage turnip (*Brassica rapa* L.) salinity tolerance

R. Shamloo-Dashtpagerdi^{1*}, S. Tahmasebi²

1. PhD in Plant breeding, Assistant Professor, Department of Agriculture and Natural Resources, Higher Education Center of Eghlid, Eghlid, Iran

2. PhD in Plant breeding, Assistant Professor, Department of Seed and Plant Improvement Research, Fars Agriculture and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran

Received 3 November 2021; Accepted 7 December 2021

Extended abstract

Introduction

Soil and water salinity has significantly reduced crop yields and threatened human food security worldwide. Understanding the molecular basis of how crop plants receive and respond to salinity and identifying the main components of their stress tolerance are essential for developing tolerant plants through genetic manipulation. Today, functional genomics methods such as transcriptomics, proteomics, and metabolomics have revolutionised the study of plant stress response and facilitated the identification of important pathways and components governing stress tolerance. For example, the production and analysis of EST sequences, RNA microarray, and RNA-sequencing technology (RNA-seq) have made it possible to study and identify gene transcripts in genome-wide stress response networks. Accordingly, this study aimed to analyse the transcript of forage turnip (*Brassica rapa* L.) under salinity stress, determine the functional orientation of the genome, and identify the important components and genes involved in salinity tolerance.

Materials and methods

Two Expressed Sequenced Tags (ESTs) libraries of forage turnip under non-stress and salinity stress conditions were analysed using bioinformatic and statistical methods. Non-stress and salinity stress libraries had 8408 and 6894 sequences, respectively. After sequences trimming, the genome functional orientation of forage turnip in response to salinity stress was determined based on Fisher's exact test using the DAVID tool. Differentially expressed genes (DEGs) were assigned using the Audio and Claverie statistical test (AC test) implemented in the IDEG6 tool, at a significance level of 5%. Based on Fisher's exact test, a hierarchical gene network among DEGs was predicted. Then, gene network topology analysis was performed using the NetworkAnalyzer plugin in Cytoscape 4.3. One gene was identified as an important gene (Hub gene) based on gene network topology analysis. In a greenhouse experiment using a tolerant genotype and a susceptible genotype of forage turnip, the expression profile of the identified important gene along with some traits related to the plant antioxidant system, including anthocyanin content, antioxidant enzymes activity, and malondialdehyde content, were evaluated in

* Corresponding author: Roohollah Shamloo-Dashtpagerdi; E-Mail: shamloo.r@gamil.com



response to different salinity time points. Finally, the relationship among the changes in gene expression, evaluated traits, and salinity tolerance was determined using Correspondence Analysis (CA).

Results and discussion

Pre-processing of 8408 EST sequences of the non-stress library resulted in 8,403 high-quality sequences. Also, out of 6894 EST sequences from the salinity stress library, 6894 high-quality sequences were obtained. BlastX against Arabidopsis proteins showed that 8075 (96.1%) of the non-stress EST sequences had at least one specific hit. 6597 (95.7%) of the EST sequences of the salinity stress library also had at least one specific hit in BlastX. Based on Fisher's exact test, 15 functional groups were significantly ($FDR \leq 0.01$) more active in salinity stress conditions than in non-stress conditions. These results clearly showed that under salinity conditions, the genome functional activity of forage turnip was oriented towards response to stresses, especially oxidative stresses, response to internal inductions such as plant hormones, control of metabolic activities, and photosynthetic reactions. Audic and Claverie's statistical test showed 344 genes were differentially expressed in response to salinity stress; among them, 242 genes were upregulated, and 102 genes were downregulated. The predicted gene network indicated a complex relationship among DEGs, regulatory molecules (especially melatonin and plant hormones), and downstream responsive pathways. Among identified DEGs, the gene encoding transcription factor ZAT6 was assigned as an important gene in the salinity response gene network. The expression profile of the ZAT6 gene, quantity of anthocyanin, the activity of antioxidant enzymes and content of malondialdehyde were significantly different between the two studied genotypes. ZAT6 was significantly more expressed in the stress-tolerant genotype than the stress-susceptible genotype at all time points. In addition, the antioxidant system of the tolerant genotype was more potent than the susceptible genotype. Also, results revealed a significant relationship between the expression profile of ZAT6 and evaluated traits in the context of salinity tolerance. Based on the results, changes in ZAT6 gene expression are directly or indirectly involved in regulating forage turnip plant responses to salinity stress, especially through the control of evaluated traits.

Conclusion

Transcriptome study clarified some of the molecular bases of the forage turnip response to salinity stress. Accordingly, it seems that the gene encoding the ZAT6 transcription factor plays an important role(s) in the salinity stress tolerance of forage turnip. There was a significant relationship between high expression levels of this gene and enhanced antioxidant activities, which could confirm the hypothesis. However, further studies are needed to assign detailed functions of ZAT6, particularly the association of this gene with the regulatory pathway of melatonin as a major regulatory molecule in plants. This can be an effective starting point for further studies.

Acknowledgments

We would like to thank the support of the Higher Education Center of Eghlid for this research project.

Keywords: Abiotic stress, Bioinformatics, Gene network, Regulation of gene expression, Transcriptome analysis

مطالعه نقش عامل رونویسی *Zinc Finger of Arabidopsis thaliana 6 (ZAT6)* در تحمل شوری گیاه شلغم علوفه‌ای (*Brassica rapa L.*)

روح‌الله شاملو دشت پاگردی^{۱*}، سیروس طهماسبی^۲

۱. دکتری اصلاح نباتات، استادیار گروه کشاورزی و منابع طبیعی، مرکز آموزش عالی اقلید، اقلید
۲. دکتری اصلاح نباتات، استادیار بخش تحقیقات نهال و بذر، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس، شیراز

مشخصات مقاله	چکیده
واژه‌های کلیدی: بیوانفورماتیک تجزیه ترانسکرپتوم تنش غیرزیستی تنظیم بیان ژن شبکه ژنی	شوری خاک و آب سبب کاهش چشمگیر عملکرد گیاهان زراعی و به خطر افتادن امنیت غذایی انسان در سراسر جهان شده است. درک مبانی مولکولی چگونگی دریافت و پاسخ به شوری برای توسعه گیاهان متحمل از طریق دست‌ورزی‌های ژنتیکی ضروری است. در این پژوهش، دو کتابخانه '۵ (ESTs) Expressed Sequenced Tags (ESTs) مربوط به گیاه شلغم علوفه‌ای (<i>Brassica rapa L.</i>) در شرایط بدون تنش و تنش شوری مورد تجزیه‌های بیوانفورماتیکی و آماری قرار گرفت و طی آن جهت‌گیری کارکردی ژنوم و شبکه ژنی پاسخ به شوری تعیین گردید. بر اساس تجزیه توپولوژی شبکه ژنی، یک ژن به‌عنوان ژن مهم (<i>Hub gene</i>) شناسایی شد. در ادامه و در یک آزمایش گلخانه‌ای، با استفاده از یک ژنوتیپ متحمل و یک ژنوتیپ حساس شلغم علوفه‌ای، نمایه بیان ژن مهم شناسایی شده و تغییرات برخی صفات مرتبط با سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه، ۳ و ۱۲ ساعت پس از تیمار شوری ۲۰۰ میلی مولار ارزیابی گردید. در نهایت، ارتباط بین تغییرات مشاهده‌شده در بیان ژن، صفات ارزیابی‌شده و تحمل شوری مشخص شد. نتایج نشان داد که فعالیت ژنوم شلغم علوفه‌ای به شکل معنی‌داری به سمت پاسخ به القانات و تنش‌ها تغییر کرده است. در بین ۳۴۴ ژن با بیان افتراقی، ژن کد کننده عامل رونویسی <i>ZAT6</i> به‌عنوان ژن مهم شبکه ژنی پاسخ به شوری تعیین شد. نمایه بیان این ژن، میزان آنتوسیانین، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و محتوای مالون-دی‌آلدهید به شکل معنی‌داری بین دو ژنوتیپ تفاوت داشت. ژنوتیپ متحمل به شکل معنی‌داری سطوح بالاتری از بیان ژن <i>ZAT6</i> میزان بیشتر آنتوسیانین، فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و محتوای کمتر مالون‌دی‌آلدهید را نشان داد. همچنین ارتباط معنی‌داری بین سطوح بیان ژن، صفات ارزیابی‌شده و تحمل شوری وجود دارد. در یک نتیجه‌گیری کلی، به نظر می‌رسد ژن <i>ZAT6</i> در تنظیم توان سیستم آنتی‌اکسیدانی شلغم علوفه‌ای و به دنبال آن تحمل شوری نقش مهمی بر عهده دارد.

مقدمه

آن‌ها در سراسر جهان است (Francini and Sebastiani, 2019).

ایران کشوری با اقلیمی خشک و نیمه‌خشک است که در کمربند بیابانی جهان واقع شده است (Amiri et al., 2010). شوری و بخصوص شوری ناشی از نمک‌های سدیم و کلر، مشکلی رایج در این مناطق است زیرا بارش‌ها به‌اندازه‌ای

تغییرات روزافزون آب و هوایی جهان به‌عنوان یک تهدید مهم برای امنیت غذایی و بقای انسان شناخته می‌شود (Ferguson, 2019). این تغییرات آب و هوایی با برهم زدن تعادل محیطی منجر به افزایش موج گرما، خشک‌سالی و افزایش شوری آب و خاک شده است (Koyro et al., 2012; Ferguson, 2019). تنش‌های غیرزیستی ناشی از چنین تغییراتی یکی از عوامل اصلی محدودکننده رشد و توسعه گیاهان زراعی و سبب کاهش بیش از ۵۰ درصدی عملکرد

تا به امروز، بر اساس تجزیه و تحلیل در سطح ژنوم، تعداد زیادی ژن متعلق به گروه‌های مختلف مانند ژن‌های عملکردی LEAs و HSPs و ژن‌های تنظیم‌کننده پروتئین فسفاتاز (از جمله ABI1 و ABI2)، پروتئین کیناز (از جمله MAPKs و CDPKs) و عوامل رونویسی (از جمله خانواده‌های MYB، WRKY، bZIP، NAC) در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی و از جمله شوری در گونه‌های مختلف گیاهی شناسایی شده است (Zhang et al., 2021). تفاوت در نمایه بیان یا ویژگی‌های پروتئینی برخی از این ژن‌ها به سطوح متفاوت تحمل تنش در گیاهان مختلف نسبت داده شده است (Haak et al., 2017). برای مثال گزارش شده است که بیان متفاوت عوامل رونویسی MADS-BOX و C2H2 zinc finger با سطوح متفاوت تحمل تنش‌های خشکی، شوری و دمای بالا در ارتباط است (Castelán-Muñoz et al., 2020; Han et al., 2019). با این وجود، میزان اهمیت ژن‌ها در ایجاد تحمل به تنش‌ها و ارتباط آن‌ها با تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گیاه کمتر مورد توجه قرار گرفته است.

این پژوهش با هدف مطالعه ترانسکریپتوم گیاه شلغم علوفه‌ای (*Brassica rapa* L.) در شرایط تنش شوری، شناسایی و بررسی اجزاء و ژن‌های مهم دخیل در تحمل شوری و تجزیه و تحلیل ارتباط این اجزاء طراحی و انجام شد. بر اساس نتایج به دست آمده، به نظر می‌رسد که ژن کد کننده عامل رونویسی ZAT6 به عنوان یک گر^{۱۰} مهم در شبکه‌ی ژنی پاسخ به شوری ایفای نقش می‌کند و از طریق تنظیم فعالیت سیستم‌های دفاعی و آنتی‌اکسیدانی شلغم علوفه‌ای، بخشی از تحمل شوری این گیاه را شکل می‌دهد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری داده‌ها

توالی‌های دو کتابخانه EST 5' مربوط به گیاه شلغم علوفه‌ای (*B. rapa* ssp. *Pekinensis*: inbred line Chiifu) که توسط موسسه ملی زیست‌فناوری کشاورزی کشور کره جنوبی (NIAB)^{۱۱} تهیه شده است از پایگاه داده NCBI دریافت

نیست که یون‌های سدیم اضافی را از لایه‌ی ریزوسفر^۱ خارج نماید. بعلاوه، در این نواحی اغلب نرخ تبخیر از سطح خاک بالاست که سبب افزایش غلظت نمک در خاک می‌شود (Ashraf and Akram, 2009). به همین دلیل، بیش از نیمی از زمین‌های قابل کشت کشور، یعنی چیزی در حدود ۳۰ میلیون هکتار، با مشکل شوری مواجه است (Moghaddam and Koocheki, 2001). بعلاوه، کاهش بارندگی و پایین رفتن سطح آب‌های زیرزمینی سبب برداشت آب‌شور و بی‌کیفیت از اعماق زمین و در نتیجه تشدید مشکل شوری شده است. از این رو، عملکرد و کیفیت گیاهان زراعی در کشور تحت تأثیر خاک و آب‌شور با کاهش چشمگیری همراه شده است.

بهبود تحمل گیاهان زراعی به تنش‌های غیرزیستی از جمله شوری، یک راهکار مفید و امیدبخش برای مقابله با تغییرات محیطی است (Anwar and Kim, 2020). اصلی‌ترین موضوع برای نیل به این مقصود، درک چگونگی دریافت، پاسخ و تحمل تنش توسط گیاه و سپس استفاده از این دانش برای ایجاد گیاهان زراعی متحمل است (Dresselhaus and Hückelhoven, 2018). امروزه روش‌های ژنومیکس کارکردی^۲ مانند ترانسکریپتومیکس، پروتئومیکس و متابولومیکس تحول بزرگی در مطالعه و شناسایی مسیرها و اجزای مهم پاسخ به تنش گیاهان ایجاد کرده است (Sahoo et al., 2020). برای مثال، تولید و تجزیه توالی‌های EST^۳، فناوری ریزآرایه^۴ و توالی‌یابی RNA^۵ (RNA-seq) امکان شناسایی، بررسی بیان و مطالعه رونوشت‌های ژن‌ها در شبکه‌های پاسخ به تنش را فراهم آورده‌اند (Shamloo-Dashtpajardi et al., 2015; Shamloo-Dashtpajardi et al., 2020). خوشبختانه داده‌های خام بیشتر این مطالعه‌ها را می‌توان از پایگاه‌های داده مختلف همچون NCBI^۶، EBI^۷، TGI^۸، PlandGDB^۹ و . . . به دست آورد و با به‌کارگیری روش‌های نوین تجزیه‌های بیوانفورماتیک و آماری، لایه‌های جدیدی از اطلاعات ارزشمند پیرامون مبانی مولکولی پاسخ به تنش را استخراج نمود (Ambrosino et al., 2020).

⁷ <https://www.ebi.ac.uk/>

⁸ <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>

⁹ <http://www.plantgdb.org/>

¹⁰ Node

¹¹ National Institute of Agricultural Biotechnology

¹ Rhizosphere

² Functional genomics

³ Expressed Sequenced Tags

⁴ Microarray

⁵ RNA-sequencing

⁶ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

به صورت هم‌زمان و با استفاده از سرویس بیوانفورماتیک EGassembler و با در نظر گرفتن ۸۰ درصد همانندی دسته‌بندی و هم‌گذاری شدند. تعداد EST‌های تشکیل‌دهنده هر کانتیگ^{۱۹} (توالی‌های دربرگیرنده حداقل دو EST) از هر کتابخانه با استفاده از برنامه نوشته‌شده در زبان برنامه‌نویسی Python (<https://www.python.org>) به‌عنوان میزان بیان هر کانتیگ در هر کتابخانه شمارش گردید. در گام بعدی، با استفاده از ابزار IDEG6 (Romualdi et al., 2003)، آزمون آماری Audic and Claverie (AC test) (Audic and Claverie, 1997) برای مقادیر شمارش‌شده و در سطح معنی‌داری ۵ درصد انجام شد. DEG‌های شناسایی شده با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench software 20 در مقابل توالی‌های پروتئینی گیاه آرابیدوپسیس BlastX شدند. کدهای پروتئینی به‌دست‌آمده از این مرحله به‌عنوان ورودی نرم‌افزار Pathway Studio7 (Nikitin et al., 2003) استفاده شد و طی آن و بر اساس آزمون دقیق فیشر و سطح معنی‌داری ۵ درصد، یک شبکه ژنی سلسله‌مراتبی^{۲۰} بین DEG‌ها پیش‌بینی گردید. با استفاده از افزونه NetworkAnalyzer در نرم‌افزار Cytoscape 4.3 (Kohl et al., 2011)، تجزیه توپولوژی شبکه^{۲۱} برای شبکه ژنی پیش‌بینی شده انجام شد. برای تعیین مهم‌ترین گره^{۲۲} (های) شبکه که معرف ژن (های) مهم‌تر در شبکه‌ی ژنی پاسخ به شوری بود، شاخص‌های ClosnessCentrality، BetweennessCentrality و EdgeBetweenness (Raman et al., 2014) مدنظر قرار گرفت.

آزمایش تنش شوری

در یک آزمایش گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی، دو ژنوتیپ شلغم علوفه‌ای به نام‌های اردکان (متحمل به شوری) و کرمانشاه (حساس به شوری) (Amirian Mojarad et al., 2018) (به‌عنوان فاکتور اول) در سطوح مختلف تنش شوری (به‌عنوان فاکتور دوم) مورد ارزیابی‌های مولکولی و بیوشیمیایی قرار گرفتند. بذرها هر دو ژنوتیپ قبل از کاشت با هیپوکلرید سدیم ۵ درصد به مدت

گردید. یک کتابخانه با شماره دسترسی LIBEST_021827 دارای ۸۴۰۸ توالی از شرایط بدون تنش و کتابخانه‌ی دیگر با شماره دسترسی LIBEST_021813 دارای ۶۸۹۴ توالی از شرایط تنش شوری بود.

پیش‌پردازش^{۱۲} و تفسیر کارکردی^{۱۳} توالی‌های EST

توالی‌های EST هر دو کتابخانه به صورت جداگانه و به‌منظور شناسایی آلودگی‌های وکتوری و بررسی طول و کیفیت آن‌ها با استفاده از سرویس بیوانفورماتیک EGassembler (<http://egassembler.hgc.jp>) (Masoudi-Nejad et al., 2006) مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر این اساس، توالی‌های مربوط به وکتور، توالی‌های تکرار شونده، توالی‌های کلروپلاستی و میتوکندریایی حذف و در نهایت EST‌های با طول کوتاه‌تر از ۱۰۰ جفت باز کنار گذاشته شدند. جستجوی بلاست ایکس^{۱۴} در برابر توالی‌های پروتئینی آرابیدوپسیس برای EST‌های هر کتابخانه با در نظر گرفتن E-value 5-10 و با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench software 20 انجام گرفت. مقایسه‌ی عملکردی ترانسکریپتوم گیاه شلغم علوفه‌ی برای شناسایی گروه‌های کارکردی معنی‌دار در پاسخ به تنش شوری بر اساس آزمون دقیق فیشر^{۱۵} با استفاده از ابزار DAVID 6.8 (<https://david.ncicrf.gov/home.jsp>) (Sherman et al., 2007) انجام گرفت. برای این منظور، فهرست توالی‌های کتابخانه تنش شوری که دارای hit مشخص در جستجوی بلاست ایکس بودند به‌عنوان آزمون^{۱۶} و فهرست توالی‌های دارای hit مشخص در کتابخانه بدون تنش به‌عنوان پس‌زمینه^{۱۷} لحاظ گردید. همچنین، سطح معنی‌داری ۱ درصد ($FDR \leq 0.01$) و حداقل تعداد توالی (ژن) در گروه کارکردی ۱۰ ژن در نظر گرفته شد.

شناسایی ژن‌های با بیان افتراقی (DEGs)^{۱۸} و تجزیه شبکه ژنی

به‌منظور شناسایی DEG‌ها در پاسخ به تنش شوری، EST‌های با کیفیت دو کتابخانه‌ی بدون تنش و تنش شوری

¹⁸ Differentially Expressed Genes

¹⁹ Contigs

²⁰ Hierarchical

²¹ Network topology analysis

²² Node

¹² Pre-processing

¹³ Functional interpretation

¹⁴ BlastX

¹⁵ Fisher exact test

¹⁶ Test

¹⁷ Background

حساس شلغم علوفه‌ای با استفاده از qPCR^۲ مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور، استخراج RNA کل از نمونه‌های برگ برگ‌برگرفته‌شده با استفاده از کیت استخراج RNA دنایزست (Column RNA isolation kit) بر اساس دستورالعمل آن صورت پذیرفت. آلودگی‌های ژنومی احتمالی توسط تیمار DNase I شرکت Jena Bioscience آلمان برطرف گردید و کمیت و کیفیت RNA با استفاده از نانودراپ و الکتروفورز روی ژل آگاروز بررسی شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت پارس (Easy cDNA Synthesis Kit, Pars, Mashhad) و مطابق با دستورالعمل آن انجام شد. qPCR با دستگاه Gentier48E شرکت TianLong و با استفاده از کیت RealQ Plus Master Mix Green شرکت Ampliqon و بر اساس راهنمای آن انجام شد. ژن *Elongation factor 1 alpha (EF-1α)* به‌عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. پرایمرهای اختصاصی نیز با استفاده از نرم‌افزار AlleleID 7 و توالی کانتینگ‌های متناظر با ژن‌ها طراحی شد (جدول ۱). سطوح بیان ژن با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001) نرمال و کمی‌سازی گردید.

۱ دقیقه ضدعفونی و سپس به مدت ۳ دقیقه با آب مقطر شستشو شد. بذرها ضدعفونی شده در گلدان‌های پلاستیکی حاوی ۱/۵ کیلوگرم خاک شنی‌رسی و در محیط کنترل‌شده با دوره دمایی ۲۴ درجه سانتی‌گراد در روز و ۱۶ درجه سانتی‌گراد در شب و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی کشت گردید. آبیاری همه گلدان‌ها تا مرحله ۴ برگی به‌طور یکنواخت و بر اساس ظرفیت زراعی خاک^۱ گلدان‌ها انجام شد. در این مرحله، گلدان‌ها به دو گروه گلدان‌های بدون تنش و تنش دسته‌بندی شدند. گروه اول تا انتهای آزمایش (مرحله ۵ برگی) مطابق قبل و بر اساس ظرفیت زراعی خاک آبیاری شدند. در گروه دوم و برای اعمال تنش شوری، بجای آب، محلول ۲۰۰ میلی‌مولار نمک NaCl به گلدان‌ها اضافه شد. نمونه‌گیری از برگ‌های در شرایط بدون تنش، ۳ و ۱۲ ساعت پس از اضافه کردن محلول نمکی با در نظر گرفتن ۳ تکرار انجام گردید.

بررسی بیان ژن مهم شناسایی شده

بر اساس نتایج تجزیه‌های بیوانفورماتیک، یک ژن به‌عنوان مهم‌ترین و تأثیرگذارترین ژن در شبکه ژنی پاسخ به شوری انتخاب شد. تغییرات بیان این ژن در دو ژنوتیپ متحمل و

جدول ۱. توالی آغازگرهای استفاده‌شده برای تجزیه بیان ژن *ZAT6* در بافت برگ گیاه شلغم علوفه‌ای در شرایط تنش شوری

Table 1. Oligonucleotide primer pairs used for expression analysis of *ZAT6* gene in *B. rapa* leaf under salinity conditions

ژن (شماره دسترسی) Gene (Accession number)	آغازگر Primer	طول قطعه بر روی cDNA Amplicon length on cDNA (bp)
<i>ZAT6</i> (XM_009124366)	F 5'-ACAAACGGTGCCACTACG-3'	133
	R 5'-GAGAATTCGCGTATCGGC-3'	
<i>EF-1α</i> (AF398148)	F 5'-TCGTTTCGCTGTTAGGGAC-3'	124
	R 5'-CTCATCATTTAGCTCCCTTC-3'	

$\epsilon=33000 \text{ mol}^{-1} \text{ Cm}^{-1}$ میزان آنتوسیانین کمی سازی گردید.

محتوای مالون دی‌آلدئید (MDA)^۴

به‌منظور تعیین غلظت MDA در برگ ارقام شلغم علوفه‌ای در پاسخ به تنش شوری از روش والنتوویچ و همکاران (Valentovic et al., 2006) استفاده شد. ابتدا ۰/۵ گرم بافت برگ در محلول ۲۰ درصد تیوکلرو استیک اسید (TCA)^۵ حاوی ۰/۵ درصد تیو باربیتوریک اسید (TBA)^۶

اندازه‌گیری آنتوسیانین

میزان آنتوسیانین در نمونه‌های برگ هر دو رقم و در زمان‌های مختلف آزمایش بر پایه میزان جذب نوری اندازه‌گیری شد (Krizek et al., 1993). برای این منظور ۰/۵ گرم بافت برگ در محلول متانول: اسید کلریدریک با نسبت ۱:۹۹ همگن^۳ شد. میزان جذب نور با اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری و سپس با استفاده از ضریب خاموشی

⁴ Malondialdehyde

⁵ Tiocloro Acetic Acid

⁶ Barbituric Acid

¹ Field Capacity (FC)

² Quantitative real time PCR

³ Homogenized

با پیش‌پردازش ۸۴۰۸ توالی EST کتابخانه بدون تنش برگ گیاه شلغم علوفه‌ای، ۹۸۸ توالی اصلاح^۵ و ۵ توالی از بین توالی‌های اولیه حذف شد. در نتیجه ۸۴۰۳ توالی باکیفیت باقی ماند. همچنین، از ۶۸۹۴ توالی EST کتابخانه تنش شوری، ۵۶ توالی اصلاح و منتج به ۶۸۹۴ توالی با کیفیت شد. جستجوی بلاست ایکس در مقابل پروتئین‌های گیاه آرآبیدوپسیس نشان داد که ۸۰۷۵ (۹۶/۱ درصد) از توالی‌های EST کتابخانه بدون تنش دارای حداقل یک hit مشخص است. ۶۵۹۷ (۹۵/۷ درصد) از توالی‌های EST کتابخانه تنش شوری نیز دارای حداقل یک hit مشخص در بلاست ایکس بودند. بر اساس نتایج آزمون دقیق فیشر، ۱۵ گروه عملکردی به شکل معنی‌داری ($FDR \leq 0.01$) در شرایط تنش شوری نسبت به شرایط بدون تنش فعالیت بیشتری داشتند (شکل ۱). در این بین، پنج گروه عملکردی واکنش‌های اکسایش-کاهش^۶، پاسخ به یون کادمیوم، فتوسنتز، پاسخ به شوری، پاسخ به سایتوکینین و پاسخ به سرما بیشترین تعداد ژن (۵۰) یا بیش از ۵۰ ژن را به خود اختصاص دادند (شکل ۱). این نتایج به‌روشنی نشان داد که فعالیت عملکردی ترانسکریپتوم گیاه شلغم روغنی در شرایط تنش شوری به سمت پاسخ به تنش‌ها به‌خصوص تنش‌های اکسیداتیو، پاسخ به القائات درونی نظیر هورمون‌های گیاهی، کنترل فعالیت‌های متابولیسمی و تنظیم واکنش‌های فتوسنتزی جهت‌گیری کرده است. این جهت‌گیری کارکردی در راستای پیام‌رسانی^۷ تنش به همه‌ی قسمت‌های گیاه و ایجاد پاسخ مناسب به اثرات تنش از جمله ایجاد صدمات سلولی، کاهش سطح فتوسنتز و تداخل در مسیر تولید انرژی در گیاه است (Foyer, 2018; Zaffagnini et al., 2019).

در مجموع، ۱۵۲۹۷ توالی EST با کیفیت از دو کتابخانه بدون تنش و تنش شوری به‌صورت هم‌زمان هم‌گذاری شد. در نتیجه، ۱۹۹۵ کانتیگ دربرگیرنده ۱۰۷۲۱ (۷۰/۱ درصد) از EST‌های هر دو کتابخانه به دست آمد. کانتیک شماره ۴۴۷ کد کننده پروتئین Ribulose biphosphate carboxylase small chain F1 بیشترین تعداد EST (401 توالی) را داشت. همچنین، ۹۴۸ کانتیک نیز دارای حداقل تعداد EST یعنی ۲ توالی بودند. آزمون آماری Audic

همگن شد. مخلوط حاصل به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در حمام بن‌ماری حرارت داده شد و سپس بر روی یخ به مدت ۵ دقیقه سرد گردید. در انتها غلظت MDA با اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

میزان فعالیت سه آنزیم پراکسیداز (POD, EC 1.11.1.7)، کاتالاز (CAT, EC 1.11.1.6) و سوپراکسیددیسموتاز (SOD, EC 1.15.1.1) در بافت برگ در پاسخ به تنش شوری در زمان‌های مختلف آزمایش اندازه‌گیری گردید. ابتدا پروتئین محلول برگ به روش بردفورد^۱ (Mann, 1984) استخراج شد. میزان فعالیت آنزیم POD مطابق با روش چنس و مانیل (Chance and Maehly, 1955) و بر اساس جذب تتراگوآیکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری فعالیت CAT با استفاده از روش پیشنهادی نورزر و همکاران (Knörzer et al., 1996) و بر اساس میزان جذب H₂O₂ در طول موج ۲۴۰ نانومتر انجام گرفت. میزان فعالیت آنزیم SOD نیز بر اساس میزان کاهش نیترو بلو تترازولولیم (NBT)^۲ اندازه‌گیری شد (Beyer Jr and Fridovich, 1987).

تجزیه‌های آماری

برای همه صفات مولکولی و بیوشیمیایی ارزیابی‌شده طی آزمایش تنش شوری، تجزیه واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار Statistica v12 انجام شد. مقایسه میانگین صفات ارزیابی‌شده نیز با همان نرم‌افزار و با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ۱ درصد انجام گرفت. همچنین به‌منظور تعیین ارتباط بین تغییرات صفات اندازه‌گیری شده با تحمل تنش شوری، تحلیل تناظری^۳ (CA) با استفاده از نرم‌افزار Statistica v12 و بر پایه آزمون کای-اسکور^۴ در سطح ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

پیش‌پردازش و تفسیر عملکردی توالی‌های EST

⁵ Trim

⁶ Oxidation-reduction process

⁷ Signaling

¹ Bradford

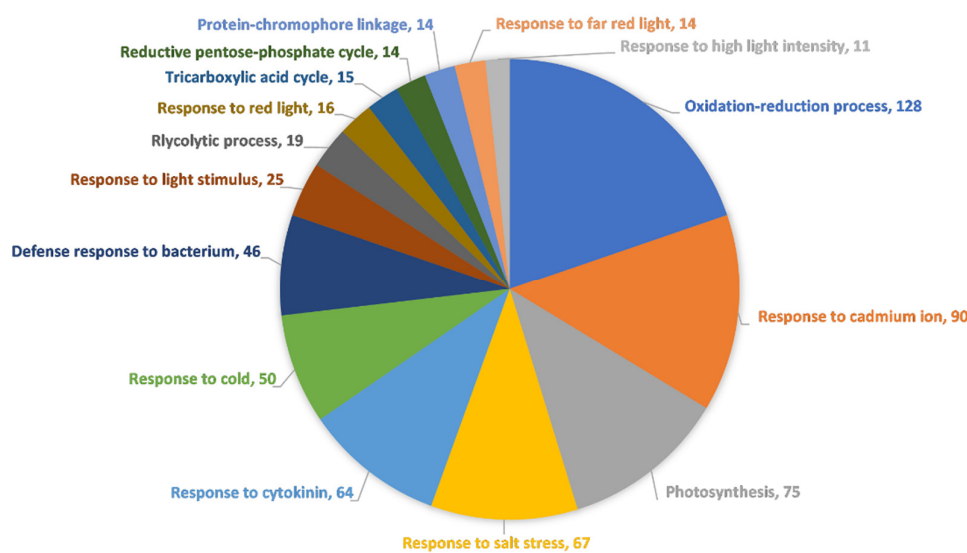
² Nitro blue tetrazolium

³ Correspondence Analysis

⁴ Chi-square

همچنین ژن کدکننده Granule-bound starch synthase 1 بیشترین کاهش بیان (۴/۶۶ برابر) را نشان داد. جستجوی بلاست ایکس در مقابل توالی‌های پروتئینی آرآیدوپسیس نشان داد که ۳۳۱ (۹۶/۲ درصد) از DEGs دارای حداقل یک hit مشخص می‌باشند.

and Claverie نشان داد که ۳۴۴ کانتینگ (ژن) دارای بیان افتراقی در سطح معنی‌داری ۵ درصد است که در این بین، ۲۴۲ ژن دارای افزایش بیان و ۱۰۲ ژن با کاهش بیان همراه بوده است. بیشترین افزایش بیان (۵/۵۲ برابر) مربوط به ژن کدکننده Chlorophyll a-b binding protein CP29.3 بود.



شکل ۱. گروه‌بندی کارکردی ژن‌های با بیان افتراقی (DEGs) در بافت برگ شلغم علوفه‌ای در شرایط تنش شوری. تعداد ژن در هر گروه کارکردی نشان داده شده است.

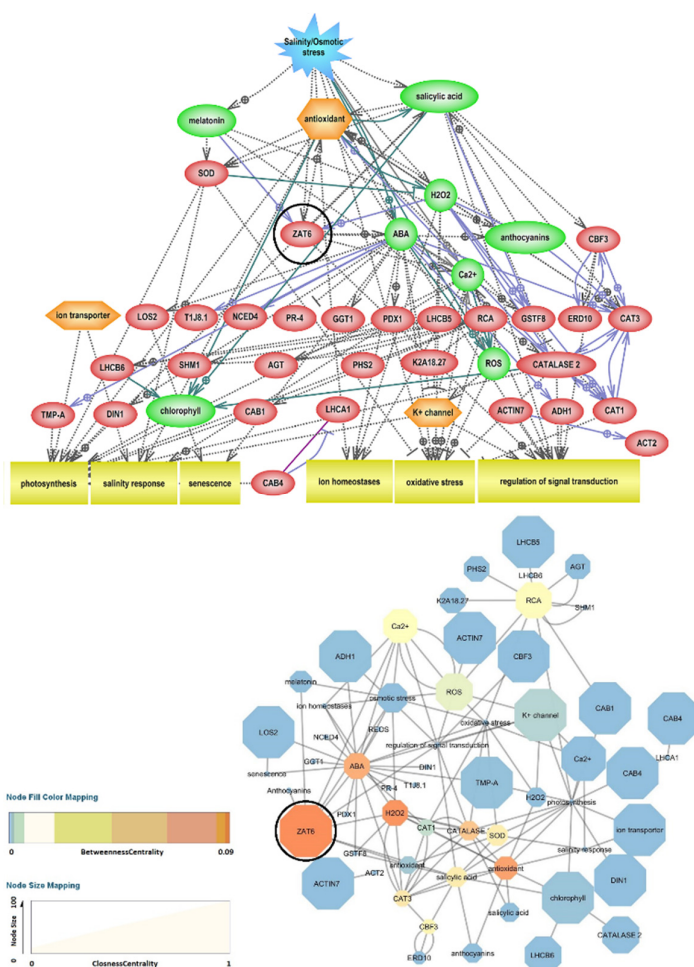
Fig. 1. Functional grouping of differentially expressed genes (DEGs) in *B. rapa* leaf under salinity stress. The number of genes in each functional group is shown

(al., 2020). تفاوت در بیان ژن‌های وابسته به این مسیرها و چگونگی تعدیل ROSها به‌عنوان یکی از وجوه تمایز ژنوتیپ‌های حساس و متحمل به تنش‌های خشکی و شوری در کلزا گزارش شده است (Shamloo-Dashtpajardi et al., 2018). همچنین، هم‌ایستایی یونی از طریق حفظ نسبت پتاسیم به سدیم به‌عنوان یک مسیر زیست‌شناختی حیاتی برای پاسخ سریع به تنش شوری در گیاه شلغم علوفه‌ای معرفی شده است (Li et al., 2021a). گزارش شده است که تجمع ROSها و ایجاد تنش اکسیداتیو در پی تنش شوری سبب تسریع در پیری برگ گیاه شلغم علوفه‌ای می‌شود (Mittal et al., 2018). این فرآیند عمدتاً از طریق تخریب کلروفیل و آسیب‌های غشای سلولی رخ می‌دهد (Fan et al., 2018; Mittal et al., 2018). در مجموع، به نظر می‌رسد تجزیه بیوانفورماتیک ESTهای شلغم علوفه‌ای و شبکه ژنی

شبکه ژنی سلسه‌مراتبی پیش‌بینی شده دربرگیرنده ۵۹ گره بود (شکل ۲). ۴۱ گره از این شبکه ژنی را DEGs تشکیل دادند. شبکه ژنی به‌خوبی مسیرهای پاسخ‌دهی و فرآیندهای پایین‌دستی واکنش به تنش شوری در برگ گیاه شلغم علوفه‌ای را به نمایش گذاشت. همان‌طور که در شکل ۲ مشخص است، هورمون‌های ABA و سالیسیلیک اسید، مولکول تنظیم‌گر ملاتونین، مسیر پیام‌رسانی Ca^{2+} ، مسیر ROS و مولکول H_2O_2 در کنار آنتوسیانین‌ها و کلروفیل به‌عنوان مسیرهای پیام‌رسانی اصلی و مولکول‌های تأثیرگذار بر شبکه تعیین شدند. بعلاوه، گروه‌های کارکردی فتوسنتز، پاسخ به شوری، پیری، هم‌ایستایی یونی، تنش اکسیداتیو و تنظیم پیام‌رسانی به‌عنوان عملکردهای اصلی در شرایط تنش شوری برجسته شدند. مسیر پیام‌رسانی هورمون ABA و ROSها یکی از مهم‌ترین مسیرهای تنظیمی پاسخ به تنش‌های غیرزیستی در خانواده براسیکاسه است (Ghorbel et

به دست آمده به خوبی توانسته است جنبه‌های مختلف پاسخ به شوری در این گیاه را مشخص نماید. تجزیه توپولوژی شبکه ژنی نشان داد که ژن *ZAT6* بیشترین میزان شاخص‌های Closness Centrality و Betweenness Centrality را به خود اختصاص می‌دهد (شکل ۲). علاوه بر این، ژن شاخص Edge Betweenness بالایی نیز داشت. این نتایج بدان معنی است که ژن *ZAT6* در شبکه‌ی ژنی پیش‌بینی شده به عنوان یک گره (ژن) مهم (Hub gene) عمل می‌نماید (Raman et al., 2014;).

به دست آمده به خوبی توانسته است جنبه‌های مختلف پاسخ به شوری در این گیاه را مشخص نماید. تجزیه توپولوژی شبکه ژنی نشان داد که ژن *ZAT6* بیشترین میزان شاخص‌های Closness Centrality و Betweenness Centrality را به خود اختصاص می‌دهد (شکل ۲). علاوه بر این، ژن شاخص Edge Betweenness بالایی نیز داشت. این نتایج بدان معنی است که ژن *ZAT6* در شبکه‌ی ژنی پیش‌بینی شده به عنوان یک گره (ژن) مهم (Hub gene) عمل می‌نماید (Raman et al., 2014;).



شکل ۲. بالا: شبکه ژنی سلسله مراتبی ژن‌های با بیان افتراقی (DEGs) شناسایی شده در برگ گیاه شلغم علوفه در شرایط تنش شوری. پایین: تجزیه توپولوژی شبکه ژنی پیش‌بینی شده: گره‌ها (ژن‌ها) با اندازه بزرگ‌تر و رنگ قرمز به ترتیب دارای مقادیر بالاتری از پارامترهای closeness centrality و betweenness centrality هستند. مکان ژن *ZAT6* در شبکه با دایره سیاه مشخص شده است.

Fig. 2. Above: Hierarchical gene network of differentially expressed genes (DEGs) identified in *B. rapa* leaf under salinity stress. Bottom: Gene network topology analysis: larger nodes (genes) with red color have higher values of closeness centrality and betweenness centrality parameters, respectively. The location of the *ZAT6* gene in the network is shown with a black circle.

ارزیابی‌های بیوشیمیایی و مولکولی

در ژنوتیپ ارکان به شکل معنی‌داری بیشتر از ژنوتیپ کرمانشاه بود. در این زمان، ژن *ZAT6* در ژنوتیپ اردکان بیش از دو برابر ژنوتیپ کرمانشاه افزایش بیان داشت. کمترین میزان بیان ژن نیز در هر دو ژنوتیپ و در شرایط بدون تنش مشاهده شد. القای قوی *ZAT6* در پاسخ به تنش‌های شوری و اسمزی در گیاه آرابیدوپسیس (Liu et al., 2013) و تغییرات بیان آن در گیاه جو در پاسخ به تنش شوری (Shamloo-Dashtpajardi et al., 2019) نیز گزارش شده است.

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اثرات نوع ژنوتیپ و تنش شوری و اثر متقابل این دو بر میزان آنتوسیانین معنی‌دار شد (جدول ۲).

تفاوت بسیار معنی‌داری برای صفات اندازه‌گیری شده در آزمایش تنش شوری مشاهده گردید (جدول ۲). اثر ژنوتیپ، اثر شوری و اثر متقابل ژنوتیپ در شوری بر بیان ژن *ZAT6* بسیار معنی‌دار بود (جدول ۲). به‌طور کلی تنش شوری سبب افزایش بیان ژن *ZAT6* در هر دو ژنوتیپ شلغم علوفه‌ای شد (شکل ۳). این افزایش به شکل چشمگیری در ژنوتیپ متحمل به شوری یعنی اردکان بیشتر از ژنوتیپ حساس به شوری یعنی کرمانشاه بود (شکل ۳). بیشترین میزان بیان ژن ۱۲ ساعت پس از تیمار شوری در ژنوتیپ اردکان مشاهده گردید به شکلی که بیان ژن در این ژنوتیپ بیش از ۳ برابر ژنوتیپ کرمانشاه بود. در زمان ۳ ساعت پس تیمار شوری نیز بیان ژن

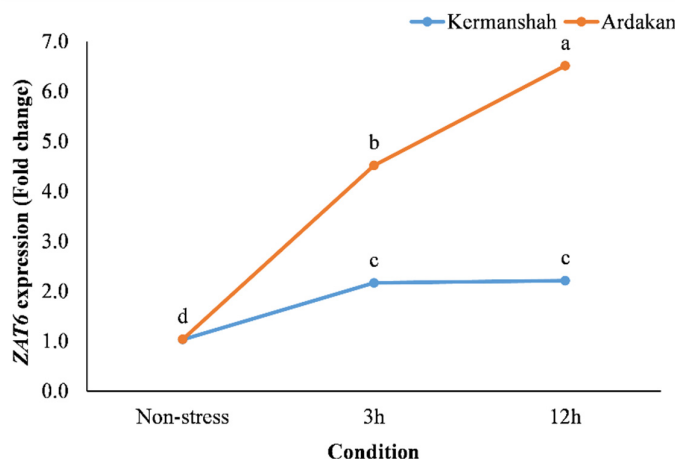
جدول ۲. تجزیه واریانس صفات ارزیابی‌شده در دو ژنوتیپ متحمل و حساس به شوری شلغم علوفه‌ای در شرایط تنش شوری

Table 2. Analysis of variance (ANOVA) of evaluated traits in salinity tolerant and susceptible genotypes of *B. rapa* under salinity stress

منابع تغییر Source of variation	درجه آزادی df	بیان ژن <i>ZAT6</i> Expression of <i>ZAT6</i>	آنتوسیانین Anthocyanin	پراکسیداز POD	کاتالاز CAT	سوپراکسید دیسموتاز SOD	مالون دی‌آلدئید MDA
ژنوتیپ Genotype (G)	1	22.16**	0.0015*	0.0045**	9.79**	1.76*	8.74**
شرایط (شوری) Condition (Salinity)(S)	2	17.43**	0.004**	0.0104**	70.81**	34.07**	46.81**
ژنوتیپ×شرایط (شوری) G × C	2	6.95**	0.005**	0.026**	3.54**	1.88**	1.89**
خطا Error	12	0.01	0.0002	0.005	0.006	0.005	0.05

* and **Significance at the $\alpha=5\%$ and 1%

* و ** به ترتیب معنی‌داری در سطح ۵ درصد و ۱ درصد



شکل ۳. تغییرات بیان ژن *ZAT6* در برگ گیاه شلغم علوفه‌ای در شرایط تنش شوری. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد.

Fig. 3. Changes in expression of *ZAT6* gene in *B. rapa* leaf under salinity stress. Different letters indicate a significant difference at the 1% level based on Duncan's multiple ranges test.

آنتوسیانین در گیاه چای به عنوان یک راهکار برای جلوگیری از صدمات ناشی از تنش‌های غیر زیستی و تحمل تنش معرفی شده است (Li et al., 2021b).

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات ژنوتیپ، تنش شوری و اثر متقابل این دو بر فعالیت هر سه آنزیم آنتی-اکسیدان یعنی POD، CAT و SOD معنی‌دار است (جدول ۲). در شرایط بدون تنش تفاوتی از نظر میزان فعالیت آنزیم POD بین دو ژنوتیپ وجود نداشت (جدول ۳). میزان فعالیت آنزیم POD پس از ۳ ساعت از اعمال تنش شوری به شکل معنی‌داری در ژنوتیپ متحمل یعنی اردکان بیشتر بود. همچنین، بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ متحمل و ۱۲ ساعت پس از اعمال تنش شوری مشاهده شد به شکلی که در این زمان، فعالیت آنزیم POD در ژنوتیپ اردکان بیش از ۲۰ درصد بیشتر از ژنوتیپ حساس یعنی کرمانشاه بود.

بیشترین میزان آنتوسیانین در ژنوتیپ اردکان ۱۲ ساعت پس از اعمال تنش شوری مشاهده گردید (جدول ۳). حتی ۳ ساعت پس از اعمال تنش شوری، میزان آنتوسیانین در این ژنوتیپ به اندازه‌ای بود که تفاوت معنی‌داری با میزان آنتوسیانین در ژنوتیپ کرمانشاه پس از ۱۲ ساعت تیمار شوری نداشت. کمترین مقادیر آنتوسیانین در هر دو ژنوتیپ نیز در شرایط بدون تنش مشاهده گردید و تفاوتی از این نظر بین ژنوتیپ‌ها مشاهده نشد. این نتایج نشان می‌دهند که اگرچه میزان آنتوسیانین در گیاه شلغم علوفه‌ای وابسته به نوع ژنوتیپ است، ولی تغییرات محیطی از جمله تنش شوری نقش مهم‌تری در تغییرات آن دارد. در مطالعات پیشین نشان داده شده است که آنتوسیانین در گیاهان آرابیدوپسیس و گندم در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی با ارتقاء سیستم آنتی-اکسیدانی گیاه و پاک‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن (ROSs)، سبب بهبود تحمل تنش می‌شود (Kovinich et al., 2015; Li et al., 2018). همچنین، افزایش محتوای

جدول ۳. مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ در تنش شوری مربوط به صفات بیوشیمیایی ارزیابی شده در برگ شلغم علوفه‌ای در شرایط تنش شوری. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن است

Table 3. Mean comparison of genotype × salinity interaction of the biochemical traits evaluated in B. rapa leaf under salinity stress. Different letters indicate a significant difference at the 1% level based on Duncan's multiple ranges test.

ژنوتیپ Genotype	شرایط (شوری) Condition (Salinity)	آنتوسیانین Anthocyanin	پراکسیداز POD	کاتالاز CAT	سوپر اکسید دیسموتاز SOD	مالون دی‌آلدئید MDA
		mg fw ⁻¹	nmol tetraguaiacol mg ⁻¹ Pro	nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ Pro	U mg ⁻¹ Pro.	mmol g ⁻¹ fw
کرمانشاه Kemanshah	بدون تنش Non-stress	0.057 ^d	0.32 ^d	20.36 ^e	6.63 ^d	27.67 ^e
	۳ ساعت 3h	0.069 ^c	0.34 ^c	22.44 ^d	7.19 ^c	29.62 ^c
	۱۲ ساعت 12h	0.09 ^b	0.37 ^b	25.67 ^b	10.05 ^b	34.42 ^a
اردکان Ardakan	بدون تنش Non-stress	0.058 ^d	0.33 ^d	20.23 ^e	6.65 ^d	27.47 ^e
	۳ ساعت 3h	0.088 ^b	0.36 ^b	24.08 ^c	7.13 ^c	28.59 ^d
	۱۲ ساعت 12h	0.124 ^a	0.45 ^a	28.61 ^a	11.96 ^a	31.78 ^b

تنش شوری، میزان فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ اردکان به شکل معنی‌داری بیشتر از ژنوتیپ کرمانشاه بود. در ارتباط با میزان فعالیت آنزیم CAT، تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها هم در شرایط بدون تنش و هم ۳ ساعت پس از اعمال تنش شوری وجود نداشت. ولی میزان فعالیت این

رند مشابهی برای فعالیت آنزیم CAT در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و در شرایط تنش شوری مشاهده گردید (جدول ۳). در اینجا نیز تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها در شرایط بدون تنش وجود نداشت ولی هم در زمان ۳ ساعت پس از اعمال تنش شوری و هم در زمان ۱۲ ساعت پس از اعمال

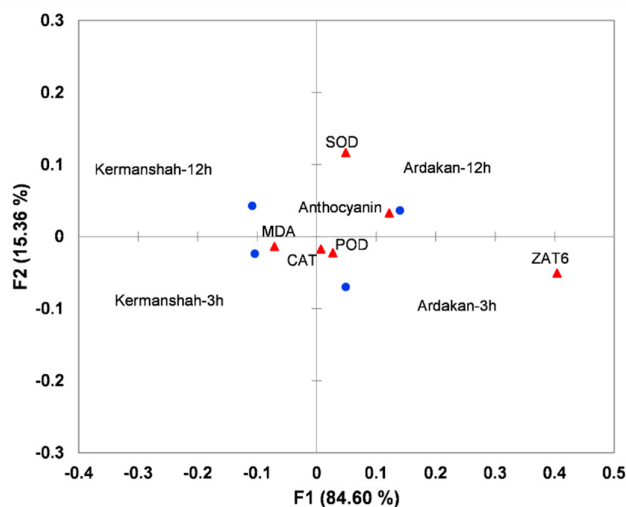
برخوردار است. کمتر بودن میزان MDA که شاخصی از میزان صدمات سلولی در شرایط تنش است (Morales and Munné-Bosch, 2019)، نیز مؤید این موضوع است. به شکل جالبی، در مطالعات پیشین مشخص شده است که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه شلغم علوفه‌ای در پاسخ به تنش شوری، ژنوتیپ اختصاصی است و ژنوتیپ‌های با سطح بالاتر فعالیت این آنزیم‌ها تحمل بیشتری به تنش شوری دارند (Noreen et al., 2010).

تجزیه ارتباط بین صفات ارزیابی شده و تحمل شوری شلغم علوفه‌ای

نتایج تحلیل تناظری (CA) در شکل ۴ نمایش داده شده است. بر اساس آزمون کای اسکور و در سطح معناداری ۵ درصد، مؤلفه‌های اول (F1) و دوم (F2) در مجموع بیش از ۹۹ درصد از تغییرات صفات ارزیابی شده را در بر گرفتند (شکل ۴).

آنزیم در ۱۲ ساعت پس از اعمال تنش شوری در ژنوتیپ اردکان حدود ۲۰ درصد بیشتر از فعالیت آن در ژنوتیپ کرمانشاه بود. اثرات نوع ژنوتیپ، تنش شوری و اثر متقابل این دو بر محتوای MDA برگ بسیار معنی‌دار بود (جدول ۲). همان‌طور که انتظار می‌رفت در شرایط بدون تنش تفاوتی بین ژنوتیپ‌ها از نظر این صفت مشاهده نگردید (جدول ۳). ولی ۳ ساعت پس از اعمال تنش شوری، میزان MDA در برگ ژنوتیپ کرمانشاه به شکل معنی‌داری بیشتر از ژنوتیپ اردکان بود. بیشترین میزان MDA نیز در برگ ژنوتیپ کرمانشاه و ۱۲ ساعت پس از اعمال تنش شوری مشاهده گردید.

افزایش سطح و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان همچون POD، CAT و SOD به‌عنوان یک مکانیسم عمومی و حائز اهمیت در تحمل تنش‌های غیرزیستی از طریق حفاظت از ساختارهای مختلف سلولی همچون غشاهای سلولی، اسیدهای نوکلئیک و . . . شناخته می‌شود (Hasanuzzaman et al., 2020). بر اساس نتایج مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد ژنوتیپ متحمل شلغم علوفه‌ای یعنی ژنوتیپ اردکان، از سیستم آنتی‌اکسیدانی و حفاظتی مؤثرتری



شکل ۴. تحلیل تناظری (CA) صفات ارزیابی شده در برگ شلغم علوفه‌ای در شرایط تنش شوری. محل ژنوتیپ تنش با دایره و محل صفات با مثلث نشان داده شده است.

Fig. 4. Correspondence analysis (CA) of evaluated traits in *B. rapa* leaf under salinity stress. The location of the genotype-stress is indicated by circles and the location of the traits by triangles.

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و به تبع آن تحمل گیاه چای در پاسخ به تنش‌های شوری، خشکی و سرما را بهبود بخشید (Li et al., 2019). عامل رونویسی ZAT6 به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین اجزای مسیر پیام‌رسانی ملاتونین در گیاهان عمل می‌کند (Shi et al., 2018a; Shi et al., 2018b). از این‌رو، به نظر می‌رسد همان‌طور که در ارزیابی ژنوتیپ‌های متحمل و حساس شلغم علوفه‌ای مشخص گردید، بیان بالاتر ژن ZAT6 نقش مهمی در ایجاد بخشی از تحمل تنش شوری در این گیاه است. در واقع محتمل است که سطح بالاتر بیان این ژن، به شکل‌گیری یک سیستم دفاعی و آنتی‌اکسیدانی قوی کمک کند و با حفظ ساختارهای مهم گیاهی از جمله غشاهای سلولی و رنگ‌دانه‌های برگ، صدمات ناشی از تنش شوری را کاهش دهد و سبب تداوم فعالیت‌های متابولیکی گیاه و در نتیجه تحمل شوری گردد.

نتیجه‌گیری نهایی

مطالعه‌ی ترانسکریپتوم گیاه شلغم علوفه‌ای سبب روشن شدن بخشی از پاسخ‌های مولکولی و جهت‌گیری کارکردی ژنوم این گیاه در پاسخ به تنش شوری گردید. به نظر می‌رسد ژن کدکننده‌ی عامل رونویسی ZAT6 نقش بسزایی در شکل‌گیری بخش مهمی از مکانیسم‌های تحمل تنش شوری در گیاه شلغم علوفه‌ای بر عهده داشته باشد. ارتباط مستقیم و معنی‌داری بین سطوح بالای بیان این ژن، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه و میزان صدمات سلولی مشاهده گردید به شکلی که بیان بیشتر ZAT6 با افزایش محتوای آنتوسیانین، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کاهش محتوای مالون دی‌آلدئید در برگ همراه بود که می‌تواند تأیید‌کننده فرضیه مطرح شده باشد. البته جزئیات کارکرد بیشتر این ژن در پاسخ به تنش شوری نیازمند مطالعات تکمیلی است. بخصوص، ارتباط این ژن با مسیر تنظیمی ملاتونین به‌عنوان یک مولکول تنظیم‌کننده اصلی در گیاهان و نقش این مولکول در ایجاد تحمل شوری در گیاه شلغم علوفه‌ای می‌تواند نقطه آغاز مؤثری برای مطالعات بعدی باشد.

سپاسگزاری

لازم می‌دانیم از حمایت‌های مالی مرکز آموزش عالی اقلید برای انجام این پروژه پژوهشی تشکر نماییم.

CA به‌خوبی پاسخ‌های دو ژنوتیپ به سطوح مختلف تنش شوری، یعنی ۳ و ۱۲ ساعت پس از اعمال تنش را از هم تفکیک نمود. بر این اساس، دو ناحیه تحمل به تنش (محل قرارگیری ژنوتیپ متحمل) و حساسیت به تنش (محل قرارگیری ژنوتیپ حساس) به دست آمد. به شکل جالبی، تغییرات بیان ژن ZAT6، میزان آنتوسیانین و فعالیت سه آنزیم POD، CAT و SOD در ناحیه تحمل به تنش قرار گرفت که نشان‌دهنده‌ی وجود رابطه مثبت بین مقادیر بالاتر این صفات با هم و با تحمل تنش شوری در شلغم علوفه‌ای است. در سمت مقابل، تغییرات MDA در ناحیه حساسیت به تنش شوری واقع گردید که نشان‌دهنده‌ی ارتباط منفی مقادیر بالاتر MDA با دیگر صفات اندازه‌گیری شده و ارتباط مثبت آن با حساسیت به تنش است. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، می‌توان چنین عنوان نمود که احتمالاً تغییرات بیان ژن ZAT6 به شکل مستقیم یا غیرمستقیم در تنظیم پاسخ‌های گیاه شلغم علوفه‌ای به تنش شوری به‌خصوص از مسیر صفات ارزیابی‌شده شرکت دارد.

مشخص شده است که عامل رونویسی ZAT6 از طریق اتصال به پروموتور ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین‌ها سبب افزایش سطوح آنتوسیانین در پاسخ به تنش‌های اکسیداتیو در گیاه آرابیدوپسیس می‌گردد (Shi et al., 2018a). بعلاوه، نقش این ژن در القای تحمل تنش سرما از طریق مسیر مولکول تنظیمی ملاتونین به اثبات رسیده است (Shi and Chan 2014). به شکل جالبی، مولکول ملاتونین در شبکه ژنی پیش‌بینی‌شده نیز وجود داشت که با دیگر گره‌های شبکه از جمله هورمون‌ها مرتبط بود (شکل ۲). به‌تازگی ملاتونین و نقش آن در رشد، تکامل و پاسخ‌های محیطی گیاهان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار شده است (Altaf et al., 2021). مشخص شده است که این مولکول تنظیمی، به‌طور مستقل یا با همکاری با سایر مولکول‌های تنظیمی از جمله هورمون‌های ABA، سالیسیلیک اسید و... آبشارهای تنظیم‌کننده‌ی فعالیت‌های رونوشتی ژنوم در پاسخ به القانات داخلی و محیطی را فعال می‌نماید (Altaf et al., 2021; Arnao et al., 2021). همچنین، مشخص شده است که یکی از سیستم‌های اصلی که توسط ملاتونین کنترل می‌شود، سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه است (Shafi et al., 2021). برای مثال مشخص شده است که ملاتونین سبب ارتقاء سیستم دفاعی و آنتی‌اکسیدانی هندوانه می‌شود (Nawaz et al., 2018). همچنین ملاتونین سطوح آنتوسیانین و

منابع

- Altaf, M.A., Shahid, R., Ren, M.X., Mora Poblete, F., Arnao, M.B., Naz, S., Anwar, M., Altaf, M.M., Shahid, S., Shakoob, A.J., 2021. Phytomelatonin: An overview of the importance and mediating functions of melatonin against environmental stresses. *Physiologia Plantarum* 172, 820-846.
- Ambrosino, L., Colantuono, C., Diretto, G., Fiore, A., Chiusano, M.L., 2020. Bioinformatics resources for plant abiotic stress responses: state of the art and opportunities in the fast evolving-omics era. *Plants* 9, 591.
- Amiri, M., Eslamian, S.S., 2010. Investigation of climate change in Iran. *Journal of Environmental Science and Technology*. 3, 208-216.
- Amirian Mojarad, M., Hassandokht, M.R., Abdossi, V., Tabatabaei, S.A., Larijani, K., 2018. Effects of salt stress on some morphological and physiological traits of Iranian turnip accessions (*Brassica rapa* L.). *Iranian Journal of Horticultural Science* 49, 579-587. [In Persian with English summary].
- Anwar, A., Kim, J.K., 2020. Transgenic breeding approaches for improving abiotic stress tolerance: recent progress and future perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 21, 2695.
- Arnao, M.B., Hernández-Ruiz, J.J.C.p., science, p., 2021. Melatonin against environmental plant stressors: a review. *Current Protein & Peptide Science*. 22, 413 - 429.
- Ashraf, M., Akram, N.A.J.B.a., 2009. Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: an analytical comparison. *Biotechnology Advances*. 27, 744-752.
- Audic, S., Claverie, J.-M., 1997. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Research*. 7, 986-995.
- Beyer Jr, W.F., Fridovich, I., 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*. 161, 559-566.
- Castelán-Muñoz, N., Herrera, J., Cajero-Sánchez, W., Arrizubieta, M., Trejo, C., García-Ponce, B., Sánchez, M.d.I.P., Álvarez-Buylla, E.R., Garay-Arroyo, A.J., 2019. MADS-box genes are key components of genetic regulatory networks involved in abiotic stress and plastic developmental responses in plants. *Frontiers in Plant Science*. 10, 853.
- Chance, B., Maehly, A.C., 1955. Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology*, 2, 764-775. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(55\)02300-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8)
- Dresselhaus, T., Hückelhoven, R., 2018. Biotic and abiotic stress responses in crop plants. *Agronomy*. 8(11), 267; <https://doi.org/10.3390/agronomy8110267>
- Fan, Z.-Q., Tan, X.-L., Chen, J.-W., Liu, Z.-L., Kuang, J.-F., Lu, W.-J., Shan, W., Chen, J.-Y., 2018. BrNAC055, a novel transcriptional activator, regulates leaf senescence in Chinese flowering cabbage by modulating reactive oxygen species production and chlorophyll degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, 9399-9408.
- Ferguson, J.N.J., 2019. Climate change and abiotic stress mechanisms in plants. *Emerging Topics in Life Sciences* 3, 165-181.
- Foyer, C.H., 2018. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. *Environmental and Experimental Botany* 154, 134-142.
- Francini, A., Sebastiani, L., 2019. Abiotic stress effects on performance of horticultural crops. *Horticulturae*. 5, 67.
- Ghorbel, M., Saibi, W., Brini, F., 2020. Abiotic Stress Signaling in Brassicaceae Plants. *Journal of Soil and Plant Biology*. 1, 138-150.
- Haak, D.C., Fukao, T., Grene, R., Hua, Z., Ivanov, R., Perrella, G., Li, S.J., 2017. Multilevel regulation of abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Plant Science*. 8, 1564.
- Han, G., Lu, C., Guo, J., Qiao, Z., Sui, N., Qiu, N., Wang, B.J., 2020. C2H2 zinc finger proteins: master regulators of abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Plant Science* 11, 115.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S.M., Mahmud, J.A., Fujita, M., Fotopoulos, V.J., 2020. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants* 9, 681.
- Knörzer, O.C., Burner, J., Boger, P., 1996. Alterations in the antioxidative system of

- suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. *Physiologia Plantarum*. 97, 388-396.
- Kovinich, N., Kayanja, G., Chanoca, A., Otegui, M.S., Grotewold, E.J., 2015. Abiotic stresses induce different localizations of anthocyanins in *Arabidopsis*. *Plant Signaling and Behavior*. 10, e1027850.
- Koyro, H.W., Ahmad, P., Geissler, N., 2012. Abiotic stress responses in plants: An overview. In: Ahmad, P., Prasad, M. (eds.), *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0815-4_1
- Krizek, D.T., Kramer, G.F., Upadhyaya, A., Mirecki, R.M., 1993. UV-B response of cucumber seedlings grown under metal halide and high pressure sodium/deluxe lamps. *Physiologia Plantarum*. 88, 350-358.
- Li, J., Yang, Y., Sun, K., Chen, Y., Chen, X., Li, X.J.M., 2019. Exogenous melatonin enhances cold, salt and drought stress tolerance by improving antioxidant defense in tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Molecules and Cells*. 24, 1826.
- Li, N., Zhang, Z., Chen, Z., Cao, B., Xu, K., 2021a. Comparative transcriptome analysis of two contrasting Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) genotypes reveals that ion homeostasis is a crucial biological pathway involved in the rapid adaptive response to salt stress. *Frontiers in Plant Science*. 12, 1093.
- Li, X., Ahammed, G.J., Zhang, X.-N., Zhang, L., Yan, P., Zhang, L.-P., Fu, J.-Y., Han, W.-Y.J., 2021b. Melatonin-mediated regulation of anthocyanin biosynthesis and antioxidant defense confer tolerance to arsenic stress in *Camellia sinensis* L. *Journal of Hazardous Materials*. 403, 123922.
- Li, X., Lv, X., Wang, X., Wang, L., Zhang, M., Ren, M.J., 2018. Effects of abiotic stress on anthocyanin accumulation and grain weight in purple wheat. *Crop and Pasture Science*. 69, 1208-1214.
- Liu, X.-M., Nguyen, X.C., Kim, K.E., Han, H.J., Yoo, J., Lee, K., Kim, M.C., Yun, D.-J., Chung, W.S.J., 2013. Phosphorylation of the zinc finger transcriptional regulator ZAT6 by MPK6 regulates *Arabidopsis* seed germination under salt and osmotic stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 430, 1054-1059.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 25, 402-408.
- Mann, T., 1984. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Annals of Biochemistry*. 72, 248-254.
- Masoudi-Nejad, A., Tonomura, K., Kawashima, S., Moriya, Y., Suzuki, M., Itoh, M., Kanehisa, M., Endo, T., Goto, S., 2006. E-Assembler: online bioinformatics service for large-scale processing, clustering and assembling ESTs and genomic DNA fragments. *Nucleic Acids Research*. 34, W459-W462.
- Mittal, N., Thakur, S., Verma, H., Kaur, A., 2018. Interactive effect of salinity and ascorbic acid on *Brassica rapa* L. plants. *Global Journal of Bio-Science and BioTechnology*. 7, 27-29.
- Moghaddam, P., Koocheki, A., 2001. History of research on salt-affected lands of Iran: present status and future prospects—halophytic ecosystems. *Prospects of Saline Agriculture in the Arabian Peninsula: Proceedings of the International Seminar on Prospects of Saline Agriculture in the GCC Countries*, pp. 18-20.
- Morales, M., Munné-Bosch, S.J.P., 2019. Malondialdehyde: facts and artifacts. *Plant Physiology*. 180, 1246-1250.
- Naseri, A., Sharghi, M., Hasheminejad, S.M.H., Chemistry, 2021. Enhancing gene regulatory networks inference through hub-based data integration. *Computational Biology Chemistry*, 95, 107589.
- Nawaz, M.A., Jiao, Y., Chen, C., Shireen, F., Zheng, Z., Imtiaz, M., Bie, Z., Huang, Y.J., 2018. Melatonin pretreatment improves vanadium stress tolerance of watermelon seedlings by reducing vanadium concentration in the leaves and regulating melatonin biosynthesis and antioxidant-related gene expression. *Journal of Plant Physiology*. 220, 115-127.
- Nikitin, A., Egorov, S., Daraselia, N., Mazo, I., 2003. Pathway studio—the analysis and navigation of molecular networks. *Bioinformatics*. 19, 2155-2157.
- Noreen, Z., Ashraf, M., Akram, N.J., 2010. Salt-induced regulation of some key antioxidant enzymes and physio-biochemical phenomena in five diverse cultivars of turnip (*Brassica rapa* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science*. 196, 273-285.

- Raman, K., Damaraju, N., Joshi, G.K., 2014. The organisational structure of protein networks: revisiting the centrality–lethality hypothesis. *Systems and Synthetic Biology*. 8, 73-81.
- Romualdi, C., Bortoluzzi, S., d'Alessi, F., Danieli, G.A., 2003. IDEG6: a web tool for detection of differentially expressed genes in multiple tag sampling experiments. *Physiological Genomics*. 12, 159-162.
- Sahoo, J.P., Behera, L., Sharma, S.S., Praveena, J., Nayak, S.K., Samal, K.C.J.A.J.o.P.S., 2020. Omics Studies and Systems Biology Perspective towards Abiotic Stress Response in Plants. *American Journal of Plant Sciences*. 11, 2172.
- Shafi, A., Singh, A.K., Zahoor, I., 2021. Melatonin: Role in Abiotic Stress Resistance and Tolerance. In: Aftab, T., Hakeem, K.R. (eds.), *Plant Growth Regulators*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-61153-8_12
- Shamloo-Dashtpaderdi, R., Lindlöf, A., Niazi, A., Pirasteh-Anosheh, H.J., 2019. LOS2 gene plays a potential role in barley (*Hordeum vulgare* L.) salinity tolerance as a hub gene. *Molecular Breeding*. 39, 1-12.
- Shamloo-Dashtpaderdi, R., Razi, H., Ebrahimie, E., Niazi, A., 2018. Molecular characterization of Brassica napus stress related transcription factors, BnMYB44 and BnVIP1, selected based on comparative analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Eutrema salsugineum* transcriptomes. *Molecular Biology Reports*. 45, 1111-1124.
- Shamloo-Dashtpaderdi, R., Razi, H., Ebrahimie, E., 2015. Mining expressed sequence tags of rapeseed (*Brassica napus* L.) to predict the drought responsive regulatory network. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 21, 329-340.
- Shamloo-Dashtpaderdi, R., Lindlöf, A., Aliakbari, M., Pirasteh-Anosheh, H.J., 2020. Plausible association between drought stress tolerance of barley (*Hordeum vulgare* L.) and programmed cell death via MCI and TSN1 genes. *Physiologia Plantarum* 170, 46-59.
- Sherman, B.T., Tan, Q., Collins, J.R., Alvord, W.G., Roayaei, J., Stephens, R., Baseler, M.W., Lane, H.C., Lempicki, R.A., 2007. The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists. *Genome Biology*. 8, 1-16.
- Shi, H., Liu, G., Wei, Y., Chan, Z.J.P.m.b., 2018a. The zinc-finger transcription factor ZAT6 is essential for hydrogen peroxide induction of anthocyanin synthesis in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology Reporter*. 97, 165-176.
- Shi, H., Zhang, S., Lin, D., Wei, Y., Yan, Y., Liu, G., Reiter, R.J., Chan, Z.J., 2018b. Zinc finger of Arabidopsis thaliana 6 is involved in melatonin-mediated auxin signaling through interacting INDETERMINATE DOMAIN 15 and INDOLE-3-ACETIC ACID 17. *Journal of Pineal Research*. 65, e12494.
- Tang, W., Luo, C.J.O.l.s., 2018. Overexpression of zinc finger transcription factor ZAT6 enhances salt tolerance. *Open Life Sciences* 13, 431-445.
- Valentovic, P., Luxova, M., Kolarovic, L., Gasparikova, O., 2006. Effect of osmotic stress on compatible solutes content, membrane stability and water relations in two maize cultivars. *Plant Soil and Environment*. 52, 184.
- Zaffagnini, M., Fermani, S., Marchand, C.H., Costa, A., Sparla, F., Rouhier, N., Geigenberger, P., Lemaire, S.D., Trost, P., 2019. Redox homeostasis in photosynthetic organisms: novel and established thiol-based molecular mechanisms. *Antioxidants & Redox Signaling*. 31, 155-210.
- Zhang, H., Zhu, J., Gong, Z., Zhu, J.-K.J., 2021. Abiotic stress responses in plants. *Nature Reviews Genetics*, 23, 104–119