

Study of Biochemical Traits and Expression of Genes Involved in the Antioxidant Production Pathway in Rapeseed Under the Influence of the Mutagenic Substance Ethyl Methane Sulfonate (EMS)

Navabpour^{1*}, S. and Nazari², M.

Received Date: 27 April 2023

Accepted Date: 10 November 2023

(Research Article)

Abstract

After cereals, oilseeds are one of the most important food items globally and play a significant role in food security due to their high oil and protein content. Rapeseed is considered one of the most important oilseeds worldwide, with an annual production of about 27 million tons. Increasing plant yield is a primary goal of plant breeding, and increasing genetic diversity through appropriate breeding methods is crucial. One effective method for creating genetic diversity is the use of mutagenesis. In this study, mutagenesis with ethyl methane sulfonate (EMS) was conducted to determine optimal concentrations and investigate biochemical changes and gene expression responses of ascorbic peroxidase (APX), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT). Rapeseed seeds were treated with four concentrations of EMS, including zero (control), 0.25, 0.50, and 0.75%. After treatment, the seeds were sown in laboratory conditions for a maximum of 24 hours. Seed cultivation took place in a greenhouse, and at the fourth leaf stage, oxidative chemical stress was induced with 1 M silver nitrate. Out of 3000 mutant lines, 50 lines tolerant to each EMS concentration were selected at each concentration (zero (control), 0.25, 0.50, and 0.75%). The experimental design was completely randomized with three replications for the four EMS treatments. Sampling was conducted at the eight-leaf stage. The results indicated significant differences in the measured biochemical traits between treatments with increasing EMS concentration, showing an overall increasing trend. The expression of *CAT*, *APX*, and *SOD* genes increased compared to the control at different EMS levels. The findings suggest that as the EMS concentration increases, the plant's ability to produce oxygen free radicals and their negative effects also increase, prompting a defense response in the plant through increased expression of related genes and enhanced antioxidants.

Keywords: Ethyl Methane Sulfonate, Genetic diversity, Rapeseed, Gene expression

1 and 2. Professor and Ph.D. Student, Respectively, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

✉: Corresponding author Email: s.navabpour@gau.ac.ir

مطالعه صفات بیوشیمیایی و بیان برخی ژن‌های دخیل در مسیر تولید آنتی‌اکسیدان در کلزا تحت تأثیر ماده جهش‌زای اتیل متان سولفونات (EMS)

Study of Biochemical Traits and Expression of Genes Involved in the Antioxidant Production Pathway in Rapeseed Under the Influence of the Mutagenic Substance Ethyl Methane Sulfonate (EMS)

سعید نواب پور^{۱*} و منیره نظری^۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۰۷

چکیده

افزایش تنوع ژنتیکی از اهداف اساسی در به‌نژادی گیاهان می‌باشد و القای جهش روشی برای افزایش تنوع ژنتیکی است. در این مطالعه، جهش‌زایی با اتیل متان سولفونات (EMS) به‌منظور تعیین غلظت‌های بهینه و بررسی برخی تغییرات بیوشیمیایی و پاسخ بیان ژن اسکوربات پراکسیداز (APX)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) در گیاه کلزا انجام شد. بذور کلزا با چهار غلظت EMS شامل صفر (شاهد)، ۰/۲۵، ۰/۵۰ و ۰/۷۵ درصد تیمار شدند و پس از تیمار، بذور برای مدت حداکثر ۲۴ ساعت در شرایط آزمایشگاهی کاشته شدند. کشت بذور در گلخانه انجام شد و در مرحله چهار برگی، تنش شیمیایی اکسیداتیو با نیترات نقره یک مولار اعمال گردید. از میان ۳۰۰۰ لاین جهش‌یافته، ۵۰ لاین متحمل در هر یک از غلظت‌های EMS انتخاب شدند. طرح آزمایشی به‌صورت کاملاً تصادفی با سه تکرار برای چهار تیمار EMS طراحی شد. نمونه‌برداری در مرحله هشت برگی انجام شد. نتایج نشان دادند که با افزایش غلظت EMS، صفات بیوشیمیایی اندازه‌گیری‌شده تفاوت معنی‌داری بین تیمارها داشتند و به‌طور کلی روند افزایشی گزارش شد. بیان ژن کاتالاز و سوپراکسیداز و اسکوربیک پراکسیداز در همه غلظت‌های اتیل متان سولفونات نسبت به شاهد افزایش یافت و در غلظت ۰/۷۵ درصد بیشترین افزایش بیان مشاهده شد. همچنین یافته‌ها نشان می‌دهد که با افزایش غلظت EMS ظرفیت تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و اثرات منفی آن‌ها افزایش می‌یابد که در نتیجه گیاه با پاسخ دفاعی از طریق افزایش بیان ژن‌های مرتبط و تقویت آنتی‌اکسیدان‌ها واکنش نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: اتیل متان سولفونات، تنوع ژنتیکی، کلزا، بیان ژن

۱ و ۲. به‌ترتیب استاد و دانشجوی دکتری، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

*: نویسنده مسوول Email: s.navabpour@gau.ac.ir

مقاله مستخرج از رساله نویسنده دوم به راهنمایی نویسنده اول آقای دکتر سعید نواب پور می‌باشد.

مقدمه

کلزا (*Brassica napus* L.) یک محصول روغنی اساسی است که به‌عنوان سومین منبع بزرگ روغن نباتی در سطح جهانی رتبه‌بندی می‌شود. دانه‌های کلزا حاوی ۴۵-۵۰ درصد روغن با پروفایل چربی سالم هستند که برای مصرف انسانی مناسب است (Jhingan et al., 2023). دانه‌های روغنی پس از غلات، دومین ذخایر غذایی جهان را تشکیل می‌دهند، این محصولات علاوه بر دارا بودن ذخایر غنی اسیدچرب، حاوی پروتئین نیز می‌باشند، در این میان کلزا به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گیاهان روغنی در سطح جهان مطرح است (Li et al., 2023). افزایش جمعیت دنیا و بهبود استانداردهای زندگی موجب افزایش تولید کلزا برای مصارف خوراکی شده است. متأسفانه در کشور ما افزایش مصرف با افزایش تولید همگام نبوده است و تنها ۱۰ درصد روغن موردنیاز کشور در داخل تولید می‌گردد. با توجه به سیاست‌های وزارت کشاورزی مبنی بر توسعه و افزایش سطح زیر کاشت این محصول جهت رسیدن به خودکفایی و حذف یا کاهش واردات روغن، دستیابی به ارقامی با خصوصیات بهینه و عملکرد بالا مدنظر قرار می‌گیرد (Pasandideh Arjomand et al., 2024). در این راستا استفاده از روش‌های به‌نژادی مناسب جهت بهبود کمی و کیفی این محصول امری ضروری می‌باشد. تنوع ژنتیکی مهم‌ترین رکن در موفقیت روش‌های به‌نژادی است. در این زمینه استفاده از جهش‌کاری قابل‌قبول دارد. با کمک جهش ژنتیکی نه‌تنها تنوع ژنتیکی جمعیت افزایش می‌یابد، بلکه با توجه به امکان ترکیب لاین‌های جهش یافته با یکدیگر و ژنوتیپ‌های موجود دسترسی به ژنوتیپ‌های مطلوب ممکن می‌گردد (Hoffmann et al., 2021). از مواد شیمیایی مختلفی می‌توان به‌عنوان مواد جهش‌زا استفاده نمود. مواد آلکلیلات‌کننده قوی‌ترین مواد جهش‌زا را تشکیل می‌دهند که با اضافه نمودن یک گروه آلکیل (اتیل یا متیل) در جایگاه‌های مختلف DNA، جهش‌های هم‌جنس یا غیر هم‌جنس را القا می‌کنند. این مواد منجر به تغییر در باندهای هیدروژنی می‌شوند. مواد آلکلیلات‌کننده شامل اتیل متان سولفونات (EMS)، متیل متان سولفونات (MMS)، اتیل اتان سولفونات (EES)، اتیلن ایمین (EI)، سولفور موستارد، نیتروژن موستارد و غیره هستند که از بین آن‌ها سه ماده اول کاربرد بیشتری دارند. از آنجایی که اثر مواد آلکلیلات‌کننده همانند پرتوهای یونیزه کننده است به آنها مواد شیمیایی اشعه‌ای نیز اطلاق می‌شود. این مواد منجر به تغییر شکل‌های کوچک و بزرگ در ساختار بازها می‌شود و جهش‌های هم‌جنس و ناهم‌جنس را القاء می‌کند (Handayani et al., 2024).

تنش اکسیداتیو در نتیجه عدم تعادل بین تولید مازاد ROS (Reactive Oxygen Species) و یا کمبود در سطوح دفاع آنتی‌اکسیدانی درون‌زا و برون‌زا ایجاد می‌شود (Poblete Aro et al., 2015). اکسیژن برای گیاهان، همانند سایر موجودات زنده، نقش دوگانه‌ای ایفا می‌کند. از یک‌سو، اکسیژن برای رشد و نمو طبیعی ارگانیسم‌ها ضروری است و استفاده از آن اجتناب‌ناپذیر می‌باشد؛ از سوی دیگر، گونه‌های فعال اکسیژن می‌توانند با ایجاد آسیب‌های مرگبار به سلول‌ها ضمن فشار اکسایشی، سلول‌ها را تحت تأثیر قرار دهند. گونه‌های فعال اکسیژن از انتقال الکترون تهییج شده به اکسیژن معمولی تولید می‌شوند و شامل انواع مختلفی مانند سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل، رادیکال پراکسید و اکسیژن منفرد می‌شوند (Qi et al., 2024). این گونه‌ها بسیار فعال بوده و قابلیت واکنش با بسیاری از مولکول‌های درون‌سلولی مانند اسیدهای نوکلئیک، رنگ‌دانه‌ها، پروتئین‌ها و چربی‌ها را دارند و سلسله‌ای از فرآیندهای تخریبی را به‌وجود می‌آورند (Ashraf, 2009). در مقابل، گیاهان قادرند با تولید انواع ترکیبات آنتی‌اکسیدان آنزیمی (مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتایون رداکتاز و آسکوربات پراکسیداز) و غیرآنزیمی (مانند کارتنوئید و آلفاتوکوفرول) گونه‌های فعال اکسیژن را حذف و اثر سمی آن‌ها را خنثی کنند (Meloni et al., 2003). با توجه به اهمیت تنش اکسیداتیو در این مطالعه به بررسی اثرات اتیل متان سولفونات در غلظت‌های متفاوت بر روند بیان برخی ژن‌های دفاعی و ویژگی‌های بیوشیمیایی در کلزا و همچنین مطالعه ارتباط تغییرات بیان ژن‌ها و ویژگی‌های یادشده در جهت شناسایی لاین جهش‌یافته برتر کلزا پرداخته خواهد شد.

مواد و روش‌ها

ژنوتیپ مورد بررسی از تلاقی لاین ۱۷ (حاصل پروژه به‌نژادی تحمل به تنش‌های غیرزنده) و رقم زراعی فالکون حاصل شد. رقم فالکون از ارقام پرمحصول اروپایی است نسبتاً زودرس و با ارتفاع حدود ۱۶۰ سانتی‌متر است. از آنجا که این رقم مقاومت بالایی به تنش‌های محیطی ندارد، این رقم با لاین شماره ۱۷ که حاصل یک پروژه اصلاحی برای شناسایی و معرفی لاین مقاوم به محیطی بود، تلاقی داده شد. به‌منظور اطمینان از القای مقاومت به تنش محیطی اعمال جهش با استفاده از اتیل متیل سولفونات در غلظت‌های صفر (شاهد)، ۰/۲۵، ۰/۵۰ و ۰/۷۵ درصد انجام شد و بذور تیمار شده در مدت حداکثر ۲۴ ساعت بعد کشت گردیدند. کشت بذور در کرت‌های یک مترمربعی در شرایط گلخانه طی چند نوبت انجام شد و در مرحله چهار برگی با اعمال تنش شیمیایی اکسیداتیو با کاربرد

میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: برای اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز یک میلی لیتر ترکیب واکنش (۱۳ میلی مول متیونین، ۲۵ میکرومول نیتروبلوتترازولیوم، ۲ میلی مولار محلول EDTA (اتیلن دی آمین تترا استیک اسید)، ۱/۵ میلی لیتر از محلول یک مولار فسفات بافر (پی اچ ۷/۸)، و ۲۰ میکرولیتر ریبوفلاوین یک میلی مولار و ۵۰ میلی مول سدیم بی کربنات) به ۰/۱ میلی لیتر عصاره آنزیمی اضافه شد و در یک مکان با دو لامپ فلورسنت ۲۰ وات به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و سپس جذب نور در طول موج ۵۶۰ نانومتر در دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد.

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز: فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس میزان مصرف پراکسید هیدروژن انجام شد. دو میلی لیتر از عصاره آنزیمی به همراه یک میلی لیتر از پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی مولار برای کاهش جذب نوری به مدت دو دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر استفاده شد.

میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز: برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی با ۰/۷۵ میلی مولار (5,5'-DNTB (dithiobis(2-nitrobenzoic acid)، ۰/۱ میلی مولار NADPH و یک میلی مولار گلوتاتیون ردوکتاز به حجم کلی یک میلی لیتر با هم ترکیب شدند سپس افزایش جذب نور در طول موج ۴۱۲ نانومتر ثبت شد.

میزان فعالیت آنزیم اسکوربیک پراکسیداز I با روش ناکانو و آسادا (Nakano & Asada, 1981) محاسبه شد. جهت انجام این آزمون یک میلی لیتر از ترکیب (۵۰ میلی مولار بافر فسفات پتاسیم (پی اچ ۷/۸)، ۰/۵ میلی مولار آسکوربات، ۰/۵ میلی مولار هیدروژن پراکسید) با ۱۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی با هم ترکیب شدند و سپس فعالیت آنزیمی با کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر مشخص شد.

میزان نمک اسکوربات با کاربرد روش آراکاوا و همکاران (Arakawa *et al.*, 1981) صورت پذیرفت. میزان جذب نوری در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت شد. منحنی استاندارد در دامنه ۰-۲۵ نانومول تهیه و نتایج حاصله از نمونه برحسب استاندارد تنظیم گردید.

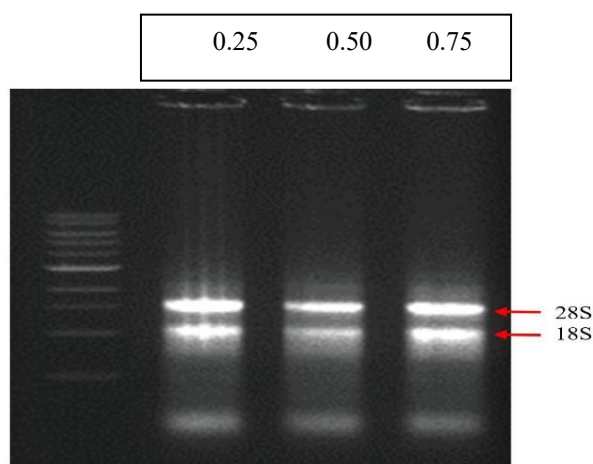
میزان آلفاتوکوفرول با استفاده از روش مون بوش و همکاران (Munné-Bosch *et al.*, ۱۹۹۹) اندازه گیری شد. آلفاتوکوفرول جدا شده به وسیله ستون التاسفر (OD=5µmol/L) در شدت ۱/۵ میلی لیتر بر دقیقه خالص سازی شد و غلظت آن با کمک دستگاه آشکارساز فرابنفش در طول موج برانگیختگی ۲۹۵ نانومتر و خروجی ۳۲۸ نانومتر تعیین گردید.

نیترا ت نقره یک مولار از بین حدود ۳۰۰۰ لاین جهش یافته تعداد ۵۰ لاین متحمل در هریک از غلظت های اتیل متان سولفونات (شامل صفر (شاهد)، ۰/۲۵، ۰/۵۰، و ۰/۷۵ درصد) انتخاب شد. با توجه به این که نقطه اشتراک تمام تنش های محیطی افزایش رادیکال های فعال اکسیژن است و عموماً فرآیند اثرگذاری این تنش ها از مسیر همین رادیکال ها است (Navabpour & Mazandarani, 2017). بر این اساس و با علم به این که شناسایی لاین های در حال تفکیک با اعمال مستقیم تنش های محیطی نظیر خشکی و شوری بسیار زمان بر است، از عامل تنش شیمیایی نیترا ت نقره که در سطح سلولی و مولکولی دقیقاً مشابه تنش های محیطی، فزاینده سطح رادیکال های فعال اکسیژن است و می تواند به عنوان جایگزینی مطمئن برای واکنش لاین های در حال تفکیک برای مقاومت به تنش های محیطی خشکی و شوری باشد، استفاده گردید (Navabpour *et al.*, 2024). آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار غلظت های اتیل متان سولفونات فوق الذکر و سه تکرار و هر تکرار شامل یک شاسی کشت با ۱۵ عدد گیاهیچه متحمل اجرا شد. نمونه برداری در مرحله هشت برگی انجام گرفت و نمونه ها بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند.

میزان رادیکال پراکسید هیدروژن با کمک روش برنان و فرنکل (Brennan & Frenkel, 1977) و با استفاده از کمپلکس پراکسید تیتانیوم ارزیابی گردید. میزان جذب در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت و به وسیله منحنی استاندارد غلظت پراکسید هیدروژن (H₂O₂) تصحیح گردید و نتایج برحسب واحد تنظیم شد. برای این منظور مقدار ۰/۳ گرم از بافت نمونه با ۰/۱ درصد (وزن / حجم) تری کلرواستیک اسید هموزنیزه شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ شد و سپس ۰/۵ میلی لیتر از محلول رویی به ۰/۵ میلی لیتر از بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار با پی اچ ۷ و یک میلی لیتر از پتاسیم یدید یک مولار اضافه شد. طیف جذبی محلول رویی در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. میزان پراکسید هیدروژن نمونه های مختلف بر اساس منحنی استاندارد غلظت های مختلف هیدروژن پراکسید محاسبه شد.

میزان یون سوپراکسید (O₂⁻) با استفاده از روش السترن و هیوپل (Elstner & Heupel, 1976) اندازه گیری شد. میزان جذب در طول موج ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه جذب نوری مدل Uvikon-Kontron خوانده شد.

اصلی و خانه‌دار با استفاده از اطلاعات توالی موجود پایگاه اینترنتی NCBI طراحی شدند. خصوصیات و توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ آمده است.



شکل ۱: کیفیت RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز
Fig. 1: Quality of extracted RNA on agarose gel

جدول ۱: چرخه PCR استاندارد جهت تأیید ساخت cDNA

Table1: Standard PCR for cDNA synthesis

چرخه Cycle	مرحله Step	دما (درجه سانتی‌گراد) Temperature (°C)	زمان (دقیقه) Time (minute)
1	1	95	۳ دقیقه 3 minute
	1	95	۱۰ ثانیه 10 second
2 (35X)	2	60	۱۰ ثانیه 10 second
	3	72	۲۰ ثانیه 20 second
	1	72	۵ دقیقه 5 minute

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی با استفاده از رنگ SYBR Green I و کیت سایبربیوپارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران) در دستگاه iQ5 (شرکت بیورد، آمریکا) انجام شد. شرایط بهینه برای اجرای واکنش Real-Time PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر و از هر نمونه سه تکرار، مطابق جدول ۳ فراهم گردید. جهت انجام Real-Time PCR از چرخه حرارتی که در جدول ۴ نشان داده شده است، استفاده گردید.

برای ارزیابی و محاسبه میزان بیان ژن‌ها دو روش کمی کردن نسبی وجود دارد که در این مطالعه از روش C_t مقایسه‌ای ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) استفاده شد (Pfaffl, 2002). در این آزمایش از ژن خانه‌دار *GAPDH* به عنوان ژن مرجع استفاده گردید. داده‌های به دست آمده از دستگاه توسط

کاروتنوئید با انجام اسپکتوفوتومتری و استفاده از روش ویل اسپچمر (Welschmeyer, 1994) اندازه‌گیری شد. بدین منظور از ۰/۱ گرم نمونه برگ با استفاده از استون ۸۰ عصاره‌گیری شد. سپس عصاره با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر در طول موج‌های ۴۸۰ و ۵۱۰ نانومتر، قرائت شد.

در سنجش TBARM (Measurement of Thiobarbituric Acid Reactive Material) که معیاری برای اندازه‌گیری میزان تنش اکسیداسیونی است، مقدار مالون‌دی‌آلدئید که محصول نهایی و نسبتاً پایدار واکنش اکسیداسیون مولکول‌های بزرگ است اندازه‌گیری می‌شود. در این خصوص از روش هگگ و همکاران (Hagege et al., 1990) استفاده گردید. مقدار جذب محلول حاصل در طول موج ۵۳۲ و ۵۹۰ نانومتر توسط دستگاه جذب نوری مدل Uvikon – Kontron اندازه‌گیری گردید.

به منظور استخراج RNA از کیت بایوزول (Bioflex Japan) استفاده شد. جهت تعیین کمیت RNA استخراج شده از دستگاه Nanophotometer مدل پی ۳۰۰ ساخت شرکت IPMLN استفاده شد. جهت تعیین کیفیت، RNAهای استخراج شده بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند. به منظور از بین بردن DNA ژنومی برای تمامی نمونه‌ها بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز انجام شد. ساخت cDNA توسط روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز انجام شد. برای ساخت cDNA هر نمونه از RNA بعد از این که تحت تیمار DNase قرار گرفت داخل تیوب جدید ریخته شد. به هر تیوب که حاوی ۱۱ میکرولیتر از محتویات مذکور بود، مقدار یک میکرولیتر آغازگر oligo dt به همراه ۰/۵ میکرولیتر ddH₂O افزوده شد تا حجم نهایی آن به ۱۲/۵ رسید. سپس به مدت پنج دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس چهارمیکرولیتر بافر ۵X ساخت cDNA، ۰/۵ میکرولیتر RNase inhibitor، دو میکرولیتر مخلوط dNTP با غلظت ۱۰ میکرومولار افزوده شد و در آخر مقدار یک میکرولیتر آنزیم رونوشت برداری معکوس افزوده شده تا محلول مذکور حجم به ۲۰ میکرولیتر رسید. سپس واکنش RT که پنج دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. از این رشته cDNA، در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده گردید. به منظور بررسی کیفیت cDNAهای ساخته شده، cDNAها توسط ژن خانه‌دار *GAPDH* توسط PCR استاندارد تکثیر شدند (جدول ۱). پس از تأیید cDNAهای ساخته شده توسط آغازگر ژن خانه‌دار، ژن‌های اختصاصی در PCR استاندارد تکثیر شده و مورد ارزیابی قرار گرفتند. آغازگرهای مورد نیاز برای ژن‌های

نرم افزار REST مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و نمودارهای مربوطه توسط نرم افزار Excel 2007 رسم شدند.

جدول ۲: خصوصیات و توالی آغازگرهای ژن اصلی و ژن خانه دار

Table 2: Specifications and sequences of the main gene and housekeeping gene

نام ژن Gene name	توالی آغازگر Primer sequence	درصد GC GC%	دمای ذوب Tm (°C)	طول محصول Amplicon size	شماره دسترسی Accession no.
سوپراکسید دیسموتاز <i>Superoxide dismutase</i>	For: 5'CATGCCCTTAGTGACACCACC3' Rev: 5'GGCATGGCGATCATCATCTTC3'	60 57.14	63.42 63	227	MH281947.1
کاتالاز <i>Catalase</i>	For: 5'TGACGCACGAGATCCGCAG3' Rev: 5'CCAAACCGCAATAAGAGCACA3'	63.16 55	60.74 60.37	116	XM_013797970.2
اسکوربیک پراکسیداز <i>Ascorbic peroxidase</i>	For: 5'AGCAGTTCCTTACCATCTCTC3' Rev: 5'GGTGGCTGGGGCTTGTCTC3'	55 63.5	56.9 57.6	224	AB901371.1
گلیسرآلدهید سه فسفات دهیدوژناز <i>GAPDH</i>	For: 5'GCTACGCAGAAGACAGTTGATGG3' Rev: 5'TGGGCACACGGAAGGACATAC3'	50 55	60.49 60.97	202	EF 592180

جدول ۳: مواد مورد استفاده برای اجرای واکنش های Real-Time PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر

Table 3: Materials used for Real-Time PCR in 20 µl

حجم مورد نیاز برای یک واکنش (میکرولیتر) Volume For 1 PCR reaction	ماده Material
10	مسترمیکس ۲X ریل تایم پی سی آر 2X Real-Time PCR Master Mix
1	آغازگر مستقیم (۱۰ میکرومولار) Forward primer (10µM)
1	آغازگر معکوس (۱۰ میکرومولار) Reverse primer (10µM)
5	cDNA نمونه cDNA sample

جدول ۴: چرخه حرارتی واکنش زنجیره ای پلی مرز در زمان واقعی

Table 4: Thermal cycling parameters for Real-Time PCR

دما (درجه سانتیگراد) Temperature (°C)	زمان Time	مرحله Step	تعداد چرخه Cycle
95	۳ دقیقه 10 minute	واسرشت Denaturing	یک چرخه 1 cycle
95	۱۰ ثانیه 10 second	واسرشت Denaturing	۴۰ چرخه 40 cycle
60	۱۰ ثانیه 10 second	اتصال Annealing	
72	۱۰ ثانیه 10 second	تکثیر Extension	
72	۵ دقیقه 10 minute	تکثیر نهایی Final extension	یک چرخه 1 cycle

اندازه گیری شده در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی دار

وجود دارد (جدول ۵).

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که بین غلظت های مختلف اتیل متان سولفونات در تمامی صفات بیوشیمیایی

جدول ۵: نتایج تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده

Table 5: Analysis of variance for the effect of different EMS doses on biochemical traits

میانگین مربعات صفات اندازه‌گیری شده Mean square of measured traits										درجه	منابع
آنزیم	آنزیم	پراکسید	آنزیم	یون	سوپراکسید	کاروتنوئید	TBARM	اسید	آلفاتوکوفرول	آزادی	تغییرات
گلوتاتین	اسکوربیک	هیدروژن	کاتالاز	سوپراکسید	دیسموتاز	Carotenoid		اسکوربیک	aTocopherol	df	S.O.V.
Glutathione reductase	Ascorbic peroxidase enzyme	Hydrogn peroxide	catalase	Superoxide	Superoxide dismutase			Ascorbiacid			
236.92**	658.96**	13.79**	9.9**	19.4**	1243.39**	44.59**	175.71**	8.9**	1532.95**	3	EMS
16.32	58.09	0.6	0.8	0.2	3.5	9.2	3.9	0.4	22	8	خطا
											Error

*: معنی‌دار شدن در سطح ۵ درصد، **: معنی‌دار شدن در سطح ۱ درصد و ns: غیرمعنی‌دار

*: Significant at the 5% level, **: Significant at the 1% level and ns: Non-significant

نتایج مقایسه میانگین صفات بیوشیمیایی

نتایج مقایسه میانگین سطوح غلظت‌های مختلف اتیل متان سولفونات برای میزان آلفاتوکوفرول، اسیداسکوربیک، TBARM، آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، آنزیم کاتالاز، یون سوپراکسید، آنزیم اسکوربیک پراکسیداز و غلظت پراکسید هیدروژن نشان داد که غلظت ۰/۷۵ درصد باعث تولید بالاترین میزان این صفات بیوشیمیایی شد و با افزایش غلظت اتیل متان سولفونات میزان این صفات بیوشیمیایی سیر صعودی داشت.

همان‌طور که در شکل ۲(A) مشاهده می‌شود، میزان اسید اسکوربیک با افزایش غلظت EMS روندی افزایشی و معنی‌دار نشان داد؛ به‌طوری‌که مقدار آن از حدود $2 \mu\text{mol g}^{-1} \text{fw}$ در شاهد به حدود $8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{fw}$ در غلظت ۰/۷۵ EMS افزایش یافت که بیانگر افزایش حدود ۴ برابر نسبت به تیمار شاهد است. این افزایش می‌تواند نشان‌دهنده فعال شدن سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی گیاه در پاسخ به تنش القاشده توسط EMS باشد.

در شکل ۲(B) محتوای آلفا-توکوفرول نیز با افزایش غلظت EMS افزایش معنی‌داری را نشان داد. مقدار این ترکیب از حدود $50 \mu\text{mol g}^{-1} \text{fw}$ در شاهد به بیش از $110 \mu\text{mol g}^{-1} \text{fw}$ در غلظت ۰/۷۵ رسید که افزایشی بیش از ۱۲۰ درصد را نشان می‌دهد. آلفا-توکوفرول به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان لیپوفیل نقش مهمی در حفاظت غشاهای سلولی در برابر پراکسیداسیون لیپیدی دارد و افزایش آن می‌تواند بیانگر افزایش فشار اکسیداتیو در تیمارهای بالاتر EMS باشد.

بررسی شاخص TBARM شکل ۲(C) نشان داد که میزان پراکسیداسیون لیپیدی با افزایش EMS به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. مقدار TBARM از حدود $8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{fw}$ در شاهد به حدود $28 \mu\text{mol g}^{-1} \text{fw}$ در غلظت ۰/۷۵

EMS رسید که نشان‌دهنده افزایش بیش از ۳/۵ برابر است. این افزایش بیانگر تشدید آسیب اکسیداتیو به غشاهای سلولی در اثر تنش ناشی از EMS می‌باشد. همچنین نتایج شکل ۲(D) نشان داد که فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به‌عنوان یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی، به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر EMS قرار گرفت. فعالیت SOD از حدود $1 \mu\text{mol g}^{-1} \text{fw}$ در تیمار ۰/۷۵ EMS افزایش یافت که بیانگر افزایشی نزدیک به ۲/۵ برابر است. افزایش فعالیت این آنزیم نشان‌دهنده تلاش گیاه برای خنثی‌سازی رادیکال‌های سوپراکسید تولیدشده در شرایط تنش می‌باشد.

فعالیت آنزیم کاتالاز شکل ۲(E) از حدود $4 \mu\text{mol g}^{-1} \text{fw}$ در تیمار شاهد به حدود (۵/۵، ۸ و ۹) $\mu\text{mol g}^{-1} \text{fw}$ در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد EMS افزایش یافت که نشان‌دهنده افزایشی بیش از ۲/۵ برابر در بالاترین دُز نسبت به شاهد است.

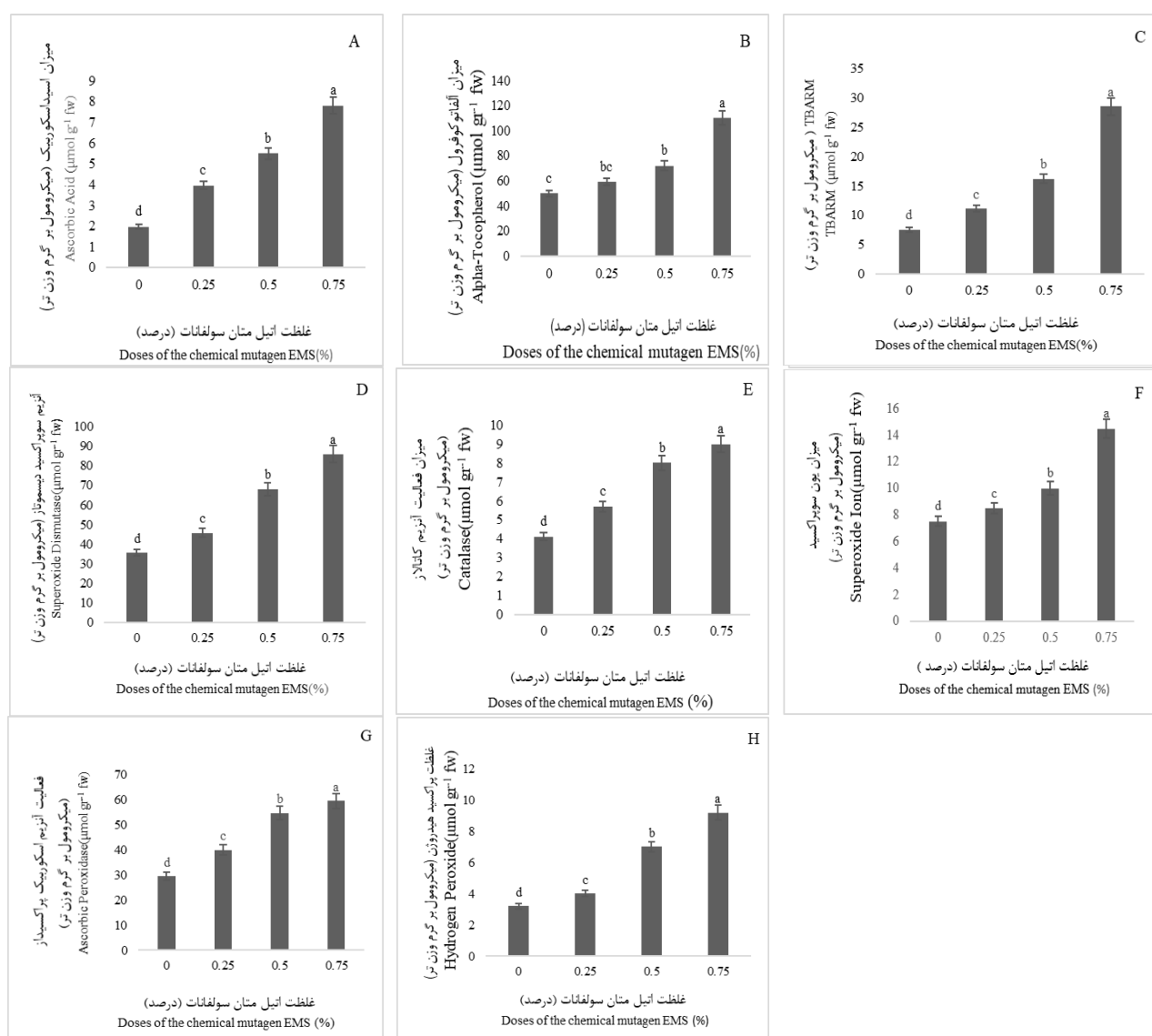
فعالیت یون سوپراکسید شکل ۲(F) نیز از حدود $1 \mu\text{mol g}^{-1} \text{fw}$ در تیمار شاهد به ترتیب به حدود ۸/۵، ۱۰ و $14 \mu\text{mol g}^{-1} \text{fw}$ در تیمارهای ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد EMS افزایش یافت که معادل افزایش تقریبی ۹۳ درصدی در بالاترین غلظت نسبت به شاهد است.

در مورد آنزیم اسکوربیک پراکسیداز شکل ۲(G) فعالیت آن از حدود $30 \mu\text{mol g}^{-1} \text{fw}$ در تیمار بدون EMS به حدود ۴۰، ۵۵ و $60 \mu\text{mol g}^{-1} \text{fw}$ در تیمارهای افزایشی EMS رسید که نشان‌دهنده افزایش حدود دو برابری فعالیت این آنزیم در غلظت ۰/۷۵ درصد است. میزان پراکسید هیدروژن شکل ۲(H) از حدود $3 \mu\text{mol g}^{-1} \text{fw}$ در تیمار شاهد به حدود ۴، ۷ و $9 \mu\text{mol g}^{-1} \text{fw}$ در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد

کاروتنوئید شد و بین سایر غلظت‌های مختلف اتیل متان سولفونات هیچ‌گونه اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نگردید و از لحاظ میزان تولید کاروتنوئید در شرایط یکسانی قرار داشتند. نتایج مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف اتیل متان سولفونات برای میزان فعالیت آنزیم گلوکاتین نشان داد که غلظت ۰/۷۵ درصد باعث تولید بالاترین میزان فعالیت آنزیم گلوکاتین شد و با افزایش غلظت اتیل متان سولفونات میزان فعالیت آنزیم گلوکاتین سیر صعودی نامنظمی داشت.

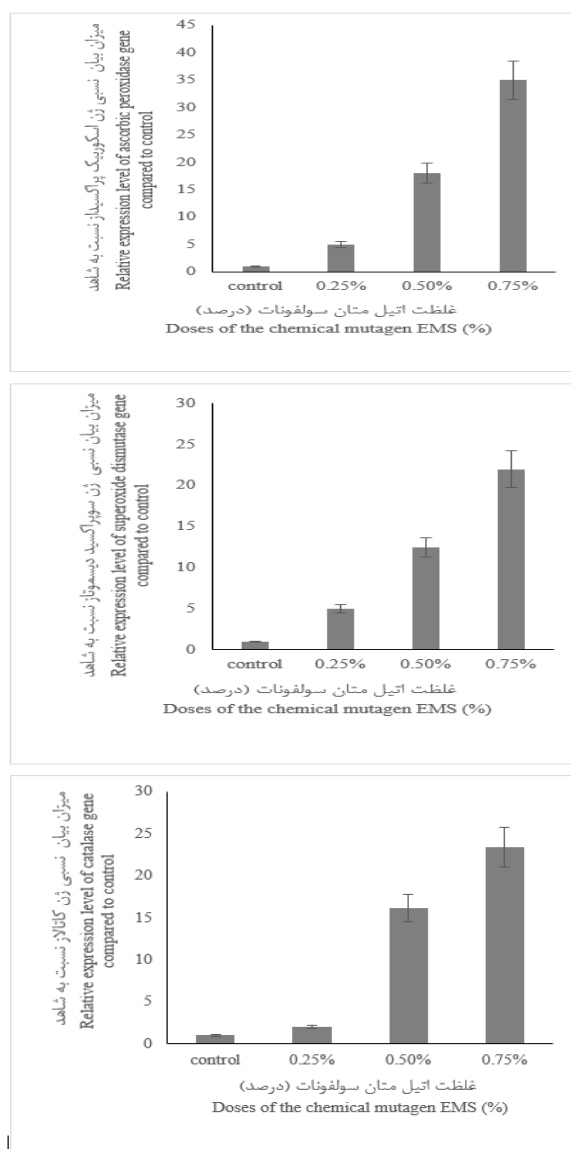
EMS افزایش یافت که بیانگر افزایشی بیش از ۳ برابر نسبت به شاهد می‌باشد. به‌طور کلی، افزایش هم‌زمان شاخص‌های آسیب اکسیداتیو (TBARM) و ترکیبات و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نشان می‌دهد که EMS به‌عنوان یک عامل تنش‌زا موجب برهم خوردن تعادل اکسیداسیون- احیا شده و سیستم دفاعی گیاه را به‌طور فعال درگیر می‌کند.

نتایج مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف اتیل متان سولفونات بر میزان کاروتنوئید نشان داد که غلظت ۰/۵ درصد با تولید ۳۳/۵ میکروگرم بر میلی‌گرم باعث تولید بالاترین میزان



شکل ۲: مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف اتیل متان سولفونات روی صفات بیوشیمیایی: (A) اسید اسکوربیک، (B) میزان آلفاتوکوفرول، (C) TBARM، (D) آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، (E) آنزیم کاتالاز، (F) یون سوپراکسید، (G) آنزیم اسکوربیک پراکسیداز و (H) پراکسید هیدروژن

Fig. 2: Mean comparison of different doses of the chemical mutagen EMS on biochemical traits: A) Ascorbic Acid, B) Alpha-Tocopherol, C) TBARM, D) Superoxide Dismutase, E) Catalase, F) Superoxide Ion, G) Ascorbic Peroxidase, H) Hydrogen Peroxide

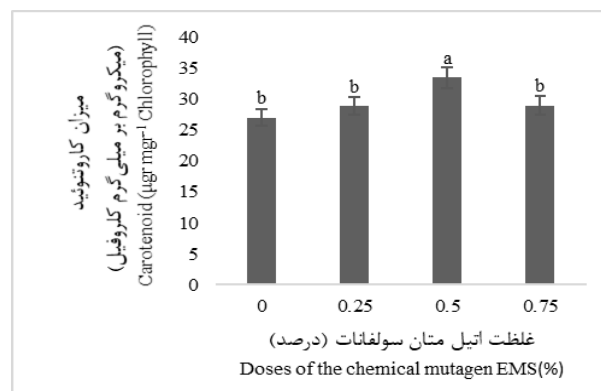


شکل ۵: میزان بیان ژن‌های اسکوربیک پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز تحت تیمار غلظت‌های مختلف اتیل متان سولفونات

Fig. 5: Ascorbic peroxidase, superoxide dismutase and Catalase genes expression level in different doses of the chemical mutagen EMS

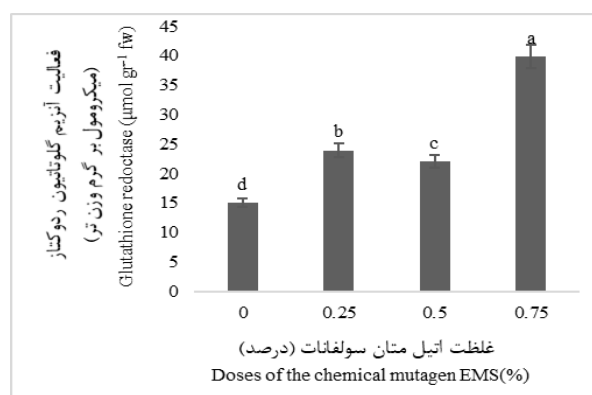
بحث

نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت اتیل متان سولفونات میزان صفات بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده در این آزمایش دارای تفاوت معنی‌داری در بین غلظت‌های مختلف بود و با افزایش غلظت دارای سیر صعودی بود. بیشترین اختلاف در بالاترین غلظت یعنی ۰/۷۵ درصد مشاهده گردید. نتایج حاصله نشان داد که با افزایش غلظت اتیل متان سولفونات ظرفیت تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن و اثرات منفی آن‌ها افزایش یافت و یا آن گیاه در یک واکنش دفاعی سطح عوامل آنتی‌اکسیدانی و بیان ژن‌های درگیر را افزایش داد. در مطالعه با استفاده از جهش‌زای شیمیایی



شکل ۳: مقایسه میانگین میزان کاروتنوئید در غلظت‌های مختلف اتیل متان سولفونات

Fig. 3: Mean comparison of different doses of the chemical mutagen EMS on Carotenoid



شکل ۴: مقایسه میانگین میزان فعالیت آنزیم گلوتاتین در غلظت‌های مختلف اتیل متان سولفونات

Fig. 4: Mean comparison of different doses of the chemical mutagen EMS on Glutathione

نتایج حاصل از ارزیابی‌های مولکولی

در مقایسه نسبی الگوی تظاهر ژن‌های مورد مطالعه در غلظت‌های مختلف اتیل متان سولفونات غلظت صفر به عنوان سطح کنترل در نظر گرفته شد و غلظت‌های مختلف به طور جداگانه نسبت به آن مقایسه گردید. در مقایسه نسبی الگوی تظاهر ژن‌های کاتالاز، اسکوربیک پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در غلظت ۰/۷۵ درصد اتیل متان سولفونات بیشترین میزان بیان نسبت به شاهد مشاهده گردید و روند بیان ژن با افزایش دُز EMS سیر صعودی داشت. بیان ژن اسکوربات پراکسیداز از ۱ واحد در شاهد به ۵، ۱۸ و ۳۵ واحد در دُزهای ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد EMS رسید. ژن سوپراکسید دیسموتاز نیز از ۱ واحد در شاهد به ۵، ۱۳ و ۲۲ واحد افزایش یافت. همچنین، بیان ژن کاتالاز ۱ واحد در شاهد به ۲، ۱۶ و ۲۳ واحد در دُزهای افزایشی EMS رسید. این نتایج نشان‌دهنده افزایش چندبرابری (تا ۳۵ برابر برای APX) بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی در پاسخ به EMS است.

سنتز کننده گلووتاتیون) و پراکسیداز می‌باشند. آنتی‌اکسیدان‌های تولیدشده توسط مکانیزم‌های غیرآنزیمی در گیاهان نیز شامل آسکوربات، گلووتاتیون، آلفاتوکوفرول و کاروتنوئیدها می‌باشند (Mishra et al., 2021). فعالیت APX، SOD، CAT و GR در مطالعه‌ای تحت شرایط تنش بهبود یافت به نظر می‌رسد احتمالاً برای خنثی کردن آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش فعالیت آنزیم‌ها افزایش یافت زیرا گیاهان سیستم آنتی‌اکسیدانی خود را برای مقابله با تأثیر مضر تنش غیرزیستی تقویت می‌کنند (Khan et al., 2020). آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی، آنزیم‌های ضروری در سلول‌های گیاهی هستند که H_2O_2 را از اندامک‌های مختلف مانند سیتوزول و کلروپلاست حذف می‌کنند تا از آسیب اکسیداتیو جلوگیری کنند (Zahra et al., 2021). فعالیت بالای APX در این مطالعه مشاهده شد و محققان مختلف نیز افزایش فعالیت APX را در طول غلظت‌های افزایش‌یافته تیمارهای EMS مشاهده کرده‌اند (Hamid et al., 2015). در سطوح بالاتر EMS، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیمی در گندم افزایش یافت، همان‌طور که در بسیاری از گونه‌های دیگر محصولات زراعی نیز افزایش یافت (Gupta et al., 2016). آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی در سلول‌ها برای خنثی کردن استرس اکسیداتیو و حفظ سطح غلظت آن‌ها در زیر سطوح سمی عمل می‌کنند (Nahar et al., 2016). حذف سوپر اکسید توسط سوپر اکسید دیسموتاز منجر به تولید هیدروژن می‌شود، درحالی‌که پراکسید هیدروژن نیز توسط کاتالاز یا آسکوربات کاهش می‌یابد (Aleem et al., 2022).

تیمار EMS منجر به ایجاد ROS موقتی است که می‌تواند با فعال‌سازی مسیرهای آنتی‌اکسیدان، بیان ژن‌های این مسیر را افزایش دهد تا با ROS مبارزه کنند. در این حالت ممکن است افزایش بیان ژن‌های *SOD*، *CAT*، *APX*، *GPX*، *MDHAR* و *DHAR* و افزایش بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز گلووتاتیون و سایر آنتی‌اکسیدان‌های ثانویه (مانند کاروتنوئیدها، ویتامین‌ها) رخ دهد (Mistry et al., 2022). EMS می‌تواند بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدان را تحت تأثیر قرار دهد به‌واسطه تغییراتی که در مسیرهای سیگنال‌دهی استرس ایجاد می‌کند، مسیری که به هورمون‌های ABA (جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید) مربوط است، این مسیرها معمولاً به‌صورت تنظیمی بر بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدان اثر می‌گذارند (Abd EL-Moneim et al., 2021).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که با افزایش غلظت اتیل متان سولفونات، بیان ژن کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و اسکوربیک

خارجی با دُزهای تقسیم شده در گیاهان تحت تنش شوری، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی را افزایش نشان داد. جالب توجه بود که کاهش استرس اکسیداتیو در گیاهان تیمار شده با جهش‌زا با افزایش قابل‌توجه سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول مطابقت داشت (Jahan et al., 2021). این نتایج با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت.

در مطالعه‌ای کاربرد عامل جهش‌زای اشعه گاما، باعث افزایش هشت درصدی ترکیبات آنتی‌اکسیدان در گیاه *Raphanus sativus* L. شد (Suk et al., 2005). کوستا و همکاران (Costa et al., 2012) تأثیرات اشعه گاما بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پوست بادام زمینی را بررسی کردند. نتایج نشان داد که اشعه گاما باعث تغییراتی در میزان ترکیبات فنولیکی، فلاونوئیدی، میزان تانن و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گردید. همچنین در مطالعه‌ای که به‌منظور بررسی اثرات ماده جهش‌زای اشعه گاما بر روی متابولیت‌های ثانویه در کالوس‌های رزماری انجام شد، میزان متابولیت‌های ثانویه با افزایش دوزهای اشعه گاما افزایش یافت. دوزهای مختلف اشعه گاما با تأثیر بر روی ROS منجر به القای مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی و در نهایت تجمع متابولیت‌های ثانویه در کالوس رزماری شد (El-beltagi et al., 2011).

کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز آنزیم‌های مهمی در پاک‌سازی سلول از گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشند. کاتالاز در پراکسی‌زوم سلول که محل سنتز H_2O_2 است وجود دارد و اولین فاکتور در شکستن H_2O_2 می‌باشد. این مولکول در مسیرهای انتقال سیگنال نقش داشته و سبب بیان ژن‌ها می‌شود (Aleem et al., 2022). نتایج این آزمایش نشان داد که در غلظت‌های بیشتر اتیل متان سولفونات فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه نسبت به کنترل افزایش قابل‌توجهی یافت. در مطالعه صفات بیوشیمیایی میزان آن در تمامی غلظت‌های اتیل متان سولفونات نسبت به شاهد افزایش را نشان داد.

ROS‌ها به طور معمول با مولکول‌های بیولوژیکی واکنش می‌دهند و سبب خسارت اکسیداتیو به لیپیدهای غشا، خسارت به اسیدآمینها، اسیدهای نوکلئیک، تخریب و رسوب پروتئین‌ها و تخریب رنگ‌دانه‌ها می‌گردند (Sairam & Tyagi, 2004). میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در تحمل تنش و سمیت‌زدایی و کاهش خسارت ناشی از رادیکال‌های آزاد دارد (Hu et al., 2022). گیاهان برای مقابله با خسارت‌های ناشی از تنش اکسیداتیو مکانیسم‌های آنزیمی و غیرآنزیمی متفاوتی دارند. مکانیسم‌های آنزیمی غلظت پراکسید هیدروژن را کاهش می‌دهند. از جمله آنزیم‌های سمیت‌زدا، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آنزیم‌های چرخه آسکوربات گلووتاتیون (مانند آسکوربات پراکسیداز، گلووتاتیون ردوکتاز و آنزیم‌های

منجر به تغییرات متابولیکی می‌شود. از طرفی با توجه به این که نقطه مشترک تمام تنش‌های زیستی و غیرزیستی از منظر سلولی افزایش میزان و فعالیت رادیکال‌های فعال اکسیژن است، با به کار بردن نیترات نقره به عنوان عامل القای تنش اکسیداتیو در عمل امکان شناسایی لاین‌های جهش یافته متحمل به تنش‌های محیطی نیز مهیا می‌گردد. به طور کلی به کارگیری EMS به عنوان ابزار معرفی تنوع ژنتیکی می‌تواند به بهبود پاسخ‌های دفاعی و پتانسیل افزایش سطح آنتی‌اکسیدانت‌ها در کلزا منجر شود، که این امر می‌تواند به افزایش مقاومت به استرس‌های فیزیولوژیک و بهبود بازده در شرایط محیطی متغیر منجر گردد.

پراکسیداز افزایش می‌یابد. در مطالعه حاضر، بیان ژن کاتالاز و سوپراکسیداز و اسکوریک پراکسیداز در همه غلظت‌های اتیل متان سولفونات نسبت به شاهد افزایش یافت و در غلظت ۰/۷۵ درصد بیشترین افزایش بیان مشاهده شد.

این مطالعه نشان می‌دهد که جهش‌زایی به کمک اتیل متیل سولفونات به طور مؤثری تنوع بیوشیمیایی و بیان ژنی را در دانه‌های روغنی کلزا افزایش می‌دهد و با افزایش غلظت EMS، پاسخ‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی گیاهان تشدید می‌شود. به طور مشخص افزایش تدریجی غلظت EMS منجر به تفاوت‌های معنی‌دار در صفات بیوشیمیایی شد و روندی افزایشی را نشان داد. این یافته نشان‌دهنده ایجاد تغییرات ژنتیکی که به سویی

References

- Abd EL-Moneim, E. A., Nassar, M. A., El-Said, R. A., and El-Refae, Y. Z. 2021. Improvement of Salt Stress Tolerance in Strawberry by Ethyl Methane Sulfonate Treatment. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 12(6): 117-126.
- Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymology*, 105: 121-126.
- Aleem, M., Aleem, S., Sharif, I., Wu, Z., Aleem, M., Tahir, A., and Ahmad, P. 2022. Characterization of SOD and GPX gene families in the soybeans in response to drought and salinity stresses. *Antioxidants*, 11(3): 460.
- Arakawa, N. K., Tsutsumi, N. G., and Sanceda, T. 1981. A Rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using diphenyl-1, 10-phenanthroline. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45: 1289-1290.
- Ashraf, M. 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advances*, 27: 84-93.
- Brennan, T., and Frenkel, C. 1977. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiology*, 59: 411-416.
- Costa de Camargo, A., Ferreira de Souza Vieira, T.M., and Regitano-D Arce, M.A.B. 2012. Gamma radiation effects on peanut skin antioxidants. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 3073-3084.
- El-Beltagi, H. S., Ahmed, O. K., and El-Desouky, W. 2011. Effect of low doses γ -irradiation on oxidative stress and secondary metabolites production of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) callus culture. *Radiation Physics and Chemistry*, 80(9): 968-976.
- Eltner, E. F., and Heupel, A. 1976. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride: a simple assay for superoxide dismutase. *Analytical Biochemistry*, 70: 616-620.
- Giannopolitis, C.N., and Ries, S.K. 1977. Superoxide dismutase: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59: 309-314.
- Gupta, N., Sood, S., Singh, Y., Sood, D. 2016. Determination of lethal dose for gamma rays and ethyl methane sulphonate induced mutagenesis in okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench.). *SABRAO Journal of Breeding & Genetics*, 48: 344-351.
- Hagege, D., Nouvelot, A., Boucard, J., and Gaspar, T. 1990. Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: avoidance of pigment interference. *Phytochemical Analysis*, 1: 86-89.
- Hameed, K., Khan, M.S., Sadaqat, H. A., and Awan, F. S. 2019. Phenotypic characterization of super basmati ethyl methane sulfonate (EMS) induced mutants. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 56(2): 377-384.
- Handayani, R. S., Harahap, M. S. A., Irawan, G., Anggraini, A., and Siregar, N. K. 2024. Induction of genetic diversity in gepak kuning soybean cultivar and M. 1.1. 3 line using ethyl methane sulfonate in M1 generation. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 1362, No. 1, p. 012024). IOP Publishing.
- Hoffmann, A. A., Miller, A. D., and Weeks, A. R. 2021. Genetic mixing for population management: From genetic rescue to provenancing. *Evolutionary Applications*, 14(3): 634-652.
- Honarnejad, R. 2003. Principles of Plant Breeding. University of Guilan Publications, 275 p. (In Persian).
- Hu, T., Chen, R., Qian, Y., Ye, K., Long, X., Park, K. Y., and Zhao, X. 2022. Antioxidant effect of *Lactobacillus fermentum* HFY02-fermented soy milk on D-galactose-induced aging mouse model. *Food Science and Human Wellness*, 11(5): 1362-1372.
- Jahan, B., Iqbal, N., Fatma, M., Sehar, Z., Masood, A., Sofu, A., and Khan, N. A. 2021. Ethylene supplementation combined with split application of nitrogen and sulfur protects salt-inhibited photosynthesis through optimization of proline metabolism and antioxidant system in mustard (*Brassica juncea* L.). *Plants*, 10(7): 1303.
- Jhingan, S., Harloff, H. J., Abbadi, A., Welsch, C., Blümel, M., Tasdemir, D., and Jung, C. 2023. Reduced glucosinolate content in oilseed rape (*Brassica napus* L.) by random mutagenesis of BnMYB28 and BnCYP79F1 genes. *Scientific Reports*, 13(1): 2344.

- Khajepour, M. R. 2012. Industrial Plants. Isfahan University of Technology Publications, 582 p. (In Persian). Shariati, Sh., and Ghazi Shahnizadeh, P. 2000. Rapeseed. Ministry of Agriculture Publications, Planning and Budget Deputy, 81 p. (In Persian).
- Khan, M. I. R., Jahan, B., AlAjmi, M. F., Rehman, M. T., and Khan, N. A. 2020. Ethephon mitigates nickel stress by modulating antioxidant system, glyoxalase system and proline metabolism in Indian mustard. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26: 1201-1213.
- Li, F., Gong, Y., Mason, A. S., Liu, Q., Huang, J., Ma, M., and Fu, D. 2023. Research progress and applications of colorful Brassica crops. *Planta*, 258(2): 45.
- Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol*, 148: 350-382.
- Malakooti, M. J., and Sepehr, A. 2004. Optimal Nutrition of Oilseeds. Khaniran Publications, 464 p. (In Persian).
- Meloni, D. A., Oliva, M. A., Martinez, C. A., and Cambraia, J. 2003. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase: peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 15: 12-21.
- Mishra, N., Tripathi, M. K., Tripathi, N., Tiwari, S., Gupta, N., Sharma, A., and Shrivastav, M. K. 2021. Changes in biochemical and antioxidant enzymes activities play significant role in drought tolerance in soybean.
- Mistry, V., Tiwari, P., Patel, P., Vishwakarma, G. S., Lee, G. J., and Sharma, A. 2022. Ethyl methane sulfonate and sodium azide-mediated chemical and x-ray-mediated physical mutagenesis positively regulate peroxidase 1 gene activity and biosynthesis of antineoplastic vinblastine in *Catharanthus roseus*. *Plants*, 11(21): 2885.
- Munné-Bosch, S., Schwarz, I., and Alegre, L. 1999. Enhanced formation of α -tocopherol and highly oxidized abietanedieterpenes in water-stress rosemary plants. *Plant Physiology*, 121: 1047-1052.
- Nahar, K., Hasanuzzaman, M., Alam, M. M., Rahman, A., Suzuki, T., and Fujita, M. 2016. Polyamine and nitric oxide crosstalk: Antagonistic effects on cadmium toxicity in mung bean plants through upregulating the metal detoxification, antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126: 245-255.
- Nakano, Y., and Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant & Cell Physiology*, 22: 867-880.
- Navabpour, S., and Mazandarani, A. 2017. Molecular and biochemical evaluation of two bread wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) under the influence of oxidative stress. *Cereal Research*, 7(3): 357-367.
- Navabpour, S., Najafi, H., and Gharekhani, M. N. 2024. Evaluation of differential expression of some genes and biochemical traits under the influence of silver nitrate stress in three bread wheat cultivars. *Cereal Biotechnology and Biochemistry*, 3(4): 479-497.
- Pasandideh Arjomand, M., Mohsenzadeh Golfzani, M. M., and Samizadeh Lahiji, H. 2024. The effect of drought stress on morphological, physiological traits and relative expression levels of important antioxidant genes in rapeseed. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 16(2): 153-176.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. and Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9): 36.
- Poblete Aro, C. E., Russell Guzmán, J. A., Soto Muñoz, M. E., and Villegas González, B. E. 2015. Effects of high intensity interval training versus moderate intensity continuous training on the reduction of oxidative stress in type 2 diabetic adult patients: CAT. *Medwave*, 15(07).
- Qi, G., Zhao, X., He, F., Sun, S., Shi, Z., and Niu, Y. 2024. Exogenous Melatonin Reinforces Photosynthesis, Antioxidant Defense and Gene Expression to Ameliorate Na_2CO_3 Stress in Maize. *Plants*, 13(20): 2844.
- Schaedle, M., and Bassham, J. A. 1977. Chloroplast glutathione reductase. *Plant Physiology*, 59: 1011-1012.
- Shariati, S. H., and Ghazi Shahnizadeh, P. 2000. Canola. General Office of Statistics and Information in Agricultural. (In Persian).
- Suk, J. E., Hwa, L. H., Sung, K. J., and Young, S. 2005. Effects of low dose γ -ray irradiation on antioxidant activity of seeds and seedling growth in *Raphanus sativus* L., *Journal of Horticultural Science and Technology*, 23: 245-249.
- Welschmeyer, N. A. 1994. Fluorometric analysis of chlorophyll a in the presence of chlorophyll b and photopigments. *Limnology and Oceanography*, 39(8): 1985-1992.
- Yang, M., Wan, S., Chen, J., Chen, W., Wang, Y., Li, W., and Guan, R. 2023. Mutation to a cytochrome P450-like gene alters the leaf color by affecting the heme and chlorophyll biosynthesis pathways in *Brassica napus*. *The Plant Journal*, 116(2): 432-445.
- Zahra, S., Hussain, M., Zulfikar, S., Ishfaq, S., Shaheen, T., and Akhtar, M. 2021. EMS-based mutants are useful for enhancing drought tolerance in spring wheat. *Cereal Research Communications*, 50: 767-778. DOI 10.1007/s42976-021-00220-7.