



# The Effect of Thermopriming on the Expression of Some Hub Genes in Nitrogen Metabolism and Evaluation of Regulatory Mechanism of These Genes in Rapeseed (*Brassica napus* L.)

Maryam Tahmasebi | Hengameh Taheri\*

Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

\*Corresponding author ✉: [taheri@asnrukh.ac.ir](mailto:taheri@asnrukh.ac.ir)

## Article Info

**Article type:**  
Research Article

### Article history:

Received: February 17, 2025;  
Received in revised form: May 04, 2025;  
Accepted: May 17, 2025;  
Available online: June 30, 2025

### Keywords:

Codon usage bias,  
Thermo-priming,  
Gene expression regulation,  
Nitrogen metabolism,  
qRT-PCR

## ABSTRACT

The present study aimed to analyze in silico transcriptomic data to identify hub nitrogen assimilation genes (NAGs), regulatory factors, and further examined the effect of thermopriming on the expression of selected genes. After identifying hub genes with CytoHubba plugin, cis-regulatory elements (CRE) were investigated by using the Tomtom tool. In addition, interactions between nitrogen assimilation genes and rapeseed miRNAs were predicted using the psRNATarget tool. Codon usage bias (CUB) was analyzed in Rstudio. Finally, the expression of nitrate reductase (*NR*) and nitrite reductase (*NiR*) genes under thermopriming and recurrent heat stress was examined using qRT-PCR method. Bioinformatics analysis of the function of hub genes in the NAG interaction network confirmed their role in enhancing nitrogen use efficiency, especially under environmental stresses. Also, the function of various transcription factors, including Dof elements, in regulating the expression of nitrogen assimilation genes was confirmed, and the role of members of the miR156, miR395, miR6028, miR6034, and miR6035 families in regulating the expression of target genes-especially genes related to the glutamine synthase/glutamate synthase cycle and nitrate reductase- was determined. The correlation study of CUB indices showed the role of mutation and natural selection in the formation of the codon pattern of the studied genes. Finally, the increased expression of *NR* and *NiR* genes under thermopriming compared to non-primed plants confirmed the importance of heat stress memory in enhancing nitrogen use efficiency in rapeseed. The findings of this study are an important step towards identifying effective components in engineering nitrogen metabolism and developing heat stress-tolerant varieties in rapeseed.



**Cite this article:** Tahmasebi, M. and Taheri, H. (2025). The Effect of thermopriming on the expression of some hub genes in nitrogen metabolism and evaluation of regulatory mechanism of these genes in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plant Genetic Research*, 12(1): 53-74.

**DOI:** <https://doi.org/10.22034/pgr.2025.2069000.1010>



## Introduction

Nitrogen (N) plays an important role in plant growth and development as factor affecting yield enhancement. Since nitrogen use efficiency (NUE) is low in rapeseed, one of the strategies to improve nitrogen efficiency, especially under environmental stresses, is to enhance the expression of nitrogen assimilation related genes (NAGs). The present study aimed to analyze in silico transcriptomic data to identify hub genes involved in nitrogen assimilation, elucidate the regulatory mechanisms underlying their expression, and investigate the role of thermopriming in the expression of specific nitrogen assimilation genes.

## Materials and Methods

Hub genes were identified based on the highest interaction with their neighbors in the nitrogen assimilation genes network using CytoHubba computational algorithms. Identification of cis-regulatory elements (CRE) and transcription factors in the 5'UTR region of these genes was performed using the Tomtom tool and searching the JASPAR <sup>2022</sup> database. Prediction of interactions between genes involved in nitrogen assimilation and rapeseed miRNAs was performed using the psRNATarget tool with the aim of identifying post-transcriptional regulatory factors. Codon usage bias (CUB) indices and correlation among them were conducted in Rstudio. Finally, to evaluate transcriptional memory on nitrogen metabolism, the expression of nitrate reductase (*NR*) and nitrite reductase (*NiR*) genes under thermopriming and recurrent heat stress was examined using qRT-PCR.

## Results and Discussion

Bioinformatics analysis of the function of hub genes in the interaction network of genes involved in nitrogen assimilation confirmed their role in enhancing NUE, especially under environmental stresses. Promoter analysis revealed the importance of various factors, especially Dof, in regulating the expression of these genes at the transcriptional stage. The interaction network of miRNAs with genes involved in nitrogen assimilation revealed the role of members of the miR156, miR395, miR6028, miR6034, and miR6035 families in regulating the expression of target genes, especially genes related to the glutamine synthase/glutamate synthase cycle and nitrate reductase. Correlation analysis of GC/GC<sub>3S</sub> and EN<sub>C</sub>/CAI indices revealed the role of mutation and natural selection in the formation of codon usage bias of the genes involved in nitrogen assimilation. Finally, the increased expression of *NR* and *NiR* genes under thermo-primed compared to non-primed plants confirmed the importance of heat stress memory in enhancing NUE in rapeseed.

## Conclusions

The findings of this study are an important step towards identifying effective components in engineering nitrogen metabolism that can be used as key targets in genome editing to develop stress-tolerant cultivars and improve canola yield.

## Author Contributions

The first author performed the laboratory procedures. The second author (corresponding author) designed the experiments, interpreted the data, and contributed to writing the original and subsequent drafts.

### **Data Availability Statement**

Data available on request from the authors.

### **Acknowledgements**

The authors gratefully acknowledge the Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan for supporting this research and providing access to laboratory facilities.

### **Ethical Considerations**

The authors avoided data fabrication, falsification, and plagiarism, and any form of misconduct.

### **Funding**

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### **Conflict of Interest**

The authors declare no conflict of interest.

## تأثیر پیش‌تیمار گرمایی بر بیان برخی ژن‌های مؤثر در متابولیسم نیتروژن و واکاوی سازوکارهای تنظیمی بیان این ژن‌ها در کلزا (*Brassica napus* L.)

مریم طهماسبی  | هنگامه طاهری\* 

گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

پژوهش حاضر با هدف واکاوی/این‌سیلیکو داده‌های ترنسکریپتومی، جهت شناسایی ژن‌های کلیدی در متابولیسم نیتروژن، شناخت سازوکارهای تنظیمی بیان این ژن‌ها و بررسی نقش پیش‌تیمار گرمایی در بیان برخی ژن‌های مؤثر در اسیمیلایون نیتروژن انجام شد. ژن‌های کلیدی بر اساس بیشترین تعامل با همسایگان خود در شبکه‌ی برهم‌کنش ژن‌های اسیمیلایون نیتروژن با استفاده از الگوریتم‌های محاسباتی CytoHubba معرفی شدند. شناسایی عوامل تنظیمی سیس (CRE) با استفاده از ابزار Tomtom انجام شد. پیش‌بینی برهم‌کنش بین ژن‌های اسیمیلایون نیتروژن با miRNAهای کلزا با استفاده از ابزار psRNATarget انجام شد. اندازه‌گیری شاخص‌های الگوی ترجیح‌کدونی (CUB) و بررسی همبستگی بین این شاخص‌ها نیز در محیط نرم‌افزار R انجام و در نهایت جهت ارزیابی حافظه رونویسی بر متابولیسم نیتروژن، بیان ژن‌های نیترات‌ردوکتاز (NR) و نیتريت‌ردوکتاز (Nir) تحت پیش‌تیمار گرمایی و تنش برگشتی با استفاده از روش qRT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. بررسی بیوانفورماتیکی عملکرد ژن‌های کلیدی در شبکه برهم‌کنشی ژن‌های مؤثر در اسیمیلایون نیتروژن، به‌خصوص تحت تنش‌های محیطی را تأیید کرد. بررسی پیش‌بینی این ژن‌ها اهمیت عوامل رونویسی مختلف از جمله عناصر Dof در تنظیم بیان این ژن‌ها در مرحله رونویسی را نشان داد. شبکه برهم‌کنش miRNAها با ژن‌های اسیمیلایون نیتروژن، نقش اعضای خانواده‌های miR156، miR395، miR6028، miR6034 و miR6035 را در تنظیم بیان ژن‌های هدف خصوصاً ژن‌های مرتبط با چرخه گلوتامین‌سیستاز/گلوتامات‌سیستاز و نیترات‌ردوکتاز مشخص کرد. همچنین مطالعه همبستگی شاخص‌های GC<sub>3S</sub>/GC و EN<sub>C</sub>/CAI، نقش جهش و انتخاب‌طبیعی را در شکل‌گیری الگوی ترجیح‌کدونی ژن‌های مورد مطالعه را نشان داد. در نهایت، افزایش بیان ژن‌های NR و Nir تحت پیش‌تیمار گرمایی نسبت به گیاهان پیش‌تیمار نشده، اهمیت حافظه تنش گرمایی در تقویت NUE در کلزا را تأیید کرد. یافته‌های این پژوهش گام مهمی در خصوص شناخت اجزای مؤثر در مهندسی متابولیسم نیتروژن می‌باشد، که می‌تواند به‌عنوان اهداف کلیدی در ویرایش ژنومی جهت توسعه ارقام متحمل به تنش و بهبود عملکرد کلزا به کار گرفته شوند.

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۲۹

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۲/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۲۷

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۴/۰۹

واژگان کلیدی:

الگوی ترجیح‌کدونی،

پیش‌تیمار گرمایی،

تنظیم بیان ژن،

متابولیسم نیتروژن،

qRT-PCR

مقدمه

مصرف نیتروژن نقش دارند. پس از انتقال به سلول‌های ریشه توسط انتقال‌دهندگان اختصاصی، نیترات توسط نیترات‌ردوکتاز به نیتريت تبدیل شده و در پلاستیدهای ریشه توسط آنزیم نیتريت‌ردوکتاز و به کمک ۶- فرودوکسین به آمونیوم احیاء می‌شود. سپس گلوتامین‌سینتتاز با تأمین انرژی حاصل از ATP و به کمک آمونیوم، اسیدگلوتامیک را به گلوتامین تبدیل می‌کند که در نهایت بواسطه گلوتامات‌سینتتاز در بیوسنتز اسیدهای آمینه، ترکیبات حاوی نیتروژن و متابولیت‌های ثانویه به‌کار گرفته می‌شود (Wang *et al.*, 2014; Thomsen *et al.*, 2014). به‌نظر می‌رسد شناخت اجزای ژنتیکی دخیل در سازگاری و تحمل به سطوح پائین نیتروژن خاک می‌تواند نقش برجسته‌ای در بهینه‌سازی راندمان مصرف نیتروژن داشته باشد. همچنین اهمیت ترجیح‌کدونی (Codon Usage Bias: CUB) در استفاده درست و بهینه از الگوهای متنوع کدونی می‌تواند بر بیان ژن و کارایی تراریختی ژنتیکی تأثیرگذار باشد (Yang *et al.*, 2023a). عوامل مختلفی نظیر جهش، انتخاب طبیعی، رانش ژنتیکی (Hersberg and Petrov, 2008; Plotkin and Kudla, 2011) و محتوای GC (Hu *et al.*, 2007) می‌توانند در ترجیح‌کدونی نقش داشته باشند. قطعاً ژن‌هایی با بیان بالا، تحت فشار انتخاب، ترجیح می‌دهند کدون‌هایی را انتخاب کنند که کارایی ترجمه را افزایش دهند (Johnson *et al.*, 2023). این یافته‌ها نشان می‌دهد که کدون‌های ترجیحی در ژن‌هایی با بیان بالا استفاده می‌شوند که به‌دلیل فراوانی بالای tRNAهای رمزگشا، به افزایش سرعت ترجمه کمک می‌کنند. در مقابل، کدون‌های نادر در ژن‌هایی با بیان پائین تجمع پیدا کرده‌اند (Xu *et al.*, 2021). از این‌رو گیاه به‌عنوان یک سازوکار دفاعی، الگوی کدون‌های خود را بهینه می‌کند تا سازگاری بهتری به عوامل تنش‌زا داشته باشد (Biswas *et al.*, 2019). این موضوع اهمیت انتخاب کدون‌های مترادف را در تنظیم سازوکارهای دخیل در کارایی رونویسی، ترجمه و بهینه‌سازی بیان ژن‌ها روشن می‌سازد.

کلزا به‌عنوان سومین گیاه روغنی پس از سویا و نخل روغنی، جهت بهبود عملکرد بذر و تولید زیست توده نیاز زیادی به کود نیتروژنه دارد، اما علی‌رغم ظرفیت بالای جذب نیترات، راندمان مصرف نیتروژن (Nitrogen Use Efficiency: NUE) کمتری در مقایسه با سایر گیاهان دارد به‌گونه‌ای که عملکرد بذر آن به ازای هر واحد نیتروژن مصرف شده در خاک، تقریباً نصف غلات است (Lammerts van Bueren and Struik, 2017; Clément *et al.*, 2018). همچنین مشخص شده است که استفاده بی‌رویه از کودهای ازته، جذب و استفاده به موقع نیترات ( $\text{NO}_3^-$ ) و آمونیوم ( $\text{NH}_4^+$ )، که دو منبع اصلی جذب نیتروژن از خاک توسط گیاه هستند (Miller and Cramer, 2005) را دچار اختلال کرده و از این‌رو با اثر سوئی که بر راندمان جذب نیتروژن (N Assimilation Efficiency: NAE) برجای می‌گذارد، راندمان مصرف نیتروژن (NUE) را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Wang *et al.*, 2021a). NUE که به‌عنوان عملکرد کل تولید شده در گیاه به ازای هر واحد کود مصرفی نیتروژن تعریف می‌شود، به‌عنوان یکی از شاخص‌های توسعه کشاورزی پایدار مورد توجه به‌نژادگران قرار گرفته است (Ali *et al.*, 2018). از این‌رو یکی از راهکارها جهت حفظ یا تقویت عملکرد محصولات، افزایش سازگاری آن‌ها با محدودیت نیتروژن است که می‌تواند با کاهش مصرف کودهای ازته، نقش مهمی در گسترش سیستم‌های کشاورزی سازگار با محیط زیست و اکوسیستم‌های پایدار داشته باشد (Hua *et al.*, 2020). مشخص شده است که چهار گروه از آنزیم‌های مؤثر در اسیمیلسیون نیتروژن (Nitrogen Assimilation-Related Genes: NAGs)، نیترات‌ردوکتاز (Nitrate Reductase: NR)، نیتريت‌ردوکتاز (Nitrite Reductase: NIR)، گلوتامین‌سینتتاز (Glutamine Synthetase: GS/GLN) و گلوتامین‌اکزوگلوئونات‌آمینو ترانسفراز (Glutamine Oxoglutarate Aminotransferase: GOGAT) که گلوتامات‌سینتتاز هم نامیده می‌شود، در تنظیم راندمان

خصوص سازوکارهای تنظیمی این ژن‌ها در بهبود وضعیت راندمان مصرف نیتروژن در کلزا دست یافت. در مطالعه‌ی اخیر عوامل مؤثر بر ترجیح کدونی با استفاده از شاخص‌های مختلف در ژن‌های اسیمیلایون نیتروژن مورد بررسی قرار گرفت تا به اطلاعات کامل‌تری از نقش عوامل ایجاد کننده ترجیح کدونی در بیان این ژن‌ها دست یافت. همچنین از آنجا که تا پیش از این آزمایش، مطالعه‌ای در خصوص اثر پیش‌تیمار گرمایی بر الگوی بیانی ژن‌های اسیمیلایون نیتروژن در کلزا انجام نشده بود، از این‌رو در این مطالعه الگوی بیانی برخی ژن‌های کلیدی اسیمیلایون نیتروژن که بر اساس الگوریتم‌های محاسباتی اعمال شده، محوریت آن‌ها در شبکه زیستی ژن‌های اسیمیلایون نیتروژن تأیید شده بود، در گیاهان پیش‌تیمار شده گرمایی و گیاهان پیش‌تیمار نشده مورد ارزیابی قرار گرفت تا بتوان نقش پیش‌تیمار گرمایی را به‌عنوان یک روش مدیریت تنش در تغییر متابولیسم نیتروژن در گیاه کلزا ارزیابی کرد.

#### مواد و روش‌ها

شبکه برهم‌کنش پروتئینی و انتخاب گره‌های ضروری و خوشه‌های ژنی: در این پژوهش ابتدا فهرست کاملی از ژن‌های مؤثر در اسیمیلایون نیتروژن بر اساس پایگاه اطلاعاتی کلزا (<http://www.bnagadb.cn/annotation/pathway>) و بر مبنای تمام ژن‌های اسیمیلایون نیتروژن شناخته شده که در مطالعات قبلی در پاسخ به تنش‌های محیطی مختلف در کلزا بیان شده بودند (Tang et al., 2019; Wang et al., 2021b; He et al., 2021)، انتخاب شدند. سپس فهرست ژنی تهیه شده جهت بررسی برهم‌کنش پروتئین‌ها به نرم‌افزار تحت وب String (<https://string-db.org>) وارد شد. آستانه برهم‌کنشی با میزان اعتماد پائین (۰/۱۵) انتخاب شد تا امکان بررسی وسیع‌تری از یال‌ها (Edges) و تعاملات در شبکه فراهم شود. برای نمایش گرافیکی شبکه برهم‌کنشی پروتئینی (Protein-Protein Interaction: PPI) از نرم‌افزار Cytoscape (نسخه ۳/۱۰/۲) استفاده شد. افزونه CytoHubba با زبان برنامه‌نویسی جاوا در نرم‌افزار Cytoscape از ۱۱ روش برای تعیین جایگاه گره‌ها

گرمایش جهانی با توجه به اثرات سوء بر عملکرد محصولات، تهدید جدی برای تأمین مواد غذایی متناسب با افزایش جمعیت محسوب می‌شود. هر چند که گیاهان به‌طور ذاتی مجهز به سازوکارهای پایه برای مقابله با آثار تنش‌زا هستند، اما این راهکار برای دفاع به‌تنهایی کافی نیست. اخیراً مشخص شده است که گیاهان قادرند با ذخیره اطلاعات مولکولی در مواجهه با تنش‌های خفیف، فرایندهای بیانی ژن‌ها را در سطوح اپی‌ژنتیکی، بعد از رونویسی و پسا ترجمه‌ای به گونه‌ای تنظیم کنند تا بتوانند با قدرت بیشتری به تنش‌های بعدی پاسخ دهند. این پاسخ سازگاری به تنش‌های بعدی با به‌خاطر آوردن حافظه تنش، تحمل اکتسابی القاء شده بوسیله پرایمینگ (-Priming Induced Acquired Stress Tolerance) نامیده می‌شود که اثربخشی آن در القاء مقاومت به تنش‌های غیرزیستی در چندین گیاه زراعی تأیید شده است (Nair et al., 2022). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که تنش‌های غیرزیستی تأثیر سوئی بر متابولیسم نیترات در گیاهان برجای می‌گذارند (Tang et al., 2013; Agnihotri et al., 2018; Cramer et al., 1986) و بالعکس بیش بیان ژن‌های اسیمیلایون نیتروژن نقش مثبتی در بهبود راندمان مصرف نیتروژن و افزایش بهره‌وری گیاه تحت شرایط تنش دارند (Hoshida et al., 2000; Lee et al., 2013).

شناسایی ژن‌های کلیدی اسیمیلایون نیتروژن می‌تواند اطلاعات جامعی در خصوص جنبه‌های مولکولی پاسخ به تنش ارائه دهد. با این حال این عوامل در کلزا به‌خوبی شناخته نشده‌اند. از سوی دیگر مطالعات نشان داده‌اند که برخی ریزRNAها قادرند با تنظیم بیان ژن‌های هدف خود در مرحله رونویسی یا پس از آن، پاسخ‌های سازگاری گیاه به کمبود منابع نیتروژن خاک را کنترل نمایند (Nguyen et al., 2015). از این‌رو، در این مطالعه در نظر است با شناسایی ژن‌های کلیدی اسیمیلایون نیتروژن (NAG) از طریق واکاوی شبکه‌های برهم‌کنشی پروتئینی، شناسایی موتیف‌های تنظیمی و شبکه‌ی برهم‌کنش miRNAها با ژن‌های مؤثر در اسیمیلایون نیتروژن، به بینش جامعی در

(<https://www.mirbase.org>) استخراج شد. برای شناسایی برهم‌کنش‌های احتمالی بین توالی رونوشت ژن‌های اسیمیلایون نیتروژن و miRNAهای شناسایی شده کلزا، از سرور تحت وب psRNATarget با پیش‌فرض‌های امتیاز مورد انتظار (Expectation) ۵ و دسترسی ناحیه هدف به ۲۵ kcal/mol (Unpaired Energy: UPE) miRNA استفاده شد و در نهایت نمایش گرافیکی این برهم‌کنش‌ها با نرم‌افزار Cytoscape انجام شد.

اندازه‌گیری شاخص‌های الگوی ترجیح‌کدونی: برای ارزیابی شاخص‌های الگوی ترجیح‌کدونی، ابتدا توالی کدکننده ژن‌های مؤثر در اسیمیلایون نیتروژن در کلزا از بخش BioMart سایت Ensemble Plant (<https://plants.ensembl.org>) به فرمت FASTA دریافت شدند. برای محاسبه شاخص‌های الگوی ترجیح‌کدونی از بسته‌های CoRdon، Stringi و Cubar در محیط نرم‌افزار R استفاده شد. از شاخص RSCU (Relative Synonymous Codon Usage) برای ارزیابی احتمال نسبی استفاده از کدون خاص از بین کدون‌های مترادفی که یک اسیدآمین را کد می‌کنند، استفاده شد (Sharp and Li, 1986). از شاخص انطباق‌پذیری کدون (Codon Adaptation Index: CAI)، برای ارزیابی میزان استفاده از کدون‌های مترادفی که عموماً در مجموعه‌ای از ژن‌های مرجع با بیان بالا (نظیر ژن‌های ریبوزومی) به کار گرفته می‌شود، استفاده شد. همچنین برای ارزیابی تعداد کدون‌هایی که به‌طور مؤثر در یک ژن استفاده می‌شود از شاخص تعداد مؤثر کدون‌ها (Effective Number of Codon: ENc) استفاده شد (Srivastava et al., 2019). علاوه بر این، محتوای GC و GC3s (محتوای GC در موقعیت باز سوم کدون) تعیین شد. جهت ارزیابی عوامل مؤثر بر شکل‌گیری ترجیح‌کدونی، همبستگی و رگرسیون بین شاخص‌های ترجیح‌کدونی نیز در محیط نرم‌افزار R محاسبه شد.

بررسی نقش پیش‌تیمار گرمایی بر بیان برخی ژن‌های درگیر در اسیمیلایون نیتروژن: این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار (P، T، P+T و C) و سه تکرار با کشت

(Nodes) و رتبه‌بندی آن‌ها استفاده می‌کند. البته به دلیل پیچیدگی شبکه‌های زیستی و جهت ارزیابی جامع‌تر و دقیق‌تر، بهتر است از تلفیقی از این روش‌ها برای شناسایی گره‌های ضروری استفاده کرد (Chin et al., 2014). از این‌رو در این مطالعه برای رتبه‌بندی گره‌ها از چهار الگوریتم (Degree، DMNC (Density of Maximum Neighborhood Component Maximal) MCC، (Clique Centrality) MNC و (Neighborhood Component Maximal) استفاده شد و بر مبنای هر الگوریتم، ۵ گره ضروری انتخاب شد. با توجه به اینکه برخی گره‌ها در ارزیابی برخی الگوریتم‌ها مشترک بودند، گره‌های تکراری حذف شدند و فهرست نهایی از گره‌های ضروری (۱۰ گره) به افزونه CytoHubba وارد شد تا تعاملات آن‌ها با دیگر همسایگان در یک زیرشبکه (Subnetwork) ترسیم شود.

شناسایی موتیف‌های تنظیمی در ناحیه بالادست ژن‌های کلیدی اسیمیلایون نیتروژن: برای شناسایی موتیف‌های تنظیمی ژن‌های کلیدی که تحت عنوان عناصر تنظیمی سیس (Cis-Regulatory Elements: CRE) شناخته می‌شوند، ابتدا توالی نوکلئوتیدی ۱/۵ کیلوباز از ناحیه بالادست ژن‌های کلیدی اسیمیلایون نیتروژن از بخش BioMart سایت Ensemble (<https://plants.ensembl.org>) استخراج گردید. حذف موتیف‌های اضافی و شناسایی موتیف‌های شناخته‌شده بر اساس پایگاه داده JASPAR<sup>2022</sup> با استفاده از ابزار Tomtom با مقادیر آستانه P و E-value به ترتیب کمتر از ۰/۰۱ و کمتر از ۰/۰۰۰۱ انجام شد (-meme <http://meme-suite.org/tools/gomo>). برای تعیین عملکرد بیولوژیکی احتمالی موتیف‌های شناخته شده از ابزار GoMo به آدرس <http://meme-suite.org/tools/gomo> استفاده شد.

شبکه برهم‌کنش miRNAها با ژن‌های اسیمیلایون نیتروژن: ابتدا کل توالی رونوشت ژن‌های اسیمیلایون نیتروژن از بخش BioMart سایت Ensemble (<https://plants.ensembl.org>) بازایی شدند. فهرستی از miRNAهای شناخته شده کلزا نیز از سایت MirBase

CDS ژن‌های نیترا تریدوکتاز (NR) و نیتريت ردوکتاز (NIR) موجود در سایت NCBI با استفاده از بخش Primer quest موجود در سایت IDT به آدرس [www.IDTdna.com](http://www.IDTdna.com) طراحی شدند (جدول ۱). کیفیت آغازگرهای طراحی شده به لحاظ احتمال تشکیل دایمر، هترودایمر و سایر پارامترها با استفاده از ابزار OligoAnalyzer موجود در سایت IDT مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین جهت اطمینان از تکثیر اختصاصی آغازگرها از ابزار Primer-BLAST موجود در ابزار OligoAnalyzer استفاده شد. برای انجام واکنش qRT-PCR از مستر میکس 2X سایبرگرین (Ampliqon) با کد دسترسی StepOnePlus Real-Time PCR (A325402) و دستگاه System (شرکت ABI، آمریکا) استفاده شد. چرخه دمایی/زمانی واکنش qRT-PCR شامل واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۴۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و گسترش به مدت ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای هر تکرار زیستی، ۲ تکرار فنی (۲ تکرار برای هر cdNA) در نظر گرفته شد. برای بررسی بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه از فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001) استفاده شد. برای این منظور از ژن اکتین (جدول ۱) به‌عنوان کنترل داخلی برای نرمال‌سازی چرخه آستانه ژن‌های مورد مطالعه استفاده شد. تکثیر اختصاصی ژن‌های مورد مطالعه و اطمینان از نبود دایمر با بررسی منحنی ذوب در دستگاه Real time تأیید شد. میزان بیان هر کدام از ژن‌ها در تیمارهای ذکر شده نسبت به تیمار شاهد با استفاده از نرم‌افزار REST محاسبه شد (Pfaffl et al., 2002) و نمودارهای بیان نسبی ژن‌های مطالعه شده با استفاده از نرم‌افزار Excel ترسیم شدند.

### نتایج و بحث

شناسایی گره‌های ضروری در شبکه برهم‌کنشی ژن‌های اسیمپلاسیون نیتروژن: پس از وارد کردن فهرست برهم‌کنش ژن‌های اسیمپلاسیون نیتروژن به نرم‌افزار Cytoscape، گره‌های ضروری بر اساس الگوریتم‌های معرفی شده در افزونه CytoHubba شناسایی شدند که رتبه‌بندی و خصوصیات عملکردی این ژن‌ها در جدول ۲

بذرهای کلزا هیبرید هایولا ۵۰ انجام شد. گیاهچه‌های جوانه‌زده پس از انتقال از سینی کشت، در گلدان‌های ۲ کیلوگرمی که شامل مخلوطی از خاک مزرعه و پیت ماس بود، کشت شدند. گیاهان تا مرحله ۵-۴ برگگی در شرایط دمایی (۲۵ درجه سانتی‌گراد در روز و ۱۸ درجه سانتی‌گراد در شب) و نور طبیعی رشد کردند. سپس گیاهچه‌های یکنواخت از نظر رشدی برای اعمال تیمارها انتخاب شدند. در تیمار P+T، تنش خفیف گرمایی تحت عنوان پیش‌تیمار گرمایی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت اعمال شد و سپس گیاهچه‌ها به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (دوره‌ی بازیابی، Recovery phase) بازگردانده شدند. پس از گذشت ۳ روز از قرار گرفتن در فاز بازیابی، گیاهچه‌ها تحت دومین تنش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در تیمار T، گیاهچه‌ها بدون اعمال تنش خفیف اول (بدون اعمال پیش‌تیمار گرمایی) فقط به مدت ۳۰ دقیقه تحت تنش گرمایی ۴۴ درجه قرار گرفتند. در تیمار P گیاهچه‌ها فقط به مدت سه ساعت تحت تنش خفیف اول قرار گرفتند (۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد) و پس از آن در فاز بازیابی یعنی دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و دیگر تنش دوم روی آن‌ها اعمال نشد و در تیمار شاهد (C) نیز هیچ تنش گرمایی اعمال نشد و گیاهچه‌ها در تمام طول مدت آزمایش در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داشتند. نمونه‌برداری از بافت ریشه گیاهان ۱، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار انجام شد. لازم به ذکر است که تیمارهای آزمایش بر اساس مطالعات لیو و همکاران (Liu et al., 2018) و شرایط دمایی برای تنش خفیف گرمایی اول و تنش برگشتی دوم بر اساس مطالعات صداقت‌مهر و همکاران (Sedaghatmehr et al., 2022) طراحی شد. برای هر زمان نمونه‌برداری، سه تکرار زیستی معادل سه گلدان (سه گیاه در هر گلدان) انتخاب شد. پس از استخراج RNA کل با استفاده از کیت استخراج RNA (شرکت سیناکلون، ایران؛ کد دسترسی EX6101)، ارزیابی‌های کمی و کیفی با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز و اطمینان از عدم آلودگی DNA انجام شد. سپس از کیت First Strand cDNA Synthesis (شرکت سیناکلون، ایران؛ کد دسترسی RT5201) جهت سنتز cdNA با آغازگر الیگو (dt) استفاده شد. آغازگرهای آزمایش با توجه به توالی

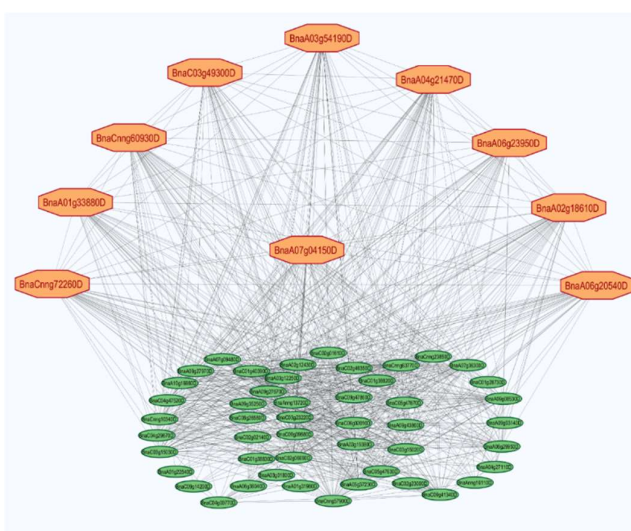
دارند. در برنج نیز غیر فعال‌سازی ژن *OsNR2* با کاهش پنجه‌زنی و عملکرد دانه همراه بوده است (Gao et al., 2019). از این رو به نظر می‌رسد ژن نیترات‌ردوکتاز یکی از مؤلفه‌های کلیدی در تنظیم راندامان مصرف نیتروژن باشد. بر اساس نتایج این تحقیق، ژن *BnaA07g04150D* کدکننده آنزیم نیتريت‌ردوکتاز، یکی دیگر از ژن‌های محوری در متابولیسم نیتروژن شناخته شد (جدول ۲). تحت شرایط کمبود نیتروژن، میزان بیان این ژن در ریشه‌های کلزا به میزان قابل توجهی افزایش یافت (Wang et al., 2021b) که عملکرد این ژن در کارایی استفاده از نیتروژن در شرایط محدود نیتروژن را نشان می‌دهد. از سوی دیگر در برنج، همبستگی مثبتی بین بیان این ژن (*OsNir1*) و رشد گیاه مشاهده شده است (Yu et al., 2021).

و گرافیک زیرشبکه برهم‌کنشی آن در شکل ۱ نشان داده شده است. بر اساس شدت برهم‌کنش‌های محاسبه شده مطابق الگوریتم‌های محاسباتی CytoHubba، ژن‌های *BnaA02g18610D* و *BnaCnng60930D* (کدکننده نیترات‌ردوکتاز)، به‌عنوان نامزدهای کلیدی ژن‌های اسیمیلایون نیتروژن (NAGs) معرفی شدند. مطالعات قبلی نشان داد که فعالیت آنزیم نیترات‌ردوکتاز بسته به نوع ژنوتیپ و میزان دسترسی به نیتروژن، متفاوت است (Huang et al., 2013)؛ به‌گونه‌ای که فعالیت این آنزیم در شرایط کمبود نیتروژن، در ژنوتیپ‌های کلزا با کارایی بالای نیتروژن در مقایسه با ژنوتیپ‌هایی با کارایی پائین نیتروژن، بالاتر است (Zou et al., 2022)؛ از این رو ژنوتیپ‌هایی با کارایی نیتروژن بالا، قدرت بیشتری در اسیمیلایون نیترات

جدول ۱- فهرست آغازگرهای مورد استفاده

Table 1. The list of used primers

نام ژن Gene name	توالی آغازگر Primer sequence (5'-3')	دمای اتصال (سانتی‌گراد) Annealing Temp (°C)	طول قطعه تکثیر شده (جفت‌باز) Amplicon length (bp)
اکتین <i>Actin</i>	F: TCTGGTGATGGTGTGTC R: ATCAGGGAATCAGTGAGGTC	60	107
نیتريت ردوکتاز <i>Nitrite reductase (NIR)</i>	F: GAAAGGTGTTCGTGTACGG R: CTCTCTCTAGGCACAGCAC	60	81
نیترات ردوکتاز <i>Nitrate reductase (NR)</i>	F: GTTCTGGTGCTGGTGTTC R: GTTTATCAGGCTGGGTGTTG	60	113



شکل ۱- نمایش زیرشبکه‌ای از ژن‌های کلیدی اسیمیلایون نیتروژن و برهم‌کنش آن‌ها با همسایگان شناخته شده (نارنجی): ژن‌های کلیدی، سبز: همسایگان شناخته شده آن‌ها). (تعداد گره: ۵۸، تعداد یال: ۸۰۸)

Figure 1. Subnetwork of hub genes involved in nitrogen assimilation and their interactions with identified neighbors (Orange color: Hub genes, Green color: their identified neighbors (No. of nodes:58, No. of edge:808)

نقش این آنزیم را در پاسخ‌های سازگاری گیاه به تنش‌های غیرزیستی روشن می‌سازد.

محصول ژن *BnaA01g33880D* نیز یکی دیگر از نامزدهای کلیدی در شبکه برهم‌کنشی مؤثر در متابولیسم نیتروژن شناخته شده است (جدول ۲) که با کد کردن آنزیم گلوتامات‌دهیدروژناز (NADH-glutamate dehydrogenase: GDH)، قادر است مقادیر اضافی  $\text{NH}_4^+$  درون سلولی را در میتوکندری با وارد کردن آن به ساختار ۲-اگزوگلوکوتارات و تبدیل به گلوتامات تعدیل کند. انتقال این ژن به گیاه برنج، با افزایش اسیمیلایون آمونیوم، اثرات بازدارندگی رشد ناشی از سمیت آمونیوم را کاهش داد و تحمل به خشکی را در این گیاه تقویت کرد (Yan et al., 2021). همچنین اثرات هم‌افزایی نیتروژن با سایتوکینین در تقویت فعالیت این آنزیم تأیید شد (Marchi et al., 2013).

بر اساس نتایج به‌دست آمده از درجه برهم‌کنشی ژن‌های مؤثر در اسیمیلایون نیتروژن و شناسایی گره‌های ضروری در این تعاملات، اهمیت ژن‌های ضروری در متابولیسم نیتروژن و تقویت راندمان مصرف نیتروژن تأیید شد. همچنین مطالعه عملکردی این ژن‌ها، اهمیت برخی از اجزای مؤثر در اسیمیلایون نیتروژن را در تحمل به تنش‌های غیرزیستی و ارتباط با پیام‌رسان‌های هورمونی تأیید کرد. بدین ترتیب این ژن‌های ضروری می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای زیستی (Biomarkers) احتمالی در انتقال ژن و بهبود وضعیت رشدی و عملکردی کلزا مورد توجه قرار گیرند.

**شناسایی موتیف‌های تنظیمی و عوامل رونویسی بالادست ژن‌های کلیدی مؤثر در اسیمیلایون نیتروژن:** از آن‌جا که عوامل رونویسی به‌طور هم‌زمان تعداد زیادی از ژن‌های موجود در یک مسیر بیوشیمیایی را تنظیم می‌کنند، از این رو می‌تواند به‌عنوان یک ابزار کلیدی در مهندسی ژنتیک برای بهبود خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی و عملکردی گیاهان مطرح باشند (Ueda and Yanagisawa, 2018). در مطالعه حاضر موتیف‌های CRE و عوامل رونویسی متصل به این توالی‌های تنظیمی در ناحیه بالادست ژن‌های کلیدی اسیمیلایون نیتروژن شناسایی شدند که مشخصات و عملکرد آن‌ها در

محصولات ژن‌های *BnaA03g54190D* و *BnaA04g21470D* نیز که در چرخه GS/GOGAT (گلوتامین سیتاز/گلوتامات‌سیتاز) در تبدیل نیتروژن غیرآلی به نیتروژن آلی نقش دارند، با توجه به شدت برهم‌کنش با دیگر همسایگان، به‌عنوان نامزدهای کلیدی در متابولیسم نیتروژن شناخته شدند (جدول ۲). گلوتامین‌سیتاز به‌عنوان یک جزء کلیدی راندمان مصرف نیتروژن شناخته شده است (Bernard and Habash, 2009). همچنین مشخص شده است که بیش بیان ژن‌های گلوتامین‌سیتاز در ذرت، برنج و گندم اثر مثبتی در راندمان مصرف نیتروژن داشته‌اند (Li et al., 2020). محصول ژن *BnaA2.Gln1;4* از اعضای خانواده گلوتامین‌سیتاز به‌عنوان یکی از نامزدهای انتخابی در بهبود کارایی نیتروژن در کلزا معرفی شده است که سطح بیان و فعالیت آن در شرایط کمبود نیتروژن به شدت افزایش می‌یابد (Zhou et al., 2022). مشاهده شده است که در شرایط کمبود نیتروژن، فعالیت آنزیم گلوتامین‌سیتاز در ژرپلاس‌هایی با کارایی بالاتر نیتروژن نسبت به ژرپلاس‌هایی با کارایی پائین‌تر نیتروژن، بیشتر می‌باشد (Yu et al., 2014). این یافته اهمیت این آنزیم در تقویت راندمان مصرف نیتروژن را تأیید می‌کند.

همچنین محصولات ژن‌های *BnaA06g23950D*، *BnaC03g49300D*، *BnaA06g20540D* و *BnaCmg72260D* که در بررسی رتبه‌بندی گره‌های شبکه به‌عنوان نامزدهای دیگری از ژن‌های مرکزی در شبکه برهم‌کنش پروتئینی شناخته شدند (جدول ۲)، آنزیم آسپاراژین‌سیتاز (Asparagine synthetase: AS) را کد می‌کنند که واکنش تبدیل آسپاراتات به آسپاراژین را با انتقال گروه آمید از گلوتامین و تبدیل آن به گلوتامات کاتالیز می‌کنند (Liu et al., 2022a). مطالعات قبلی نشان داده است که جهش در ژن *ASN2*، منجر به تجمع  $\text{NH}_4^+$  در گیاه آراییدوپسیس شده و آثار سمی آن رشد و نمو گیاه را تحت تأثیر قرار داده است (Gaufichon et al., 2013). همچنین جهش در ژن *osasn1* در برنج با کاهش فرایندهای نموی این گیاه همراه بوده است (Lee et al., 2020). علاوه بر اهمیت این آنزیم در متابولیسم و اسیمیلایون نیتروژن، القاء بیان ژن *ASN2* در پاسخ به تنش شوری و سرما (Wong et al., 2004)،

نبوده است و فقط عملکرد تعداد معدودی از این عوامل رونویسی نظیر *Dof1* و *NAC* در تقویت راندمان مصرف نیتروژن مؤثر بوده است (Li *et al.*, 2020). اولین مثال از مهندسی ژنتیک عوامل رونویسی بر تقویت راندمان مصرف نیتروژن و بهبود خصوصیات رشدی آراییدوپسیس در شرایط کمبود نیتروژن نیز با انتقال ژن *Dof1* ذرت صورت گرفت (Yanagisawa *et al.*, 2004). در مطالعات متعددی عملکرد عوامل رونویسی *Dof* در تنظیم متابولیسم نیتروژن و بهبود شاخص راندمان مصرف نیتروژن در گیاهان مختلف تأیید شد (Rueda-López *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2009; Peña *et al.*, 2017; Hasnain *et al.*, 2020). بررسی پیش‌بری ژن‌های *BnaNLA1* که به‌عنوان یک تنظیم‌کننده مثبت نقش مهمی در پاسخ‌های سازگاری به محدودیت نیتروژن در کلزا دارد (Peng *et al.*, 2007)، نشان داد که این نواحی غنی از جایگاه‌های اتصال پروتئین‌های *Dof*، *W-box* و عوامل *MYB* می‌باشند که با توجه به کثرت جایگاه‌های اتصال *Dof*، این عنصر به‌عنوان تنظیم‌کننده اصلی رونویسی ژن‌های خانواده *BnaNLA1* در کلزا معرفی شد (Zhang *et al.*, 2018).

جدول ۳ نمایش داده شده است. بر اساس تنوع موتیف‌های CRE شناسایی شده، می‌توان دریافت که شبکه تنظیمی گسترده‌ای در کنترل بیان ژن‌های اسیمیلاسیون نیتروژن نقش دارند. در این مطالعه تعدادی از CRE‌های مرتبط به اعضای خانواده‌ها و عوامل *Dof* (DNA with one finger)، *MYB*، *WRKY*، انگشت‌روی *C2H2*، جعبه *MADS* و *AT-hook* شناسایی شدند (جدول ۳). در مطالعات قبلی عوامل رونویسی از اعضای خانواده *bZIP*، *MYB*، *MADS-box* و *NAC* به‌عنوان عوامل پاسخ‌دهنده به نیترات شناخته شدند (Armijo *et al.*, 2017). همچنین نقش عناصر *MYB* در تنظیم تحمل گیاه به تنش کمبود نیتروژن تأیید شد (Lea *et al.*, 2007). در مطالعه دیگری محصول ژن *BnaC4.MYB2* به‌عنوان عامل پاسخ‌دهنده به تیمارهای آمونیوم و نیترات در کلزا شناخته شد (Zhou *et al.*, 2022). از سوی دیگر مشخص شد که بیان ژن *OsNRI.2* به‌وسیله عامل رونویسی انگشت‌روی *C2H2* فعال می‌شود که نقش مثبت این تنظیم‌کننده را در اسیمیلاسیون نیتروژن تأیید کرد (Han *et al.*, 2022). مطالعات جدید نشان می‌دهد عملکرد عناصر تنظیمی در گیاهانی نظیر گندم، ذرت و برنج در بهبود راندمان مصرف نیتروژن قابل توجه

جدول ۲- رتبه‌بندی ژن‌های کلیدی اسیمیلاسیون نیتروژن شناسایی شده با استفاده از الگوریتم‌های *Degree*، *MCC*، *MNC* و *DMNC*

Table 2. Ranking of identified hub genes involved in nitrogen assimilation using *Degree*، *MCC*، *MNC* and *DMNC* algorithms

رتبه Rank	شناسه ژن Gene ID	الگوریتم رتبه‌بندی Ranking Method	عملکرد Gene Description
1	<i>BnaA04g21470D</i>	<i>Degree</i> ، <i>MCC</i> ، <i>MNC</i>	GOGATs/GLUs/GLTs چرخه گلوتامین سینتاز/گلوتامات سینتاز
1	<i>BnaA06g23950D</i>	<i>DMNC</i> ، <i>MCC</i>	آسپاراژین سینتاز AS
1	<i>BnaC03g49300D</i>	<i>DMNC</i> ، <i>MCC</i>	آسپاراژین سینتاز AS
1	<i>BnaA06g20540D</i>	<i>DMNC</i> ، <i>MCC</i>	آسپاراژین سینتاز AS
1	<i>BnaCnng72260D</i>	<i>DMNC</i> ، <i>MCC</i>	آسپاراژین سینتاز AS
2	<i>BnaA03g54190D</i>	<i>Degree</i> ، <i>MNC</i>	چرخه گلوتامین سینتاز/گلوتامات سینتاز GOGATs/GLUs/GLTs
2	<i>BnaA02g18610D</i>	<i>Degree</i> ، <i>MNC</i>	نیترات ردوکتاز NR
2	<i>BnaCnng60930D</i>	<i>Degree</i> ، <i>MNC</i>	نیترات ردوکتاز NR
5	<i>BnaA07g04150D</i>	<i>Degree</i> ، <i>MNC</i>	نیتريت ردوکتاز NIR
5	<i>BnaA01g33880D</i>	<i>DMNC</i>	گلوتامات دهیدروژناز GDH

در پژوهش حاضر، بررسی پیش‌بر ژن‌های کلیدی مؤثر در اسیمیلاسیون نیتروژن، تنوعی از CRE‌های مختلف (MA1267.1، MA1274.1، MA1278.1، MA1281.1، MA1268.1، MA1279.1 و MA1277.1) که به‌ترتیب محل اتصال عواملی نظیر Dof 5.8، Dof 3.6، Dof 3.4، Dof، Dof 1.7 و Dof 1.5، CDF 5، 5.1 می‌باشند را نشان داد که جزئیات برخی از آن‌ها در جدول ۳ نشان داده شده است. این یافته‌ها نقش محوری عوامل رونویسی Dof را در تنظیم بیان ژن‌های اسیمیلاسیون نیتروژن و بهبود راندمان مصرف نیتروژن تأیید کرد.

**شبکه برهم‌کنشی miRNAها با ژن‌های مؤثر در اسیمیلاسیون نیتروژن:** بهره‌گیری از ابزارهای مهندسی ژنتیک نظیر دستکاری تنظیم بیان ژن‌های مؤثر در متابولیسم نیتروژن یکی از راهکارهای ضروری برای افزایش راندمان مصرف نیتروژن در کلزا می‌باشد (Hua et al., 2020). miRNAها که بیان ژن‌های هدف را پس از رونویسی یا در سطح ترجمه تنظیم می‌کنند، می‌توانند اهداف خوبی برای تقویت صفات زراعی و عملکردی گیاهان باشند (Moayedinezhad et al., 2019; Rani et al., 2023; Joudaki et al., 2024). در مطالعه کنونی در مجموع ۳۴ ژن اسیمیلاسیون نیتروژن به‌عنوان ژن‌های هدف miRNAهای مورد مطالعه شناسایی شد که با ۲۶ خانواده miRNA که مشتمل بر ۶۰ عضو بودند، تعامل داشتند (شکل ۲). بدین ترتیب که طیف متنوعی از خانواده‌های miRNA نظیر miR156، miR161، miR164، miR166، miR167، miR168، miR169، miR171، miR172، miR390، miR395، miR396، miR397، miR399، miR403، miR6028، miR6029، miR6031، miR6032، miR6033، miR6034، miR6035، miR6036، miR824، miR1140 و miR2111 در برهم‌کنش با ژن‌های اسیمیلاسیون نیتروژن شناسایی شدند که بر اساس پیش‌بینی برهم‌کنش‌های mRNA-miRNA اعضای خانواده (a,d,e,f) miR156، miR6028، miR6034، miR6035 (a,b,c) و miR395 بیشترین تعامل را با ژن‌های

اسیمیلاسیون نیتروژن نشان دادند. همچنین بر اساس نتایج به‌دست آمده، *BnaC03g15030D* (برهم‌کنش با ۱۷ miRNA)، *BnaC03g23220D* (برهم‌کنش با ۱۳ miRNA)، *BnaA03g12250D* (برهم‌کنش با ۱۴ miRNA)، *BnaC02g46350D* (برهم‌کنش با ۱۴ miRNA)، *BnaCnng10340D* (برهم‌کنش با ۱۲ miRNA) و *BnaC08g26580D* (برهم‌کنش با ۱۰ miRNA) که همگی از ژن‌های مرتبط با چرخه گلوتامین سبیتاز/گلو تامات سبیتاز بودند، بیشترین تعاملات را با انواع مختلفی از miRNAها در شبکه برهم‌کنشی نشان دادند که نشان از نقش عناصر تنظیمی miRNA در کنترل بیان این ژن‌ها پس از رونویسی یا ترجمه می‌باشد. در مطالعات پیشین نیز نقش برخی miRNAها نظیر miR157، miR160، miR164، miR169 و miR171 در تنظیم بیان ژن‌های هدف جهت سازگاری با کمبود نیتروژن در کلزا مورد بررسی قرار گرفت. به‌عنوان مثال مشخص شد که کاهش بیان اعضای خانواده miR169 در ریشه با افزایش بیان ژن‌های مؤثر در انتقال نترات در شرایط کمبود نیتروژن همراه بوده است (Hua et al., 2020). علی‌رغم این‌که اطلاعات کافی در خصوص تنظیم بیان ژن‌های اسیمیلاسیون نیتروژن از طریق برهم‌کنش با ریزRNAها در دست نیست، اما یافته‌های پژوهش حاضر می‌تواند بستر مناسبی را برای مطالعه بیان این عناصر تنظیمی و ژن‌های هدفشان در مقابله با شرایط محیطی ایجاد کند.

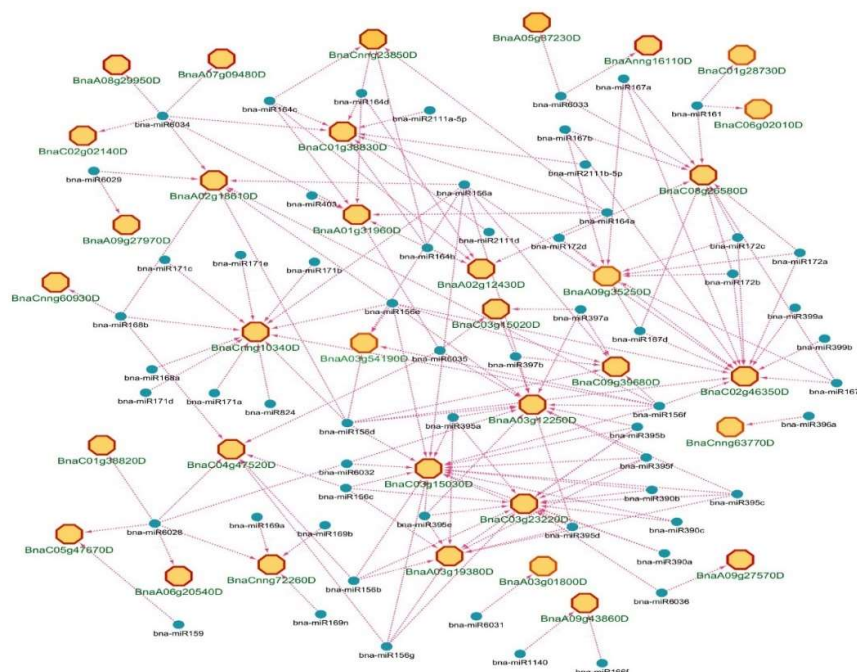
**بررسی الگوی ترجیح کدونی:** مطالعه الگوی ترجیح کدونی برای درک عملکرد و سازوکارهای تکاملی ژنوم گیاهان ضروری است (Yang et al., 2023b). در این مطالعه محاسبه شاخص‌های ترجیح کدونی ژن‌های اسیمیلاسیون نیتروژن (۵۸ ژن) بر روی توالی‌های کدکننده در جدول ۴ نشان داده شده است. همچنین جهت شناسایی عوامل مؤثر بر ترجیح کدونی، مقادیر همبستگی بین شاخص‌های مذکور در جدول ۵ نشان داده شده است. محتوای GC در مطالعه مذکور در محدوده ۰/۵۱-۰/۳۹ و مقادیر GC<sub>3s</sub> بین ۰/۵۳-۰/۳- ثبت شده است (جدول ۴). از نتایج نمودار GC<sub>3s</sub>

نزدیک یا مساوی صفر باشد، انتخاب طبیعی عامل اصلی مؤثر بر شکل‌گیری الگوی ترجیح‌کدونی است (Huo *et al.*, 2021). در این مطالعه همبستگی مثبت معنی‌داری بین GC و GC<sub>3S</sub> مشاهده شد (جدول ۵). با این حال مقدار شیب‌خط (۰/۳۵) (شکل ۳A) نشان داد که انتخاب طبیعی در درجه اول بر الگوهای استفاده از کدون در ژن‌های اسیمیلایون نیتروژن تأثیر می‌گذارد، در حالی که احتمالاً جهش‌های پایه نقش ثانویه دارند.

(GC- برای برآورد میزان درجه تأثیر جهش و انتخاب طبیعی بر الگوی ترجیح‌کدونی استفاده می‌شود (Sueoka, 1988). از این رو جهت شناسایی عوامل مؤثر بر شکل‌گیری الگوی ترجیح‌کدونی، منحنی رگرسیون بین GC (محور Y) و GC<sub>3S</sub> (محور X) مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳A). مطالعات نشان داده است که اگر GC به‌طور قابل‌توجهی با GC<sub>3S</sub> همبستگی داشته باشد و شیب منحنی رگرسیون نزدیک یا مساوی ۱ باشد، جهش عامل اصلی مؤثر بر شکل‌گیری الگوی ترجیح‌کدونی است. برعکس، اگر شیب

جدول ۳- عناصر تنظیمی CRE و عوامل رونویسی شناسایی شده در ناحیه پیشبری ژن‌های کلیدی اسیمیلایون نیتروژن  
Table 3. Cis-regulatory elements (CREs) sequences and their transcriptional factor identified in promoter regions of hub genes involved in nitrogen assimilation

موتیف Motif	نشان توالی Logo	فاکتور رونویسی TF	عملکرد Function
MA1267.1		Dof5.8	عملکرد مولکولی فعالیت فاکتور رونویسی MF transcription factor activity
MA1274.1		Dof3.6	فرایند بیولوژیکی تنظیم رونویسی BP regulation of transcription اجزای سلولی هسته و غشای پلاسمایی CC nucleus and plasma membrane عملکرد مولکولی فعالیت فاکتور رونویسی MF transcription factor activity
MA0933.1		AHL20 (A.T hook factors)	اجزای سلولی سیستم غشای داخلی CC endomembrane system فرایند بیولوژیکی تنظیم رونویسی BP regulation of transcription
MA1204.1		AGL13 (MADS box factors)	عملکرد مولکولی فعالیت فاکتور رونویسی MF transcription factor activity
MA1094.2		WRKY8 (GCM domain factors)	عملکرد مولکولی فعالیت فاکتور رونویسی MF transcription factor activity اجزای سلولی غشای پلاسمایی CC plasma membrane
MA1158.1		MGP (C2H2 zinc finger factors)	عملکرد مولکولی فعالیت سرین/ترئونین کینازی MF protein serine/threonine kinase activity
MA1184.1		RVE1 (Myb-related)	عملکرد مولکولی فعالیت فاکتور رونویسی MF transcription factor activity فرایند بیولوژیکی تنظیم رونویسی BP regulation of transcription اجزای سلولی سیستم غشای داخلی CC endomembrane system



شکل ۲- شبکه برهم‌کنش بین miRNAهای شناسایی شده با ژن‌های اسیمیلایون نیتروژن (دایره‌های سبز miRNAها، شش ضلعی‌های نارنجی ژن‌های اسیمیلایون نیتروژن و پیکان‌ها برهم‌کنش miRNAها با ژن‌های هدف را نشان می‌دهند).

Figure 2. The interaction network between the identified miRNAs and genes involved in nitrogen assimilation (Green circles represent miRNAs, orange hexagons represent genes involved in nitrogen assimilation, and arrows indicate the interaction of miRNAs with target genes).

مشخص شده است که همبستگی بالا (به سمت -۱) بین مقادیر ENc و CAI نشان‌دهنده نقش انتخاب‌طبیعی در شکل‌گیری ترجیح‌کدونی است (Chen *et al.*, 2014). نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که همبستگی منفی و معنی‌داری (جدول ۵، شکل ۳B) بین دو شاخص وجود دارد. از سوی دیگر همبستگی منفی بین CAI و GC<sub>3S</sub> (جدول ۵، شکل ۳C) و CAI و GC (جدول ۵، شکل ۳D) نشان داد ژن‌هایی که درصد GC در موقعیت سوم کدون‌شان بالا است (GC<sub>3S</sub>) یا درصد GC بالاتری دارند، شاخص انطباق‌پذیری کدون (CAI) کمتری دارند.

بر اساس ارزیابی شاخص RSCU، مقادیر بالای این شاخص نشان از جهت‌گیری مثبت استفاده از کدون خاص دارد (Sharp *et al.*, 1993). در خصوص ژن‌های اسیمیلایون نیتروژن مورد مطالعه ما، حداکثر RSCU معادل ۲ برای کدون CGT بود که اسیدآمینه آرژنین را کد می‌کند. همچنین بر اساس مقادیر RSCU به‌دست آمده، برای اسیدهای آمینه لوسین، کدون CTT، پرولین، کدون CCT، والین، کدون GTT، آلانین، کدون GCT و سرین،

مشخص شده است که حداقل مقدار ENc یعنی ۲۰ نشان‌دهنده ترجیح شدید در استفاده از فقط از یک کدون مترادف است، در حالی که حداکثر مقدار ENc یعنی ۶۱ نشان‌دهنده استفاده مساوی از همه کدون‌های مترادف برای هر اسیدآمینه است و هیچ ترجیحی در استفاده از کدون خاصی وجود ندارد (Li *et al.*, 2019; Shen *et al.*, 2020). در مطالعه کنونی محدوده این شاخص به‌طور میانگین برای ژن‌های مورد مطالعه بین ۵۵/۷-۴/۴ بود (جدول ۴) که بیانگر ترجیحات خاص کدونی در ژن‌های مورد مطالعه است. مقادیر شاخص انطباق‌پذیری کدون (CAI) بین صفر تا یک متغیر است. مشخص شده است که مقدار بالاتر این شاخص نشان‌دهنده سطح بیان نسبی بالاتر و سازگاری بیشتر به تنش‌های محیطی است (Sharp and Li 1987; Nath Choudhury *et al.*, 2017). محدوده این شاخص در ژن‌های مورد مطالعه ما بین ۰/۸۵-۰/۷۳ قرار داشت (جدول ۴) که بیانگر اهمیت ژن‌های اسیمیلایون نیتروژن در سازگاری به تنش‌های محیطی است.

تحت تأثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرند (Meyer and Stitt, 2001). در مطالعه‌ای که به بررسی بیان ژن‌های مؤثر در جذب، انتقال و اسیمیلایون نیتروژن در *Brassica juncea* L. تحت تنش‌های محیطی مختلف پرداخته شد، بیان دو ژن نیترات‌ردوکتاز و نیتريت‌ردوکتاز تحت تنش گرمایی کاهش یافت (Goel and Singh, 2015). پیش‌تر هم گزارش‌هایی مبنی بر کاهش فعالیت آنزیم‌های نیترات و نیتريت‌ردوکتاز تحت تنش گرمایی و شوری منتشر شده بود (Kolbert et al., 2010; Klimenko et al., 2006). در مطالعه حاضر نیز بیان این دو ژن تحت شرایط دمایی بالا کاهش یافت. این یافته‌ها حاکی از اثر سوء تنش حرارتی بر کاهش رونویسی ژن‌های اسیمیلایون نیتروژن و در نتیجه کاهش راندمان مصرف نیتروژن در گیاه کلزا می‌باشد.

کدون TCT در مقایسه با سایر کدون‌های مترادفشان ترجیح داده شدند (جدول ۶).

**الگوی بیان برخی از ژن‌های اسیمیلایون نیتروژن:** نتایج بیان نسبی ژن نیترات‌ردوکتاز در تیمار T (که در آن گیاهان بدون پیش‌تیمار گرمایی اولیه، فقط تحت تنش گرمایی قرار گرفته بودند)، نشان داد که در زمان‌های یک و ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار، میزان بیان این ژن به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافت (به ترتیب ۱۳/۵- و ۳۴/۹-). سطح بیان ژن نیتريت‌ردوکتاز هم تحت تیمار پیش‌تیمار گرمایی در زمان نمونه‌برداری ۷۲ ساعت کاهش معنی‌داری را نشان داد (شکل ۴). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که بیان دو ژن نیترات‌ردوکتاز و نیتريت‌ردوکتاز به میزان قابل‌توجهی در سطح رونویسی و ترجمه تنظیم می‌شوند و به شدت

جدول ۴- میانگین شاخص‌های ترجیح‌کدونی برای ژن‌های اسیمیلایون نیتروژن

Table 4. The average of codon usage bias indices for genes involved in nitrogen assimilation

شناسه ژن Gene ID	CAI	GC	GC <sub>3s</sub>	ENC	شناسه ژن Gene ID	CAI	GC	GC <sub>3s</sub>	ENC
<i>BnaA06g20540D</i>	0.76	0.47	0.46	53.4	<i>BnaC02g23000D</i>	0.74	0.46	0.47	54.8
<i>BnaA09g43860D</i>	0.77	0.43	0.33	51.6	<i>BnaA09g08530D</i>	0.76	0.49	0.47	52.8
<i>BnaC03g49300D</i>	0.79	0.44	0.37	51.9	<i>BnaA07g09480D</i>	0.78	0.43	0.37	51.9
<i>BnaC02g01610D</i>	0.79	0.48	0.44	50.3	<i>BnaA10g16660D</i>	0.79	0.47	0.43	51.6
<i>BnaC02g02140D</i>	0.75	0.44	0.36	55.1	<i>BnaC03g23220D</i>	0.75	0.45	0.37	53.9
<i>BnaA01g33880D</i>	0.80	0.45	0.39	50.5	<i>BnaA09g27970D</i>	0.78	0.43	0.4	52.8
<i>BnaA02g12430D</i>	0.82	0.47	0.39	48.9	<i>BnaC09g41340D</i>	0.74	0.50	0.46	54.3
<i>BnaA06g23950D</i>	0.79	0.44	0.38	52.6	<i>BnaAnng13720D</i>	0.79	0.48	0.44	51
<i>BnaA04g21470D</i>	0.73	0.48	0.37	54.1	<i>BnaCnng57900D</i>	0.77	0.51	0.51	49.4
<i>BnaA09g03140D</i>	0.80	0.47	0.48	48.4	<i>BnaC06g02010D</i>	0.75	0.46	0.41	54.9
<i>BnaA03g01800D</i>	0.76	0.42	0.33	52.5	<i>BnaC09g47860D</i>	0.76	0.51	0.53	50.7
<i>BnaC01g38830D</i>	0.76	0.44	0.35	51.2	<i>BnaA04g27110D</i>	0.75	0.43	0.49	53.2
<i>BnaC04g47520D</i>	0.75	0.46	0.38	54.5	<i>BnaCnng72260D</i>	0.77	0.47	0.48	53.7
<i>BnaC01g38820D</i>	0.76	0.41	0.35	52.5	<i>BnaC02g46350D</i>	0.85	0.39	0.31	50.9
<i>BnaC03g15020D</i>	0.78	0.47	0.44	51.8	<i>BnaCnng60930D</i>	0.74	0.47	0.48	55.7
<i>BnaA06g36040D</i>	0.76	0.42	0.30	51.7	<i>BnaC05g47630D</i>	0.79	0.44	0.4	52.3
<i>BnaA03g54190D</i>	0.73	0.48	0.44	55.2	<i>BnaA05g37230D</i>	0.77	0.44	0.39	53.5
<i>BnaA03g19380D</i>	0.76	0.45	0.34	53.7	<i>BnaC05g47670D</i>	0.78	0.44	0.35	51
<i>BnaC02g06690D</i>	0.77	0.49	0.42	51.5	<i>BnaAnng16110D</i>	0.80	0.44	0.46	52.2
<i>BnaC01g28730D</i>	0.81	0.41	0.35	52.4	<i>BnaCnng23850D</i>	0.82	0.47	0.4	49
<i>BnaA02g18610D</i>	0.75	0.45	0.47	54.7	<i>BnaA03g12250D</i>	0.77	0.48	0.45	52.8
<i>BnaA09g35250D</i>	0.81	0.41	0.34	50.1	<i>BnaCnng10340D</i>	0.77	0.45	0.38	53
<i>BnaC01g40390D</i>	0.80	0.46	0.40	50.9	<i>BnaC09g14200D</i>	0.79	0.43	0.39	52
<i>BnaA09g27570D</i>	0.74	0.46	0.44	53.8	<i>BnaA08g29950D</i>	0.81	0.45	0.39	50.6
<i>BnaA07g04150D</i>	0.76	0.48	0.47	53.0	<i>BnaA01g31960D</i>	0.76	0.44	0.35	51.9
<i>BnaC03g15030D</i>	0.76	0.48	0.45	54.0	<i>BnaC04g00770D</i>	0.75	0.42	0.48	52.8
<i>BnaA01g22540D</i>	0.84	0.41	0.33	50.1	<i>BnaCnng63770D</i>	0.77	0.49	0.46	51.8
<i>BnaC09g39680D</i>	0.78	0.47	0.44	53.0	<i>BnaC08g26580D</i>	0.81	0.41	0.34	49.6
<i>BnaC04g29670D</i>	0.81	0.45	0.42	50.6	<i>BnaA07g36300D</i>	0.76	0.49	0.48	51.9

CAI: شاخص انطباق‌پذیری کدون; GC: محتوای GC; GC<sub>3s</sub>: محتوای GC در موقعیت باز سوم کدون; ENC: شاخص تعداد مؤثر کدون

CAI: Codon adaptability index; GC: GC content; GC<sub>3s</sub>: Frequency of GC at the third codon position; ENC: Effective number of codons

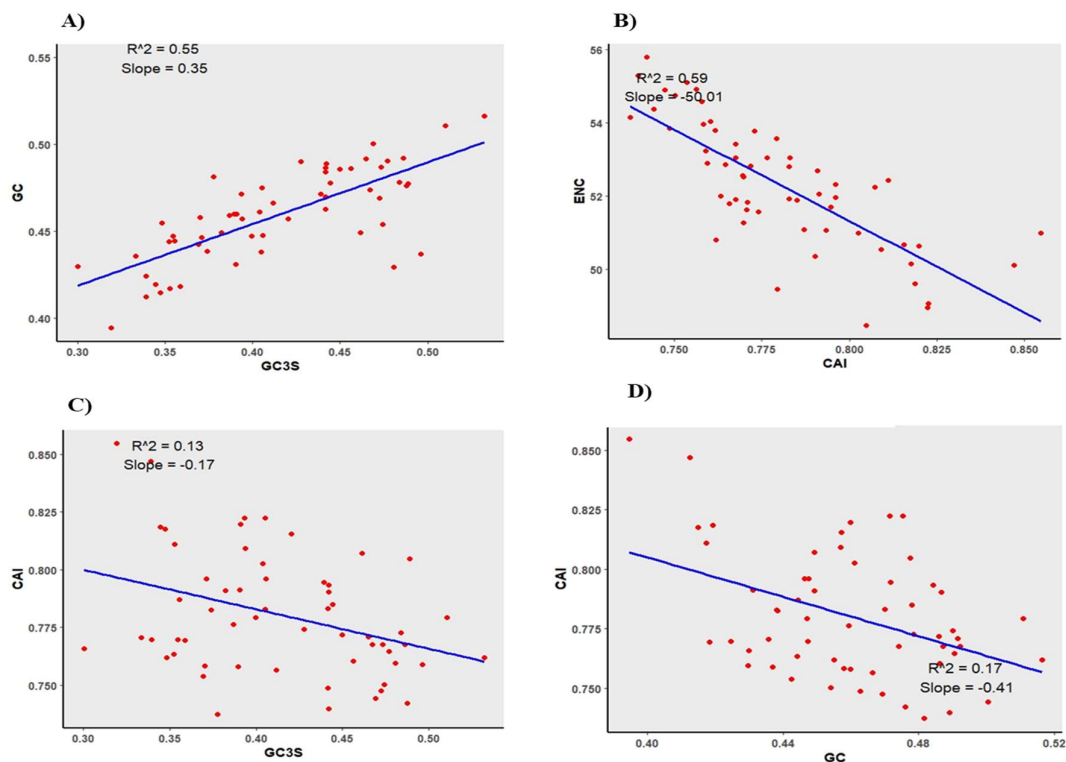
جدول ۵- همبستگی بین شاخص‌های ترجیح‌کدونی ژن‌های اسیمیلایون نیتروژن

Table 5. Correlation between codon usage bias indices of genes involved in nitrogen assimilation

شاخص (Index)	GC	GC <sub>3s</sub>	CAI	ENC
GC <sub>3s</sub>	0.74**			
CAI	-0.415**	-0.359**		
ENC	0.09 <sup>ns</sup>	0.17 <sup>ns</sup>	-0.77**	

GC: محتوای GC; GC<sub>3s</sub>: محتوای GC در موقعیت باز سوم کدون; CAI: شاخص انطباق‌پذیری کدون; ENC: شاخص تعداد مؤثر کدون

GC: GC content; GC<sub>3s</sub>: Frequency of GC at the third codon position; CAI: Codon adaptability index; ENC: Effective number of codons



شکل ۳- رابطه رگرسیون بین شاخص‌های الگوی ترجیح‌کدونی در ارتباط با ژن‌های اسیمیلاسیون نیتروژن (نقاط قرمز رنگ بیانگر ژن‌های اسیمیلاسیون نیتروژن هستند)

Figure 3. Regression relationship between codon usage bias indices associated with genes involved in nitrogen assimilation (Red dots represent genes involved in nitrogen assimilation).

جدول ۶- مقادیر RSCU کدون‌های مترادف شناسایی شده در نواحی ORF ژن‌های اسیمیلاسیون نیتروژن

Table 6. Relative synonymous codon usage (RSCU) values of synonymous codons identified in the ORF regions of the studied genes involved in nitrogen assimilation

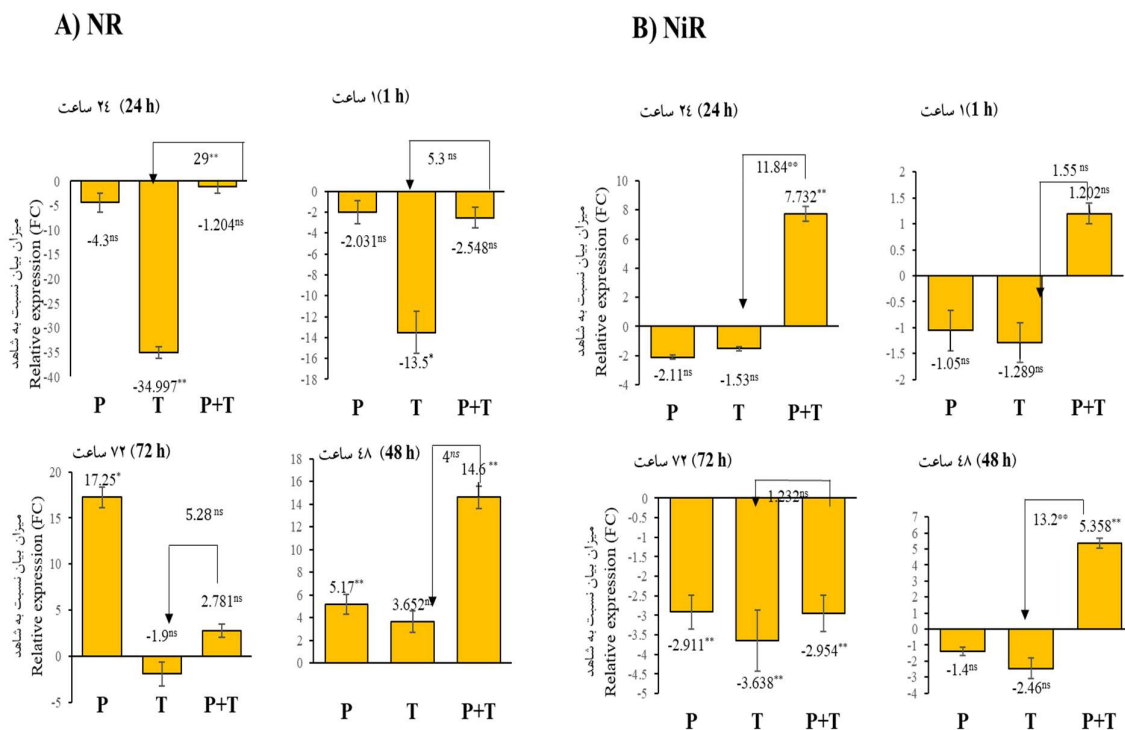
شاخص RSCU	کدون	اسید آمینه	شاخص RSCU	کدون	اسید آمینه	شاخص RSCU	کدون	اسید آمینه
RSCU index	Codon	Amino acid	RSCU index	Codon	Amino acid	RSCU index	Codon	Amino acid
Phe	TTT	0.919926	His	CAT	1.145658	Arg	AGA	1.307221542
Phe	TTC	1.080074	His	CAC	0.854342	Arg	AGG	0.692778458
Leu	TTA	0.72	Gln	CAA	0.984652	Val	GTT	1.617675312
Leu	TTG	1.28	Gln	CAG	1.015348	Val	GTC	0.849183477
Ser	TCT	1.515646	Arg	CGT	2.126126	Val	GTA	0.482228626
Ser	TCC	0.77551	Arg	CGC	0.642643	Val	GTG	1.050912584
Ser	TCA	1.140136	Arg	CGA	0.684685	Ala	GCT	1.92
Ser	TCG	0.568707	Arg	CGG	0.546547	Ala	GCC	0.608735632
Tyr	TAT	0.853659	Ile	ATT	1.223267	Ala	GCA	1.009655172
Tyr	TAC	1.146341	Ile	ATC	1.133373	Ala	GCG	0.461609195
Cys	TGT	1.159236	Ile	ATA	0.643361	Asp	GAT	1.264831804
Cys	TGC	0.840764	Met	ATG	1	Asp	GAC	0.735168196
Trp	TGG	1	Thr	ACT	1.365188	Glu	GAA	0.963805584
Leu	CTT	1.760703	Thr	ACC	0.931058	Glu	GAG	1.036194416
Leu	CTC	1.020856	Thr	ACA	1.168601	Gly	GGT	1.352329611
Leu	CTA	0.614709	Thr	ACG	0.535154	Gly	GGC	0.540623797
Leu	CTG	0.603732	Asn	AAT	0.787415	Gly	GGA	1.495571814
Pro	CCT	1.722814	Asn	AAC	1.212585	Gly	GGG	0.611474779
Pro	CCC	0.463397	Lys	AAA	0.905809			
Pro	CCA	1.250888	Lys	AAG	1.094191			
Pro	CCG	0.5629	Ser	AGT	1.097978			
			Ser	AGC	0.902022			

در شرایط نرمال حرارتی، به‌طور مؤثری به تنش‌های بعدی پاسخ دهند (Liu et al., 2022b; Nair et al., 2022). در گیاه خردل وحشی با بررسی سازوکارهای پیش تیمار گرمایی بر اثرات تنش

گیاهان با مجهز شدن به سازوکار حافظه سلولی و در رویارویی با تنش‌های خفیف، که تحت عنوان پیش‌آمدگی تنش (Stress priming) نامیده می‌شود، قادرند پس از یک دوره بازیابی کوتاه

در این مطالعه جهت درک بیشتر عوامل مؤثر بر تقویت بهره‌وری نیتروژن و پاسخ مناسب به تنش‌های محیطی، برهم‌کنش اعضای خانواده ژنی مؤثر در متابولیسم نیتروژن در گیاه کلزا مورد بررسی قرار گرفت و اعضای از ژن‌های خانواده نیترات‌ردوکتاز، نیتريت‌ردوکتاز، چرخه GS/GOGAT، آسپاراژین سیتاز و گلوتامات‌دهیدروژناژ به‌عنوان ژن‌های کلیدی با بیشترین اثرگذاری بر سایر ژن‌های اسیمیلاسیون نیتروژن شناسایی شدند. بررسی عملکردی این ژن‌ها حاکی از اهمیت آن‌ها در تنظیم بهینه‌ی مصرف نیتروژن، پاسخ‌های سازگاری به تنش‌های محیطی و پیام‌رسان‌های هورمونی بود. بررسی پیش‌ری ژن‌های مذکور نقش چندین عنصر CRE و عناصر ترانس متصل شونده به آن‌ها نظیر اعضای خانواده Dof، MYB، WRKY، انگشت‌روی C2H2، HD-ZIP و MADS-box را در تنظیم بیان این ژن‌ها روشن ساخت که با توجه به تنوع حضور عوامل Dof و توالی‌های سیس‌شناسایی شده آن در ناحیه 5'UTR ژن‌های ضروری، می‌توان این عوامل رونویسی را به‌عنوان عوامل محوری تنظیم ژن‌های اسیمیلاسیون نیتروژن معرفی کرد. از سوی دیگر پیش‌بینی برهم‌کنش miRNA-mRNA بر اساس توالی رونوشت ژن‌های مذکور، فهرستی از miRNAها که با ژن‌های هدف برهم‌کنش دارند را ارائه داد که از آن میان، اعضای miRNAهای خانواده‌های miR6028، miR395، miR156، miR6034 و miR6035 بیشترین برهم‌کنش را با mRNA ژن‌های اسیمیلاسیون نیتروژن نشان دادند که می‌توانند به‌عنوان اهداف کلیدی در ویرایش ژنومی و تنظیم بهینه بیان این ژن‌ها در مرحله‌ی پسا‌رونویسی و ترجمه مورد توجه قرار گیرند. از سوی دیگر بررسی الگوی ترجیح‌کدونی ژن‌های اسیمیلاسیون نیتروژن مورد مطالعه با استفاده از شاخص‌های مختلف، نقش انتخاب‌طبیعی و جهش را به‌عنوان عوامل اصلی در شکل‌گیری الگوی ترجیح‌کدونی ژن‌های مذکور تأیید کرد. همچنین مقادیر بالای شاخص CAI بیانگر استفاده از کدون‌های بهینه در ژن‌های مذکور و اهمیت این کدون‌ها در تنظیم افزایش بیان ژن‌ها در پاسخ‌های سازگاری به تنش‌های محیطی می‌باشد.

در طیفی از واریته‌های حساس، نیمه‌مقاوم و مقاوم مشخص شد که این سازوکار قادر است با تسریع القاء عوامل تنش گرمایی (HSFs)، تعادل آنتی‌اکسیدانی مناسبی را برای مقابله با تنش اکسیداتیوی که به دنبال تنش گرمایی القاء می‌شود، ایجاد کند (Samantaray *et al.*, 2023). نقش پیش‌تیمار گرمایی در گیاه کلزا در تغییر میزان مواد ترشح‌شده از ریشه تأیید شد (Delamare *et al.*, 2023)، با این حال تا پیش از این پژوهش، مطالعه‌ای در این گیاه در خصوص نقش پیش‌تیمار گرمایی در پاسخ رونویسی ژن‌های مؤثر در اسیمیلاسیون نیتروژن انجام نشده بود. در مطالعه کنونی، بررسی تغییرات بیان ژن نیترات‌ردوکتاز پس از تنش گرمایی شدید دوم در گیاهانی که تحت پیش‌تیمار گرمایی اولیه قرار گرفته بودند (P+T)، نشان داد ۴۸ ساعت پس از تنش دوم، میزان تجمع mRNA به میزان قابل‌توجهی در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش یافت (۱۴/۶ برابر). همچنین میزان بیان این ژن در این تیمار (P+T) ۴ برابر بیشتر از زمانی بود که گیاهان بدون پیش‌آمادگی در معرض تنش گرمایی دوم قرار گرفته بودند (شکل ۴A). در خصوص ژن نیتريت‌ردوکتاز نیز ۲۴ ساعت پس از تنش دوم در گیاهان پرایم شده (P+T)، سرعت رونویسی ۷/۷ برابر نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت. همچنین در مقایسه تیماری P+T/T یعنی گیاهان پیش‌تیمار شده نسبت به گیاهان پیش‌تیمار نشده میزان تجمع mRNA، ۱۱/۸ برابر افزایش نشان داد. همین روند افزایشی نیز ۴۸ ساعت پس از تنش دوم ادامه داشت به‌گونه‌ای که نرخ رونویسی در تیمار P+T، ۵/۳ برابر نسبت به گیاهان شاهد تقویت شد و در مقایسه تیماری P+T/T نیز پیش‌تیمار گرمایی نقش مثبت خود را در تقویت رونویسی این ژن نشان داد به‌گونه‌ای که در گیاهان پیش‌تیمار شده نرخ رونویسی ۱۳/۲ برابر نسبت به گیاهان پیش‌تیمار نشده افزایش یافت (شکل B ۴). این یافته‌ها نشان داد که پیش‌آماده‌سازی گیاه کلزا بوسیله تنش‌های ملایم گرمایی باعث تقویت بیان ژن‌های *NR* و *NIR* پس از تنش گرمایی دوم شد. به این ترتیب می‌توان نقش حافظه گرمایی را در تقویت بیان ژن‌های اسیمیلاسیون نیتروژن و به دنبال آن افزایش راندمان مصرف نیتروژن تأیید کرد.



شکل ۴- بیان ژن نیترات ردوکتاز (A) و نیتريت ردوکتاز (B) در بازه‌های زمانی ۱، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمارهای P (پیش تیمار گرمایی)، T (تنش گرمایی بدون اعمال پیش تیمار گرمایی)، P+T (پیش تیمار گرمایی + تنش دوم) نسبت به تیمار شاهد (بدون تنش گرمایی) در کلزا. اعداد بالای ستون‌ها تغییرات میزان بیان نسبت به شاهد را نشان می‌دهد. پیکان بالای نمودارها و عدد مجاور آن میزان تغییرات بیان ژن‌ها در تیمار P+T نسبت به تیمار T را نشان می‌دهد. \*\* معنی داری در سطح یک درصد؛ \* معنی داری در سطح پنج درصد؛ <sup>ns</sup> عدم معنی داری.

Figure 4. Expression pattern of Nitrate reductase (A) and Nitrite reductase (B) at timecourse 1, 24, 48 and 72 hours after P (thermopriming), T (Heat stress without thermopriming), P+T (thermopriming + second stress) compare to control plants in canola. The numbers above the columns indicate changes in expression levels compared to the control (Fold change: FC). The arrow above the graphs and the number next to it indicate the amount of change in gene expression in the P+T treatment compared to the T treatment. \*\* at 0.01 level significant, \* at 0.05 level significant, <sup>ns</sup> non-significant

اهمیت حافظه تنش گرمایی را در تقویت رونویسی ژن‌های ضروری متابولیسم نیتروژن و کاهش اثرات سوء گرما بر میزان رونویسی ژن‌های مذکور عنوان کرد. در مجموع یافته‌های این تحقیق می‌تواند گام مؤثری در جهت مهندسی متابولیسم نیتروژن و توسعه ژنوتیپ‌هایی با بهره‌وری بالای نیتروژن در شرایط تنش‌های محیطی در کلزا باشد.

ارزیابی شاخص RSCU ژن‌های مورد مطالعه نیز تمایل استفاده از یک کدون خاص را از میان کدون‌های مترادف در اسیدهای آمینه مختلف مشخص کرد که می‌تواند در بهینه‌سازی بیان ژن مورد استفاده قرار گیرد. از سوی دیگر نقش پیش تیمار گرمایی در بهبود رونویسی ژن‌های ضروری اسیمیلایون نیتروژن نظیر نیترات ردوکتاز و نیتريت ردوکتاز با استفاده از تکنیک qRT-PCR نیز

## References

- Agnihotri, A., Gupta, P., Dwivedi, A. and Seth, C.S. (2018). Counteractive mechanism (s) of salicylic acid in response to lead toxicity in *Brassica juncea* (L.) Czern. cv. Varuna. *Planta*, 248(1): 49-68. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2867-0>

- Ali, J., Jewel, Z.A., Mahender, A., Anandan, A., Hernandez, J. and Li, Z. (2018). Molecular genetics and breeding for nutrient use efficiency in rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6): 1762. <https://doi.org/10.3390/ijms19061762>
- Armijo, G. and Gutiérrez, R.A. (2017). Emerging players in the nitrate signaling pathway. *Molecular Plant*, 10(8): 1019-1022. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.07.006>
- Bernard, S.M. and Habash, D.Z. (2009). The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytologist*, 182(3): 608-620. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02823>
- Biswas, K.K., Palchoudhury, S., Chakraborty, P., Bhattacharyya, U.K., Ghosh, D.K., Debnath, P., Ramadugu, C., Keremane, M.L., Khetarpal, R.K. and Lee, R.F. (2019). Codon usage bias analysis of *citrus tristeza virus*: Higher codon adaptation to *citrus reticulata* host. *Viruses*, 11(4): 331. <https://doi.org/10.3390/v11040331>
- Chen, H., Sun, S., Norenburg, J.L. and Sundberg, P. (2014). Mutation and selection cause codon usage and bias in mitochondrial genomes of ribbon worms (Nemertea). *PLoS One*, 9(1): e85631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085631>
- Chin, C.H., Chen, S.H., Wu, H.H., Ho, C.W., Ko, M.T. and Lin, C.Y. (2014). CytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Systems Biology*, 8(Suppl 4): 1-7. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-8-S4-S11>
- Clément, G., Moison, M., Soulay, F., Reisdorf-Cren, M. and Masclaux-Daubresse, C. (2018). Metabolomics of laminae and midvein during leaf senescence and source-sink metabolite management in *Brassica napus* L. leaves. *Journal of Experimental Botany*, 69(4): 891-903. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx253>
- Cramer, G.R., Läuchli, A. and Epstein, E. (1986). Effects of NaCl and CaCl<sub>2</sub> on ion activities in complex nutrient solutions and root growth of cotton. *Plant Physiology*, 81(3): 792-797. <https://doi.org/10.1104/pp.81.3.792>
- Delamare, J., Brunel-Muguet, S., Morvan-Bertrand, A., Cantat, O., Firmin, S., Trinsoutrot-Gattin, I., Le Franc, L. and Personeni, E. (2023). Thermoprimer effects on root morphological traits and root exudation during the reproductive phase in two species with contrasting strategies: *Brassica napus* (L.) and *Camelina sativa* (L.) Crantz. *Environmental and Experimental Botany*, 210: 105318. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2023.105318>
- Gao, Z., Wang, Y., Chen, G., Zhang, A., Yang, S., Shang, L., Wang, D., Ruan, B., Liu, C., Jiang, H., Dong, G., Zhu, L., Hu, J., Zhang, G., Zeng, D., Guo, L., Xu, G., Teng, S., Harberd, N. and Qian, Q. (2019). The *indica* nitrate reductase gene *OsNR2* allele enhances rice yield potential and nitrogen use efficiency. *Nature Communications*, 10(1): 5207. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13110-8>
- Gaufichon, L., Masclaux-Daubresse, C., Tcherkez, G., Reisdorf-Cren, M., Sakakibara, Y., Hase, T., Clement, G., Avicé, J. C., Grandjean, O., Marmagne, A., Mercey, S. B., Azzopardi, M., Soulay, F. and Suzuki, A. (2013). *Arabidopsis thaliana* *ASN2* encoding asparagine synthetase is involved in the control of nitrogen assimilation and export during vegetative growth. *Plant, Cell & Environment*, 36(2): 328-342. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02576.x>
- Goel, P. and Singh, A.K. (2015). Abiotic stresses downregulate key genes involved in nitrogen uptake and assimilation in *Brassica juncea* L. *Plos One*, 10(11): e0143645. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143645>
- Han, M.L., Lv, Q.Y., Zhang, J., Wang, T., Zhang, C.X., Tan, R.J., Wang, Y.L., Zhong, L.Y., Gao, Y.Q., Chao, Z.F., Li, Q.Q., Chen, G.Y., Shi, Z., Lin, H.X. and Chao, D.Y. (2022). Decreasing nitrogen assimilation under drought stress by suppressing DST-mediated activation of *Nitrate Reductase 1.2* in rice. *Molecular Plant*, 15(1): 167-178. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.09.005>
- Hasnain, A., Irfan, M., Bashir, A., Maqbool, A. and Malik, K.A. (2020). Transcription factor *TaDof1* improves nitrogen and carbon assimilation under low-nitrogen conditions in wheat. *Plant Molecular Biology Reporter*, 38(3): 441-451. <https://doi.org/10.1007/s11105-020-01208-z>
- He, X., Zhang, H., Ye, X., Hong, J. and Ding, G. (2021). Nitrogen assimilation related genes in *Brassica napus*: Systematic characterization and expression analysis identified hub genes in multiple nutrient stress responses. *Plants*, 10(10): 2160. <https://doi.org/10.3390/plants10102160>
- Hershberg, R. and Petrov, D.A. (2008). Selection on codon bias. *Annual Review of Genetics*, 42(1): 287-299. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091442>
- Hoshida, H., Tanaka, Y., Hibino, T., Hayashi, Y., Tanaka, A., Takabe, T. and Takabe, T. (2000). Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. *Plant Molecular Biology*, 43(1): 103-111. <https://doi.org/10.1023/A:1006408712416>
- Hu, J., Zhao, X., Zhang, Z. and Yu, J. (2007). Compositional dynamics of guanine and cytosine content in prokaryotic genomes. *Research in Microbiology*, 158(4): 363-370. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.02.007>
- Hua, Y.P., Zhou, T., Huang, J.Y., Yue, C.P., Song, H.X., Guan, C.Y. and Zhang, Z.H. (2020). Genome-wide differential DNA methylation and miRNA expression profiling reveals epigenetic regulatory mechanisms underlying nitrogen-limitation-triggered adaptation and use efficiency enhancement in allotetraploid rapeseed. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22): 8453. <https://doi.org/10.3390/ijms21228453>
- Huang, H., Rong, X., Song, H., Liu, Q., Liao, Q., Luo, J., Gu, J., Guan, C., Gong, J. and Zhang, Z. (2013). Effect of nitrate reductase (NR) inhibitor on NR activity in oilseed rape (*Brassica napus* L.) and its relation to nitrate content. *Acta Agronomica Sinica*, 39: 1668-1673. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1006.2013.01668>

- Huo, X., Liu, S., Li, Y., Wei, H., Gao, J., Yan, Y., Zhang, G. and Liu, M. (2021). Analysis of synonymous codon usage of transcriptome database in *Rheum palmatum*. *PeerJournal*, 9: e10450. <https://doi.org/10.7717/peerj.10450>
- Johnson, M.M., Hockenberry, A.J., McGuffie, M.J., Vieira, L.C. and Wilke, C.O. (2023). Growth-dependent gene expression variation influences the strength of codon usage biases. *Molecular Biology and Evolution*, 40(9): msad189. <https://doi.org/10.1093/molbev/msad189>
- Joudaki, F., Ismaili, A., Sohrabi, S. S., Hosseini, S. Z. and Ahmadi, H. (2024). Conserved microRNAs and their target genes in *Quercus infectoria*. *Plant Genetic Research*, 10(2): 103-118 (In Persian). <http://dx.doi.org/10.22034/PGR.10.2.8>
- Klimenko, S.B., Peshkova, A.A. and Dorofeev, N.V. (2006). Nitrate reductase activity during heat shock in winter wheat. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 2(1): 50-55.
- Kolbert, Z., Ortega, L. and Erdei, L. (2010). Involvement of nitrate reductase (NR) in osmotic stress-induced NO generation of *Arabidopsis thaliana* L. roots. *Journal of Plant Physiology*, 167(1): 77-80. <https://doi.org/10.1016/j.plph.2009.08.013>
- Kumar, R., Taware, R., Gaur, V.S., Guru, S.K. and Kumar, A. (2009). Influence of nitrogen on the expression of *TaDof1* transcription factor in wheat and its relationship with photo synthetic and ammonium assimilating efficiency. *Molecular Biology Reports*, 36(8): 2209-2220. <https://doi.org/10.1007/s11033-008-9436-8>
- Lammerts van Bueren, E.T. and Struik, P.C. (2017). Diverse concepts of breeding for nitrogen use efficiency. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 37(5): 50. <https://doi.org/10.1007/s13593-017-0457-3>
- Lea, U.S., Slimestad, R., Smedvig, P. and Lillo, C. (2007). Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta*, 225(5): 1245-1253. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0414-x>
- Lee, H.J., Abdula, S.E., Jang, D.W., Park, S.H., Yoon, U.H., Jung, Y.J., Kang, K.K., Nou, I.S. and Cho, Y.G. (2013). Overexpression of the glutamine synthetase gene modulates oxidative stress response in rice after exposure to cadmium stress. *Plant Cell Reports*, 32(10): 1521-1529. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1464-8>
- Lee, S., Park, J., Lee, J., Shin, D., Marmagne, A., Lim, P.O., Masclaux-Daubresse, C., An, G. and Nam, H.G. (2020). *OsASN1* overexpression in rice increases grain protein content and yield under nitrogen-limiting conditions. *Plant and Cell Physiology*, 61(7): 1309-1320. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa060>
- Li, G., Pan, Z., Gao, S., He, Y., Xia, Q., Jin, Y. and Yao, H. (2019). Analysis of synonymous codon usage of chloroplast genome in *Porphyra umbilicalis*. *Genes & Genomics*, 41(10): 1173-1181. <https://doi.org/10.1007/s13258-019-00847-1>
- Li, M., Xu, J., Gao, Z., Tian, H., Gao, Y. and Kariman, K. (2020). Genetically modified crops are superior in their nitrogen use efficiency-A meta-analysis of three major cereals. *Scientific Reports*, 10(1): 8568. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65684-9>
- Liu, H.C., Lämke, J., Lin, S. Y., Hung, M.J., Liu, K.M., Charng, Y.Y. and Bäurle, I. (2018). Distinct heat shock factors and chromatin modifications mediate the organ-autonomous transcriptional memory of heat stress. *The Plant Journal*, 95(3): 401-413. <https://doi.org/10.1111/tpj.13958>
- Liu, X., Hu, B. and Chu, C. (2022a). Nitrogen assimilation in plants: current status and future prospects. *Journal of Genetics and Genomics*, 49(5): 394-404. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.12.006>
- Liu, H., Able, A.J. and Able, J.A. (2022b). Priming crops for the future: rewiring stress memory. *Trends in Plant Science*, 27(7): 699-716. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.11.015>
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25(4): 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Marchi, L., Degola, F., Polverini, E., Tercé-Laforgue, T., Dubois, F., Hirel, B. and Restivo, F.M. (2013). Glutamate dehydrogenase isoenzyme 3 (GDH3) of *Arabidopsis thaliana* is regulated by a combined effect of nitrogen and cytokinin. *Plant Physiology and Biochemistry*, 73: 368-374. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.10.019>
- Meyer, C. and Stitt, M. (2001). Nitrate Reduction and Signalling. In: Lea, P.J. and Morot-Gaudry, J.F., Eds., *Plant Nitrogen*, pp. 61-78. Springer-Verlag, Berlin, DA. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-04064-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-662-04064-5_2)
- Miller, A.J. and Cramer, M.D. (2005). Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and Soil*, 274(1): 1-36. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-0965-1>
- Moayedinezhad, A., Mohammadparast, B., Hosseini Salekdeh, G., Mohsenifard, E. and Nejatian, M.A. (2019). Upstream regulatory elements, potential targets and expression patterns of three drought responsive miRNAs in two grapevine cultivars. *Plant Genetic Research*, 6(1): 115-126 (In Persian). <https://doi.org/10.29252/pgr.6.1.115>
- Nair, A.U., Bhukya, D.P.N., Sunkar, R., Chavali, S. and Allu, A.D. (2022). Molecular basis of priming-induced acquired tolerance to multiple abiotic stresses in plants. *Journal of Experimental Botany*, 73(11): 3355-3371. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac089>
- Nath Choudhury, M., Uddin, A. and Chakraborty, S. (2017) Codon usage bias and its influencing factors for Y-linked genes in human. *Computational Biology and Chemistry*, 69: 77-86. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2017.05.005>
- Nguyen, G.N., Rothstein, S.J., Spangenberg, G. and Kant, S. (2015). Role of microRNAs involved in plant response to nitrogen and phosphorous limiting conditions. *Frontiers in Plant Science*, 6: 629. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00629>
- Peña, P.A., Quach, T., Sato, S., Ge, Z., Nersesian, N., Changa, T., Dweikat, I., Soundararajan, M. and Clemente, T.E. (2017). Expression of the maize *Dof1* transcription factor in wheat and sorghum. *Frontiers in Plant Science*, 8: 434. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00434>

- Peng, M., Hannam, C., Gu, H., Bi, Y.M. and Rothstein, S.J. (2007). A mutation in NLA, which encodes a RING-type ubiquitin ligase, disrupts the adaptability of Arabidopsis to nitrogen limitation. *The Plant Journal*, 50(2): 320-337. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03050.x>
- 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): e36-e36. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>
- Plotkin, J.B. and Kudla, G. (2011). Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nature Reviews Genetics*, 12(1): 32-42. <https://doi.org/10.1038/nrg2899>
- Rani, A., Singh, S., Yadav, P., Arora, H., Kaur, I. and Dhaka, N. (2023). MicroRNAs for understanding and improving agronomic traits in oilseed Brassicas. *Plant Gene*, 34: 100422. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2023.100422>
- Rueda-López, M., Crespillo, R., Cánovas, F. M. and Ávila, C. (2008). Differential regulation of two glutamine synthetase genes by a single Dof transcription factor. *The Plant Journal*, 56(1): 73-85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03573.x>
- Samantaray, D., Vankanavath, A.B., Kadumuri, R.V., Ramadurai, D., Chavali, S. and Allu, A.D. (2023). Thermopriming mitigates the effects of heat stress by modulating the expression of Heat shock factors in *Brassica juncea* (Indian mustard). *Environmental and Experimental Botany*, 211: 105371. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2023.105371>
- Sedaghatmehr, M., Stüwe, B., Mueller-Roeber, B. and Balazadeh, S. (2022). Heat shock factor HSFA2 fine-tunes resetting of thermomemory via plastidic metalloprotease FtsH6. *Journal of Experimental Botany*, 73(18): 6394-6404. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac257>
- Sharp, P.M. and Li, W.H. (1986). An evolutionary perspective on synonymous codon usage in unicellular organisms. *Journal of Molecular Evolution*, 24(1): 28-38. <https://doi.org/10.1007/BF02099948>
- Sharp, P.M. and Li, W.H. (1987). The codon adaptation index-a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Research*, 15(3): 1281-1295. <https://doi.org/10.1093/nar/15.3.1281>
- Sharp, P.M., Stenico, M., Peden, J.F. and Lloyd, A.T. (1993). Codon usage: mutational bias, translational selection, or both?. *Biochemical Society Transactions*, 21(4): 835-841. <https://doi.org/10.1042/bst0210835>
- Shen, Z., Gan, Z., Zhang, F., Yi, X., Zhang, J. and Wan, X. (2020). Analysis of codon usage patterns in citrus based on coding sequence data. *BMC Genomics*, 21(Suppl 5): 234. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6641-x>
- Srivastava, S., Chanyal, S., Dubey, A., Tewari, A.K. and Taj, G. (2019). Patterns of codon usage bias in WRKY genes of *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Agricultural Science*, 11(4): 76. <https://doi.org/10.5539/jas.v11n4p76>
- Sueoka, N. (1988). Directional mutation pressure and neutral molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(8): 2653-2657. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.8.2653>
- Tang, Y., Sun, X., Hu, C., Tan, Q. and Zhao, X. (2013). Genotypic differences in nitrate uptake, translocation and assimilation of two Chinese cabbage cultivars [*Brassica campestris* L. ssp. *Chinensis* (L.)]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70: 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.04.027>
- Tang, W., He, X., Qian, L., Wang, F., Zhang, Z., Sun, C., Lin, L. and Guan, C. (2019). Comparative transcriptome analysis in oilseed rape (*Brassica napus*) reveals distinct gene expression details between nitrate and ammonium nutrition. *Genes*, 10(5): 391. <https://doi.org/10.3390/genes10050391>
- Thomsen, H.C., Eriksson, D., Møller, I.S. and Schjoerring, J.K. (2014). Cytosolic glutamine synthetase: a target for improvement of crop nitrogen use efficiency?. *Trends in Plant Science*, 19(10): 656-663. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.06.002>
- Ueda, Y. and Yanagisawa, S. (2018). Transcription Factor-Based Genetic Engineering to Increase Nitrogen Use Efficiency. In: Shrawat, A., Zayed, A. and Lightfoot, D., Eds., *Engineering Nitrogen Utilization in Crop Plants*, PP. 37-55. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-92958-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-92958-3_3)
- Wang, G., Ding, G., Li, L., Cai, H., Ye, X., Zou, J. and Xu, F. (2014). Identification and characterization of improved nitrogen efficiency in interspecific hybridized new-type *Brassica napus*. *Annals of Botany*, 114(3): 549-559. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu135>
- Wang, F., Yoshida, H. and Matsuoka, M. (2021a). Making the 'Green Revolution' truly green: improving crop nitrogen use efficiency. *Plant and Cell Physiology*, 62(6): 942-947. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcab051>
- Wang, Y., Hua, Y.P., Zhou, T., Huang, J.Y. and Yue, C.P. (2021b). Genomic identification of nitrogen assimilation-related genes and transcriptional characterization of their responses to nitrogen in allotetraploid rapeseed. *Molecular Biology Reports*, 48(8): 5977-5992. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06599-0>
- Wong, H.K., Chan, H.K., Coruzzi, G.M. and Lam, H.M. (2004). Correlation of *ASN2* gene expression with ammonium metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134(1): 332-338. <https://doi.org/10.1104/pp.103.033126>
- Xu, Y., Liu, K., Han, Y., Xing, Y., Zhang, Y., Yang, Q. and Zhou, M. (2021). Codon usage bias regulates gene expression and protein conformation in yeast expression system *P. pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 20(1): 91. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01580-9>
- Yan, L. U., Gong, Y., Luo, Q., Dai, G.X., Teng, Z., He, Y., Wu, X., Liu, C., Tang, D., Ye, N., Deng, G., Lin, J. and Liu, X. (2021). Heterologous expression of fungal *AcGDH* alleviates ammonium toxicity and suppresses photorespiration, thereby improving drought tolerance in rice. *Plant Science*, 305: 110769. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110769>

- Yanagisawa, S., Akiyama, A., Kisaka, H., Uchimiya, H. and Miwa, T. (2004). Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants: improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(20): 7833-7838. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402267101>
- Yang, M., Liu, J., Yang, W., Li, Z., Hai, Y., Duan, B., Zhang, H., Yang, X. and Xia, C. (2023a). Analysis of codon usage patterns in 48 *Aconitum* species. *BMC Genomics*, 24(1): 703. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09650-5>
- Yang, Q., Xin, C., Xiao, Q.S., Lin, Y.T., Li, L. and Zhao, J.L. (2023b). Codon usage bias in chloroplast genes implicate adaptive evolution of four ginger species. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1304264. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1304264>
- Yu, J.L., Zhu, Z.K., Zhang, Z.H., Shu, J.B., Yang, C., Song, H.X. and Guan, C. (2014). Influence of glutamine synthase and glutamate synthase on N reutilization in *Brassica napus* under different nitrogen condition. *Crops*, 6: 81-85.
- Yu, J., Xuan, W., Tian, Y., Fan, L., Sun, J., Tang, W., Chen, G., Wang, B., Liu, Y., Wu, W., Liu, X., Jiang, X., Zhou, C., Dai, Z., Xu, D., Wang, C. and Wan, J. (2021). Enhanced OsNLP4-OsNiR cascade confers nitrogen use efficiency by promoting tiller number in rice. *Plant Biotechnology Journal*, 19(1): 167-176. <https://doi.org/10.1111/pbi.13450>
- Zhang, Z.H., Zhou, T., Liao, Q., Yao, J.Y., Liang, G.H., Song, H.X., Guan, C.Y. and Hua, Y.P. (2018). Integrated physiologic, genomic and transcriptomic strategies involving the adaptation of allotetraploid rapeseed to nitrogen limitation. *BMC Plant Biology*, 18(1): 322. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1507-y>
- Zhou, T., Wu, P., Yue, C., Huang, J., Zhang, Z. and Hua, Y. (2022). Transcriptomic dissection of allotetraploid rapeseed (*Brassica napus* L.) in responses to nitrate and ammonium regimes and functional analysis of *BnaA2. Gln1; 4* in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 63(6): 755-769. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcac037>
- Zou, X., Guan, M. and Guan, C. (2022). Studies on plant morphological and physiological characteristics of high nitrogen absorption in *Brassica napus* L. *Crops*, 5: 97-103.