

مقایسه الگوی بیان ژنهای *SOS1*، *NHX1* و *HvHKT3* در گیاهچه‌های جو تحت تنش شوری

Comparison of expression patterns of *SOS1*, *NHX1* and *HvHKT3* genes in barley seedlings under salinity stress

امید جدیدی^۱، علیرضا اطمینان^{۲*}، رضا عزیزی نژاد^۳، آسا ابراهیمی^۴، علیرضا پورابوقداره^۴

۱- دانشجوی دکترا، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴- استادیار، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

Jadidi O¹, Etminan A^{*2}, Azizinezhad R³, Ebrahimi A³, Pour-Aboughadareh A⁴

1- PhD Student, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

3- Assistant Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: alietminan55@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۴)

چکیده

جو (*Hordeum vulgare* L.) متحمل‌ترین گیاه نسبت به تنش شوری در بین غلات است و در گستره وسیعی از شرایط آب و هوایی کشت می‌شود. شناسایی ژن‌های دخیل در تحمل به شوری و بررسی بیان آن‌ها در سطوح مختلف تنش از جمله روش‌های معمول مورد استفاده در پروژه‌های به‌نژادی برای تحمل به شوری می‌باشد. در این تحقیق تأثیر تنش شوری بر بیان ژن‌های *SOS1*، *NHX1* و *HvHKT3* در گیاهچه‌های سه ژنوتیپ جو زراعی مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به نتایج به‌دست آمده تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار نمک NaCl موجب افزایش بیان ژن‌های مورد بررسی به‌ترتیب به میزان ۱۲/۸۷، ۲/۱۹ و ۲/۵۴ برابر نسبت به شرایط عدم تنش شد. علاوه بر این، بین ژنوتیپ‌های ارزیابی شده نیز اختلاف معنی‌داری از نظر بیان نسبی هر یک از ژن‌های مورد اشاره وجود داشت. نتایج مقایسه میانگین بیان نسبی ژن‌های *SOS1*، *NHX1* و *HvHKT3* بیانگر برتری نسبی ژنوتیپ اصلاحی G3 با شجره D10*2/4/Productive/3/Roho//Alger/Ceres362-1-1 نسبت به ژنوتیپ دیگر و رقم شاهد (مهر) بود. بنابراین به‌نظر می‌رسد این ژنوتیپ از پتانسیل مناسبی برای استفاده در برنامه‌های به‌نژادی جو برای بهبود تحمل به تنش شوری برخوردار باشد.

واژه‌های کلیدی

آنتی‌پورترهای یونی
الگو بیان ژن
ترنسکریپتوم
جو

مقدمه

جو (*Hordeum vulgare* L.) پس از گندم به عنوان مهم ترین غله زراعی در ایران شناخته شده است و بخش عمده ای از زمین های زراعی کشور به کشت این گیاه اختصاص دارد. از سوی دیگر، این محصول در تغذیه انسان به صورت نان، انواع سوپ، غذای کودکان، و دیگر خوراکی ها به ویژه تهیه مالت دارای کاربرد زیادی می باشد (Vaezi et al. 2019). از نظر میزان تحمل به تنش های محیطی، این گیاه زراعی دارای درجه بالایی از تحمل به تنش شوری بوده و معمولاً به عنوان متحمل ترین غله به تنش شوری شناخته می شود (Ahmadi et al. 2018; Mwando et al. 2020). با توجه به پدیده گرم شدن کره زمین که همراه با کاهش منابع آب برای کشاورزی منجر به افزایش شوری زمین های قابل کشت در سراسر جهان شده است، تنش شوری به طور مضاعف می تواند یک عامل تهدید کننده مهم برای امنیت غذایی حال و آینده ای نه چندان دور باشد.

زمانی که گیاه در معرض تنش قرار می گیرد مجموعه ای از مکانیسم های فیزیولوژیکی و مولکولی توأم در پاسخ به تنش فعال می شوند. افزایش تحمل به تنش شوری یکی از مهم ترین راه کارها برای افزایش عملکرد در محیط های شور است زیرا تحمل به شوری یک صفت بسیار پیچیده بوده و در هر دو سطح اندام و سلول، گیاه را با فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در مراحل مختلف رشد و نمو درگیر می کند (Fahmideh et al. 2018). بنابراین شناخت بهتر مکانیسم های فیزیولوژیکی در مراحل اولیه رشد ممکن است شرایطی را فراهم آورد تا بتوان در مدت زمان کم تعداد زیادی از مواد ژنتیکی متحمل به تنش شوری را جهت استفاده در برنامه های اصلاحی شناسایی کرد (Pour-Aboughadareh et al. 2017). به طور کلی مکانیسم های تحمل به شوری در گیاهان به دو گروه اصلی مورفو-فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تقسیم بندی می شوند. مکانیسم های گروه اول دارای توارث کمی بوده که توسط تعداد زیادی ژن کنترل می شوند و در مقابل مکانیسم های گروه دوم دارای روابط ساده تر و ژن های کمتری نسبت به گروه اول می باشند. برای مثال، تجمع محلول های سازگار در گیاه مانند پرولین، گلیسین، بتاین و آکترین از این جمله می باشند، که نیاز به فعال شدن فقط یک تا سه آنزیم برای

انجام مسیر اصلی متابولیسمی برای ذخیره متابولیت ها هستند (Raman 2000). با این حال اثرات بررسی اثرات تنش شوری بر رشد و نمو گیاهان بسیار پیچیده می باشد. حضور غلظت های بالای نمک در محیط ریشه باعث کاهش پتانسیل آب خاک خواهد شد که به نوبه خود باعث ایجاد تنش اسمزی و در نتیجه کاهش جذب آب و مواد غذایی خواهد شد (Mahajan and Tuteja 2005). عدم جذب آب و مواد غذایی خود منجر به هم خوردن تعادل یونی و انباشت یون های مضر و سمیت یونی در سلول های گیاهی خواهد شد که در نهایت باعث کاهش رشد اندام های هوایی و مرگ گیاه خواهد شد (Muuns et al. 1995). در شرایط تنش شوری حفظ حالت هموستازی یونی نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژی سلول های زنده دارد به طوری که تنظیم به موقع جریان یونی برای پایین نگهداشتن غلظت یونی هایی همچون سدیم (Na^+) و پتاسیم (K^+) در درون سلول ضروری است (Basu et al. 2020). معمولاً گیاهان تحت شرایط تنش شوری غلظت های بالایی از یون های K^+ و غلظت های پایینی از یون های Na^+ را در سیتوسول سلول حفظ می نمایند. از این رو حفظ نسبت بالای K^+/Na^+ به عنوان یکی از معیارهای مهم تحمل به شوری در گیاهان شناخته شده است (Singh et al. 2020). وجود مقادیر اضافی یون های سدیم اثرات مخرب فراوانی بر روی فعالیت های بیوشیمیایی و متابولیسمی گیاهان دارد. زمانی که انباشت این یون ها و یا سایر نمک های مضر در گیاه افزایش می یابد مکانیسم های تحمل به تنش شوری به واسطه فعالیت های پیام رسانی ویژه ای در سطوح مختلف سلولی القا می شوند. در واقع تمامی این مکانیسم ها تحت کنترل ژن ها و یکسری عوامل رونویسی مرتبط با آن ها فعال و ایفای نقش خواهند کرد. یکی از مهم ترین مسیرهای تنظیم هموستازی یونی مسیر SOS^1 و عوامل رونویسی وابسته است این مسیر از سه جز اصلی $SOS1$ ، $SOS2$ و $SOS3$ تشکیل شده است (Shi et al. 2000). ژن $SOS1$ مسئول کد کردن آنتی پورترهای Na^+/H^+ هستند که نقش اصلی در خروج یون های سدیم از سلول را بر عهده دارند (Shi et al. 2000). ژن $SOS2$ نیز با حضور خود در غشای پلاسمایی نقش حسگر داشته و به واسطه ساختار خود مقدار یون های کلسیم موجود در

¹ Salt overly sensitive

(Bobgohari et al. 2011). مشخص شده است که سطح رونوشت چندین ژن از فاکتورهای رونویسی *HKT* به وسیله کمبود پتاسیم در گندم، جو و برنج افزایش یافته است (Horie et al. 2001). یکی از روش های مطالعه مکانیسم های مولکولی درگیر در تحمل شوری در گیاهان بررسی الگوی بیان ژن ها مهم دخیل در آنها می باشد. از این رو، هدف از این اجرای پژوهش بررسی و مقایسه الگوی بیان ژن های *SOS1*، *NHX1* و *HvHKT3* در گیاهچه های جو تحت شرایط تنش شوری بود.

مواد و روش ها

در این پژوهش اثر تنش شوری بر تغییرات بیان ژن های *SOS1*، *NHX1* و *HvHKT3* در جو زراعی رقم مهر (به عنوان شاهد) و دو لاین اصلاحی تحت عنوان G2 و G3 به ترتیب با شجره Deir Alla 106/Hem/Bc/3/Rihane"s"14/4/Lignee527/NK1272/JLB7 0-063/3/Barjouj و D10*2/4/Productive/3/Roho//Alger/Ceres362-1-1 حاصل از تلاقی های مختلف بین لاین ها و ارقام دریافتی از مراکز بین المللی (به عنوان لاین اصلاحی) در دو شرایط رشدی عدم تنش و تنش NaCl انجام شد. لازم به ذکر است لاین های منتخب جهت بررسی بر اساس برخی از صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی توسط (Pour-Aboughadareh (2021 انتخاب شدند.

به منظور اجرای آزمایش، ابتدا بذور ژنوتیپ های مورد بررسی جوانه دار شده و سپس به سینی های کشت حاوی محلول غذایی هوگلند منتقل شدند. دو تیمار بدون NaCl و NaCl به میزان ۲۰۰ میلی مولار به ترتیب به عنوان سطوح عدم تنش و تنش شوری در نظر گرفته شدند. پس از استقرار گیاهچه ها و تا مرحله سه برگگی تمامی نمونه های آزمایشی با محلول غذایی مشابه و بدون نمک تغذیه شدند. در مرحله سه برگگی نیمی از گیاهچه ها به صورت تدریجی در معرض حضور NaCl قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۱ از روز از اعمال تنش شوری و ظاهر شدن علائم تنش در گیاهچه ها نمونه برداری از بافت برگ صورت گرفت و بلافاصله در دمای ۸۰- درجه سلسیوس تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند. استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج شرکت

سیتوپلاسم را تنظیم خواهد کرد. موقعی که گیاه با تنش شوری روبرو می شود دریافت پیام آشفستگی در مقدار یون های کلسیم موجود در سیتوسول توسط *SOS3* موجب ایجاد برهمکنش این جز با *SOS2* خواهد شد. یکی از پیامد برهمکنش *SOS2* و *SOS3* فعال شدن ژن *SOS1* است که به عنوان یک آنتی پورتر Na^+/H^+ در غشا پلاسمایی موجب خروج یون های سدیم اضافی می شود (Liu and Zhu 1998). پیامد دیگر فعال شدن کمپلکس *SOS2/SOS3* فعال شدن پروتئین واکوئلی NHX^1 است که ورود یون های کلسیم به واکوئل را میانجی گری می کنند. به عبارت دیگر ژن های *NHX* آنتی پورترهای Na^+/H^+ واکوئلی را کد می کنند که ترابری یون های سدیم از طریق H^+ از عرض غشای واکوئلی و تجمع یون های سدیم در واکوئل ها را کاتالیز می کنند (Nass et al. 1997). جایگزینی یون های سدیم در واکوئل نه تنها سبب پایین آوردن غلظت این یون و جلوگیری از سمیت یونی در سیتوسول می شود، بلکه در تنظیم اسمزی برای حفظ جذب آب از محلول نمک نیز دخالت دارد. بنابراین هنگام انباشت یون های سدیم در واکوئل، ژن های *NHX* نقش مستقیمی در القای تحمل به شوری در گیاهان دارند (Tester and Devenport 2003). در مطالعه ای به منظور بررسی تنش شوری بر مکانیسم های تحمل به تنش شوری و بیان برخی از ژن های درگیر در انتقال یون های سدیم و پتاسیم در جو مشخص شد تیمار ۱۵۰ میلی مولار NaCl موجب افزایش بیان ژن های *NHX1*، *NHX2* و *NHX3* در ژنوتیپ های مورد بررسی شد (Adem et al. 2014). از دیگر عوامل مؤثر در ترابری یون ها در گیاهان می توان به فاکتورهای رونویسی خانواده HKT^2 اشاره کرد. *HKT* ها شامل گروه مهمی از ژن های درگیر در انتقال یون های سدیم و پتاسیم هستند و در پوست ریشه قادر به انتقال هر دو یون سدیم و پتاسیم از محیط ریشه و ساقه به درون سلول های پارانشیمی هستند (Pardo 2010). ژن های *HKT* براساس اولین حلقه اسید آمینه موجود در ساختار پروتئین خود در دو گروه قرار می گیرند. گروه اول با داشتن اسید آمینه سرین در انتقال یون های سدیم و گروه دوم با داشتن اسید آمینه گلیسین به احتمال بیشتر در انتقال یون های پتاسیم نقش دارند (Zamani

¹ Na^+/H^+ antiporter

² High-affinity potassium transporter

پس از محاسبه داده‌های مربوط به میزان بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی، تجزیه‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. میزان بیان نسبی هر ژن نسبت به ژن خانه‌دار سنجش شد. به‌منظور انجام تجزیه واریانس دو تکرار بیولوژیک و یک تکرار تکنیکی در نظر گرفته شد رسم نمودارها نیز در محیط نرم‌افزار Excel صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس مقادیر بیان نسبی ژن‌های *SOS1*، *NHX1* و *HvHKT3* به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در جدول ۱ ارائه شده است. بر اساس نتایج مشخص شد از نظر هر سه ژن اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای تنش و بدون تنش، و همچنین ژنوتیپ‌ها مشاهده شد. علاوه بر این، اثر متقابل تنش و ژنوتیپ نیز برای کلیه ژن‌ها به جز معنی‌دار بود.

جدول ۱- تجزیه واریانس بیان نسبی ژن‌های ارزیابی شده در تیمارهای

بدون تنش و تنش شوری

منابع تغییر	df	<i>HvHKT3</i>	<i>NHX1</i>	<i>SOS1</i>
تکرار	۲	۱/۹۰	۰/۶۲	۶۲/۶۵
تیمار	۱	۲۹/۶۵**	۸/۲۶**	۵۴۷/۷۳**
ژنوتیپ	۲	۱۴/۹۲*	۱/۰۸*	۳۲۹/۱۴**
اثر متقابل	۲	۸/۵۶*	۲/۲۴**	۳۴۲/۵۸**
خطا	۱۰	۲/۵۹	۰/۱۶	۴۲/۵۱

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

تغییر در تظاهر، تجمع و سنتز پروتئین در پاسخ به تنش‌های محیطی از مکانیسم‌های مهم گیاهان در جهت حفاظت از متابولیسم سلولی و ایجاد سازگاری تلقی می‌شود. زمانی که گیاه با چنین شرایط نامساعدی مواجه می‌شود مسیرهای پیام‌رسانی مختلفی به‌منظور تبدیل تنش فیزیکی به یک پاسخ بیوشیمیایی مناسب شروع شده و هر یک از آن‌ها بیان دسته‌ای خاص از ژن‌های پاسخ دهنده به تنش را سبب می‌شوند. فعالیت کامل همه این آبشارهای پیام‌رسانی القاء شده، منجر به انطباق گیاه و در نتیجه تحمل تنش در آن می‌شوند (Leonardis et al. 2007). علاوه بر این، فرآورده‌های این ژن‌ها نه تنها در حفاظت سلول از

DENA^{ZIST} ASIA انجام گرفت. واکنش سنتز cDNA نیز با استفاده از کیت EasyTM cDNA Synthesis Kit و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده (<https://parstous.com>) صورت گرفت.

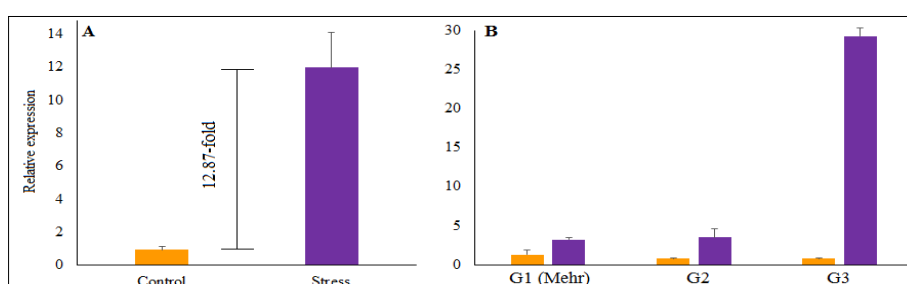
برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی، از کیت Sina SYBR Blue HS-qPCR (2x) استفاده شد. در ابتدا به‌منظور تعیین کارایی هر جفت آغازگر در واکنش Real-time PCR ترکیبی از تمامی تیمارها و تکرارهای cDNA سنتز شده، تهیه شد و برای هر جفت آغازگر چندین ضریب رقت در نظر گرفته شد. پس از تعیین بهترین غلظت آغازگر و cDNA، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی با استفاده از دستگاه Rotor-Gene Q انجام شد. آغازگرهای مربوط به ژن‌های *SOS1* (Yousefi-Rad et al. 2019)، *NHX1* (Adem et al. 2014) و *HvHKT3* (Qui et al. 2011) به ترتیب دارای توالی

FSOS1: 5'GGCACCAACAGGAAGATGAA3'
 RSOS1: 5'GATATGCAGGAGGCCAGAGA3'
 FNHX1: 5'TGCATATCTACCAGTGCTTAT 3'
 RNHX1: 5'GGTTCAAGACACAAGTTCAGT 3'
 FHKT3: 5'TGAGCCGAACATTACTGTGAT 3'
 RHKT3: 5'ACGAGCTTACCTTTCAATACA 3'

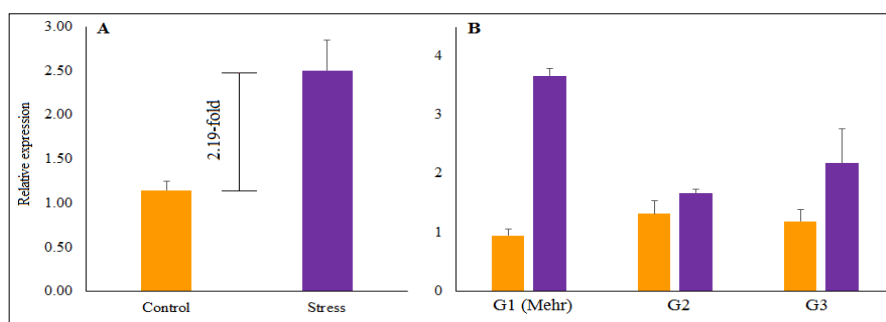
از ژن *a-tubulin* (Adam et al. 2014) با توالی 5'AGTGTCTGTCCACCCACTC 3' به‌عنوان ژن خانه‌دار استفاده شد. حجم واکنش ۱۲ میکرولیتر شامل ۶ میکرولیتر مسترمیکس، ۲ میکرولیتر cDNA (۱۰۰ نانوگرم)، ۰/۳ μl از هر یک از آغازگرهای پیشرو و پسرو (با غلظت ۰/۳ میکرولیتر) و ۳/۴ میکرولیتر آب عاری از RNase بود. پس از آماده نمودن مخلوط واکنش، واکنش qRT-PCR با شرایط دمایی ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و به دنبال آن ۴۰ تکرار با چرخه‌های ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ۲۰ ثانیه در دمای ۵۳ تا ۶۱ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و افزایش دما از ۶۵ تا ۹۵ درجه سلسیوس هر ثانیه یک درجه انجام شد. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، بر اساس دمای ذوب به‌دست آمده برای هر آغازگر میزان بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی با استفاده از رابطه $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد (Pffafli 2001).

می‌توان عنوان کرد ژنوتیپ‌های ارزیابی شده به‌خوبی به غلظت‌های بالای نمک پاسخ داده‌اند. ژن‌های *NHX* نقش مهمی در تنظیم اسمزی بر عهده دارند. شواهد بسیار زیادی وجود دارد که بیان بالای ژن‌های *NHX* در گونه‌های مختلف تحمل به شوری را افزایش می‌دهند (Apse et al. 1999; Zhang et al. 2001). ژن‌های *NHX* در بسیاری از خانواده‌های گیاهی حضور دارند (Dong et al. 2020). به‌عنوان مثال تا کنون هشت ژن در آرکیدوپسیس (Brett et al. 2005)، شش ژن در انگور (Ayadi et al. 2020)، پنج ژن در چغندرقد (Wu et al. 2019)، هفت ژن در سویا (Kumari et al. 2018)، ۱۰ ژن در سویا (Chen et al. 2015) و ۲۵ ژن در پنبه (Akram et al. 2020) شناسایی شده است. از مهم‌ترین ژن‌های موجود در خانواده *NHX* می‌توان به ژن‌های *NHX1* اشاره داشت. این ژن جز آنتی‌پورترهای غشایی بوده که در غشای تونوپلاست قرار دارند. در واقع این ژن طیف گسترده‌ای از فرایندهای سلولی، نمو، پیرایش پروتئین‌ها و ارتباط میان آن‌ها را تحت تاثیر خود قرار می‌دهد (Apse and Sottosanto et al. 2003). بین مقادیر بیان نسبی ژن *NHX1* در ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی تفاوت معنی‌داری در شرایط تنش وجود نداشت. با این‌حال، در شرایط تنش شوری دو ژنوتیپ *G3* و رقم مهر دارای بیشترین میزان بیان نسبی نسبت به ژنوتیپ *G2* بود (شکل ۲-B). با توجه به این نتیجه می‌توان اظهار داشت ژنوتیپ *G3* دارای قابلیت بالایی در کنترل تعادل یونی در سلول‌های بافت برگ هستند. گزارش شده است که بین بیان ژن‌های *NHX* و *SOS* ارتباط مستقیمی وجود دارد (Maleki et al. 2015). در واقع تلفیق آنتی‌پورترهای *SOS* و *NHX* در شرایط تنش شوری سبب افزایش انتشار یون‌های سدیم به آپوپلاست و تقسیم آن در واکوئل سلولی می‌شود.

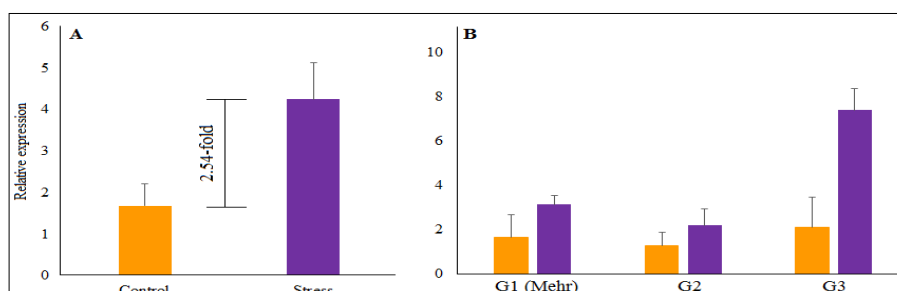
تنش عمل می‌نماید بلکه در تنظیم ژن‌های درگیر در پیام‌رسانی پاسخ به تنش نیز وارد عمل می‌شوند (Maruyama et al. 2004). در شکل ۱-A میانگین بیان نسبی ژن *SOS1* در تیمارهای بدون تنش و تنش شوری و همچنین در ژنوتیپ‌های مختلف ارزیابی شده نشان داده شده است. تنش شوری منجر به افزایش بیان نسبی ژن *SOS1* به میزان ۱۲/۸۷ برابر نسبت به تیمار عدم تنش شد. در این راستا Yousefi-Rad et al. (2019) نیز با مطالعه بیان ژن‌های *SOS* در ریشه موتان‌های جو تحت تیمارهای مختلف تنش شوری گزارش دادند تنش شوری منجر به افزایش بیان ژن‌های *SOS* در اندام ریشه در گیاهچه‌های متحمل به شوری شده که این افزایش بیان نقش مهمی در خروج یون‌های سدیم از اندام ریشه و انتقال به اندام‌های هوایی دارد. (Ahmadi et al. 2020) نیز در مطالعه خود نشان دادند تنش شوری به‌طور معنی‌داری موجب افزایش بیان ژن‌های *SOS* در برخی از توده‌های وحشی گندم شد. مقایسه الگوی بیان ژن *SOS1* در سه ژنوتیپ بررسی شده نشان داد دو ژنوتیپ *G2* و *G3* نسبت به ژنوتیپ شاهد (رقم مهر) دارای بیشترین میزان بیان بودند به‌طوری که میزان بیان آن‌ها در شرایط تنش شوری به‌ترتیب ۴/۵۳ و ۲۹/۲۳ برابر بیشتر از بیان آن‌ها در شرایط عدم تنش بود (شکل ۱-B). نتایج بیانگر این است که مکانیسم دریافت پیام و انتقال آن برای کنترل تعادل یونی در این ژنوتیپ‌ها فعال‌تر است. نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس مقادیر بیان نسبی ژن *NHX1* بیانگر وجود اختلاف بسیار معنی‌داری بین دو تیمار بدون تنش و تنش شوری در ژنوتیپ‌های ارزیابی شده بود (جدول ۱). مقایسه میزان بیان این ژن در دو تیمار مختلف نشان داد غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl به‌طور معنی‌داری باعث افزایش بیان این ژن به میزان ۲/۱۹ برابر نسبت به تیمار عدم تنش شد (شکل ۲-A). بنابراین بر اساس این نتایج



شکل ۱- میزان بیان نسبی ژن *SOS1* در دو تیمار عدم تنش و تنش شوری (۲۰۰ میلی‌مولار NaCl) (A) و در ژنوتیپ‌های جو (B)



شکل ۲- میزان بیان نسبی ژن *NHX1* در دو تیمار عدم تنش و تنش شوری (۲۰۰ میلی‌مولار NaCl) (A) و در ژنوتیپ‌های جو (B)



شکل ۳- میزان بیان نسبی ژن *HvHKT3* در دو تیمار عدم تنش و تنش شوری (۲۰۰ میلی‌مولار NaCl) (A) و در ژنوتیپ‌های جو (B)

نشان داده شد که تنش شوری ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl موجب افزایش بیان ژن‌های *HvHKT2* و *HvHKT3* به میزان ۵۰ و ۳۰ برابر نسبت به شرایط عدم تنش شد. در دیگر مطالعه صورت گرفته توسط Huang et al. (2008) نقشه ژنتیکی ژن‌های *HKT* در گندم، جو و برنج مقایسه شد و مشخص شد که ژن‌های *HKT* نقش بالقوه‌ای در انتقال یون‌های سدیم دارند. نتایج مقایسه ژنوتیپ‌های بررسی شده از نظر ژن *HvHKT3* در این تحقیق نشان داد بیشترین میزان بیان نسبی به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ G3 و به‌دنبال آن ژنوتیپ شاهد و ژنوتیپ G2 بود. نسبت تغییرات ترنسکریپتوم این ژن در شرایط تنش شوری نسبت به شرایط عدم تنش به‌ترتیب در سه ژنوتیپ G3، G2 و ژنوتیپ شاهد (مهر) به‌ترتیب ۳/۵۵، ۱/۷۱ و ۱/۹۱ برابر بیشتر بود (شکل ۳).

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی با توجه به نتایج به‌دست آمده از این تحقیق مشخص شد تیمار تنش شوری موجب افزایش سطح ترنسکریپتوم و یا به‌عبارتی بیان ژن‌های *SOS1*، *NHX1* و *HvHKT3* در گیاهچه‌های جو شده است. با در نظر گرفتن تغییرات بیان این ژن‌ها در هنگام مواجهه با تنش شوری در ژنوتیپ‌ها اصلاحی (به‌ویژه G3) می‌توان نتیجه گرفت این ژنوتیپ‌ها دارای پتانسیل قابل توجهی جهت استفاده در برنامه‌های دورگ‌گیری به والد می‌باشند. علاوه

به‌عبارت دیگر ژن‌های *SOS* و *NHX* نه تنها به‌خودی خود بلکه به‌دلیل اثرات هم‌افزایی برای القای تحمل به تنش شوری مهم هستند (Maleki et al. 2015). در این تحقیق نیز ژنوتیپ G3 از نظر هر دو ژن *SOS1* و *NHX1* دارای نمود بهتری نسبت به دو ژنوتیپ دیگر بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که برهمکنش مثبت این دو ژن افزایش تحمل به شوری در ژنوتیپ G3 را به دنبال خواهد داشت.

مشابه دیگر ژن‌های بررسی شده، بیان نسبی ژن *HvHKT3* نیز تحت تأثیر تیمار تنش شوری قرار گرفت (شکل ۳). اعمال تیمار شوری موجب افزایش تجمع سطح ترنسکریپتوم ژن *HvHKT3* به میزان ۲/۵۴ برابر تیمار عدم تنش شد. این نتایج با نتایج دیگر محققان در رابطه با تأثیر تنش شوری بر افزایش بیان ژن‌های *HKT* مطابقت داشت. به‌عنوان نمونه، در مطالعه Ahmadi et al. (2020) غلظت‌های بالای NaCl به‌طور معنی‌داری باعث افزایش بیان ژن *HKT* در گونه‌های وحشی گندم شد. (Haro et al. 2005) اظهار داشتند بیان ژن‌های *HKT* در جو در تنظیم هموستازی یون‌های سدیم و پتاسیم نقش دارند و بیان آن‌ها نقش مهمی در جابجایی یون‌های سدیم دارد. در واقع این ژن‌ها قادر به انتقال هر دو یون سدیم و پتاسیم از محیط ریشه و ساقه به درون سلول‌های پارانشیمی هستند (Pardo 2010). در آزمایش Qui et al. (2011)

مهندسی ژنتیک و اصلاح کلاسیک به ارقام حساس منتقل و تحمل به شوری آن‌ها را بهبود داد.

براین، می‌توان با انجام آزمایشات تکمیلی بر روی ژنوتیپ‌های G2 و G3 ژن‌های مربوط به را کلون و با استفاده از روش‌های

منابع

Adem GD, Roy SJ, Zhou M, Bowman JP, Shabala S (2014) Evaluating contribution of ionic, osmotic and oxidative stress components towards salinity tolerance in barley. *BMC Plant Biology* 14:113.

Ahmadi J, Pour- Aboughadareh A, Fabriki Ourang S, Khalili P, Pocza P (2020) Unravelling salinity stress responses in ancestral and neglected wheat species at early growth stage: a baseline for utilization in future wheat improvement programs. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 26:537-549.

Ahmadi J, Pour Aboughadareh A, Fabriki- Ourang S, Mehrabi AA, Siddique KHM (2018) Screening wild progenitors of wheat for salinity stress at early stages of plant growth: insight into potential sources of variability for salinity adaptation in wheat. *Crop & Pasture Science* 69:649-658.

Akram U, Song Y, Liang C, Abid M, Askari M, Myat A, Abbas M, Malik W, Ali Z, Guo S, Zhang R, Meng Z (2020) Genome-wide characterization and expression analysis of *NHX* gene family under salinity stress in *Gossypium barbadense* and its comparison with *Gossypium hirsutum*. *Genes* 11:803.

Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285:1256-1258.

Apse MP, Sottosanto JB, Blumwald E (2003) Vacuolar cation H^+ exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of *AtNHX1*, the *Arabidopsis* vacuolar Na^+/H^+ antiporter. *The Plant Journal* 36:229-239.

Ayadi M, Martins V, Ben Ayed R, Jbir R, Feki M, Mzid R, Geros H, Aifa S, Hanana M (2020) Genome wide identification, molecular characterization, and gene expression analyses of grapevine *NHX* antiporters suggest their involvement in growth, ripening, seed dormancy, and stress response. *Biochemical Genetics* 58:102-128.

Basu S, Kumar A, Benazir I, Kumar G (2020) Reassessing the role of ion homeostasis for improving salinity tolerance in crop plants. *Physiologia Plantarum* 171:502-519.

Brett CL, Donowitz M, Rao R (2005) Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 288:223-239.

Chen HT, Chen X, Wu BY, Yuan XX, Zhang HM, Cui XY, Liu XQ (2015) Whole-genome identification and expression analysis of K^+ efflux antiporter (KEA) and Na^+/H^+ antiporter (*NHX*) families under abiotic stress in soybean. *Journal of Integrative Agriculture* 14:1171-1183.

Dong J, Liu C, Wang Y, Zhao Y, Ge D, Yuan Z (2021) Genome-wide identification of the *NHX* gene family in

Punica granatum L. and their expressional patterns under salt stress. *Agronomy* 11:264.

Fahmideh L, Delarampoor MA, Fooladvand Z (2018) Study of MYB transcription factor gene expression in some bread wheat cultivars of sistian region, Iran. *Plant Genetic Researches* 7:181-196.

Haro R, Anuelos MA, Senn ME, Barrero-Gil J, Rodriguez-Navarro A (2005) *HKT1* mediates sodium uniport in roots. Pitfalls in the expression of *HKT1* in yeast. *Plant Physiology* 139:1495-1506.

Horie T, Costa A, Kim TH, Han MJ, Horie R, Leung H-Y, Miyao A, Hirochika H, An G, Schroeder JI (2007) Rice *OsHKT2;1* transporter mediates large Na^+ influx component into K^+ -starved roots for growth. *EMBO J* 26:3003-3014.

Huang S, Spielmeyer W, Lagudah ES, Munns R (2008) Comparative mapping of *HKT* genes in wheat, barley and rice, key determinants of Na^+ transport, and salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* 59:927-937.

Kumari H, Kumar S, Ramesh K, Palakolanu SR, Marka N, Prakash A, Shah T, Henderson A, Srivastava R, Rajasheker G, Chitilineni A, Varshney RK, Rathanaigiri P, Narasu M, Kishor K (2018) Genome-wide identification and analysis of *Arabidopsis* sodium proton antiporter (*NHX*) and human sodium proton exchanger (*NHE*) homologs in *Sorghum bicolor*. *Genes* 9:236.

Leonardis AMD, Marone D, Mazzucotelli E, Neffar F, Rizza F, Fonzo ND, Cattivelli L, Mastrangelo AM (2007) Durum wheat genes up-regulated in the early phases of cold stress and genotype dependent manner. *Plant Science* 172:1005-1016.

Liu J, Zhu JK (1998) A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science* 280:1943-1945.

Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444:139-158.

Maleki F, Fotovat R, Azimi MR, Shekari F, Shobbar ZS (2015) The effect of salicylic acid on expression of *NHX1* and *SOS1* genes in root of wheat seedlings under salt stress. *Modern Genetics Journal* 3:267-278.

Maruyama K, Sakuma Y, Kasuga M, Ito Y, Seki M, Goda H, Shimada Y, Yoshida S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004) Identification of cold-inducible downstream genes of the *Arabidopsis DREB1A/CBF3* transcriptional factor using two microarray systems. *Plant Journal* 38:982-993.

Munns R, Schachtman D, Condon A (1995) The Significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. *Functional Plant Biology* 22:561-569.

Mwando E, Han Y, Angessa TT, Zhou G, Hill CB, Zhang XQ, Li C (2020) Genome- wide association study of

salinity tolerance during germination in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Frontiers in Plant Science* 11:118.

Nass R, Cunningham KW, Rao R (1997). Intracellular sequestration of sodium by a novel Na^+/H^+ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H^+ -ATPase. *Journal of Biological Chemistry* 272:26145-26152.

Pardo JM (2010) Biotechnology of water and salinity stress tolerance. *Current Opinion in Biotechnology* 21:185-196.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29:e45.

Pour-Aboughadareh A, Ahmadi J, Mehrabi AA, Etminan A, Moghaddam M, Siddique KH (2017) Physiological responses to drought stress in wild relatives of wheat: Implications for wheat improvement. *Acta Physiologiae Plantarum* 39:106-114.

Pour-Aboughadareh A, Sanjani S, Nikkhah-Chamanabad H, Asadi A, Amini A (2021) Identification of salt-tolerant barley genotypes using multiple-traits index and yield performance at the early growth and maturity stages. *Bulletin of the National Research Centre* 45:117.

Qiu L, Wu D, Ali S, Cai S, Dai F, Jin X, Wu F, Zhang G (2011) Evaluation of salinity tolerance and analysis of allelic function of *HvHKT1* and *HvHKT2* in Tibetan wild barley. *Theoretical and Applied Genetics* 122:695-703.

Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu JK (2000) Arabidopsis thaliana salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na^+/H^+ antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:6896-6901.

Singh P, Mahajan MM, Singh NK, Kumar D, Kumar K (2020) Physiological and molecular response under salinity stress in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 29:125-133.

Tester M, Davenport R (2003) Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. *Annals of Botany* 91: 503-527.

Vaezi B, Pour Aboughadareh A, Mohammadi R, Mehraban A, Hossein Pour T, Koohkan E, Ghasemi S, Moradkhani H, Siddique KH (2019) Integrating different stability models to investigate genotype $\times$ environment interactions and identify stable and high- yielding barley genotypes. *Euphytica* 215:63.

Wu GQ, Wang JL, Li SJ (2019) Genome-wide Identification of Na^+/H^+ antiporter (*NHX*) genes in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and their regulated expression under salt stress. *Genes* 10:401.

Yousefi-Rad S, Soltanloo H, Ramezanpour SS, Zaynali Nezhad (2019) The study of *SOS* genes expression in mutant barley root under salt stress. *Journal of Crop breeding* 29:1-8.

Zamani Bangohari M, Niazi A, Moghaddam AA, Deihimi T, Ebrahimie E (2013) Genome-wide analysis of key salinity-tolerance transporter (*HKT*;5) in wheat and wild wheat relatives (A and D genomes). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 49:97-106.

Zhang HX, Hodson JN, Williams JP, Blumwald E (2001) Engineering salt-tolerant Brassica plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98:12832-12836.