

Evaluation of gene expression of transcription factors involved in salinity tolerance in Barley (*Hordeum vulgare* L.) advanced genotypes

Soraya Ghorbani

PhD Candidate, Department of Agronomy and plant breeding, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran. Email: ghorbani3531@yahoo.com

Alireza Etminan 

*Corresponding author. Associate Professor, Department of plant breeding and Biotechnology, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran. Email: alietminan55@yahoo.com

Varahram Rashidi

Associate Professor, Department of Agronomy and plant breeding, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran. Email: Rash270@yahoo.com

Alireza Pour-Aboughadareh 

Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Email: a.poraboghadareh@gmail.com

Lia Shooshtari

Assistant Professor, Department of plant breeding and Biotechnology, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran. Email: L_shooshtary@yahoo.com

Abstract

Objective

Salinity stress is considered as one of the most important abiotic stresses that significantly decreased crop production in the world. The development of salt-tolerant varieties is one of the most strategies against decreasing crop performance in saline conditions. Hence, assessment of expression patterns of genes responsible for the biosynthesis pathways can be very effective in creating tolerant genotypes. The main objective of this study was to compression of expression patterns of *HvSOS1*, *HvSOS3*, *HvNHX3*, and *HvHKT3* genes in some advanced barley genotypes under salinity stress conditions.

Materials and methods

In the present study, the effect of salt stress on relative changes expression of *HvSOS1*, *HvSOS3*, *HvNHX3*, and *HvHKT3* genes in the six advanced barley genotypes along with Mehr cultivar (as

a check) was investigated under the control (no NaCl) and salt (200 mM NaCl) treatments. All tested genotypes were planted under controlled greenhouse conditions using a hydroponic system. After salt treatment duration, all seedling plants were subjected to sampling and the relative expression of selected genes was estimated.

Results

Based on obtained results, there are significant differences between treatments as well as among tested genotypes. Salt treatment significantly increased expression of *HvSOS1*, *HvSOS3*, *HvNHX3*, and *HvHKT3* genes by 14.76-, 4.65-, 4-, and 4-fold compared to the control treatment, respectively. Comparison of the expression patterns of studied genes showed that two genotypes G3 and G6 had the highest transcription rate of mentioned genes and it seems that they have an acceptable tolerance to the high levels of salinity stress. A positive association between *HvHKT3* and *HvSOS* genes was another obtained result so that two identified genotypes indicated the highest expression of these genes under salt treatment.

Conclusions

It is inferred that increasing expression of studied genes is an important part of the salt tolerance mechanism because each of them has a key role in the signaling pathway and translocation of Na ions in the plant cells. Two identified genotypes, G3 and G6, with having this potential can be appreciated candidates for future research and use as salt-tolerant cultivars.

Keywords: Hydroponic system, Transcriptome, transcription factors, tolerant genes.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Ghorbani S, Etminan A, Rashidi V, Pour-Aboughadareh A, Shooshtari L (2022) Evaluation of gene expression of transcription factors involved in salinity tolerance in Barley (*Hordeum vulgare* L.) advanced genotypes. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (1), 67-84.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (1), 67-84.

DOI: 10.22103/jab.2022.18546.1355

Received: December 21, 2021.

Accepted: January 17, 2021.



Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

بررسی بیان عوامل رونویسی دخیل در تحمل به تنش شوری در ژنوتیپ‌های اصلاحی جو زراعی (*Hordeum vulgare* L.)

ثریا قربانی


دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران. رایانامه:
ghorbani3531@yahoo.com

 علیرضا اطمینان

* نویسنده مسئول: دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران. رایانامه:
alietminan55@yahoo.com

ورهرام رشیدی

دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران. رایانامه: Rash270@yahoo.com

 علیرضا پورابوقداره

استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه:
a.poraboghadareh@gmail.com

لیا شوشتاری

استادیار، گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران. رایانامه:
L_shooshtary@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۳۰

چکیده

هدف: تنش شوری به عنوان یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیر زیستی مؤثر بر کاهش تولید محصولات زراعی در دنیا شناخته می‌شود. یکی از مهم‌ترین استراتژی‌های مقابله با کاهش عملکرد در شرایط محیطی شور ایجاد وارپته‌های متحمل به شوری است. از این رو، بررسی الگوی بیان ژن‌های مؤثر در پاسخ به تنش شوری و مسیرهای بیوسنتزی می‌تواند در ایجاد ژنوتیپ‌های متحمل بسیار مؤثر باشد. هدف از این مطالعه مقایسه الگوی بیان ژن‌های *HvHKT3* و *HvNHX3*، *HvSOS3*، *HvSOS1* در برخی از ژنوتیپ‌های اصلاحی جو تحت تنش شوری بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش اثر تنش شوری بر تغییرات بیان ژن‌های *HvHKT3* و *HvNHX3*، *HvSOS3* و *HvSOS1* در شش ژنوتیپ اصلاحی جو به همراه رقم مهر (به عنوان شاهد) در دو تیمار عدم تنش (بدون کلرید سدیم) و تنش شوری با غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم مورد بررسی قرار گرفت. رقم و ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی در شرایط کنترل شده گلخانه و در محیط کشت هیدروپونیک کشت و مورد بررسی قرار گرفتند. پس از پایان اعمال دوره تنش، نمونه‌برداری از گیاهچه‌ها انجام و میزان نسبی هر یک از ژن‌های مورد نظر مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج: بر اساس نتایج به دست آمده اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی و ژنوتیپ‌ها از نظر بیان چهار ژن مورد نظر مشاهده شد. تیمار تنش شوری به طور معنی‌داری موجب افزایش بیان هر یک از ژن‌های *HvSOS1*، *HvSOS3* و *HvNHX3* و *HvHKT3* به میزان ۱۴/۷۶، ۴/۶۵، ۴ و ۴ برابر نسبت به تیمار عدم تنش شد. مقایسه الگوی بیان ژن‌ها در ژنوتیپ‌های مختلف نشان داد دو ژنوتیپ G3 و G6 نسبت به رقم شاهد و دیگر ژنوتیپ‌ها دارای بیشترین میزان رونوشت ژن‌های فوق بوده و به نظر می‌رسد دارای تحمل به تنش بالایی باشند. از دیگر نتایج به دست آمده از این پژوهش می‌توان به ارتباط بین ژن‌های *HvHKT3* و *HvSOS* اشاره نمود، به طوری که این ژن‌ها در ژنوتیپ‌های متحمل دارای بیشترین میزان سطح رونوشت بودند.

نتیجه‌گیری: استنباط می‌شود که افزایش بیان ژن‌های بررسی شده قسمت مهمی از مکانیسم‌های تحمل به شوری بوده زیرا هر یک از آن‌ها نقش مهمی در مسیرهای پیام‌رسانی و جابجایی یون‌های سدیم در سلول‌های گیاهی دارند و ژنوتیپ G3 و G6 با داشتن چنین پتانسیلی می‌تواند به عنوان کاندیدهای مناسبی برای آزمایش‌های بعدی و استفاده به عنوان ارقام متحمل به شوری در نظر گرفته شوند.

کلیدواژه‌ها: سیستم هیدروپونیک، ترنسکریپتوم، فاکتورهای رونویسی، ژن‌های تحمل

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: قربانی ثریا، اطمینان علیرضا، رشیدی وره‌رام، پورابوقداره علیرضا، شوشتری لیا (۱۴۰۱) بررسی بیان عوامل رونویسی دخیل در تحمل به تنش شوری در ژنوتیپ‌های اصلاحی جو زراعی (*Hordeum vulgare* L.). مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۴(۱)، ۶۷-۸۴

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

در میان انواع غلات، جو زراعی (*Hordeum vulgare* L.) به عنوان چهارمین غله مهم جهان محسوب می‌شود که در مقایسه با سه غله مهم دیگر یعنی گندم، برنج و ذرت از درجه تحمل بیشتری در برابر تنش شوری برخوردار است و به همین دلیل

معمولاً به عنوان کاندید مناسبی برای مطالعات در زمینه بررسی مکانیسم‌های تحمل به شوری محسوب می‌شود (Jood & Kalra 2001; Shen et al. 2016; Mwando et al. 2020). پیش بینی می‌شود که جمعیت جهان تا کمتر از ۱۰ سال آینده از ۸ میلیارد نفر تجاوز نماید و یکی از پیامدهای این موضوع افزایش نیاز جهانی به محصولات حاصل از گیاهان زراعی به خصوص غلات خواهد بود (Fischer et al. 2009). این درحالی است که حتی در شرایط کنونی علی‌رغم افزایش تقاضا برای محصولات کشاورزی، تولید این محصولات افزایش قابل توجهی نداشته و از سوی دیگر تنش‌های محیطی مختلف همواره یکی از مهمترین عوامل محدود کننده برای تولید محصولات زراعی به شمار می‌روند، به طوری که گاهی تا حدود ۵۰ درصد از کاهش عملکرد محصول گیاهان زراعی به انواع تنش‌های زیستی و غیر زیستی نسبت داده می‌شود (Vij & Tyagi 2007). افزایش و تجمع انواع نمک‌های موجود در لایه‌های مختلف خاک سبب شده است تا بخش وسیعی از اراضی قابل کشت دنیا متأثر از تنش شوری شوند. براساس گزارش‌های موجود، تقریباً ۳۳ درصد از اراضی آبی و ۲۰ درصد از کل اراضی قابل کشت در سراسر دنیا متأثر از فرآیندهای شور شدن خاک هستند (Al-Tawaha et al. 2021) که هر یک از آن‌ها می‌تواند به واسطه فعالیت‌های انسانی، عوامل محیطی و همچنین تغییرات گسترده اقلیمی به ویژه در دهه اخیر باشند. بنابراین به نظر می‌رسد پدیده شوری به عنوان یکی از شدیدترین تنش‌های محیطی عامل تهدید کننده مهمی برای تولید محصولات کشاورزی در حال و آینده‌ای نه چندان دور باشد (Flowers 2004; Munns & Tester 2008).

یکی از مهم‌ترین استراتژی‌های مقابله با کاهش عملکرد در شرایط محیطی شور ایجاد وارپته‌های متحمل به شوری است. با این حال، کمبود ذخایر ژنتیکی با صفات و ویژگی‌های مناسب برای سازگاری نسبت به شرایط شوری همواره مانعی بزرگ بر سر راه برنامه‌های به‌نژادی گیاهان برای افزایش تحمل به شوری ارقام زراعی بوده است. از سوی دیگر، بررسی بیشتر مکانیسم‌های فیزیولوژیکی و ژنتیکی مرتبط با تحمل به شوری یکی از راهکارهای مهم برای مقابله با این معضل جهانی می‌باشد (Zeeshan et al. 2020). تنش شوری به دلیل تأثیر همزمان بر خصوصیات مورفو-فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بافت‌ها و سلول‌های گیاهی در نهایت منجر به کاهش شدید عملکرد و یا از بین رفتن گیاه می‌گردد (Gupta & Huang 2014). تنش شوری دارای اثرات نامطلوبی نظیر کاهش کیفیت و کمیت دانه (Rawson et al. 1988)، کاهش تولید ماده خشک، سطح برگ و نسبت ساقه به ریشه (Tadayon & Emam 2007) در مراحل مختلف رشد گیاهان می‌باشد. شوری به طور همزمان با ایجاد تنش اسمزی و سمیت یونی ضمن کاهش میزان جذب آب از خاک که با کاهش آماس سلولی و سخت شدن دیواره سلول‌ها همراه است (Ahmed et al. 2013; Zaghdoud et al. 2013) سبب بروز انواع اختلالات فیزیولوژیکی و متابولیکی در گیاه می‌شود که از آن جمله می‌توان به کاهش میزان فتوسنتز و هدایت روزنه‌ای، کاهش وزن خشک، غلظت CO₂ (Jiang et al. 2006) و در نهایت کاهش میزان عملکرد و کیفیت محصول (Knight & Knight 2001) اشاره نمود. ریشه‌ها اولین بخش از گیاه هستند که در معرض شوری خاک قرار می‌گیرند. صدمه دیدن اندام ریشه بر اثر شوری باعث کاهش رشد اندام هوایی از طریق کاهش سطح برگ می‌شود. با این حال نتایج مطالعات انجام گرفته بیانگر آن است که حساسیت اندام هوایی به شوری در مقایسه با ریشه‌ها بیشتر می‌باشد (Pour-

2021; Rasel et al. 2021; Aboughadareh et al. 2021). پس از رویارویی گیاه با شرایط شوری و افزایش غلظت نمک‌ها در بافت‌ها و سلول‌های گیاهی، یکسری از مکانیسم‌های دفاعی به منظور دفع یون‌های سدیم و یا جابجایی آن‌ها در بخش‌های مختلف گیاه فعال خواهند شد. در چنین شرایطی، زمانی که غلظت یون‌های نمک در گیاه افزایش می‌یابد تولید و افزایش سریع سطح رادیکال‌های اکسیژن واکنشگر (ROS) همچون هیدروکسیل (OH^-)، سوپراکسید (O_2^-) و پراکسیداز هیدروژن پراکسید (H_2O_2) منجر به وقوع تنش اکسیداتیو می‌شود. گونه‌های فعال اکسیژن واکنش‌گر به صورت مستقیم به مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها، فسفولیپیدها و اسیدهای نوکلئیک آسیب جدی وارد می‌سازند و از این طریق موجب کاهش رشد گیاه خواهند شد (Sharma et al. 2012). مکانیسم تحمل به شوری در مقایسه با مکانیسم‌های تحمل به دیگر تنش‌های محیطی به مراتب از پیچیدگی بیشتری برخوردار است و سازوکارهای مختلفی را جهت تکمیل چرخه رویشی و زایشی در گیاه و در امان ماندن از اثرات شدید تنش طلب می‌کند. در این بین، تنظیم پتانسیل اسمزی و توانایی انتقال و جابجایی یون‌ها از غشاهای سلولی از عوامل کلیدی و تاثیرگذار بر درجه تحمل شوری در گیاهان مختلف می‌باشد (Ekiz & Yilmaz 2003; Widodo et al. 2009) از سوی دیگر، بسیاری از گیاهان قادرند از طریق توسعه و ایجاد مکانیسم‌هایی همچون کاهش جذب یون‌های سدیم در ریشه و یا کاهش غلظت یون‌های نمک در سیتوسول با تنش شوری مقابله کنند (Arzani & Ashraf 2016). از این رو، شناسایی و مطالعه عملکرد ژن‌های دخیل در کنترل سطح یون‌های نمک در سلول و همچنین ژن‌های دخیل در القا مکانیسم‌های جابجایی یون‌های سدیم و پتاسیم می‌تواند نقش مهمی در بررسی سازوکارهای تحمل به شوری در گیاهان زراعی باشد. تاکنون مطالعات فراوانی در خصوص نقش مسیرهای کنترلی و ژن‌ها مؤثر در انتقال یون‌های سدیم و پتاسیم در انواعی از گیاهان صورت گرفته است و از مهم‌ترین نتایج آن‌ها می‌توان به نقش SOS (Salt overly sensitive) در مسیر انتقال پیام جهت هموستازی یونی، فعالیت HKT (High-affinity Potassium Transporter) در تنظیم انتقال و جابجایی یون‌های سدیم و پتاسیم و پروتئین درون سلولی NHX (sodium/hydrogen antiporter) در مشارکت در هموستازی یون K^+ اشاره نمود. علاوه بر موارد یاد شده ژن‌های مؤثر در تنظیم اسمزی، پروتئین‌های آنتی اکسیدانت، فاکتورهای رونویسی WRKY و ERF (Ethylene response factor) نیز از آن جمله محسوب می‌شوند (Hasegawa et al. 2000; Ali et al. 2012).

خانواده ژنی *HKT* گروه مهمی از ژن‌های درگیر در انتقال یون‌های سدیم و پتاسیم را شامل می‌شوند که قادر به انتقال هر دو یون سدیم و پتاسیم از محیط ریشه و ساقه به درون سلول‌های پارانشیمی می‌باشند (Pardo 2010; Zamani-Babgohari et al. 2011). ژن‌های *HKT* براساس اولین حلقه اسید آمینه موجود در ساختار پروتئین خود در دو گروه قرار می‌گیرند. گروه اول با داشتن اسید آمینه سرین در انتقال یون‌های سدیم و گروه دوم با داشتن اسید آمینه گلیسین به احتمال بیشتر در انتقال یون‌های پتاسیم نقش دارند (Zamani-Babgohari 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).

نتایج حاصل از تحقیقات نشان داده بیان برخی ژن‌ها با کاهش سرعت جذب نمک از خاک و انتقال آن به سراسر گیاه به برقراری تعادل اسمزی و یونی در بافت ریشه و اندام‌های هوایی کمک می‌کند و از این طریق باعث افزایش تحمل گیاه به تنش شوری می‌شود (Greenway & Munns 1980; Niazian et al. 2016). مسیر سیگنالی SOS یکی از مسیرهای بیوشیمیایی اختصاصی در تنش شوری است که اجزای آن ژن‌های *SOS1*، *SOS2* و *SOS3* می‌باشند که در واقع حسگرهای میزان کلسیم سلول هستند. به طور کلی مسیر SOS در پاسخ به تنش یونی ناشی از تنش شوری فعال می‌شوند (Qiu et al. 2002). در این مسیر افزایش سطح سدیم در سلول، پروتئین متصل به کلسیم یا *SOS3* را فعال می‌نماید. *SOS3*، پروتئین *SOS2* را فعال می‌کند و در نهایت کمپلکسی را تشکیل می‌دهند که موجبات فعال‌سازی پروتئین‌های *SOS1* و *HKT* درگیر در تنش شوری را فعال می‌سازند (Qiu et al. 2002; Zhu 2003). یکی دیگر از راهکارهای مقابله با تنش شوری، انتقال یون‌هایی که به طور بالقوه برای سوخت و ساز سلولی مضر هستند به داخل واکوئل‌ها می‌باشد (Pardo & Rubio 2011). *NHX*ها پروتئین‌های غشای داخل سلول هستند که نقش عمده‌ای در تنظیم pH، K^+ و Na^+ در گیاهان دارند (Jia et al. 2018). آنتی پورترهای Na^+/H^+ واکوئلی مستقر در تونوپلاست که توسط ژن‌های *NHX* کد می‌شوند، وظیفه‌ی انتقال Na^+ به وسیله‌ی H^+ از غشای واکوئلی و تجمع یون سدیم در سلول‌های واکوئل را برعهده دارد (Nass et al. 1997). تجمع یون سدیم اضافی در واکوئل، موجب تنظیم اسمزی سیتوسول و جذب آب از محلول نمک می‌شود. ژن‌های *NHX* با تنظیم مکانیزم انتقال یون سدیم اضافی از سیتوسول به واکوئل‌ها نقش مهمی در تحمل شوری بر عهده دارند (Tester & Davenport 2003; Apse & Blumwald 2007). پیشرفت‌های اخیر در زمینه ژنتیک ملکولی به به‌نژادگران گیاهی این امکان را داده است تا با بررسی بیان ژن‌ها در پاسخ به تنش‌های مختلف از جمله شوری ضمن دستیابی به اطلاعات بیشتر و عمیق‌تری در خصوص ساز و کارهای ایجاد تحمل به شوری راهکارهای مناسب‌تری را در برنامه‌های به‌نژادی طرح‌ریزی نمایند. از این رو در برنامه‌های به‌نژادی با هدف ایجاد تحمل به تنش شوری، شناسایی و بررسی بیان ژن‌های مؤثر در پاسخ به تنش و همچنین شناسایی فاکتورهای رونویسی و مسیرهای بیوستیزی کلیدی می‌تواند در ایجاد ژنوتیپ‌های متحمل بسیار مؤثر باشد. در این راستا این مطالعه با بررسی بیان ژن‌های *HvSOS1*، *HvSOS3*، *HvNHX3* و *HvHKT3* در لاین‌های اصلاحی جو تحت شرایط شوری در مرحله گیاهچه‌ای و تحت شرایط کنترل شده گلخانه انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش اثر تنش شوری بر تغییرات بیان ژن‌های *HvSOS1*، *HvSOS3*، *HvNHX3* و *HvHKT3* در شش ژنوتیپ اصلاحی جو به همراه رقم مهر به عنوان شاهد (رقم متحمل به شوری) تحت دو شرایط رشدی عدم تنش و تنش کلرید سدیم در قالب یک آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد (جدول ۱). ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی در این

مطالعه حاصل برنامه‌های دورگ‌گیری بین ارقام و لاین‌های موجود جو در کشور بوده که به همراه رقم شاهد از موسسه تهیه و اصلاح نهال و بذر، کرج تهیه شدند. آزمایش تحت شرایط کنترل شده با شرایط دمایی ۲۰ و ۲۵ درجه سانتیگراد در طول شب و روز و همچنین نسبت ۱۶ به ۸ روشنایی و تاریکی در گلخانه تحقیقاتی بخش تحقیقات غلات واقع در موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر انجام شد. ابتدا بذور ژنوتیپ‌های مورد بررسی جوانه‌دار شده و سپس به سینی‌های کشت حاوی محلول غذایی هوگلد منتقل شدند. دو تیمار بدون کلرید سدیم و حضور کلرید سدیم به میزان ۲۰۰ میلی‌مولار به عنوان سطوح تنش در نظر گرفته شدند. پس از استقرار گیاهچه‌ها و تا مرحله سه برگگی تمامی نمونه‌های آزمایشی با محلول غذایی مشابه و بدون نمک تغذیه شدند. در مرحله سه برگگی نیمی از گیاهچه‌ها در معرض حضور کلرید سدیم قرار گرفتند. به منظور جلوگیری از شوک ناگهانی و تخریب بافت گیاه، اعمال تنش شوری به صورت تدریجی (۳۰ میلی‌مولار سدیم کلرید) و در فاصله زمانی سه روز یکبار صورت گرفت. پس از گذشت ۲۱ روز از اعمال تنش شوری و ظاهر شدن علائم تنش در گیاهچه‌ها (مرحله ۵ برگگی) نمونه‌برداری 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 DENAZIST ASIA انجام گرفت. واکنش ساخت cDNA نیز با استفاده از کیت EasyTM cDNA Synthesis Kit و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده (پارس توس) صورت گرفت.

جدول ۱. شجره ژنوتیپ‌های اصلاحی و ارقام شاهد جو ارزیابی شده

Table 1. List of the studied advanced barley genotype

No.	Pedigree
1	Mehr (local check)
2	(Salt-12)ROHO/MAZORKA/TROMPILO/3/Lignee 527/NK1272//JLB 70-63
3	Lignee 527/NK1272//JLB 70-63/3/Zarjow
4	Deir Alla 106//Hem/Bc/3/Rihane"s"14/4/Lignee527/NK1272//JLB70-
5	D10*2/4/Productive/3/Roho//Alger/Ceres362-1-1
6	Lignee 527/NK1272//JLB 70-63/5/CLN-B/80.5138//GLORIA-
7	MBS-95-2

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی، از کیت Sina SYBR Blue HS-qPCR (2x) استفاده شد. در ابتدا به منظور تعیین کارایی هر جفت آغازگر در واکنش Real-Time PCR ترکیبی از تمامی تیمارها و تکرارهای cDNA سنتز شده، تهیه گردید و برای هر جفت آغازگر چندین ضریب رقت در نظر گرفته شد. پس از تعیین بهترین غلظت آغازگر و cDNA، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی با استفاده از دستگاه Rotor-Gene Q انجام شد. در جدول ۲ توالی آغازگرهای مورد استفاده ارائه شده است. حجم مخلوط واکنش ۱۲ µl و شامل µl SYBR Blue، ۲ µl نمونه cDNA، ۰/۳ µl از هر یک از آغازگر مستقیم و معکوس و ۳/۴ µl 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 پلیمرز، براساس دمای ذوب به دست آمده برای هر آغازگر میزان بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی با استفاده از رابطه $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد (Pfaffl 2001). پس از محاسبه داده‌های مربوط به میزان بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی، تجزیه‌های آماری شامل تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن و سطح معنی‌داری هر از یک از اثرات اصلی و یا متقابل با استفاده از نرم افزار SPSS ver. 16 انجام شد.

جدول ۲. توالی آغازگرهای مربوط به ژن‌های استفاده شده در مطالعه حاضر

Table 2. Sequence of gene primers used in the present study

Gene name		Sequence (5'-3')	Reference
<i>HvSOS1</i>	Forward	GGCACCAACAGGAAGATGAA	Yousefi-Rad et al. (2019)
	Reverse	GATATGCAGGAGGCCAGAGA	
<i>HvSOS3</i>	Forward	GCTGCACCTCGAAAATCC	Yousefi-Rad et al. (2019)
	Reverse	AAACCGCTCGTCACTGCT	
<i>HvNHX3</i>	Forward	TGAGCCGAACATTACTGTGAT	Adem et al. (2014)
	Reverse	ACGAGCTTACCTTTCAATACA	
<i>HvHKT3</i>	Forward	TGAGCCGAACATTACTGTGAT	Qiu et al. (2011)
	Reverse	ACGAGCTTACCTTTCAATACA	
<i>a-tubulin</i>	Forward	AGTGTCTGTCCACCCACTC	Qiu et al. (2011)
	Reverse	ATTCAGAGCACCGTCAAACC	

نتایج و بحث

نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس مقادیر بیان نسبی هر یک از ژن‌های *HvSOS1*، *HvSOS3*، *HvNHX3*، *HvHKT3* در جدول ۳ نشان داده شده است. با توجه به این نتایج مشخص شد اختلاف معنی‌داری ($P < 0.01$) بین تیمار عدم تنش و تنش شوری از نظر بیان نسبی ژن‌های بررسی شده وجود داشت. علاوه بر این بین ژنوتیپ‌های مورد نظر نیز تفاوت معنی‌داری ($P < 0.01$) از نظر تمامی ژن‌ها مشاهده شد. اثر متقابل بین تیمار تنش و ژنوتیپ نیز برای هر یک از ژن‌ها معنی‌دار بود ($P < 0.01$). بررسی الگوی بیان ژن‌های مطالعه شده در دو شرایط رشدی متفاوت در شکل ۱ نشان داده شده است. تنش شوری به طور معنی‌داری موجب افزایش بیان کلیه ژن‌ها شد که این نتایج با دیگر یافته‌های به دست آمده در خصوص افزایش بیان ژن‌ها بواسطه تنش شوری در مقایسه با شرایط عدم تنش مطابقت نشان داد (Yousefi Rad et al. 2019; Ahmadi et al. 2020; Akram et al. 2021; Dong et al. 2020). ژن *HvSOS1* در اثر تیمار تنش شوری به میزان ۱۴/۷۶ برابر نسبت به تیمار بدون تنش افزایش بیان داشت (شکل A-۱). علاوه بر این میزان افزایش بیان ژن *HvSOS3* نیز قابل توجه و ۴/۶۴ برابر تیمار بدون تنش بود (شکل

B-۱). ژن‌های *HvSOS1* و *HvSOS3* دو ژن کلیدی در مسیر تنظیمی SOS هستند که در کنترل هموستازی یونی در گیاهان نقش مهمی بر عهده دارند. زمانی که گیاه در معرض غلظت‌های بالای نمک قرار می‌گیرد مقدار یون‌های کلسیم موجود در سیتوپلاسم دستخوش تغییر خواهد شد که این امر موجب دریافت پیام توسط ژن *SOS2* موجود در غشای پلاسمایی می‌شود. ژن *SOS3* با *SOS2* دارای رابطه مستقیمی بوده به طوری که برهمکنش بین آن‌ها موجب بیان ژن *SOS1* می‌شود. پروتئین *SOS1* دارای نقش آنتی‌پورتری بوده و موجب خروج یون‌های سدیم اضافی به خارج از سیتوسول می‌شود (Liu & Zhu 1998).

جدول ۳. تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن‌های ارزیابی شده

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) of the relative expression of investigated genes

SOV منبع تغییرات	df درجه آزادی	SOS1	SOS3	NHX3	HvHKT3
Treatment تیمار	1	1791.57**	196.21**	119.62**	212.4**
Genotype ژنوتیپ	6	221.12**	50.91**	25.06**	24.99**
T × G اثر متقابل تیمار و ژنوتیپ	6	221.64**	49.54**	20.45**	23.48**
Error خطا	28	25.36	0.95	3.28	2.41

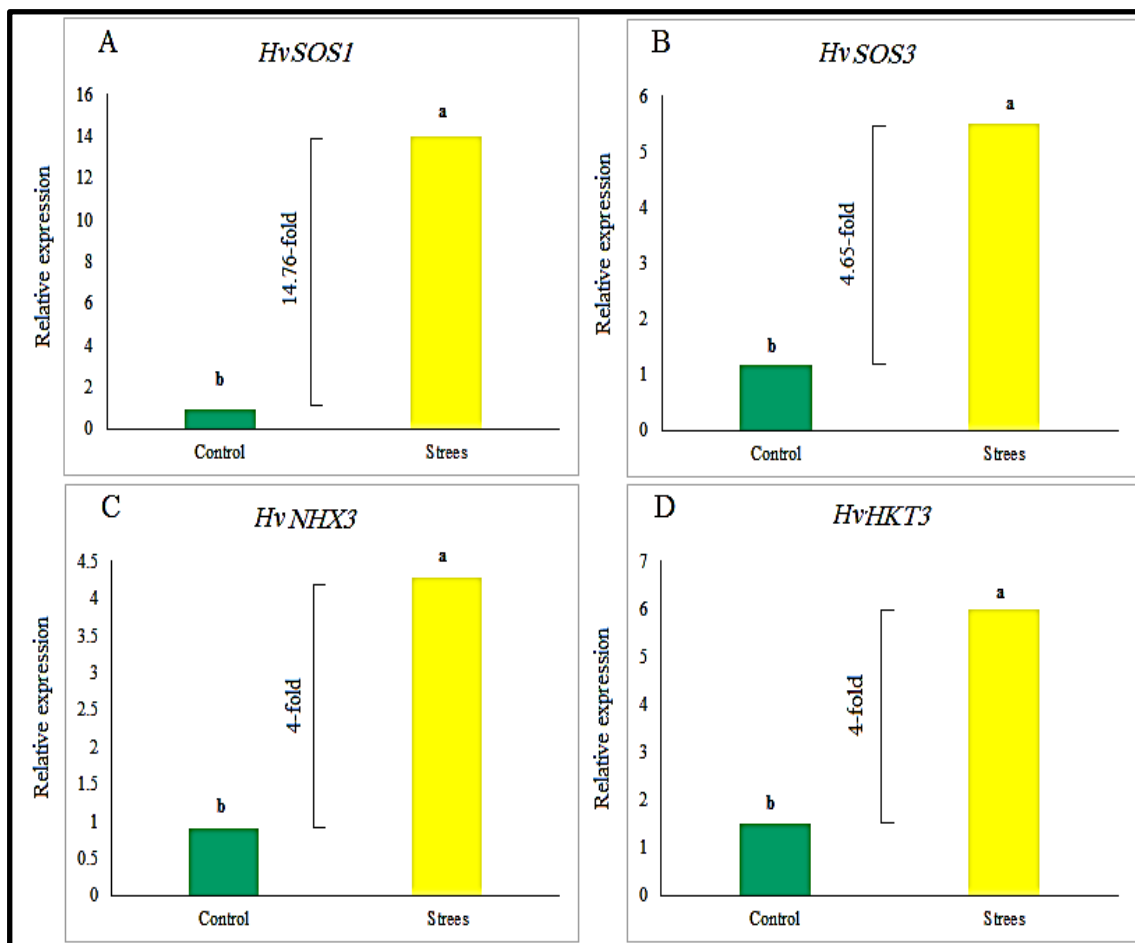
** Significant at 0.01 level of probability.

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

با توجه به مقادیر بیان نسبی ژن‌های *HvSOS1* و *HvSOS3* اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های ارزیابی شده در تیمار بدون تنش شوری مشاهده شد. در مقابل تیمار تنش شوری موجب افزایش بیان این ژن‌ها در تمامی ژنوتیپ‌ها شد. بیشترین میزان افزایش بیان ژن *HvSOS1* مربوط به ژنوتیپ‌های G5 و G6 بود (شکل A-۲). ژنوتیپ G5 به همراه G3 از نظر ژن *HvSOS3* نسبت به ژنوتیپ شاهد و سایر ژنوتیپ‌ها دارای بیشترین مقدار بیان ژن بود (شکل B-۲). همچنین لازم به ذکر است که دو ژنوتیپ G3 و G6 از نظر بیان دو ژن مذکور نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها در رتبه بعدی قرار گرفتند و درصد تغییرات بیان آن‌ها در مقایسه با تیمار عدم تنش نشان داد این ژنوتیپ‌ها مشابه ژنوتیپ G5 احتمالاً از نظر فعالیت مکانسیم کنترلی SOS دارای برتری قابل توجهی هستند. تیمار تنش شوری موجب افزایش میانگین بیان نسبی ژن *HvNXH3* به میزان ۴ برابر در مقایسه با تیمار بدون تنش شد (شکل C-۱). افزایش بیان نسبی ژن *NHX* در شرایط تنش شوری نشان دهنده فعال بودن مکانسیم‌های تحمل به شوری در گیاه است. مشخص شده است که افزایش بیان ژن‌های *NHX* در گونه‌های گیاهی باعث افزایش تحمل به شوری می‌شود (Zhang et al. 2001).

در مطالعه Chen et al. (2007)، پس از بیان بالای ژن *NHX1*، تحمل بالایی به تنش شوری در گیاهان تراریخت برنج مشاهده شد در صورتی که گیاهچه‌های تراریخت در شرایط عدم تنش از توانایی رشدی کمتری برخوردار بودند. در این

رابطه (2003) Tester and Devenport اظهار داشتند فعالیت ناقل *NHX* با جایگزینی یون‌های سدیم در واکوئل علاوه بر پایین آوردن غلظت آن‌ها در سیتوسول موجب تنظیم اسمزی و حفظ جذب آب از محلول نمک می‌شود.



شکل ۱. میزان بیان نسبی ژن‌های *HvSOS1*, *HvSOS3*, *HvNHX3* و *HvHKT3* در تیمارهای کنترل و شوری. حروف متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشند.

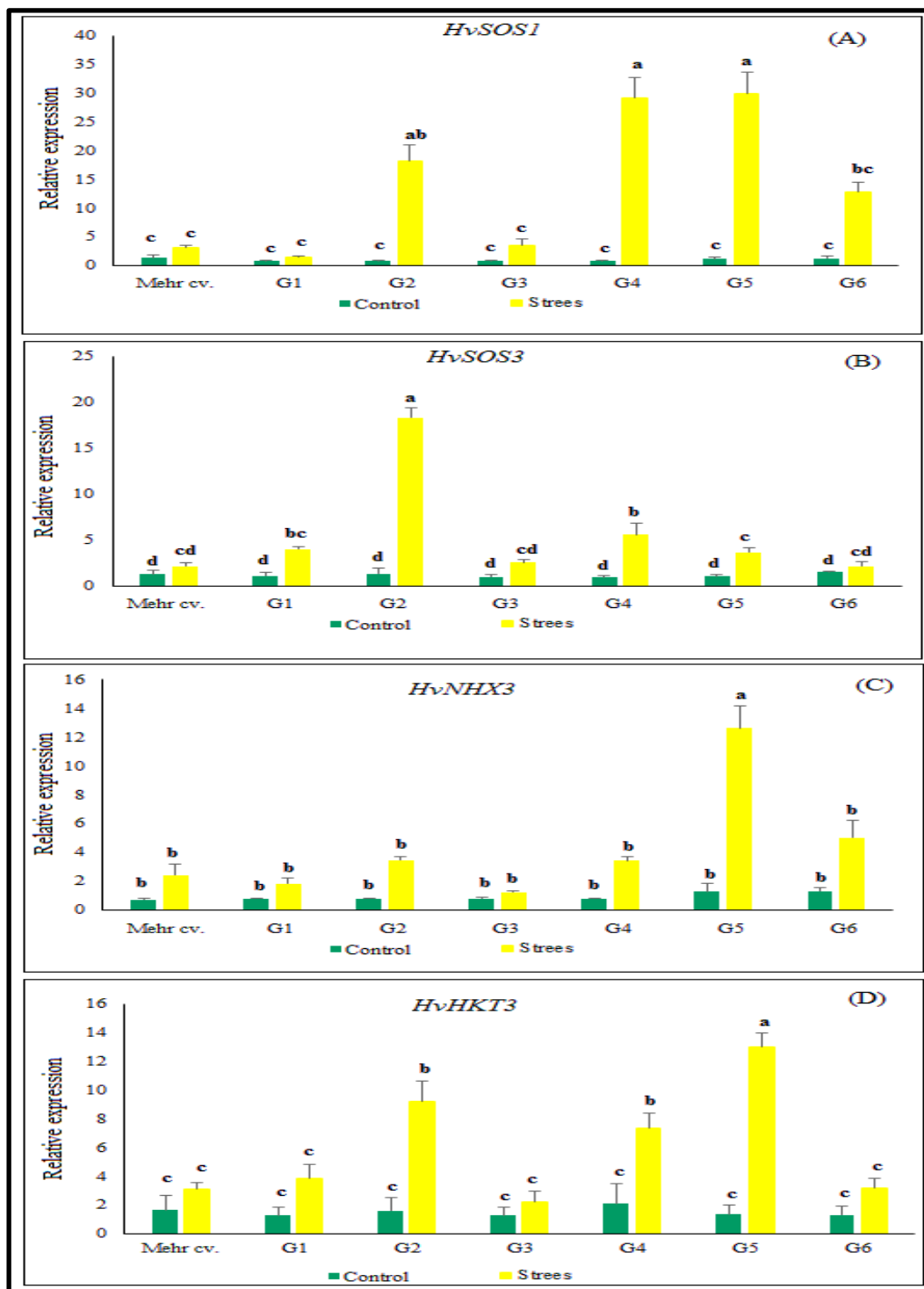
Figure 1. The relative expression of *HvSOS1*, *HvSOS3*, *HvNHX3*, and *HvHKT3* genes in the control and salinity treatments. Different letters on each column show a significant difference at $P \leq 0.01$.

همچنین این ناقل‌ها با انباشت یون‌های اضافی سدیم در واکوئل موجب حفظ حالت پایدار سیتوسول و افزایش تحمل گیاه به شوری می‌شود. در آزمایش Pour-Saeid et al. (2015) نیز مشخص شد در شرایط تنش شوری بیان نسبی ژن *NHX* در گیاهچه‌های گلرنگ نسبت به شرایط عدم تنش به شدت افزایش یافت. مقایسه بیان ژن *HvNHX3* در ژنوتیپ‌های مختلف نشان داد در تیمار عدم تنش، دو ژنوتیپ G6 و G7 نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها از بیان بیشتری برخوردار بودند (شکل C-۲). همچنین در سطح تیمار تنش شوری، این دو ژنوتیپ به همراه ژنوتیپ G3 دارای بیشترین میزان بیان بودند. ژنوتیپ G5 نیز دارای الگوی مشابه با G3 بود و اختلاف معنی‌داری با آن نداشت. میزان تغییرات بیان ژن در ژنوتیپ‌های مختلف نیز نشان داد ژنوتیپ‌های

مذکور نسبت به دیگر ژنوتیپ‌ها دارای بیشترین میزان تغییرات بودند که این نتایج بیانگر تحمل بالای آن‌ها به شرایط شوری است. ژنوتیپ شاهد (رقم مهر) از نظر بیان این ژن الگوی قابل توجهی نشان نداد و میزان بیان این ژن در آن مشابه سایر ژنوتیپ‌های نیمه متحمل و حساس بود.

کانال‌های سدیم-پتاسیم نقش مهمی در هموستازی یونی و افزایش تحمل گیاهان به تنش شوری دارند. این کانال‌ها با قرارگیری در عرض غشای پلاسمایی و واکوئل سبب برقراری تبادلات یونی می‌شوند. به عبارت دیگر این کانال‌ها با انتقال یون‌های سدیم به واکوئل اثرات مخرب سدیم در محیط سیتوسول را کاهش داده و از طرف دیگر باعث ایجاد تعادل اسمزی می‌شود (Bhaskaran & Savithamma 2011). فاکتور رونویسی *HKT* یکی از عوامل مؤثر در فعالیت این کانال‌های انتقال یونی می‌باشد. تاکنون ۲۹ ژن *HKT* در نه‌گونه گیاهی شناسایی شده است که همگی آن‌ها نقش مهمی در افزایش تحمل به شوری دارند (Li et al. 2019). در مطالعه حاضر نیز بررسی اثر تنش شوری بر بیان ژن *HvHKT3* در گیاهچه‌های جو نشان داد تیمار تنش باعث افزایش بیان نسبی آن شد. مقایسه سطح رونوشت این ژن در شرایط شوری نسبت به تیمار بدون تنش نشان داد تیمار شوری منجر شد تا تجمع رونوشت این ژن ۴ برابر بیشتر از تیمار بدون شوری باشد (شکل ۱-D). این نتایج بیانگر پاسخ ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به شرایط شوری می‌باشد. در این راستا Ahmadi et al. (2020) نیز نتایج مشابهی در گندم گزارش کردند و نشان دادند تنش شوری موجب افزایش بیان ژن *HKT* در گیاهچه‌های رشد کرده در شرایط تنش شوری شد. در مطالعه Fakhravari (2011) بیان نسبی *HKT1* در گیاهچه‌های ذرت مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد تنش شوری بلند مدت موجب افزایش بیان این در اندام‌های ریشه و برگ ژنوتیپ مقاوم به شوری شد.

مقایسه ژنوتیپ‌های ارزیابی شده از نظر بیان ژن *HvHKT3* در هر دو تیمار بدون تنش و تنش شوری نشان داد در سطح تیمار بدون تنش ژنوتیپ *G5* دارای بیشترین میزان بیان ژن بود و با سایر ژنوتیپ تفاوت قابل توجهی داشت. دیگر ژنوتیپ‌ها اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند و الگوی یکسانی نشان دادند. در سطح تیمار تنش اختلاف الگوی بیان ژن بین ژنوتیپ‌ها چشمگیرتر بود و سه ژنوتیپ *G3*، *G5* و *G6* به طور معنی‌داری دارای بیشترین میزان بیان ژن *HvHKT3* بودند (شکل ۲-D). بنابراین می‌توان عنوان کرد کانال‌های انتقال دهنده یون‌های سدیم در این ژنوتیپ‌ها بسیار فعال بوده و به خوبی قادر به ایجاد تعادل یونی در محیط سیتوسول می‌باشند. در این راستا نتایج مشابهی توسط سایر محققان نیز گزارش شده است. Davenport et al. (2007) گزارش دادند ژن‌های *HKT* نقش مهمی در بازیابی سدیم از آوند چوبی دارند. در مطالعه Jiang et al. (2018) بیان بالای ژن *ZmHKT1;5* در ژنوتیپ‌های ذرت متحمل به شوری توانست بواسطه حفظ تعادل بهینه نسبت سدیم به پتاسیم و نیز افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌هایی که میزان تجمع گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر را در سطح پایینی نگه داشتند، به طور مؤثری باعث افزایش تحمل به تنش شوری در آن‌ها شود.



شکل ۲. میزان بیان نسبی ژن‌های *HvSOS1*, *HvSOS3*, *HvNHX3* و *HvHKT3* در ژنوتیپ‌های ارزیابی شده در تیمارهای کنترل و شوری. حروف متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشند

Figure 2. The relative expression of *HvSOS1*, *HvSOS3*, *HvNHX3*, and *HvHKT3* genes for the investigated genotypes in the control and salinity treatments. Different letters on each column show a significant difference at $P \leq 0.01$

مقایسه نتایج به دست آمده از الگوی بیان ژن‌های *SOS* و *HKT* در ژنوتیپ‌های ارزیابی شده جو نشان داد دو ژن *HvSOS1* و *HvHKT3* نتایج مشابهی را از نظر شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به شوری نشان دادند و براساس بیان هر دو ژن، ژنوتیپ‌های *G3*، *G5* و *G6* به عنوان متحمل‌ترین ژنوتیپ‌ها شناسایی شدند. این نتیجه نشان می‌دهد که ممکن است ارتباط مستقیمی بین دو ژن مذکور باشد. در این راستا نتایج مطالعه دیگری نشان داد بین الگوی بیان ژن‌های *TaHKT1;5* و *TaSOS1* همبستگی مثبتی وجود دارد (Ahmadi et al. 2020). بنابراین بررسی ارتباط بین الگوی بیان ژن در ژن‌های مختلف و شبکه‌های ژنی می‌تواند در درک بهتر مکانیسم‌های تحمل به شوری و ژن‌های دخیل در این مسیر اطلاعات کاملی فراهم آورد.

نتیجه‌گیری: در این آزمایش بیان ژن‌های *HvSOS1*، *HvSOS3*، *HvNHX3* و *HvHKT3* در ژنوتیپ‌های جو در دو تیمار بدون تنش و تنش شوری به طور معنی‌داری متفاوت از هم بود. به طور کلی با توجه به نتایج بدست آمده مشخص شد تیمار شوری بیشترین اثر را بر بیان ژن *HvSOS1* داشت. بین ژنوتیپ‌های ارزیابی شده جو نیز در شرایط شوری اختلاف معنی‌داری از نظر بیان ژن‌های مطالعه شده مشاهده شد. در مجموع با مقایسه الگوی بیان ژن‌های سنجش شده، مشاهده شد دو ژنوتیپ *G3* و *G6* بواسطه دارا بودن بیشترین میزان سطح رونوشت از ژن‌های مورد نظر در شرایط تنش شوری بودند. بنابراین با در نظر گرفتن این نتیجه، بررسی بیشتر سازوکارهای فیزیولوژیکی و سنجش توانایی این ژنوتیپ‌ها از نظر محتوای سدیم و پتاسیم و همچنین قابلیت آن‌ها در تنظیم هم‌سازای یونی سلول‌های خود قابل توجه می‌باشد. علاوه بر این به نظر می‌رسد در صورت مشاهده سطوح تحمل در دیگر خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی این ژنوتیپ‌ها بتوانند کاندید مناسبی برای بررسی پتانسیل عملکرد در مناطق شور باشند.

سپاسگزاری: نویسندگان از مدیریت و داوران محترم مجله به خاطر ارائه نظرات و پیشنهادهای ارزشمندشان سپاسگزار می‌کنند.

منابع

زمانی بابگهری محبوبه؛ نیازی علی؛ ابراهیمی اسماعیل (۱۳۹۰) بررسی نواحی کروموزومی و شناسایی لوکوس‌های اطراف ژن‌های درگیر در انتقال یون‌های سدیم و پتاسیم در آراییدوپسیس، برنج و *Physcomotrella patent*، هفتمین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، تهران.

سعیدپور علی؛ کاوسی حمیدرضا؛ محمدی نژاد قاسم؛ خسروی سارا (۱۳۹۳) بررسی بیان ژن *NHX* در گیاه گلرنگ تحت تنش شوری. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۶، ۹۹ - ۹۱.

فخرآوری ته‌مینه (۱۳۹۰) تأثیر تنش شوری بر بیان برخی ژن‌های ناقل (*ITaSOS*، *ITaHKT*، *ITaNHX*) دخیل در ایجاد تحمل به شوری طی دوره رشد رویشی گندم نان. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تحصیلات تکمیلی کرمان، ۸۲-۱۰۳.

References

- Ahmadi J, Pour-Aboughadareh A, Ourang SF et al. (2020) Unraveling salinity stress responses in ancestral and neglected wheat species at early growth stage: A baseline for utilization in future wheat improvement programs. *Physiol Mol Biol Plants* 26, 537-549.
- Ahmed IM, Dai H, Zheng W et al. (2013) Genotypic differences in physiological characteristics in the tolerance to drought and salinity combined stress between Tibetan wild and cultivated barley. *Plant Physiol Biochem* 63, 49-60.
- Akram U, Song Y, Liang C et al. (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.
- Ali Z, Zhang DY, Xu ZL et al. (2012) Uncovering the salt response of soybean by unraveling its wild and cultivated functional genomes using tag sequencing. *PLoS One* 7, e48819.
- Al-Tawaha AR, Samarah N, Ranga AD et al. (2021) Soil Salinity and Climate Change. In: Sustainable soil and land management and climate change. CRC Press, UK. pp. 83-93.
- Apse MP, Blumwald E (2007) Na⁺ transport in plants. *FEBS letters* 581, 2247-2254.
- Arzani A, Ashraf M (2016) Smart engineering of genetic resources for enhanced salinity tolerance in crop plants. *Crit Rev Plant Sci* 35, 146-189.
- Bhaskaran S, Savithamma D (2011) Co-expression of *Pennisetum glaucum* vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter and *Arabidopsis* H⁺-pyrophosphatase enhances salt tolerance in transgenic tomato. *J Exp Bot* 62, 5561-5570.
- Chen Z, Pottosin II, Cuin TA et al. (2007) Root plasma membrane transporters controlling K⁺/Na⁺ homeostasis in salt-stressed barley. *Plant Physiol* 145(4), 1714-1724.
- Davenport RJ, Muñoz-Mayor A, Jha D et al. (2007) The Na⁺ transporter *AtHKT1;1* controls retrieval of Na⁺ from the xylem in *Arabidopsis*. *Plant, cell & environment* 30, 497-507.
- Dong J, Liu C, Wang Y et al. (2021) Genome-wide identification of the *NHX* gene family in *Punica granatum* L. and their expressional patterns under salt stress. *Agronomy* 11, 264.
- Ekiz H, Yilmaz A (2003) Determination of the salt tolerance of some barley genotypes and the characteristics affecting tolerance. *Turk J Agri For* 27, 253-260.
- Fischer R, Byerlee DR, Edmeades GO (2009) Can technology deliver on the yield challenge to 2050?. *Plant Physiol Biochem* 63, 49-60.
- Flowers T (2004) Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental botany* 55, 307-319.
- Greenway H, Munns R (1980) Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annu Rev Plant Physiol* 31, 149-190.
- Gupta B, Huang B (2014) Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *Inter J Genomics* 2014.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu J-K et al. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Biol* 51, 463-499.
- Horie T, Yoshida K, Nakayama H et al. (2001) Two types of HKT transporters with different properties of Na⁺ and K⁺ transport in *Oryza sativa*. *Plant J* 27, 129-138.
- Jia Q, Zheng C, Sun S et al. (2018) The role of plant cation/proton antiporter gene family in salt tolerance. *Biol Plant* 62, 617-629.
- Jiang Z, Song G, Shan X et al. (2018) Association analysis and identification of *ZmHKT1; 5* variation with salt-stress tolerance. *Front Plant Sci* 9, 1485.
- Jood S, Kalra S (2001) Chemical composition and nutritional characteristics of some hull less and hulled barley cultivars grown in India. *Food/Nahrung* 45, 35-39.
- Knight H, Knight MR (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci* 6, 262-267.

- Li H, Xu G, Yang C et al. (2019) Genome-wide identification and expression analysis of HKT transcription factor under salt stress in nine plant species. *Ecotoxicol Environ Saf* 171, 435-442.
- Liu J, Zhu J-K (1998) A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Sci* 280, 1943-1945.
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59, 651-681.
- Mwando E, Han Y, Angessa TT et al. (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: insights into mechanisms of sodium tolerance. *J Biol Chem* 272, 26145-26152.
- Niazian M, Masoumeh N, Sadat NSA (2016) A review on biometrical methods used for salt tolerance breeding in crops. *J Crop Breed* 17, 24-41.
- Pardo JM (2010) Biotechnology of water and salinity stress tolerance. *Curr Opin Biotechnol* 21, 185-196.
- Pardo JM, Rubio F (2011) Na⁺ and K⁺ transporters in plant signaling. In: *Transporters and pumps in plant signaling*. Springer. pp. 65-98.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45-e45.
- Pour-Aboughadareh A, Sanjani S, Nikkiah-Chamanabad H et al. (2021) Identification of salt-tolerant barley genotypes using multiple-traits index and yield performance at the early growth and maturity stages. *Bull Natl Res Cent* 45, 1-16.
- Qiu Q-S, Guo Y, Dietrich MA et al. (2002) Regulation of *SOS1*, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by *SOS2* and *SOS3*. *PNAS* 99, 8436-8441.
- Rasel M, Tahjib-UI-Arif M, Hossain MA et al. (2021) Screening of salt-tolerant rice landraces by seedling stage phenotyping and dissecting biochemical determinants of tolerance mechanism. *J Plant Growth Regul* 40, 1853-1868.
- Rawson H, Richards R, Munns R (1988) An examination of selection criteria for salt tolerance in wheat, barley and triticale genotypes. *Aust J Agri Res* 39, 759-772.
- Saeid Pour A, Kavousi HR, Mohammadi Nezhad Q et al. (2015) Gene Expression Analysis of NHX to Salinity stress in Safflower (*Carthamus tinctorius* L). *Agricultural Biotechnology Journal* 6, 91-99. (In Persian).
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS et al. (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Botan* 2012.
- Shen Y, Zhang H, Cheng L et al. (2016) In vitro and in vivo antioxidant activity of polyphenols extracted from black highland barley. *Food Chem* 194, 1003-1012.
- Tadayon M, Emam Y (2007) Physiological and morphological responses of two barley cultivars to salinity stress in relation to grain yield. *Isfahan University of Technology-Journal of Crop Production and Processing* 11, 253-263.
- Tester M, Davenport R (2003) Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann Bot* 91, 503-527.
- Vij S, Tyagi AK (2007) Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants. *Plant Biotechnol J* 5, 361-380.
- Widodo, Patterson JH, Newbigin E et al. (2009) Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance. *J Exp Bot* 60, 4089-4103.

- Yousefi Rad S, Soltanloo H, Ramezanpour SS et al. (2019) The study of *SOS* genes expression in mutant barley root under salt stress. *J Crop Breed* 11, 1-8.
- Zaghdoud C, Mota-Cadenas C, Carvajal M et al. (2013) Elevated CO₂ alleviates negative effects of salinity on broccoli (*Brassica oleracea* L. var Italica) plants by modulating water balance through aquaporins abundance. *Environ Exp Bot* 95, 15-24.
- Zamani-Babgohari M, Niaz A, Ebrahimi A (2011) Analysis of chromosomal region and identification of loci surrounding genes involved in Na⁺ and K⁺ in rice, Arabidopsis and hyscomotrella patent. National Biotechnology Congress of Iran (In Persian).
- Zeeshan M ,Lu M, Sehar S et al. (2020) Comparison of biochemical, anatomical, morphological, and physiological responses to salinity stress in wheat and barley genotypes deferring in salinity tolerance. *Agronomy* 10, 127.
- Zhang H-X, Hodson JN, Williams JP et al. (2001) Engineering salt-tolerant Brassica plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *PNAS* 98, 12832-12836.
- Zhu J-K (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol* 6, 441-445.

