

Investigation of expression pattern for some genes related to antioxidant activities in promising genotypes of barley under salinity stress conditions

Omid Jadidi

Ph.D. Student, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. E-mail address: omid2.jadidi@yahoo.com

Alireza Etminan

*Corresponding author. Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran. E-mail address: alietminan55@yahoo.com

Reza Azizinezhad

Assistant Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. E-mail address: r.azizi@srbiau.ac.ir

Alireza Pour-Aboughadareh

Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. E-mail address: a.poraboghadareh@gmail.com and a.poraboghadareh@edu.ikiu.ac.ir

Asa Ebrahimi

Assistant Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. E-mail address: dr.asaebrahimi@gmail.com

Abstract

Objective

Salinity stress is one of the most important environmental stresses that significantly has negative effects on plant growth and crop production all over the world. Among cereal crops, barley (*Hordeum vulgare* L.) is the most tolerate cereal to abiotic stresses, especially to salinity stress. In the present study, to evaluate the molecular response of some promising genotypes of barley to salinity stress, the expression patterns of *APX*, *GPX*, *SOD*, *Rboh1*, and *Rboh2* genes were assessed under two control and salt stress conditions.

Materials and methods

In this study, the effect of salt treatment (200 mM NaCl) on relative expression patterns of *APX*, *GPX*, *SOD*, *Rboh1*, and *Rboh2* genes in a set of six promising genotypes of barley along with a

local cultivar as the reference genotype (cv. Mehr) was evaluated. The experiment was conducted in a randomized complete block design in two environments (normal and saline stress) under controlled glasshouse conditions using a hydroponic system. After seedling establishment and applying stress treatment (21-days), plants were subjected to sampling and the relative expression for targeted genes was estimated as proposed by Pfaffl (2001).

Results

According to the results, a significant difference was observed between control and salt treatments, as well as, among tested barley genotype in terms of all investigated genes. Salt treatment significantly increased expression of *Rboh1*, *APX*, *GPX*, *Rboh2*, and *SOD* by 6.80, 4.51, 4.26, 2.76, and 2.72-fold compared to control treatment, respectively. A comparison of the expression patterns of studied genes revealed that promising genotypes G6 and G7 showed better tolerance against oxidative stress induced by salt treatment and revealed an acceptable tolerance to salinity stress.

Conclusions

Our results revealed that the genotypes G6 and G7 due to their genetic background have a high potential to the regulation of their antioxidant system. Hence, these genotypes can be used as ideal candidates for supplementary studies and even participate in adaptability and stability trials to release as commercial cultivars tolerant to salt stress.

Keywords: Gene expression pattern, salinity, antioxidant activity, barley

Paper Type: Research Paper.

Citation: Jadidi O, Etminan A, Aziziezhad R, Pour-Aboughadareh A, Ebrahimi A (2023) Investigation of expression pattern for some genes related to antioxidant activities in promising genotypes of barley under salinity stress conditions. *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (1), 43-60.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (1), 43-60.

DOI: 10.22103/jab.2022.20336.1435

Received: November 12, 2022.

Received in revised form: December 17, 2022.

Accepted: December 18, 2022.

Published online: February 18, 2023

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant



Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.

© the authors

بررسی الگوی بیان برخی از ژن‌های مرتبط با فعالیت آن‌تی‌اکسیدان‌تی در ژنوتیپ‌های

امیدبخش جو تحت شرایط تنش شوری

امید جدیدی

دانشجوی دکترا، گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. رایانامه:

omid2.jadidi@yahoo.com

 علیرضا اطمینان


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

Alietminan55@yahoo.com

رضا عزیزی نژاد

استادیار، گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. رایانامه:

r.azizi@srbiau.ac.ir

 علیرضا پورابوقداره

استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه:

a.poraboghadareh@edu.ikiu.ac.ir و a.poraboghadareh@gmail.com

آسا ابراهیمی

استادیار، گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. رایانامه:

dr.asaebrahimi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۲۱ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۹/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۷

چکیده

هدف: تنش شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که اثرات نامطلوب گسترده‌ای بر رشد و نمو گیاهان و بهره‌وری محصولات کشاورزی در جهان دارد. در بین غلات، جو (*Hordeum vulgare* L.) دارای بیشترین میزان تحمل به تنش‌های غیر زیستی به ویژه شوری می‌باشد. در این تحقیق به منظور ارزیابی پاسخ مولکولی برخی از ژنوتیپ‌های امیدبخش جو به تنش شوری، الگوی بیان ژن‌های *Rboh1*، *Rboh2*، *SOD*، *GPX*، *APX* در دو تیمار عدم تنش و تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه اثر تیمار شوری (۲۰۰ mM NaCl) بر تغییرات الگوی بیان ژن‌های *SOD*، *GPX*، *APX*، *Rboh1* و *Rboh2* در شش ژنوتیپ امیدبخش جو به همراه رقم مهر (به عنوان شاهد) مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی و در دو محیط نرمال و تنش شوری در شرایط کنترل شده گلخانه و با استفاده از سیستم کشت هیدروپونیک به اجرا درآمد. پس از استقرار گیاهچه‌ها و اعمال دوره تنش (۲۱ روز)، نمونه برداری از بافت برگ انجام و میزان نسبی هر یک از ژن‌ها در هر دو شرایط رشدی با استفاده از روش (Pfaffl 2001) اندازه‌گیری شد.

نتایج: با توجه به نتایج به دست آمده اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای عدم تنش و تنش شوری و همچنین بین ژنوتیپ‌های ارزیابی شده از نظر بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه مشاهده شد. تیمار شوری به طور معنی‌داری موجب افزایش بیان هر یک از ژن‌های *Rboh1*، *Rboh2*، *GPX*، *APX* و *SOD* به ترتیب به میزان ۶/۸۰، ۴/۵۱، ۴/۲۶، ۲/۷۶ و ۲/۷۲ برابر نسبت به تیمار عدم تنش شد. مقایسه الگوی بیان ژن‌های ارزیابی شده در ژنوتیپ‌های مختلف نشان داد دو ژنوتیپ G6 و G7 دارای واکنش بهتری از نظر پاسخ به تنش اکسیداتیو ایجاد شده به واسطه تیمار شوری و در نتیجه تحمل قابل قبولی در برابر تنش شوری بودند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه مشخص شد ژنوتیپ‌های G6 و G7 بواسطه زمینه ژنتیکی خود قابلیت بالایی در تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با سیستم آنتی‌اکسیدانتی دارند. از این‌رو این ژنوتیپ‌ها می‌تواند به عنوان کاندید مناسبی برای بررسی‌های تکمیلی و استفاده در آزمایشات سازگاری و پایداری جهت معرفی ارقام متحمل به تنش شوری مورد توجه قرار گیرد.

کلید واژه‌ها: الگوی بیان ژن، شوری، فعالیت آنتی‌اکسیدانت، جو زراعی

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: جدیدی امید، اطمینان علیرضا، عزیزی‌نژاد رضا، پورابوقدره علیرضا، ابراهیمی آسا (۱۴۰۲) بررسی الگوی بیان برخی از ژن‌های مرتبط با فعالیت آنتی‌اکسیدانتی در ژنوتیپ‌های امیدبخش جو تحت شرایط تنش شوری. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۱)، ۴۳-۶۰.

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



© the authors

مقدمه

جو زراعی (*Hordeum vulgare* L.) یکی از انواع غلات دانه ریز است که نقش مهمی در تأمین بخش بزرگی از علوفه و خوراک دام و طیور و همچنین صنایع غذایی دارد. این گیاه خودگشن بوده و دارای سطح کروموزومی دیپلوئید می‌باشد. اندازه ژنوم این گیاه سبب شده است به عنوان یک گیاه مدل برای بررسی انواعی از تنش‌های محیطی نسبت به گندم و ذرت بیشتر مورد توجه

محققان قرار گیرد (Schreiber et al. 2020). بر اساس گزارش منتشر شده توسط FAO در سال ۲۰۱۹ متوسط تولید جهانی این غله نزدیک ۳/۵ میلیون تن دانه برآورده شده است. از نظر ارزش تغذیه‌ای، دانه جو دارای مقدار قابل توجهی فیبر، انواع ویتامین‌ها به ویژه B، پروتئین، فسفات و کلسیم می‌باشد (Fatemi et al. 2022; Singh et al. 2021). از اینرو به نظر می‌رسد دستیابی به ارقام پر بازده و پایدار برای کشت در مناطق مختلف، نقش مهمی در افزایش تولید و گسترش این گیاه زراعی داشته باشد.

در سال‌های اخیر تغییرات اقلیمی به طور چشمگیری سبب به وجود آمدن مشکلاتی همچون محدود شدن دسترسی به منابع آبی، افزایش شوری خاک و بسیاری از آلودگی‌های زیست محیطی بیش از پیش شده است. از اینرو، کاهش چشمگیر اراضی قابل استفاده برای تولید محصولات کشاورزی از یکسو و افزایش جمعیت جهان از سوی دیگر به عنوان دو عامل تهدید کننده جدی برای تولید پایدار محصولات کشاورزی پایدار در نظر گرفته شده‌اند (Shahbaz & Ashraf 2013). شوری خاک یکی از مخرب‌ترین تنش‌های محیطی است که تولید محصولات زراعی را در بخش‌های زیادی از جهان تحت تأثیر خود قرار داده است (Ahmadi et al. 2018). علاوه بر این، تخمین زده شده است تا سال ۲۰۵۰ نیمی از کل زمین‌های قابل کشت به دلیل استفاده بیش از حد از آب‌های زیرزمینی و روش‌های نادرست مدیریت زراعی با مشکل شوری خاک مواجه شوند (Nachshon 2018). از اینرو، در آینده‌ای نه چندان دور موفقیت در بهره‌برداری از خاک‌های شور مستلزم مدیریت صحیح منابع آبی و خاکی و همچنین استفاده از گیاهان متحمل به سطوح مختلفی از تنش شوری است.

فرآیند اکسیداسیون به عنوان بخش مهمی از متابولیسم و زندگی هوایی موجودات زنده شناخته شده است. اکسیژن در موقعیت‌های خاصی ممکن است به شکل تک الکترونی درآید و ایجاد رادیکال‌های آزاد کند. اکسیژنی که به شکل تک الکترونی تبدیل می‌شود گونه اکسیژن واکنشگر (Reactive oxygen species) نامیده می‌شود. سلول‌های گیاهی دارای ساختاری اتمی بوده و شامل هسته‌ای با بار مثبت هستند که الکترون‌ها با بار منفی حول آن می‌چرخند. زمانی که گیاه در معرض تنش قرار می‌گیرد الکترون‌ها از مدار خود خارج شده و اتمی که الکترون از دست می‌دهد ناپایدار شده و در نتیجه سعی می‌کند تا از اتم‌های مجاور خود الکترون دریافت کند. طی این فرآیند واکنش‌های زنجیره‌ای متعددی اتفاق خواهد افتاد که در نهایت منجر به تولید ROSها خواهد شد که این پدیده تحت عنوان تنش اکسیداتیو نامیده می‌شود. افزایش تولید و تجمع ROSها در سلول‌های گیاهی دارای مضرات فراوانی است که از جمله آن می‌توان به اکسیداسیون لیپیدهای غشای سلولی، اکسیداسیون پروتئین‌های بافتی و تخریب DNA اشاره نمود (Hossain & Dietz 2016). زمانی که گیاه در معرض تنش قرار می‌گیرد مجموعه‌ای از مکانیسم‌های فیزیولوژیکی و مولکولی توأم در پاسخ به تنش فعال می‌شوند. یکی از مکانیسم‌های مهم درگیر در القای تحمل تنش فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانت می‌باشد. آنتی اکسیدانت‌ها خود به دو دسته کلی شامل آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و غیر آنزیمی گروه‌بندی می‌شوند. گروه اول شامل آنزیم‌های همچون کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، مالون دی‌هیدرو آسکوربات ردوکتاز (MDHAR)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، پراکسیداز (POX)، هیدروآسکوربات ردوکتاز (DHAR) می‌باشند. از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدانت‌های غیر آنزیمی نیز می‌توان به اسید آسکوربات (AsA)، گلوتاتیون (GSH)، کارتنوئیدها و توکوفرول‌ها اشاره نمود (Ashraf 2009).

به طور کلی فعالیت هر یک از انواع آنتی اکسیدانت‌ها به صورت مستقیم یا غیر مستقیم منجر به کاهش اثرات تنش اکسیداتیو و افزایش تحمل گیاه در برابر تنش‌های محیطی می‌شود. به عنوان نمونه، (Ahmadi et al. (2020) در بررسی مکانیسم‌های درگیر در پاسخ به تنش شوری در برخی از گونه‌های وحشی گندم نشان دادند بین الگوی بیان ژن‌های کد کننده آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو و ژن‌های *SOS* و *HKT* ارتباط مستقیمی وجود دارد. نتایج مطالعه (Pour-Aboughadareh et al. (2020) با بررسی خویشاوندان وحشی گندم نشان دادند بین فعالیت آنزیم‌های *APX*، *POX* و *CAT* با بیوماس خشک اندام‌های هوایی تحت شرایط تنش کم آبی ارتباط مثبت و معنی‌داری وجود دارد.

با پیشرفت در حوزه‌های مختلف زیست‌فناوری و توسعه ابزارهای مولکولی و ژنتیکی تغییر گسترده‌ای در استفاده از روش‌های مولکولی و بهره‌مندی از روش‌های نوین در فیزیولوژی گیاهی ایجاد شده است. در این زمینه، یکی از مهم‌ترین ابزارهای مولکولی مورد استفاده در شناسایی مواد گیاهی ایده‌آل از نظر مجموعه‌ای از صفات زراعی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جهت بکارگیری آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی، مانند انتخاب بهترین والد به منظور استفاده در برنامه‌های تلاقی، مطالعات ترنسکریپتوم و بررسی الگوی بیان ژن‌ها است. به عنوان مثال، پیش از این شناسایی برترین والدین شرکت کننده در برنامه‌های تلاقی تنها با استفاده از نشانگرهای اختصاصی امکان‌پذیر بود ولی با استفاده از روش‌های بررسی بیان ژن‌ها نه تنها این شناسایی صورت می‌گیرد بلکه میزان بیان ژن‌های) دخیل در تحمل و مقاومت به تنش‌ها نیز سنجیده می‌شود که این امر به نوبه خود می‌تواند اطلاعات مفید دیگری را در رابطه با سازوکارهای ژن‌های مورد هدف برای پژوهشگران فراهم نماید (Araujo et al. 2012). علاوه بر این، در رابطه با کارایی استفاده از الگوی بیان ژن‌ها در شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به تنش شوری مطالعات فراوانی صورت گرفته، به طوری که هر یک از آن‌ها به جنبه‌های متفاوت فیزیولوژیکی و همچنین نقش ژن‌ها و یا خانواده‌های ژنی تأثیرگذار در القای تحمل تنش پرداخته‌اند. سلامی و همکاران (۱۳۹۴) الگوی تغییر بیان ژن‌های رمز کننده کانال‌های پروتئینی موجود در طول غشا (*HvTIP*) را در دو ژنوتیپ حساس و مقاوم به شوری جو مورد بررسی قرار دادند. این محققان اظهار داشتند تنش شوری باعث افزایش بیان ژن *TIP4;1* در ژنوتیپ مقاوم به شوری می‌شود. در یک مطالعه انجام شده توسط یوسفی‌راد و همکاران (۱۳۹۸) الگوی بیان ژن‌های *SOS* در ریشه گیاه جو در سطوح مختلف تنش شوری بررسی شد و نتایج آن‌ها نشان داد که بیان بالای ژن‌های *HvSOS1*، *HvSOS2* و *HvSOS3* در شرایط تنش شوری مرتبط با فعالیت بیشتر آنتی‌پورترهای Na^+/H^+ و خروج یون سدیم به فضای آپوپلاستی و یا انتقال آن از ریشه به اندام هوایی می‌باشد. در مطالعه غفاریان و همکاران (Ghafarian et al. 2018) تنش شوری به طور معنی‌داری منجر به کاهش بیان ژن *AtIs1* (ژن القایی نور) در اندام ریشه شد. این محققان بیان کردند کاهش بیان این ژن در تیمار شوری بلند مدت نشان می‌دهد که احتمالاً این ژن در مراحل ابتدایی پاسخ به تنش شوری دخالت دارد. اهمیت جو زراعی در مرتفع نمودن بخش قابل توجهی از خوراک دام و طیور و همچنین کاربرد گسترده آن در صنایع غذایی از یک سو و تحمل بالای آن نسبت تنش شوری در مقایسه با سایر گیاهان زراعی از سوی دیگر سبب شده است همواره ارزیابی لاین‌های امیدبخش جو برای شرایط محیطی برخوردار

از خاک و یا آب شور مورد توجه به‌نژادگران قرار گیرد. در این راستا این مطالعه با هدف ارزیابی الگوی بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدان در شش لاین امیدبخش جو انتخاب شده از برنامه‌های به‌نژادی جو آبی کشور اجرا شد.

مواد و روش‌ها

مواد آزمایشی مورد ارزیابی در این پروژه شامل شش ژنوتیپ جو امیدبخش به همراه یک رقم تجاری به عنوان شاهد (رقم مهر) بود. ژنوتیپ‌های بررسی شده حاصل برنامه‌های دورگ‌گیری بین ارقام مختلف بوده که در مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه شدند. این ژنوتیپ‌ها پس از ارزیابی در قالب آزمایشات به‌نژادی متعدد و در نهایت مقایسه عملکرد و سایر صفات زراعی با ارقام شاهد جهت انجام بررسی‌های تکمیلی قبل از معرفی گزینش شده‌اند. شجره هر یک از ژنوتیپ‌ها در جدول ۱ ارائه شده است. به منظور اعمال شرایط تنش و تهیه نمونه گیاهی، دو آزمایش جداگانه بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار برای شرایط عدم تنش (بدون نمک NaCl) و تنش شوری (۲۰۰ میلی‌مولار نمک NaCl) اجرا شد. آزمایش به صورت هیدروپونیک و در گلخانه بخش تحقیقات غلات واقع در مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر (واقع در کرج) به اجرا درآمد. شرایط رشدی گلخانه با دوره نوری ۱۶ : ۸ (روشنایی : تاریکی) و شرایط دمایی ۲۵ - ۲۰ درجه سانتی‌گراد در حد مطلوب برای رشد گیاهچه‌ها بهینه گردید.

جدول ۱. لیست ژنوتیپ‌های جو ارزیابی شده در مطالعه حاضر

Table 1. List of the studied barley genotypes in the present work

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	Nik/5/CLN-B/80.5138//GLORIA-R/COPAL/3/ALISO/4/CABUYA/6/(D10)Rhn-
7	02/11 527/NK1272 POA/Hjo//Quina/3/Rojo

ابتدا بذور مربوط به هر یک از ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی جوانه‌دار و سپس به درون سینی‌های کشت منتقل شدند. هر یک از ظروف کشت با محلول غذایی نیم هوکلند با pH بین ۵ تا ۵/۵ بارگیری شدند. پس از استقرار کامل گیاهچه در هفته سوم تمامی گیاهچه‌ها با محلول غذایی هوکلند کامل تیمار شدند (Hoagland and Arnon 1950). در طول دوره استقرار گیاهچه و تا زمان نمونه‌برداری تمامی واحدهای آزمایشی به صورت کامل و ۲۴ ساعته از طریق یک سیستم مرکزی به طور کامل تحت هوادهی قرار گرفتند. تنش شوری در مرحله سه برگی اعمال شد. به منظور جلوگیری از اعمال شوک ناگهانی به گیاهچه‌ها و از بین رفتن آن‌ها، NaCl به صورت تدریجی به محیط رشد اضافه شد و در نهایت پس از یک هفته غلظت نهایی تیمارهای تنش به ۲۰۰ میلی‌مولار

رسید. پس از گذشت سه هفته از اعمال تیمار شوری و ظاهر شدن علائم تنش در گیاهچه‌های مورد بررسی، نمونه‌برداری از بافت برگ انجام و بلافاصله در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج (DENAZIST ASIA) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. به منظور ساخت cDNA نیز از کیت EasyTM cDNA Synthesis Kit تهیه شده از شرکت پارس توس استفاده شد. واکنش RT-PCR با استفاده از دستگاه Rotor-Gene Q انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۶ میکرولیتر از کیت SYBER Blue (2x)، ۵/۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای مستقیم و معکوس، ۱۱ μ نمونه cDNA و ۵/۳۱ μ آب عاری از RNase بود. لیست آغازگرهای استفاده شده برای هر یک از ژن‌های موردنظر به همراه ژن خانه‌دار *a-tubulin* در جدول ۲ ارائه شده است. پس از تهیه مخلوط واکنش، واکنش qRT-PCR با شرایط دمایی شامل ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ۴۰ تکرار با چرخه‌های ۱۰ ثانیه و 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 به ازای هر ثانیه یک درجه صورت گرفت. پس از انجام واکنش، بر اساس دمای ذوب به دست آمده برای آغازگرهای مربوط به هر ژن، میزان بیان نسبی ژن‌های مورد نظر در تیمارهای عدم تنش و تنش شوری نسبت به ژن خانه‌دار با استفاده از رابطه $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد (Pfaffl 2001). پس از محاسبه میزان بیان نسبی ژن‌های مورد نظر تجزیه واریانس مرکب بر اساس سه تکرار بیولوژیکی و یک تکرار تکنیکی با استفاده از نرم افزار R انجام شد.

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

Table 2. The sequence of primers for used genes in the present study

Gene		Sequence (5' – 3')	Reference
<i>GPX</i>	Forward	CTGGCACCAATGATGAGATAG	Ansari et al. (2017)
	Reverse	CCTTTGCTAGACTTCAGGAAC	
<i>APX</i>	Forward	CCAGCACCAACAAGTGATAC	Nasirzadeh et al. (2020)
	Reverse	CCAGCACCAACAAGTGATAC	
<i>SOD</i>	Forward	CCATCCAGTTCGTCCAAGAT	Ansari et al. (2017)
	Reverse	GTATCGCCAAGAGCATGGAT	
<i>Rboh1</i>	Forward	TTACAACATGGACCTGCGTCCCTACA	Lightfoot et al. (2008)
	Reverse	TGCCTTGGTCAGACACTCAGCTGCAT	
<i>Rboh2</i>	Forward	TATGCGGAGTCCCGCAGAAAGATG	Lightfoot et al. (2008)
	Reverse	TGTA CTGTACTCCCCCTGCCTGTGT	
<i>a-tubulin</i>	Forward	AGTGTCCCTGTCCACCCACTC	Qiu et al. (2011)
	Reverse	ATTCAGAGCACCGTCAAACC	

نتایج و بحث

بر اساس نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده‌های حاصل از میزان بیان نسبی هر یک از ژن‌های *APX*، *GPX*، *SOD*، *Rboh1* و *Rboh2* مشخص شد از نظر تمامی ژن‌های بررسی شده بین تیمار عدم تنش و تنش شوری اختلاف معنی‌داری وجود دارد. علاوه بر این، اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های امیدبخش جو از نظر بیان نسبی کلیه ژن‌ها وجود داشت. بررسی اثر متقابل تیمار و ژنوتیپ نشان داد این اثر نیز برای کلیه ژن‌ها به جز *Rboh2* معنی‌دار بود (جدول ۳). در واقع نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌های بررسی شده از نظر سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی متفاوت از هم بوده که خود نشان‌دهنده توانایی آن‌ها در کاهش اثرات منفی تنش اکسیداتیو ایجاد شده بواسطه تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای می‌باشد. با بررسی الگوی بیان هر یک از ژن‌ها مشخص شد که اعمال شوری سبب افزایش سطح رونوشت هر یک از ژن‌ها در مقایسه با تیمار عدم تنش شده است (شکل ۱) که این یافته‌ها با نتایج گزارش شده توسط سایر محققان مطابقت داشت (Ahmadi et al. 2020؛ Aazami et al. 2021؛ Ouertani et al. 2022).

جدول ۳- تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن‌های ارزیابی شده

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

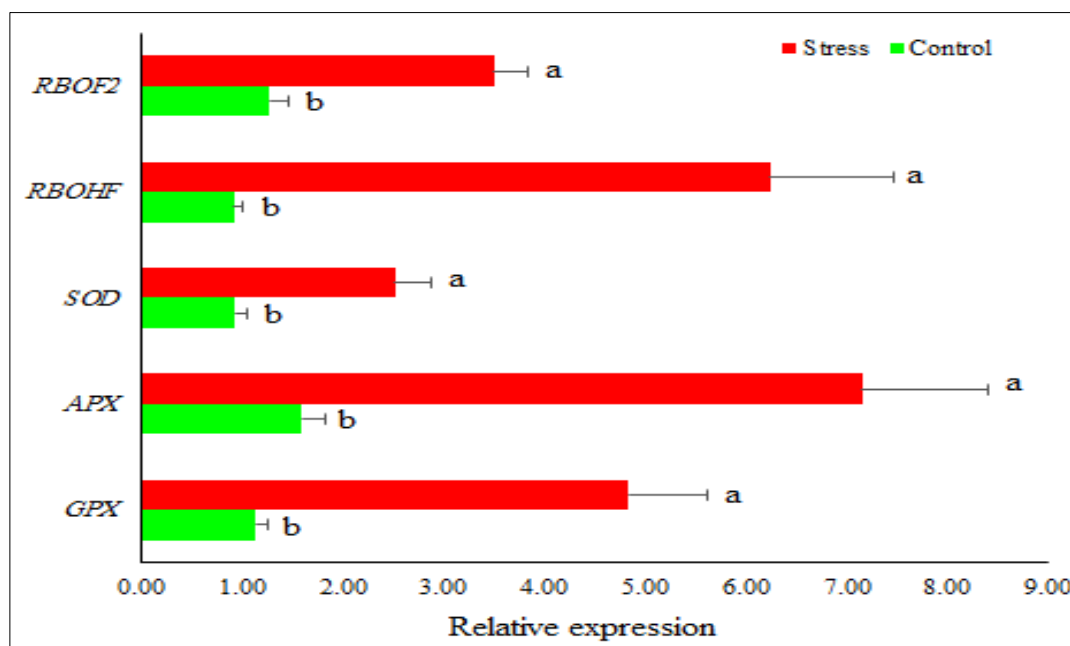
SOV	df	<i>GPX</i>	<i>APX</i>	<i>SOD</i>	<i>Rboh1</i>	<i>Rboh2</i>	
منبع تغییرات	درجه آزادی						
Treatment	تیمار شوری	1	143.52*	325.65**	26.64**	297.81*	52.15*
Replication / T	تیمار / تکرار	4	7.33	1.76	0.28	15.09	2.97
Genotype	ژنوتیپ	6	18.35**	40.23**	5.63**	149.59**	3.37**
T × G	اثر متقابل تیمار و ژنوتیپ	6	17.25**	48.18**	2.21**	151.05**	2.13 ^{ns}
Error	خطا	24	1.19	5.79	0.38	9.07	0.89

ns, * و **: غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد

ns, * and **: Non-significant and significant at 5% and 1% levels of probability

در اثر تنش شوری میزان بیان نسبی ژن *GPX* در مقایسه با تیمار عدم تنش شوری ۴/۲۶ برابر بیشتر شد (شکل ۱). آنزیم *GPX* یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است که نقش مهمی در کاهش اثرات منفی حاصل از تنش اکسیداتیو در گیاهان دارد. در واقع این آنزیم با تجزیه هیدروژن پراکسیداز به مولکول‌های آب از فرآیندهای اکسیداسیون لیپیدها و تخریب سایر سلول‌ها جلوگیری می‌کند (Ighodaro & Akinloye 2018). با توجه به معنی‌دار بودن اثر متقابل ژنوتیپ و تیمارهای تنش برای هر یک از ژن‌ها (به جز *Rboh2*) مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش دانکن و در سطح معنی‌داری صورت گرفت. همانطور که در شکل

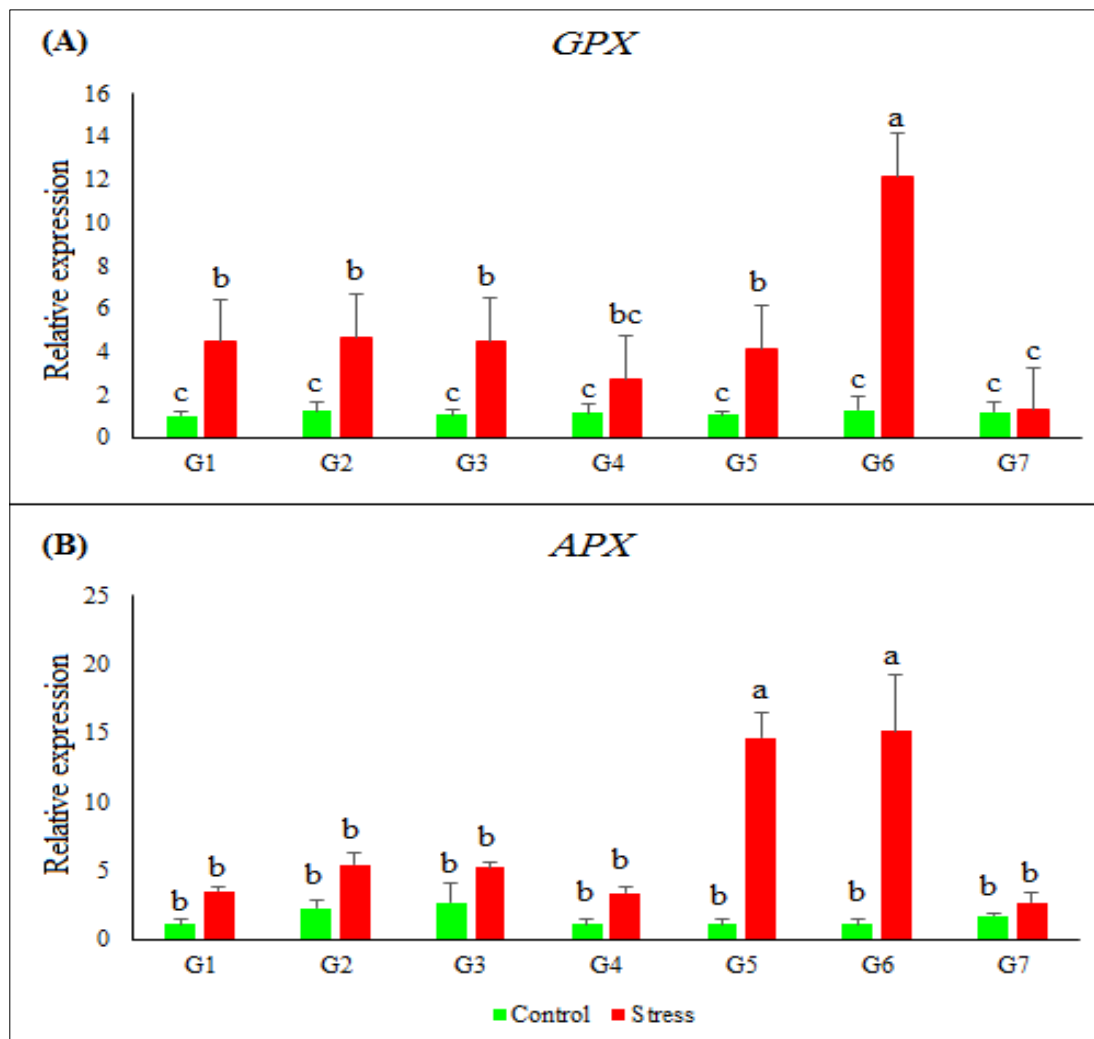
A-۲ مشاهده می‌شود، ژنوتیپ G6 تحت شرایط تنش شوری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها و شاهد آزمایشی (رقم مهر) دارای بیشترین میزان بیان ژن *GPX* بود. بررسی میزان بیان نسبی این ژن در دو تیمار عدم تنش و تنش شوری نیز نشان داد، بیان این ژن بواسطه تنش شوری در ژنوتیپ G6 حدوداً ۹/۵۰ برابر نسبت به تیمار عدم تنش افزایش یافته است. بین ژنوتیپ‌های G2، G3، G4 و G5 با رقم شاهد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. در شرایط عدم تنش نیز اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های بررسی شده از نظر بیان نسبی این ژن مشاهده نشد.



شکل ۱. الگوی بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه در تیمارهای عدم تنش و تنش شوری

Figure 1. The relative gene expression pattern of studied genes in the control and salinity stress treatments

اعمال تیمار شوری بر روی ژنوتیپ‌های ارزیابی شده سبب شد میزان بیان ژن *APX* در مقایسه با تیمار عدم تنش شوری ۴/۵ برابر افزایش یابد (شکل ۱). الگوی بیان این ژن در هر یک از ژنوتیپ‌ها نشان داد ژنوتیپ‌های G5 و G6 دارای بیشترین تعداد رونوشت‌ها در شرایط تنش شوری در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها هستند. با این حال، بین بقیه ژنوتیپ‌ها در هر دو تیمار عدم تنش و تنش شوری اختلاف معنی‌داری از نظر بیان نسبی ژن *APX* مشاهده نشد (شکل B-۲). آنزیم *APX* یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانسی بوده که قدرت چسبندگی بالایی با پراکسید هیدروژن دارد به طوریکه فعالیت این آنزیم باعث می‌شود تا گیاه در برابر سطح بالایی از ROS انباشت شده بواسطه تنش اکسیداتیو مصون بماند. در واقع *APX* مشابه یک سیگنال مولکولی عمل نموده و سطح پراکسید هیدروژن را تنظیم می‌کند (Panchuk et al. 2005).



شکل ۲. میزان بیان نسبی ژن‌های *GPX* و *APX* در ژنوتیپ‌های ارزیابی شده جو در تیمارهای عدم تنش و تنش شوری. حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد می‌باشند

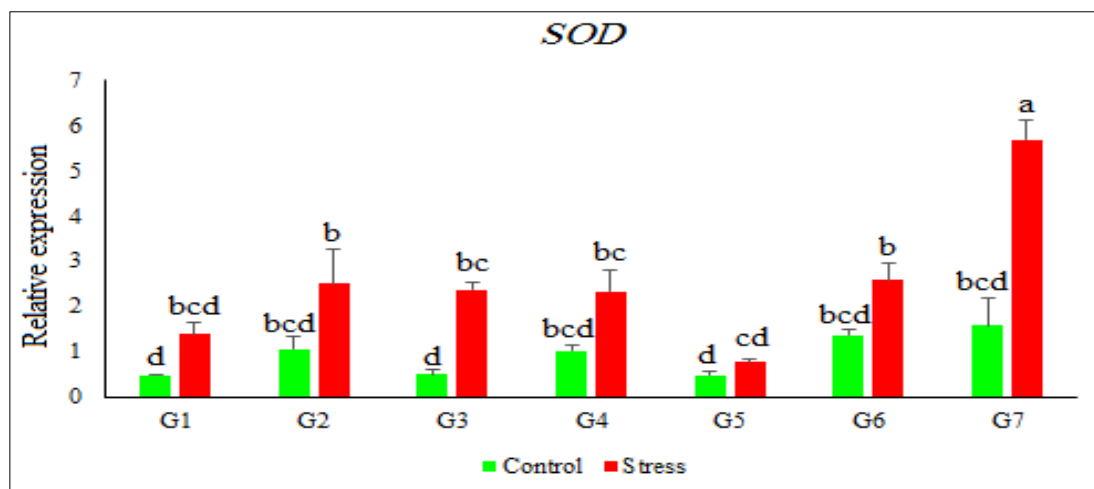
Figure 2. The relative expression of *GPX* and *APX* genes in the investigated genotypes under the control and salinity stress treatments. Different letters on each column indicate a significant difference at $P \leq 0.01$

در پژوهشی (Chen & Gallie (2004) اظهار داشتند آنزیم *APX* نقش کلیدی در فعالیت روزنه‌ها دارد. به عبارت دیگر تحت شرایط تنش شوری، این آنزیم با تنظیم غلظت پراکسید هیدروژن در سلول‌های گیاهی باعث به حرکت درآوردن سلول‌های محافظ روزنه شده و در نتیجه نقش مهمی در تنظیم فعالیت‌های فتوسنتزی بر عهده دارد. در گیاهان عالی خانواده‌های ژنی متعددی برای *APX* شناسایی شده است به طوریکه با توجه به ایزوفرم‌های مختلف این ژن در چند گروه ژنی اصلی شامل کلروپلاستی (*ChlAPX*)، سیتوپلاستی (*cAPX*)، پراکسیسومال / گلایکوسومال (*mAPX*) و میتوکندریایی (*mitAPX*) دسته‌بندی می‌شوند

(Ighodaro & Akinloye 2018). به طور کلی نتایج به دست آمده در رابطه با افزایش تعداد رونوشت‌های ژن *APX* بررسی شده بواسطه تنش شوری با نتایج دیگر محققان مطابقت داشت (Fan et al. 2014; Fayez & Bazaid 2014; Ahmadi et al. 2020).

آنزیم *SOD* بواسطه دارا بودن نقش کلیدی خود در تجزیه *ROS* تولید شده در شرایط تنش‌زای محیطی به عنوان یکی از مهمترین اعضای گروه آنتی‌اکسیدان‌ها شناخته می‌شود به طوری که در بسیاری از مطالعات فیزیولوژیکی فعال شدن ژن‌های مرتبط با این آنزیم را نخستین خط دفاعی گیاه در برابر تنش‌های محیطی می‌دانند (Lightfoot et al. 2017; Ahmadi et al. 2018; Zhang et al. 2021). این آنتی‌اکسیدان یک خانواده آنزیم فلزی بوده و اعضای آن از مجموعه‌ای از پروتئین‌ها و یون‌های فلزی تشکیل شده‌اند که به طور مؤثری می‌توانند آنیون‌های سوپراکسیداز را کاتالیز نمایند. در شرایط تنش، *SOD* قادر است رادیکال‌های آزاد سوپراکسید را به H_2O_2 تبدیل کند و به دنبال آن H_2O_2 ایجاد شده بواسطه فعالیت آنزیم‌های *CAT* و *POD* به مولکول‌های آب تبدیل خواهند شد و در نهایت تداوم این زنجیره سبب حذف و یا جلوگیری از انباشت *ROS*‌های تولید شده در جریان تنش اکسیداتیو می‌شود. به طور کلی می‌توان اظهار داشت که *SOD* توسط ژن‌های هسته‌ای بیان و در اندام/اندامک‌های مختلف یافت می‌شوند (Zhang et al. 2020). نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد تیمار شوری، در مجموع ژنوتیپ‌های ارزیابی شده جو، منجر به افزایش سطح رونوشت ژن *SOD* در مقایسه با تیمار عدم تنش به میزان ۲/۷۳ برابر شد (شکل ۱). با مقایسه الگوی بیان این ژن در بین ژنوتیپ‌ها مختلف مشاهده شد ژنوتیپ *G7* در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها دارای بیشترین میزان بیان نسبی ژن *SOD* در شرایط تنش شوری می‌باشد. علاوه بر این بیان این ژن در ژنوتیپ مذکور در شرایط عدم تنش نیز نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها بیشتر بود (شکل ۳). در پژوهشی (Guo et al. 2018) اظهار داشتند *SOD* به عنوان نخستین آنزیم آنتی‌اکسیدان در تمام واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان در پاسخ به تنش‌های محیطی نقش دارد. به عنوان مثال، طول ریشه نمونه‌های گیاهی *Dioscorea esculenta* (Lour.) بواسطه افزایش بیان ژن *Cu-SOD* در شرایط تنش شوری افزایش یافت (Yan et al. 2016). در مطالعه دیگری (Shafi et al. 2015) عنوان کردند افزایش بیان ژن‌های *SOD* نقش مهمی در سنتز دیواره‌های ثانویه سلول‌های گیاهی دارند به طوری که این تغییر ساختاری خود منجر به افزایش تحمل شوری گیاه آراییدوپسیس شده است. به طور کلی نتایج به دست آمده در این مطالعه با دیگر یافته‌های ارائه شده توسط سایر محققان مطابقت نشان داد (Feng et al. 2019; Jiang et al. 2016; Feng et al. 2015). بر اساس نتایج مندرج در جدول ۳ از نظر میزان بیان نسبی ژن‌های *Rboh1* و *Rboh2* در مقایسه با تیمار عدم تنش افزایش یافت به طوری که این افزایش برای این دو ژن به ترتیب به میزان ۶/۸۰ و ۲/۷۶ برابر بیشتر از تیمار عدم تنش بود (شکل ۱). بنابراین به نظر می‌رسد تنش شوری باعث القای بیان این ژن شده و سطح ترنسکریپتوم آن افزایش یافته است. زمانی که گیاه در برابر تنش‌های محیطی قرار می‌گیرد انواعی از

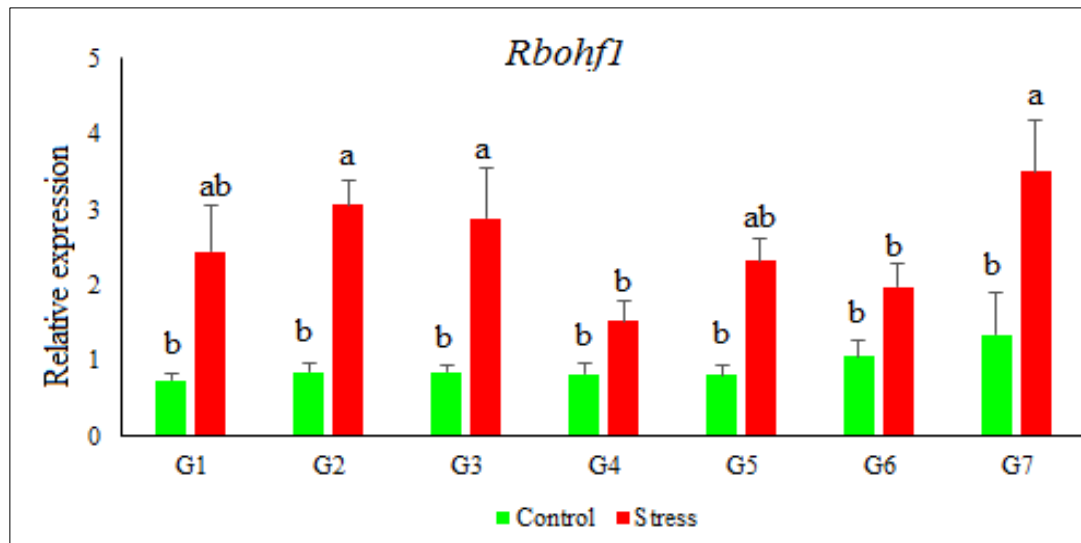
گونه‌های ROS در سطح سلول تولید و انباشت می‌شوند. سوپراکسید آپوپلاستی می‌تواند توسط همولوگ‌های اکسیداز انفجار تنفسی (Rboh) تولید شود.



شکل ۳. میزان بیان نسبی ژن *SOD* در ژنوتیپ‌های ارزیابی شده جو در تیمارهای عدم تنش و تنش شوری. حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد می‌باشند.

Figure 3. The relative expression of *SOD* gene in the investigated genotypes under the control and salinity stress treatments. Different letters on each column indicate a significant difference at $P \leq 0.01$

انتقال الکترون و تولید سوپراکسیداز زمانی اتفاق می‌افتد که دومین کاتالیک الکترون‌های بین سلولی را از NADH یا NADPH گرفته و آن‌ها را به اکسیژن خارج سلولی منتقل می‌کند (Keller et al. 1998). خانواده ژنی *Rboh* زیر واحد کلیدی آنزیم Noxs (NADPH oxidase) را کد نموده و به همین دلیل گاهی NADPH اکسیداز نامیده می‌شود (Torres & Dangle 2005). مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که تولید ROSها و فعالیت اکسیدازهای NADPH (Nox) در گیاهان بواسطه انواعی از تنش‌های محیطی مانند شوری و خشکی القا می‌شود (Ahmadi et al. 2018; Ahmadi & Baisakh et al. 2006; Pour-Aboughadareh et al. 2020; et al. 2020). علاوه بر این، تولید ROS به عنوان یک مکانیسم تنظیمی مهم در درک و پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی بوده و Noxها نیز به عنوان یک مرکز مولکولی مهم به عنوان یک پیام‌رسان وابسته به ROS در پاسخ گیاهان به شرایط تنش عمل می‌کنند (Marino et al. 2012). در این بررسی نیز نتایج بدست آمده نشان داد ژنوتیپ G7 در هر دو تیمار عدم شوری و شوری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها دارای بیشترین سطح ترنسکرپتوم برای ژن *Rbohfl* بود. از اینرو به نظر می‌رسد این ژنوتیپ ذاتاً دارای مکانسیم‌های عملکردی و دفاعی در برابر تنش شوری می‌باشد که زمینه لازم برای بررسی‌های بیشتر در مرحله گیاه کامل و همچنین ارزیابی مقدمات عملکرد در محیط‌های شور را دارد.



شکل ۴. میزان بیان نسبی ژن های *Rbohfl* در ژنوتیپ های ارزیابی شده جو در تیمارهای عدم تنش و تنش شوری. حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال یک درصد می باشند

Figure 4. The relative expression of *Rbohfl* and *Rboh2* genes in the investigated genotypes under the control and salinity stress treatments. Different letters on each column indicate a significant difference at $P \leq 0.01$

نتیجه گیری: نتایج به دست آمده از الگوی بیان ژن نشان داد از نظر میزان بیان نسبی ژن های *SOD*، *GPX*، *APX*، *Rbohfl* و *Rboh2* اختلاف معنی داری بین سطوح عدم تنش و تنش شوری وجود داشت. بررسی روند تغییرات تجمع ترنسکریپتوم این ژن ها در هر دو شرایط عدم تنش و تنش شوری نشان داد اختلاف معنی داری نیز بین ژنوتیپ های امیدبخش جو ارزیابی شده از نظر تمامی ژن های مورد بررسی وجود داشت. با در نظر گرفتن نتایج به دست آمده می توان اظهار داشت ژنوتیپ های G6 و G7 می توانند به عنوان یک ژنوتیپ متحمل به شوری برای مطالعات تکمیلی مورد ارزیابی قرار گیرد. با توجه به شجره ژنوتیپ (Nik/5/CLN-B/80.5138//GLORIA-R/COPAL/3/ALISO/4/CABUYA/6/(D10)Rhn-03//L.527/NK1272) مشاهده می شود، بخشی از زمینه ژنتیکی این ژنوتیپ از والدین رقم نیک و Rhn-03 تشکیل شده است. رقم نیک جزو ارقام پربازده و سازگار به مناطق معتدل کشور می باشد که سازگاری خوبی به تنش های محیطی دارد. از طرف دیگر ژنوتیپ Rhn-03 بواسطه دامنه سازگاری وسیع آن به مناطق مختلف کشور تحمل قابل قبولی نسبت به سطوح مختلف شوری دارد. بنابراین قرارگیری این ژنوتیپ ها در برنامه های دورگ گیری و همچنین قابلیت ترکیب پذیری بالای رقم نیک سبب شده است تا ژنوتیپ G6 پاسخ مطلوبی در برابر تنش شوری در مراحل اولیه رشد و استقرار گیاهچه داشته باشد. علاوه بر این ژنوتیپ G7 در شجره خود دارای والدی همچون Rojo (POA/Hjo//Quina/3/Rojo) بوده که بر اساس آزمایشات مختلف مشخص شده است این رقم

در ترکیب با سایر ژنوتیپ‌ها تحمل مطلوبی به شوری را دارد. بنابراین با در نظر گرفتن برتری این ژنوتیپ‌ها در مراحل اولیه رشد از نظر بیان ژن‌های القاکننده تحمل به تنش شوری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها و شاهد آزمایشی، توصیه می‌شود در مطالعات بعدی پتانسیل عملکرد این ژنوتیپ در شرایط مزرعه نیز سنجیده شود تا با کنار هم قرار دادن نتایج جنبه‌های مختلف رشدی بتوان آن را در آزمایشات یکنواخت سراسری و سازگاری مورد ارزیابی قرار داد و از آن‌ها به عنوان ارقام امیدبخش برای کشت در مناطق دارای شوری استفاده نمود.

سپاسگزاری: نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از داوران محترم مجله بیوتکنولوژی کشاورزی به خاطر مطالعه متن مقاله حاضر و ارائه نظرهای ارزشمند سپاسگزاری نمایند.

منابع

سلامی ر، محمدی س، غفاریان س، مقدم م (۱۳۹۴). بررسی بیان ژن‌های HvTIP2;3 و HvTIP4;1 در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل جو تحت تنش شوری. پژوهش‌های ژنتیک گیاهی ۲(۲)، ۱۴-۱.

References

- Aazami MA, Rasouli F, Tajaragh RP (2021) Influence of salinity stress on morphological, nutritional and physiological attributes in different cultivars of *Prunus amygdalus* L. J Plant Nutr 44, 1758–1769.
- Ahmadi J, Pour-Aboughadareh A, Fabriki Ourang S, Poczai P (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.
- Ahmadi J, Pour-Aboughadareh A, Fabriki-Ourang S, et al. (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 Sci* 69, 649–658.
- Ansari WA, Atri N, Singh B, Pandey S (2018) Changes in antioxidant enzyme activities and gene expression in two muskmelon genotypes under progressive water stress. *Biol Plant* 61, 333–341.
- Araujo PR, Yoon K, Ko D, Smith AD et al. (2012) Before It Gets Started: Regulating Translation at the 5' UTR. *Comp Funct Genom* 2012, e475731.
- Ashraf M (2009) Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnol Adv* 27, 84-93.
- Baisakh N, Subudhi PK, Parami NP (2006) cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in response to salt stress in a halophyte *Spartina alterniflora* Loisel. *Plant Science* 170(6), 1141-1149.

- Chen Z, Gallie DR (2004) The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell* 16, 1143–1162.
- Fan HF, Du CX, Ding L, Xu YL (2014) Exogenous nitric oxide promotes waterlogging tolerance as related to the activities of antioxidant enzymes in cucumber seedling. *Russ J Plant Physiol* 61, 366–373.
- Fatemi F, Kianersi F, Pour-Aboughadareh A, et al. (2022) Overview of identified genomic regions associated with various agronomic and physiological traits in barley under abiotic stresses. *Appl Sci* 12, 5189.
- Fayez KA, Bazaid SA (2014) Improving drought and salinity tolerance in barley by application of salicylic acid and potassium nitrate. *J Saudi Soc Agric Sci* 13, 45–55.
- Feng K, Yu J, Cheng Y et al. (2016) The SOD gene family in tomato: identification, phylogenetic relationships, and expression patterns. *Front Plant Sci* 7, e1279.
- Feng X, Lai Z, Lin Y, et al. (2015) Genome-wide identification and characterization of the superoxide dismutase gene family in *Musa acuminata* cv Tianbaojiao (AAA group). *BMC Genom* 16, e823.
- Ghafarian S, Mohammadi SA, Toorchi M (2018) Effect of short- and long-time salt treatment on root traits and expression pattern of *AtIs1* gene in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Plant Physiol Breed* 8, 1–11.
- Guo Y, Tian S, Liu S, et al. (2018) Energy dissipation and antioxidant enzyme system protect photosystem II of sweet sorghum under drought stress. *Photosynthetica* 56, 861–872.
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station, Circular No. 374. The College of Agriculture, University of California, Berkeley, CA, USA.
- Hossain MS, Dietz KJ (2016) Tuning of redox regulatory mechanisms, reactive oxygen species and redox homeostasis under salinity stress. *Front Plant Sci* 7, 548.
- Ighodaro OM, Akinloye OA (2018) First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med* 54, 287–293.
- Jiang W, Yang L, He Y, et al. (2019) Genome-wide identification and transcriptional expression analysis of superoxide dismutase (SOD) family in wheat (*Triticum aestivum*). *Peer J* 7, e8062.

- Keller T, Damude HG, Werner D, et al. (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *The Plant Cell* 10, 255–266.
- Lightfoot DJ, Boettcher A, Little A, Shirley N, Able AJ (2008) Identification and characterization of barley (*Hordeum vulgare* L.) respiratory burst oxidase homologue family members. *Funct Plant Biol* 35, 347–359.
- Lightfoot DL, Mcgrann GRD, Able AJ (2017) The role of a cytosolic superoxide dismutase in barley-pathogen interactions. *Mol Plant Pathol* 18, 323–335.
- Nachshon U (2018) Cropland soil salinization and associated hydrology: Trends, processes and examples. *Water* 10, e1030.
- Nasirzadeh L, Sorkhilaleloo B, Majidi Hervan E, Fatehi F (2020) Changes in antioxidant enzyme activities and gene expression profiles under drought stress in tolerant, intermediate, and susceptible wheat genotypes. *Cereal Res Commun* 49, 83–89.
- Panchuk II, Zentgraf U, Volkov RA (2005) Expression of the APX gene family during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 222, 926–932.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acids Res* 29, e45.
- Pour-Aboughadareh A, Omidi M, Naghavi MR, et al. (2020) Wild relatives of wheat respond well to water deficit stress: a comparative study of antioxidant enzyme activities and their encoding gene expression. *Agriculture* 10, e415.
- 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*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 8436-8441.
- Salami R, Mohammadi SA, Ghafarian S, Moghaddam M (2017) Expression analysis of *HvTIP2;3* and *HvTIP4;1* in sensitive and tolerant barley genotypes under salinity stress. *Plant Genet Res* 2, 1–14 (In Persian).
- Schreiber M, Mascher M, Wright J, et al. (2020) A Genome assembly of the barley transformation reference cultivar golden promise. *G3* 10, 1823–1827.
- Shahbaz M, Ashraf M (2013) Improving salinity tolerance in cereals. *CRC Crit Rev Plant Sci* 32, 237-49.
- Singh L, Park RF, Dracatos P, et al. (2021) Understanding the expression and interaction of *Rph* genes conferring seedling and adult plant resistance to *Puccinia hordei* in barley. *Can J Plant Pathol* 43, 218–226.
- Torres MA, Dangl JL (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol* 8, 397–403.

- Yan H, Li Q, Park SC, et al. (2016) Overexpression of *CuZnSOD* and *APX* enhance salt stress tolerance in sweet potato. *Plant Physiol Biochem* 109, 20–27.
- Yang Y, Costa A, Leonhardt N, et al. (2008) Isolation of a strong *Arabidopsis* guard cell promoter and its potential as a research tool. *Plant Method* 4, 1–15.
- Zhang X, Zhang L, Chen Y, et al. (2020) Genome-wide identification of the SOD gene family and expression analysis under drought and salt stress in barley. *Plant Growth Regul* 94, 49–60.