

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 stressامید جدیدی<sup>۱</sup>، علیرضا اطمینان<sup>۲\*</sup>، رضا عزیزی نژاد<sup>۳</sup>، آسا ابراهیمی<sup>۳</sup>، علیرضا پورابوقداره<sup>۴</sup>

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 O<sup>1</sup>, Etminan A<sup>\*2</sup>, Azizinezhad R<sup>3</sup>, Ebrahimi A<sup>3</sup>, Pour-Aboughadareh A<sup>4</sup>

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 برای تحمل به شوری 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

ترنسکرپتوم

جو

## مقدمه

جو (*Hordeum vulgare* L.) پس از گندم به‌عنوان مهم‌ترین غله زراعی در ایران شناخته شده است و بخش عمده‌ای از زمین‌های زراعی کشور به کشت این گیاه اختصاص دارد. از سوی دیگر، این محصول در تغذیه انسان به‌صورت نان، انواع سوپ، غذای کودکان، و دیگر خوراکی‌ها به‌ویژه تهیه مالت دارای کاربرد زیادی می‌باشد (Vaezi et al. 2019). از نظر میزان تحمل به تنش‌های محیطی، این گیاه زراعی دارای درجه بالایی از تحمل به تنش شوری بوده و معمولاً به‌عنوان متحمل‌ترین غله به تنش شوری شناخته می‌شود (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 زمین‌های قابل کشت در سراسر جهان شده است، تنش شوری به‌طور مضاعف می‌تواند یک عامل تهدید کننده مهم برای امنیت غذایی حال و آینده‌ای نه چندان دور باشد.

زمانی که گیاه در معرض تنش قرار می‌گیرد مجموعه‌ای از مکانیسم‌های فیزیولوژیکی و مولکولی توأم در پاسخ به تنش فعال می‌شوند. افزایش تحمل به تنش شوری یکی از مهم‌ترین راه‌کارها برای افزایش عملکرد در محیط‌های 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 می‌کند (Fahmideh et al. 2018). بنابراین شناخت بهتر مکانیسم‌های 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 برنامه‌های اصلاحی شناسایی کرد (Pour-Aboughadareh et al. 2017). به‌طور کلی مکانیسم‌های تحمل به شوری در گیاهان به دو گروه اصلی مورفو-فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تقسیم‌بندی می‌شوند. مکانیسم‌های گروه اول دارای توارث کمی بوده که توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌شوند و در مقابل مکانیسم‌های گروه دوم دارای روابط ساده‌تر و ژن‌های کمتری نسبت به گروه اول می‌باشند. برای مثال، تجمع محلول‌های سازگار در گیاه مانند پرولین، گلیسین، بتاین و آکتین از این جمله می‌باشند، که نیاز به فعال شدن فقط یک تا سه آنزیم برای

انجام مسیر اصلی متابولیسمی برای ذخیره متابولیت‌ها هستند (Raman 2000). با این‌حال اثرات بررسی اثرات تنش شوری بر رشد و نمو گیاهان بسیار پیچیده می‌باشد. حضور غلظت‌های 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 یون‌های مضر و سمیت یونی در سلول‌های گیاهی خواهد شد که در نهایت باعث کاهش رشد اندام‌های هوایی و مرگ گیاه خواهد شد (Muuns et al. 1995). در شرایط تنش شوری حفظ حالت هموستازی یونی نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژی سلول‌های زنده دارد به‌طوری که تنظیم به موقع جریان یونی برای پایین نگهداشتن غلظت یونی‌هایی همچون سدیم ( $Na^+$ ) و پتاسیم ( $K^+$ ) در درون سلول ضروری است (Basu et al. 2020). معمولاً گیاهان تحت شرایط تنش شوری غلظت‌های بالایی از یون‌های  $K^+$  و غلظت‌های پایینی از یون‌های  $Na^+$  را در سیتوسول سلول حفظ می‌نمایند. از این‌رو حفظ نسبت بالای  $K^+/Na^+$  به‌عنوان یکی از معیارهای مهم تحمل به شوری در گیاهان شناخته شده است (Singh et al. 2020). وجود مقادیر اضافی یون‌های سدیم اثرات مخرب فراوانی بر روی فعالیت‌های بیوشیمیایی و متابولیسمی گیاهان دارد. زمانی که انباشت این یون‌ها و یا سایر نمک‌های مضر در گیاه افزایش می‌یابد مکانیسم‌های تحمل به تنش شوری به‌واسطه فعالیت‌های پیام‌رسانی ویژه‌ای در سطوح مختلف سلولی القا می‌شوند. در واقع تمامی این مکانیسم‌ها تحت کنترل ژن‌ها و یکسری عوامل رونویسی مرتبط با آن‌ها فعال و ایفای نقش خواهند کرد. یکی از مهم‌ترین 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 آنتی‌پورترهای  $Na^+/H^+$  هستند که نقش اصلی در خروج یون‌های سدیم از سلول را بر عهده دارند (Shi et al. 2000). ژن  $SOS2$  نیز با حضور خود در غشای پلاسمایی نقش حسگر داشته و به‌واسطه ساختار خود مقدار یون‌های کلسیم موجود در

<sup>1</sup> 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 روش‌های مطالعه مکانیسم‌های مولکولی درگیر در تحمل شوری در گیاهان بررسی الگوی بیان ژن‌ها مهم دخیل در آن‌ها می‌باشد. از این‌رو، هدف از این اجرای پژوهش بررسی و مقایسه الگوی بیان ژن‌های *SOS1*، *NHX1* و *HvHKT3* در گیاهچه‌های جو تحت شرایط تنش شوری بود.

### مواد و روش‌ها

در این پژوهش اثر تنش شوری بر تغییرات بیان ژن‌های *SOS1*، *NHX1* و *HvHKT3* در جو زراعی رقم مهر (به‌عنوان 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 تلاقی‌های مختلف بین لاین‌ها و ارقام دریافتی از مراکز بین‌المللی (به‌عنوان لاین اصلاحی) در دو شرایط رشدی عدم تنش و تنش NaCl انجام شد. لازم به ذکر است لاین‌های منتخب جهت بررسی بر اساس برخی از صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی توسط (Pour-Aboughadareh (2021) انتخاب شدند.

به‌منظور اجرای آزمایش، ابتدا بذور ژنوتیپ‌های مورد بررسی جوانه‌دار شده و سپس به سینی‌های کشت حاوی محلول غذایی هوگلند منتقل شدند. دو تیمار بدون NaCl و NaCl به میزان ۲۰۰ میلی‌مولار به ترتیب به‌عنوان سطوح عدم تنش و تنش شوری در نظر گرفته شدند. پس از استقرار گیاهچه‌ها و تا مرحله سه برگی تمامی نمونه‌های آزمایشی با محلول غذایی مشابه و بدون نمک تغذیه شدند. در مرحله سه برگی نیمی از گیاهچه‌ها به‌صورت تدریجی در معرض حضور NaCl قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۱ روز از اعمال تنش شوری و ظاهر شدن علائم تنش در گیاهچه‌ها 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

سیتوپلاسم را تنظیم خواهد کرد. موقعی که گیاه با تنش شوری روبرو می‌شود دریافت پیام آشفستگی در مقدار یون‌های کلسیم موجود در سیتوسول توسط *SOS3* موجب ایجاد برهمکنش این جز با *SOS2* خواهد شد. یکی از پیامد برهمکنش *SOS3* و *SOS2* فعال شدن ژن *SOS1* است که به‌عنوان یک آنتی‌پورتر  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  در غشا پلاسمایی موجب خروج یون‌های سدیم اضافی می‌شود (Liu and Zhu 1998). پیامد دیگر فعال شدن کمپلکس *SOS2/SOS3*، فعال شدن پروتئین واکوئلی  $\text{NHX}^1$  است که ورود یون‌های کلسیم به واکوئل را میانجی‌گری می‌کنند. به‌عبارت دیگر ژن‌های *NHX* آنتی‌پورترهای  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  واکوئلی را کد می‌کنند که ترابری یون‌های سدیم از طریق  $\text{H}^+$  از عرض غشای واکوئلی و تجمع یون‌های سدیم در واکوئل‌ها را کاتالیز می‌کنند (Nass et al. 1997). جایگزینی یون‌های سدیم در واکوئل نه تنها سبب پایین آوردن غلظت این یون و جلوگیری از سمیت یونی در سیتوسول می‌شود، بلکه در تنظیم اسمزی برای حفظ جذب آب از محلول نمک نیز دخالت دارد. بنابراین هنگام انباشت یون‌های سدیم در واکوئل، ژن‌های *NHX* نقش مستقیمی در القای تحمل به شوری در گیاهان دارند (Tester and Devenport 2003). در مطالعه‌ای به‌منظور بررسی تنش شوری بر مکانیسم‌های تحمل به تنش شوری و بیان برخی از ژن‌های درگیر در انتقال یون‌های سدیم و پتاسیم در جو مشخص شد تیمار ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl موجب افزایش بیان ژن‌های *NHX1*، *NHX2* و *NHX3* در ژنوتیپ‌های مورد بررسی شد (Adem et al. 2014). از دیگر عوامل مؤثر در ترابری یون‌ها در گیاهان می‌توان به فاکتورهای رونویسی خانواده  $\text{HKT}^2$  اشاره کرد. *HKT*‌ها شامل گروه مهمی از ژن‌های درگیر در انتقال یون‌های سدیم و پتاسیم هستند و در پوست ریشه قادر به انتقال هر دو یون سدیم و پتاسیم از محیط ریشه و ساقه به درون سلول‌های پارانشیمی هستند (Pardo 2010). 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-

<sup>1</sup>  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter

<sup>2</sup> 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<sup>ZIST</sup> 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 پلی‌مرز 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 پلی‌مرز 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

RSOS1: 5'GGCACCAACAGGAAGATGAA3'

FNHX1: 5'GATATGCAGGAGGCCAGAGA3'

RNHX1: 5' /TGCATATCTACCAGTGCTTAT 3'

FHKT3: 5'GGTTC AAGACACAAGTTCAGT 3'

RHKT3: 5' /TGAGCCGAACATTACTGTGAT 3'

ACGAGCTTACCTTTCAATACA 3' بودند. از ژن

*tubulin* (Adam et al. 2014) با توالی

Rtubulin: 5' /AGTGTCTGTCCACCCACTC 3'

ATTGAGAGCACCGTCAAACC 3' به‌عنوان ژن خانه‌دار

استفاده شد. حجم واکنش ۱۲ میکرولیتر شامل ۶ میکرولیتر

مستر میکس، 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.

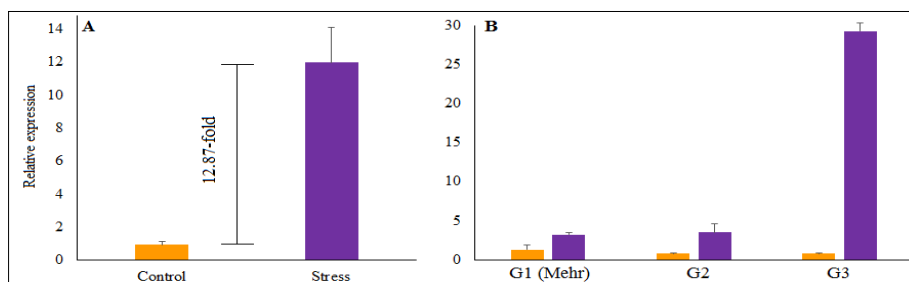
پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، بر اساس دمای ذوب

به‌دست آمده برای هر آغازگر میزان بیان نسبی ژن‌های مورد

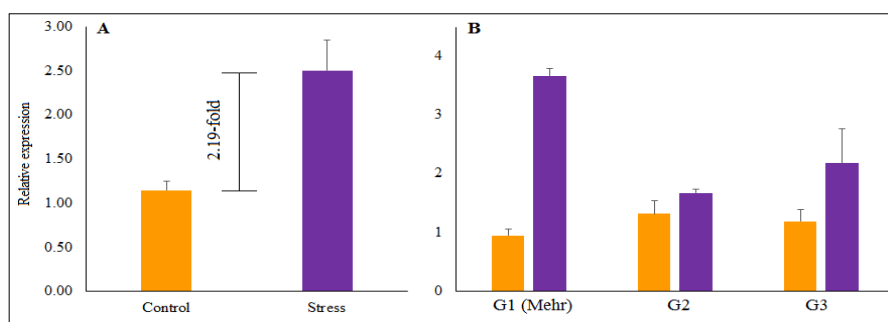
بررسی با استفاده از رابطه  $2^{-\Delta\Delta CT}$  محاسبه شد (Pffafli 2001).

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 B-۲). 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.

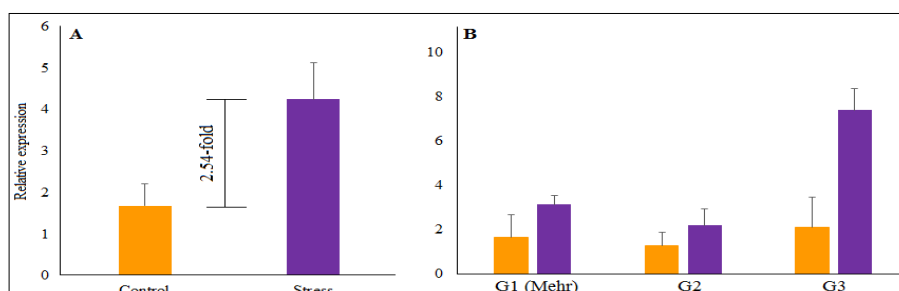
تنش عمل می‌نماید بلکه در تنظیم ژن‌های درگیر در پیام‌رسانی پاسخ به تنش نیز وارد عمل می‌شوند (Maruyama et al. 2004). در شکل A-۱ میانگین بیان نسبی ژن *SOS1* در تیمارهای بدون تنش و تنش شوری و همچنین در ژنوتیپ‌های مختلف ارزیابی شده نشان داده شده است. تنش شوری منجر به افزایش بیان نسبی ژن *SOS1* به میزان ۱۲/۸۷ 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 به ترتیب ۴/۵۳ و ۲۹/۲۳ برابر بیشتر از بیان آن‌ها در شرایط عدم تنش بود (شکل B-۱). 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 A-۲). 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 میلی مولار NaCl) (A) و در ژنوتیپ‌های جو (B)



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

نشان داده شد که تنش شوری ۱۵۰ میلی مولار 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 به ترتیب مربوط به ژنوتیپ G3 و به دنبال آن ژنوتیپ شاهد و ژنوتیپ G2 بود. نسبت تغییرات ترنسکریپتوم این ژن در شرایط تنش شوری نسبت به شرایط عدم تنش به ترتیب در سه ژنوتیپ G3، G2 و ژنوتیپ شاهد (مهر) به ترتیب 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 به عبارتی 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

به عبارت دیگر ژن‌های *SOS* و *NHX* نه تنها به‌خودی خود بلکه به دلیل 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, Poczai 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  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter in Arabidopsis. *Science* 285:1256-1258.
- Apse MP, Sottosanto JB, Blumwald E (2003) Vacuolar cation  $\text{H}^+$  exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of *AtNHX1*, the Arabidopsis vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  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  $\text{K}^+$  efflux antiporter (KEA) and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  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  $\text{Na}^+$  influx component into  $\text{K}^+$ -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  $\text{Na}^+$  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  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane  $\text{H}^+$ -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  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  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, Dovenport R (2003)  $\text{Na}^+$  tolerance and  $\text{Na}^+$  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  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter (*NHX*) genes in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and their regulated expression under salt stress. *Genes* 10:401.
- Yousefi-Rad S, Soltanloo H, Ramezanzpour 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, Ebrahimi 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.